

Karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom iz tikava u Srbiji

Ana Vučurović¹, Aleksandra Bulajić¹, Ivana Stanković¹, Danijela Ristić¹,
Janoš Berenji² i Branka Krstić¹

¹ Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 11080 Beograd, Nemanjina 6, Srbija
(branka.krstic@agrif.bg.ac.rs)

² Institut za ratarstvo i povrtarstvo, 21000 Novi Sad, Maksima Gorkog 30, Srbija

Primljen: 30. juna 2011.

Prihvaćen: 7. septembra 2011.

REZIME

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) je veoma široko rasprostranjen i jedan je od ekonomski najznačajnijih virusa za poljoprivrednu proizvodnju, sa veoma širokim krugom domaćina u koji spada i veliki broj gajenih biljaka, među kojima i predstavnici familije Cucurbitaceae. Epidemiologija ovog virusa je veoma složena, zbog čega je i njegova kontrola otežana. Na tikvama u Srbiji CMV je detektovan u pojedinačnim i mešanim infekcijama sa virusom žutog mozaika kukuruznog (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) i virusom mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV). Virusi, pa tako i CMV, su stalno prisutni u usevima tikava, ali se njihova učestalost menja po godinama i lokalitetima. Pregledi terena i sakupljanje uzoraka tikava obavljani su u periodu 2008-2009. godine na 15 lokaliteta gajenja tikava u Vojvodini, a testiranje sakupljenih uzoraka izvršeno je primenom DAS-ELISA metode i komercijalno dostupnih antiseruma za šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava u svetu. Tokom 2008. godine u 13 useva gajenih tikava sakupljen je ukupno 51 uzorak uljane tikve sorte Olinka, bundeve i vrga, a CMV je detektovan u ukupno 55% testiranih uzoraka sa simptomima virusnih zaraza. CMV je najčešće bio detektovan u mešanoj infekciji sa ZYMV i WMV (35,3%), a zatim u mešanoj infekciji sa ZYMV (17,7%) i sa WMV (2%). Ukupno 599 simptomatičnih uzoraka uljane tikve sorte Olinka, tikvica sorti Beogradska i Toska, bundeve i muskatne tikve sakupljeno je u 15 useva tokom 2009. godine. U sakupljenim uzorcima CMV je bio prisutan u ukupno 4,4% testiranih uzoraka. U pojedinačnim infekcijama u 1,3%, a u mešanim sa WMV ili ZYMV u 1,3%, odnosno 1,8% testiranih uzoraka. Mehaničkim inokulacijama *N. glutinosa* dobijeno je pet izolata CMV od kojih je jedan izabran za dalju biološku karakterizaciju. Odabrani izolat (115-08) izazvao je na test biljkama koje su opisane kao domaćini CMV pojavu karakterističnih simptoma. Specifičnim prajmerima CMV Au1u/Au2d uz upotrebu RT-PCR metode umnožen je deo genoma od oko 850 bp koji kodira ceo protein omotača virusa i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona dva odabrana izolata CMV. Amplifikovani fragmenti su sekvencionirani i prijavljeni u NCBI, gde su im dodeljeni pristupni brojevi, HM065510 (115-08) i HM065509 (151-08). Sekvence CMV izolata iz Srbije dele najveću nukleotidnu i aminokiselinsku sličnost sa izolatima iz podgrupe IA, od 99,5 do 97,4%, odnosno 99,1 do 97,4%, a najmanju sa izolatima II podgrupe od 66,9 do 64,5%, odnosno od 75,8 do 74,1%.

Ključne reči: Tikve; *Cucumber mosaic virus*; serologija; analiza sekvenci; rasprostranjenost; učestalost

UVOD

Vrste roda *Cucurbita*, a među njima i obična tikva (*Cucurbita pepo* L.) vode poreklo iz centralne i južne Amerike, ali se smatra da je jedna od danas najznačajnijih gajenih formi obične tikve – uljana tikva golica nastala na području austrijske pokrajine Štajerske u XV veku (Berenji, 2011). Pored Austrije, uljana tikva tradicionalno se gaji u Sloveniji, Mađarskoj, Hrvatskoj, Nemačkoj, kao i Srbiji, naročito u Vojvodini koja se odlikuje posebno dobrim agroekološkim uslovima za ovu proizvodnju. Uljana tikva spada u takozvane alternativne kulture, često se smatra okosnicom organske poljoprivrede, a dobijeni proizvodi obezbeđuju i do 10 puta veći profit u odnosu na druge konvencionalne useve (Berenji, 2011). Jedan od najznačajnijih proizvoda od uljane tikve je tikvino ulje, koje se odlikuje pre svega povoljnim odnosom zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, a sadrži i tokoferol (vitamin E) i karotenoide zbog čega se preporučuje u ishrani. Utiče na poboljšanje opšteg stanja organizma, prevenciju kancerogenih oboljenja, prevenciju i smanjenje nivoa holesterola i jačanje imuniteta. Tikvino ulje je jedno od najstarijih jestivih ulja koja se proizvode na našim područjima, a dobija se hladnim ceđenjem semenki uljane tikve. Zbog veoma velikih mogućnosti upotrebe i specifične tehnologije proizvodnje tikvino ulje dostiže veoma visoku cenu na tržištu. Površine pod ovom kulturom u našoj zemlji procenjuju se na oko 2000-3000 ha, sa tendencijom stalnog rasta (Berenji, 2011).

Na tikvama se javlja veliki broj prouzrokovaca bolesti i štetočina, ali se smatra da ekonomski najznačajnije gubitke prouzrokuju virusi (Provvidenti i Schroeder, 1970; Blanchard i sar., 1994; Lecoq i sar., 2003; Sevik i Arli-Sokmen, 2003), kojih je do sada na tikvama opisano preko 50 (Kucharek i Purcifull, 1997). Broj opisanih virusa se, pre svega usled veoma brzog napredovanja dijagnostičkih tehnika, povećava iz godine u godinu. Međutim, ekonomski najznačajnije štete, koje pojedinih godina mogu da potpuno unište proizvodnju, u većini regiona gajenja ovih kultura prouzrokuju virusi koji se na neperzistentan način prenose velikim brojem vrsta biljnih vaši, a to su virus žutog mozaika kukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) i virus prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV) (Kucharek i Purcifull, 1997; Dukić i sar., 2001, 2002; Tóbiás i Tulipán, 2002; Lecoq i sar., 2003; Bananej i sar., 2008; Vučurović i sar., 2009a, 2009b). Značajne štete mogu da nanesu i virusi koji se prenose semenom tikava, kao što je virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Lecoq i sar., 2009).

Virus mozaika krastavca je tipičan predstavnik roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* i jedan je od ekonomski najznačajnijih virusa (van Regenmortel i sar., 2000). Prvi put je otkriven kao prouzrokovac oboljenja na tikvama 1916. godine u Americi (Doolittle, 1916., loc. cit. Garcia-Arenal i Palukaitis, 2008) i upravo je njegovim proučavanjem otpočeo pionirski rad na izučavanju virusa tikava u svetu 1925. godine (Doolittle i Walker, 1925, loc. cit. Lecoq i sar., 2009). Mada je CMV široko rasprostranjen, najznačajniji je u umereno toplim regionima gde su povoljni uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši (Shew i Lucas, 1991; Palukaitis i sar., 1992). CMV se prenosi na neperzistentan način sa više od 80 vrsta vaši, a najefikasniji vektori su mu vrste *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Garcia-Arenal i Palukaitis, 2008). Virus mozaika krastavca ima veoma širok krug domaćina koji uključuje preko 1300 vrsta iz više od 500 rodova i 100 botaničkih familija, među kojima su neki značajni usevi, ukrasne biljke i biljke spontane flore. Krug domaćina CMV iz godine u godinu se povećava (Garcia-Arenal i Palukaitis, 2008). Genom CMV smešten je u tri vrste čestica ikosaedrične građe, prečnika oko 29 nm, koje sadrže jednolančane, pozitivne RNA (RNA1, RNA2 i RNA3) na kojima je raspoređeno pet gena, a za ostvarivanje infekcije neophodno je prisustvo sve tri čestice (Palukaitis i sar., 1992; Garcia-Arenal i Palukaitis, 2008).

U Srbiji je virus mozaika krastavca prvi put opisan na dinji (Stakić i Nikolić, 1966) i drugim biljkama familije Cucurbitaceae (Pejčinovski, 1978), a otkriven je i na paprici, paradajzu, duvanu, lucerki, crvenoj detelini i drugim gajenim biljkama (Šutić, 1995). Ispitivanja viroza tikava, vršena u Srbiji u poslednjih desetak godina ukazuju da je CMV jedan od stalno prisutnih i ekonomski štetnih virusa na ovim gajenim biljkama (Dukić i sar., 2001, 2004; Krstić i sar., 2002; Vučurović i sar., 2008).

Kako se CMV stalno javlja u usevima tikava kod nas i kako je često zastupljen u veoma visokom procentu u usevima tikava u Srbiji (Krstić i sar., 2002; Vučurović i sar., 2008), cilj ovih istraživanja bio je: (i) da se sakupe i biološki i serološki okarakterišu izolati CMV sa tikava iz Srbije, (ii) implementira protokol za brzu i pouzdanu molekularnu detekciju CMV u prirodno zaraženim biljkama, (iii) utvrdi varijabilnost u okviru populacije ovog virusa kroz određivanje stope genetičkog diverziteta u odnosu na izolate poreklom iz različitih delova sveta. Obavljena istraživanja pružaju prve informacije o serološkoj, biološkoj i molekularnoj karakterizaciji virusa mozaika krastavca poreklom iz tikava u Srbiji kao uvod u neophodna dalja proučavanja strukture populacije ovog značajnog virusa.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka tikava

Ispitivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa mozaika krastavca u Srbiji obavljeno je tokom 2008. i 2009. godine. Pregledom je obuhvaćeno 28 useva na 15 lokaliteta gajenja tikava u Vojvodini (Tabela 1). Tokom pregleda, sakupljeni su uzorci tikava sa različitim tipovima simptoma koji su ukazivali na virusnu zarazu. Metoda po kojoj su uzorci sakupljeni zavisila je od veličine useva, odnosno parcele i intenziteta zaraze, odnosno broja biljaka sa simptomima virusnih zaraza. Ukoliko su parcele bile manjih dimenzija ili intenzitet zaraze slab, sakupljen je manji broj uzoraka sa simptomima, a ukoliko su parcele bile veće ili je intenzitet zaraze bio jači, uzorci su sakupljeni kretanjem po „X modelu“ i odabirom uzoraka sa simptomima.

Tokom 2008. godine sakupljen je 51 uzorak, a tokom 2009. godine 599 uzoraka tikava sa simptomima virusnih zaraza. Pregled vrsta i broja useva tikava po lokalitetima dat je u tabeli 1.

Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA)

Uzorci tikava sa simptomima virusnih zaraza testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) po protokolu koji su opisali Clark i Adams (1977). Uzorci sakupljeni tokom 2008. godine testirani su primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland) specifičnih za detekciju šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava CMV, WMV, ZYMV, PRSV, SqMV i virusa prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Serološka testiranja uzoraka sakupljenih 2009. godine izvršena su primenom poliklonalnih antiseruma (DSMZ, Germany) specifičnih za detekciju CMV, WMV, ZYMV, PRSV, TRSV i SqMV. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu, osim za TRSV i CMV kada su antitela razređena u odnosu 1:500. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:6. Nakon 1-2 časa po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), intenzitet bojene reakcije je očitavan spektrofotometrijski (Microplate reader, DASsrl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcije na 405 nm dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Biološka karakterizacija

Radi dobijanja izolata CMV, biljke *Nicotiana glutinosa* L. mehanički su inokulisane inokulumom pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka tikava u kojima je prethodno dokazana mešana infekcija CMV sa ZYMV, kao i CMV sa ZYMV i WMV. Na ovaj način je dobijeno pet izolata, a izolat 115-08 poreklom sa lokaliteta Gardinovci iz vrste *C. pepo* 'Olinka' slučajnim izborom odabran je za dalju biološku karakterizaciju, mehaničkim inokulacijama niza test biljaka.

U cilju ispitivanja kruga domaćina odabrani izolat CMV inokulisan je na 45 vrsta test biljaka iz pet botaničkih familija. Kao test biljke korišćene su: *C. pepo* 'Olivija', 'Olinka', 'Slovenačka golica', 'Beogradska', hibrid 'Ezra F1' i tikvica cukini (nepoznata sorta), *C. moschata* 'Lola' i 'Beja', *C. maxima*, *C. foetidissima*, *C. mixta*, *C. ficifolia*, *Cucumis sativus* 'Regal', 'Delicates', 'Dugi zeleni', 'Senzacija' i 'Sunčani potok', *C. anguria*, *C. melo* 'Ananas', *Citrulus lanatus* 'Creamson sweet', *Benincasa hispida*, *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata*, *Lagenaria siceraria*, *Momordica* sp., *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *C. foetidum*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum nigrum*, *Lycopersicon esculentum* 'San Pjer', *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* 'Banat', 'Prilep' i 'Samsun', *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyii*, *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac' i *Pisum sativum* 'Mali provansalac'.

Inokulum za mehaničke inokulacije pripremljen je homogenizacijom zaraženog lišća u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera pH 7,0, uz korišćenje karborundum praha finoće 400 meša kao abraziva.

Ispitivani izolat CMV inokulisan je na pet biljaka jedne vrste eksperimentalnog domaćina. Test biljke su inokulisane u fenofazi 2-3 lista i održavane u uslovima staklenika. Pojava i tip simptoma praćeni su na inokulisanom lišću i lišću formiranom posle inokulacije u periodu do mesec dana nakon inokulacija. Moguće latentne infekcije test biljaka bez simptoma proveravane su DAS-ELISA testom.

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

U cilju molekularne detekcije i identifikacije CMV kao potvrda rezultata dobijenih biološkim i serološkim analizama, primenjena je metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (reverse transcription-polimerase chain reaction, RT-PCR), uz upotrebu specifičnih prajmera CMV Au1u/Au2d (Đekić i sar., 2008) za detekciju različitih izolata CMV poreklom

iz tikava iz Srbije. Za ove analize odabrano je pet izolata CMV, u kojima je prethodno serološki dokazano prisustvo CMV.

Izolacija ukupnih RNK iz 100 mg lišća prirodno zaraženih biljaka tikava obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema preporuci proizvođača. Ukupna izolovana RNK korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera CMV Au1u/Au2d koji obuhvataju celi gen za proteinski omotač i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona koji se nalaze na RNK3 segmentu (ili subgenomnom RNK4).

Detekcija CMV izvršena je primenom OneStep RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša za RT-PCR (25 μ l) sadržala je: 5 μ l 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 μ l dNTP Miks (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smeši 400 μ M), 1 μ l RT-PCR enzimskog miksa, 1,5 μ l svakog prajmera (finalne koncentracije 0,6 μ M), 14 μ l RNase-free vode i 1 μ l izolovane ukupne RNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase free voda, kao i ukupna RNK ekstrahovana iz zdravog lišća tikava. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; denaturacija 30 s na 94°C, elongacija 30 s na 58°C i ekstenzija 30 s na 72°C (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 μ g/ml i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine od oko 850 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplicona korišćen je marker, MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Umnoženi ampliconi ispitivanih izolata su, pre slanja na uslužno sekvencioniranje u BMR Genomic u Padovu (Italija), prečišćeni primenom QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) i po instrukcijama proizvođača. Sekvencioniranje je obavljeno u oba smera, prajmerima koji su korišćeni za umnožavanje. Po dobijanju sekvence su obrađene u FinchTV Version 1.4.0., a zatim upoređene u MEGA5 (Tamura i sar., 2011) programu gde su dobijene konsenzus sekvence koje su zatim, sa relevantnim podacima vezanim za ispitivane izolate, deponovane u National Center of Biotechnology Information (NCBI) banku podataka, posle čega im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number).

Analiza dobijenih sekvenci prvo je obavljena upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programa upoređivanjem sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Zatim su sekvence CMV izolata iz Srbije i odgovarajuće dostupne sekvence iz GenBank poravnate i međusobno upoređene CLUSTAL *W* programom (Thompson i sar., 1994), delom programa MEGA verzija 5.0. Za proračun genetičke sličnosti na osnovu sekvenci dela genoma odabranih izolata sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, kao i filogenetske analize upotrebljen je MEGA verzija 5.0 softverski paket (Tamura i sar., 2011). Za međusobno poređenje sekvenci izolata dobijenih u toku ovog rada i sekvenci izolata podnetih u NCBI bazu podataka, BLAST analizom odabrane su sekvence izolata CMV koje su pokazivale 99% i 93% nukleotidne identičnosti, a 100% pokrivenosti. Za detaljniju molekularnu karakterizaciju odabrano je 15 izolata kompletnog CP gena CMV iz NCBI, koji su referentni za svaku podgrupu. Zatim je u MEGA5 programu sproveden test pronalazjenja najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije metodom maksimalne verodostojnosti i parnim poređenjima proračunata odgovarajuća sličnost ispitivanih izolata i odabranih referentnih izolata iz NCBI na nukleotidnom nivou, dok je sličnost na aminokiselinskom nivou izražena preko prosečne stope genetičkog diverziteta. Kimura 2-parametar kao najbolje prilagođen model odabran je na osnovu najniže vrednosti BIC (Bayesian Information Criterion).

REZULTATI

Simptomi u polju

Tokom pregleda različitih useva tikava 2008. godine uočeni su veoma brojni i raznovrsni simptomi na svim nadzemnim organima različitih vrsta tikava – od različitih vidova mozaika, preko hloroze, šarenila listova, do veoma destruktivnih promena oblika lista kao što su izražena klobučavost (Slika 1), duboka nazubljenost, a često i potpuna redukcija lisne površine do nitavosti. Na vrežama zaraženih biljaka zapaženo je mozaično prošaravanje, dok su plodovi usled očiglednih ranih infekcija bili veoma deformisani, sa različitim bradavičastim izraštajima na površini. Takođe, verovatno usled veoma ranih infekcija, dolazilo je do nekroze tek zametnutih plodova ili do potpunog izostanka zametanja plodova. Plodovi zaraženi u kasnijim fazama razvoja ispoljavali su različite vidove mozaičnih prošaravanja.



Slika 1. Mešana infekcija CMV, ZYMV i WMV: mozaik, klobučavost i deformacija na *C. pepo* 'Olinka'



Slika 2. Mešana infekcija CMV i WMV: izraženi mozaik na *C. pepo* 'Tosca'



Slika 3. Mešana infekcija CMV i WMV: uvijanje liske na gore na *C. pepo* 'Tosca'



Slika 4. Mešana infekcija CMV i WMV: promena boje ploda i bradavičavost na *C. pepo* 'Tosca'

Tabela 1. Prisustvo i procentualna zastupljenost *Cucumber mosaic virus* (CMV) u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2008. i 2009. godine

Godina	Genotip	Lokalitet	Broj useva	Broj uzoraka	Pojedinačne infekcije	Mešane infekcije		
					CMV*	CMV+ ZYMV	CMV+ WMV	CMV+ ZYMV+ WMV
2008**	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	2	10	0	3 (30) ***	0	4 (40)
		Gardinovci	1	10	0	3 (30)	0	7 (70)
		Lok	1	2	0	0	0	0
		Titel	2	8	0	1 (12,5)	0	0
		Kisač	4	13	0	1 (7,7)	0	1 (7,7)
		Kulpin	1	2	0	1 (50)	0	1 (50)
	<i>C. maxima</i>	Bački Petrovac	1	4	0	0	1 (25)	3 (75)
	<i>L. siceraria</i>	Bački Petrovac	1	2	0	0	0	2 (100)
Ukupno za 2008			13	51	0	9 (17,7)	1 (2)	18 (35,3)
2009	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	1	3	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0
		Budisava	1	111	0	7 (6,3)	0	0
	<i>C. pepo</i> 'Tosca'	Čenej	1	104	0	0	0	0
		Srbobran	1	107	0	0	0	0
		Zmajev	1	105	0	0	0	0
		Kisač	1	110	0	0	0	0
		Bački Petrovac	1	1	0	0	0	0
	<i>C. pepo</i> 'Beogradska'	Ruma	3	16	2 (12,5)	0	7 (43,8)	0
		Sirig	1	5	0	0	0	0
	<i>C. maxima</i>	Beška	1	25	5 (20)	2 (8)	1 (4)	0
		Bački Petrovac	1	7	0	1 (14,3)	0	0
<i>C. moschata</i>	Zmajev	1	3	0	0	0	0	
<i>C. moschata</i>	Bački Petrovac	1	2	0	0	0	0	
Ukupno za 2009			15	599	8 (1,3)	11 (1,8)	8 (1,3)	0
Ukupno			28	650	8 (1,2)	20 (3,1)	9 (1,4)	18 (2,8)

* CMV- *Cucumber mosaic virus*, WMV-*Watermelon mosaic virus*, ZYMV- *Zucchini yellow mosaic virus*

** podaci navedeni za 2008. godinu objavljeni su u radu Vučurović i sar. (2009a)

*** broj pozitivnih uzoraka (% zaraženih uzoraka preračunat na ukupan broj testiranih uzoraka)

Iako su i tokom 2009. godine u polju uočeni brojni i raznovrsni simptomi, bili su manje intenzivni u odnosu na prethodnu godinu. Najčešće se javljao mozaik, hlorotična prošaravanja i klobučavost listova i malformacije plodova. Međutim, i tokom ove godine na pojedinim lokalitetima usled očiglednih ranih zaraza javili su se veoma izraženi i destruktivni simptomi, koji su se ogledali u zaostajanju u porastu zaraženih biljaka u odnosu na zdrave, listovi zaraženih biljaka bili su sa veoma redukovanom lisnom površinom, često do glavnih lisnih nerava, a plodovi su bili izrazito deformisani i mozaični. Biljke u kojima je CMV dokazan u mešanim infekcijama pokazivale su intenzivnije simptome na lišću u vidu jakog mozaika (Slika 2) i uvijanja ivica liske na gore (Slika 3), kao i promene na plodovima u vidu promene boje i pojave ispupčenja na površini (Slika 4).

Serološka detekcija

Tokom dvogodišnjih ispitivanja sprovedenih 2008. i 2009. godine na različitim lokalitetima gajenja i u različitim usevima tikava u Vojvodini, dokazano je prisustvo tri virusa: CMV, ZYMV i WMV. Sva tri virusa detektovana su u svim ispitivanim vrstama tikava, osim kod *C. pepo* 'Tosca', gde nije detektovano prisustvo ZYMV i *C. moschata*, u kojoj nije detektovan nijedan od ispitivanih virusa (Tabela 1). Prisustvo PRSV, SqMV, kao i TRSV, koji se nalazi na karantinskoj A1 štetnih organizama Srbije, nije detektovano ni u jednom od testiranih uzoraka tikava tokom obe godine ispitivanja.

U ispitivanjima sprovedenim tokom 2008. godine CMV je bio prisutan na svim ispitivanim lokalitetima, osim na lokalitetu Lok. Najzastupljeniji je bio na loka-

Tabela 2. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije 115-08 izolatom *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Test biljke	Tip simptoma
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	M, UL
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Slovenačka golica'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska tikvica'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Ezra'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Zucchini'	M
<i>Cucurbita maxima</i>	M, ZBN
<i>Cucurbita mixta</i>	M, ŽM
<i>Cucurbita moschata</i> 'Beja'	ŽM
<i>Cucurbita moschata</i> 'Lola'	M
<i>Cucurbita ficifolia</i>	/
<i>Cucurbita foetidissima</i>	/
<i>Cucumis sativus</i> 'Delikates'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Dugi zeleni'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Sunčani potok'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Senzacija'	BM
<i>Cucumis sativus</i> 'Regal'	Hn, M
<i>Cucumis melo</i> 'Ananas'	M
<i>Cucumis anguria</i>	M
<i>Citrus lanatus</i> 'Creamson sweet'	LNPk, NP, M
<i>Lagenaria siceraria</i>	LHPk, M
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	/
<i>Cyclanthera pedata</i>	/
<i>Momordica</i> sp.	/
<i>Benincasa hispida</i>	/
<i>Petunia x hybrida</i>	/
<i>Physalis floridana</i>	/
<i>Chenopodium quinoa</i>	LNP
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNP
<i>Chenopodium foetidum</i>	D, Kr
<i>Chenopodium murale</i>	LNP
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Poboljšani gradištanac'	/
<i>Pisum sativum</i> 'Mali provansalac'	/
<i>Lycopersicon esculentum</i> 'San Pjer'	/
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Prilep'	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Samsun'	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Banat'	M
<i>Nicotiana debneyii</i>	M
<i>Nicotiana clelandii</i>	LNP
<i>Nicotiana rustica</i>	M
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, N, K
<i>Datura stramonium</i>	/
<i>Datura metel</i>	/
<i>Solanum nigrum</i>	/
<i>Gomphrena globosa</i>	LNP

M – mozaik, ŽM – žuti mozaik, BM – blagi mozaik, ZBN – zelena boja oko nerava, HN – hloroza nerava, K – klobučavost, D – deformacije, N – nitavost, LHP – lokalne hlorotične pege, LNP – lokalne nekrotične pege, PLD – povijanje listova na dole, UL – uvijanje lišća, SHP – sistemična hlorotična pegavost, Kr – kržljivost, LHPk – lokalne hlorotične pege na kotiledonima, LNPk – lokalne nekrotične pege na kotiledonima, / – bez simptoma

litetu Kulpin, gde je u usevu *C. pepo* 'Olinka' dokazan u svim testiranim uzorcima, kao i u usevu *C. maxima* na lokalitetu Bački Petrovac, gde je takođe dokazan u svim testiranim uzorcima. U toku 2008. godine CMV nije bio detektovan u pojedinačnim infekcijama, već isključivo u mešanim sa druga dva prisutna virusa. Od mešanih infekcija, najzastupljenija je bila trostruka infekcija dokazana u 35,3% testiranih uzoraka, dok su mešane infekcije sa ZYMV ili WMV dokazane u nešto manjem procentu testiranih uzoraka (17,7%, odnosno 2%). Ukupno, u toku 2008. godine CMV je detektovan u 55% testiranih uzoraka tikava.

Tokom ispitivanja sprovedenih 2009. godine CMV se javio na četiri od devet ispitivanih lokaliteta, a najzastupljeniji je bio na lokalitetu Ruma, u usevu *C. pepo* 'Tosca', gde je dokazan u 56,3% testiranih uzoraka. Za razliku od prethodne, tokom 2009. godine CMV je detektovan i u pojedinačnim zarazama u 1,3% testiranih uzoraka, dok su od mešanih infekcija bile prisutne samo dvostruke sa ZYMV (1,8%) i WMV (1,3%). Ukupno u 2009. godini CMV je detektovan u 4,4% testiranih uzoraka.

Reakcije test biljaka na ispitivani izolat virusa mozaika krastavca

Detaljna biološka karakterizacija odabranog izolata CMV, 115-08, obavljena je na osnovu ispoljavanja i tipa simptoma na biljkama koje pripadaju krugu domaćina ovog virusa, kao i onih koje nisu opisane kao njegovi domaćini. Reakcije test biljaka iz pet botaničkih familija Cucurbitaceae, Solanaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae i Fabaceae prikazane su u tabeli 2.

Različite sorte *C. pepo*, *C. sativus* i *C. moschata* su, na mehaničke inokulacije odabranim izolatom 115-08 virusa mozaika krastavca, reagovale pojavom tipičnih simptoma, pre svega u vidu mozaika, hloroze nerava i uvijanja lišća. Simptomi su se takođe javili i na biljkama *C. maxima*, *C. mixta*, *C. anguria*, *C. lanatus* 'Creamson sweet' i *L. siceraria*, uglavnom u vidu mozaika, zadržavanja zelene boje oko nerava ili pojave lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pega. Od biljaka familije Cucurbitaceae, izolat 115-08 nije mogao da zarazi *C. ficifolia*, *C. foetidissima*, *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata*, *Momordica* sp. i *Benincasa hispida*.

Posle mehaničkih inokulacija *Chenopodium* spp., *Gomphrena globosa*, kao i *Nicotiana* spp. ispitivanim izolatom, javili su se tipični simptomi koji upućuju na CMV u vidu lokalnih nekrotičnih pega, odnosno mozaika.

Biljke *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac', *Pisum sati-*

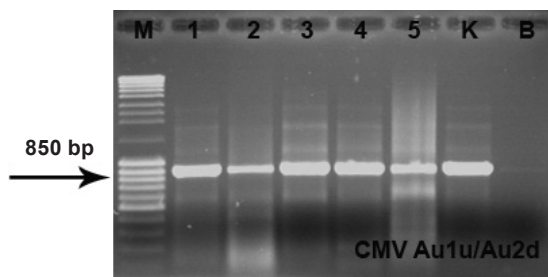
Tabela 3. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost ispitivanih izolata *Cucumber mosaic virus* (CMV) iz Srbije i reprezentativnih izolata za svaku podgrupu

CMV subgrupa	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Izolat	Pristupni broj	HM065510	HM065509
	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	115-08	HM065510		
	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	151-08	HM065509	99,1/98,9*	
Subgroup IA	Španija	<i>Cucurbita pepo</i> var. melopepo (zucchini)	MAD99/4	AJ829770	99,2/99,1	99,2/99,2
	Španija	<i>Cucumis melo</i>	MAD99/1	AJ829776	99,2/99,1	99,2/99,2
	SAD	<i>Cucumis melo</i>	Fny	D10538	99,2/99,1	99,5/99,5
	Japan	/**	Leg	D16405	97,4/97,4	97,9/98
	Japan	<i>N. tabacum</i>	Y	D12499	97,4/97,6	97,6/97,6
	Koreja	<i>Melandryum firmum</i>	Mf	AJ276481	97,9/97,9	98,3/98,3
Subgroup IB	Tajvan	<i>L. esculentum</i>	NT9	D28780	93,9/94,4	95/95,4
	Indonezija	/	IA	AB042294	92,6/92,7	93,4/93,2
	Italija	<i>L. esculentum</i>	Tfn	Y16926	94,3/94,7	95,7/95,4
	Filipini	<i>L. esculentum</i>	Ixora	U20219	92,6/92,7	92,8/92,7
	Kina	<i>N. tabacum</i>	SD	AB009777	93,3/94,1	94,1/94,5
Subgroup II	Mađarska	<i>Trifolium repens</i>	Trk7	L15336	64,5/74,1	66/74,7
	Južna Afrika	<i>Cucurbita pepo</i>	S	AF063610	65,1/74,4	66,6/75
	SAD	<i>Lactuca sativa</i>	LS	AF127976	66,2/74,9	67,6/75,5
	Australija	<i>Capsicum annuum</i>	Q	M21464	66,9/75,2	68,3/75,8

* – nukleotidna sličnost određena je na osnovu Kimura 2-parametra

** / – biljka domaćin nije poznata

vum 'Mali provansalac', *Lycopersicon esculentum* 'San Pjer', *Datura stramonium*, *D. metel* i *Solanum nigrum* mehanički nisu mogle biti zaražene ispitivanim izolatom.



Slika 5. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem CMV specifičnog seta prajmera CMV Au1u/Au2d. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 2-izolat 115-08 iz *C. Pepo* 'Olinka', 3-izolat 151-08 iz *C. pepo* Olinka', 4-izolat 162-08 iz *C. maxima*, 5-izolat 242-09 iz *C. maxima*, 6-izolat 263-09 iz *C. pepo* Tosca', 7-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

Rezultati seroloških i bioloških analiza prisustva virusa mozaika krastavca potvrđeni su primenom molekularne RT-PCR metode i specifičnih prajmera CMV Au1u i Au2d za detekciju CMV (Slika 5). Kod testiranih uzoraka uljane tikve 115-08 i 151-08 sa lokaliteta Gardinovci i Kulpin uspešno su amplifikovani fragmenti očekivane veličine od oko 850 bp koji obuhvataju ceo gen za protein omotača virusa i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona. Do uspešne amplifikacije fragmenta iste veličine došlo je i kod izolata 746-07 iz paradajza, prethodno serološki, biološki i molekularno okarakterisanog kao CMV koji je korišćen kao pozitivna kontrola (Đekić i sar, 2008). Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNK pripremljenom od nezaraženog lišća tikava, a takođe ni u PCR smeši sa RNase-free vodom, odnosno negativnoj kontroli.

Dobijeni amplikoni odabranih izolata, 115-08 i 151-08 iz *C. pepo* 'Olinka' sa lokaliteta Gardinovci i Kulpin su sekvencionirani, a zatim su dobijene sekvence prijavljene u NCBI banku podataka, gde su im dodeljeni pri-

stupni brojevi HM065510 i HM065509. U cilju molekularne identifikacije primenjena je BLAST analiza ispitivanih sekvenci, koja je pokazala da izolati 115-08 i 151-08 dele najveću nukleotidnu sličnost od 99,1%, odnosno 99,4% uz 100% pokrivenosti sekvence sa izolatom CMV 207 iz *L. esculentum* poreklom iz Australije (pristupni broj AJ585517). Izolat 115-08 ima najveću prosečnu stopu genetičkog diverziteta od 0,055 (94,5% sličnosti) sa izolatom CMV L36251 iz Južne Koreje, a izolat 151-08 ima najveću prosečnu stopu genetičkog diverziteta, od 0,053 (94,7% sličnosti) sa izolatom virusa mozaika krastavca pod pristupnim brojem D42079 iz Japana.

Međusobno poređenje izolata 115-08 i 151-08 pokazalo je da se oni razlikuju u 12 nukleotida (98,5%), na celoj dužini dobijenih sekvenci, dok se u delu sekvence dužine od 657 nt koji kodira protein omotača virusa razlikuju u sedam nukleotida (98,9%), što je rezultiralo izmenom dve aminokiseline (99,1%).

Kao najbolje prilagođen model nukleotidne supstitucije na osnovu testa maksimalne verodostojnosti pokazao se model sa Kimura 2-parametrom i gama distribucija. Rezultati poređenja nukleotidne sličnosti po Kimura 2-parametar i aminokiselinske sličnosti po p-distance modelu na osnovu sekvenci CP gena izolata 115-08 i 151-08 sa referentnim izolatima za IA, IB i II podgrupu CMV prikazani su u tabeli 3. Ispitivani izolati CMV iz Srbije najveću nukleotidnu i aminokiselinsku sličnost pokazuju sa izolatima iz podgrupe IA, od 99,5 do 97,4%, odnosno 99,1 do 97,4%. Sličnost srpskih izolata sa izolatima IB podgrupe kretala se od 95,7 do 92,6% na nukleotidnom nivou i od 95,4 do 92,7% na aminokiselinskom nivou. Najmanju nukleotidnu i aminokiselinsku sličnost izolati 115-08 i 151-08 pokazali su sa izolatima II podgrupe CMV, gde se nukleotidna sličnost kretala od 66,9 do 64,5%, a sličnost u sadržaju aminokiselina od 75,8 do 74,1%.

DISKUSIJA

Virus mozaika krastavca jedan je od najštetnijih virusa u biljnoj proizvodnji čemu značajno doprinosi njegov veoma širok krug domaćina i opšte rasprostranjenje. Od kako je kod nas opisan 1966. godine, javlja se svake godine u velikom broju useva, često pričinjavajući velike ekonomske štete (Stakić i Nikolić, 1966; Dukić i sar., 2001; Krstić i sar., 2002; Dukić, 2004; Vučurović i sar., 2008). Opsežna ispitivanja virusa tikava sprovedena u Srbiji poslednjih desetak godina u cilju praćenja prisustva i rasprostranjenosti virusa tikava, ukazala su da se CMV javlja redovno, kao jedan od tri prisutna

virusa, u različitim usevima tikava, kao i da mu učestalost kako po godinama, tako i po lokalitetima značajno varira (Dukić i sar., 2001, 2004; Krstić i sar., 2002; Vučurović i sar., 2008).

Dosadašnja istraživanja prisustva i rasprostranjenosti CMV na tikvama u Srbiji ukazuju da se zastupljenost ovog virusa po godinama značajno menjala, tako da je 2001. godine kada su virusi tikava u Srbiji svojim prisustvom i veoma značajnim štetama skrenuli na sebe pažnju, CMV bio drugi po zastupljenosti, odmah iza ZYMV, koji je samo godinu ranije prvi put detektovan na tikvama kod nas (Krstić i sar., 2002). Već naredne godine, kao i 2003. i 2004. situacija je bila donekle drugačija, pa je CMV bio treći virus po zastupljenosti (Dukić i sar., 2004; Duduk, 2008). U toku 2007. godine, CMV je ponovo bio drugi po zastupljenosti virus u usevu tikava (Vučurović i sar., 2009a). Iako je bio drugi, odnosno treći po zastupljenosti od detektovanih virusa na tikvama, CMV je bio zastupljen u veoma visokom procentu testiranih uzoraka, pa je tako 2001. godine detektovan u čak 61,3% testiranih uzoraka, dok je 2002. detektovan u nešto manjem, ali i dalje značajnom broju uzoraka 40,4%, a 2007. godine je detektovan u čak 55,1% testiranih uzoraka (Dukić i sar., 2004; Vučurović i sar., 2009a). U periodu 2001-2004. godine, CMV se javio i u pojedinačnim, i u mešanim infekcijama sa drugim prisutnim virusima (od mešanih infekcija bile su prisutne infekcije sa dva: CMV sa ZYMV ili WMV i infekcije sa sva tri prisutna virusa). Takođe, i u ovom pogledu uočena je značajna varijabilnost, pa je 2001. i 2002. godine bilo dominantno prisustvo pojedinačnih infekcija, a 2003. i 2004, kao i 2007. godine mešanih, a posebno je značajno što su se mešane infekcije sa tri prisutna virusa 2004. godine javile u čak 37,2% testiranih uzoraka (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004; Duduk, 2008; Vučurović i sar., 2009a). Na osnovu istraživanja sprovedenih 2007. godine (Vučurović i sar., 2009a), kao i u ranijem periodu (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004) zaključuje se da je CMV prisutan svake godine sa različitom učestalosti, ali vrlo visokim intenzitetom zaraze u usevima tikava u Srbiji. Rezultati ovih istraživanja ukazali su na potrebu da se pregled, uzorkovanje i testiranje simptomatičnih biljaka tikava nastavi tokom 2008. i 2009. godine, u cilju praćenja prisustva i učestalosti CMV u usevima različitih vrsta tikava u Srbiji.

Tokom 2008. godine CMV se javio na pet od šest ispitivanih lokaliteta, a bio je prisutan u veoma visokom procentu testiranih uzoraka. Naročito je specifično to što se ove godine CMV javio samo u mešanim infekcijama. Ukupna zaraza CMV bila je detektovana u 55%

testiranih uzoraka, a virus je detektovan u svim testiranim vrstama i genotipovima. Istraživanja sprovedena 2009. godine pokazala su značajne razlike u zastupljenosti CMV koji je bio detektovan samo na četiri od devet testiranih lokaliteta ukupno tek u 4,4% testiranih uzoraka. Što se tiče zastupljenosti po ispitivanim vrstama i genotipovima tikava, CMV nije detektovan samo u *C. moschata*.

Ispitivanja sprovedena u ovom radu potvrđuju ranija ispitivanja viroza tikava kod nas, koja nisu ukazala na prisustvo PRSV, SqMV i TRSV (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004; Vučurović i sar., 2009a) iz čega se može zaključiti da ova tri ekonomski veoma značajna virusa tikava za sada nisu prisutna u Srbiji. Uzimajući u obzir njihovu rasprostranjenost i značaj u svetu, neophodno je nastaviti sa naporima da se eventualna introdukcija što ranije detektuje.

Razlike u pojavi, rasprostranjenosti i učestalosti virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način u zavisnosti od godine i lokaliteta često se javljaju kod virusa tikava i u drugim delovima sveta (Tóbiás i Tulipán, 2002; Lecoq i sar., 2003). Ipak, situacija zabeležena 2009. godine bila je iznenađujuća zbog pojave CMV u malom broju testiranih uzoraka, što je najverovatnije vezano za smanjeno prisustvo vektorskih vaši koje ovaj virus prenose na neperzistentan način. Za viruse i biljke iz familije tikava kao njihove domaćine, navodi se da su ne samo složen već i izrazito promenljiv patološki sistem zbog stalne pojave novih vrsta ili sojeva u okviru vrsta (Lecoq i sar., 2009).

Nakon mehaničkih inokulacija biljaka roda *Nicotiana*, odabranim izolatom zabeležena je pojava mozaike, nitavosti, klobučavosti, nekrotičnih pega, čime je i ovom metodom potvrđena pripadnost ispitivanog izolata CMV. Detaljnom biološkom karakterizacijom ispitivanog izolata zabeležena je pojava karakterističnih simptoma opisanih za izolate CMV kao što je mozaik i prosvetljavanje nerava na različitim vrstama kao i sortama biljaka familije Cucurbitaceae. Simptomi koji su se pojavili na inokulisanim test biljkama odgovarali su simptomima zabeleženim za CMV i od strane drugih autora (Provvidenti i Schroeder, 1970; Rahimian i Izadpanah, 1978; Francky i sar., 1979; Tóbiás i Tulipán, 2002).

Iako je u našoj zemlji već ispitivan krug domaćina ovog virusa, značajan doprinos istraživanja sprovedenih u ovom radu je taj što je ovde obuhvaćen veći broj vrsta u okviru familije Cucurbitaceae, pa će ova ispitivanja značajno doprineti sticanju potpunijeg uvida u osetljivost/otpornost pre svega komercijalno dostupnih sorti tikava i krastavaca u našoj zemlji što može biti od veli-

kog značaja poljoprivrednim proizvođačima koji se bave proizvodnjom ovih kultura. Takođe, rezultati ovih ispitivanja mogu biti od velike pomoći selekcionarima u programima selekcije tikava na otpornost, jer je gajenje otpornih genotipova najefikasniji i najuspešniji način kontrole svih bolesti koje izazivaju biljni virusi koji se neperzistentno prenose vašima.

Analiza nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata 115-08 i 151-08 iz različitih lokaliteta, pokazala je da su se izolati, iako su poticali iz iste biljke domaćina, razlikovali kako na nukleotidnom, tako i na aminokiselinskom nivou. Takođe, poređenjem ispitivanih izolata sa referentnim izolatima CMV iz NCBI utvrđeno je da izolati CMV poreklom iz tikava iz Srbije pripadaju podgrupi IA, u koju je svrstana većina svetskih izolata ovog virusa (Roossinck i sar., 1999). Veoma izraženoj varijabilnosti između izolata CMV doprinose mutacije, rekombinacije i pseudorekombinacije, kao najznačajniji faktori varijabilnosti (Palukaitis i Garcia-Arenal, 2003), ali posebnu pažnju treba posvetiti i veoma značajnoj trgovinskoj razmeni koja može značajno da doprinese pojavi novih sojeva, gde do tada nisu bili prisutni, kao što je slučaj sa nedavnom introdukcijom sojeva IB podgrupe u Italiju (Gallitelli, 2000). Prisustvo izolata ove grupe, koji mogu da pričine veoma velike štete, do tada je bilo karakteristično samo za Aziju i Ameriku. Sve ovo činjenice ukazuju na potrebu stalnog praćenja i analize strukture populacije virusa mozaika krastavca kod nas.

Detaljna serološka, biološka i molekularna karakterizacija izolata CMV u Vojvodini, obavljena u ovom radu po prvi put pruža uvid u postojanje varijabilnosti i značajnih razlika između pojedinih izolata CMV i predstavlja uvod u mnogo obimnija istraživanja strukture populacije ovog značajnog patogena tikava i drugih useva u Srbiji. Dalja istraživanja uključice sekvencioniranje i analizu većeg broja izolata različitog porekla i iz različitih domaćina u cilju rasvetljavanja nepoznatih epidemioloških aspekata i otkrivanja biljaka koje su od značaja za održavanje virusa, puteva introdukcije, evolutivnih i taksonomskih međudodosa između izolata, kao i određivanje prevalentnih izolata koji bi se dalje koristili u selekciji i stvaranju novih genotipova tikava i drugih domaćina koji bi bili sa poboljšanim nivoom otpornosti.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekata III-43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodi-

verzitetu ključnih grupa artropoda i biljnih patogena) i TR-31025 (Razvoj novih sorti i poboljšanje tehnologije proizvodnje uljanih biljnih vrsta za različite name-ne), koje finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Bananej, K., Keshavaraz, T., Vahdat, A., Hosseini Salkdeh, G. and Glasa, M.:** Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156: 654-659, 2008.
- Berenji, J.:** Uljana tikva – *Cucurbita pepo* L. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 2011.
- Blanchard, D., Lecoq, H. and Pitrat, M.:** A Color Atlas of Cucurbit Diseases. Manson Publishing/John Wiley, New York, USA, 1994.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.:** Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 44-50, 1977.
- Duduk, N.:** Identifikacija, molekularna karakterizacija i načini prenošenja virusa gajenih biljaka porodice Cucurbitaceae u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2008, str. 1-134.
- Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I. i Bulajić, A.:** Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 35/36: 71-79, 2004.
- Dukić, N., Krstić, B., Katis, N.I., Papavassiliou, C., Berenji, J. i Vico, I.:** Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V jugoslovenskog save-tovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2001, str. 85.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavassiliou, C. and Berenji, J.:** Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Science*, 47: 149-160, 2002.
- Dekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J. i Krstić, B.:** Učestalost i molekularna detekcija *Cucumber mosaic virus* u usevu duvana. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 40: 70-82, 2008.
- Francky, R.I.B., Mossop, D.W. and Hatta, T.:** Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213, 1979.
- Gallitelli, D.:** The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sus-tainable agriculture. *Virus Research*, 71: 9-21, 2000.
- Garcia-Arenal, F. and Palukaitis, P.:** Cucumber mosaic virus. *Encyclopedia of Virology*, Vol. 1, 2008, pp. 614-619.
- Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N.I. and Papavassiliou, C.:** Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, 103: 57-65, 2002.
- Kucharek, T.A. and Purcifull, D.E.:** Aphid-transmitted vi-ruses of cucurbits in Florida. Florida Cooperative Extension Service Circular, No. 1184. University of Florida, Gainesville, 1997, p. 11.
- Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C. and Girard, M.:** Potential involvement of melon fruit in long distance dis-semination of cucurbit potyviruses. *Plant Disease*, 87: 955-959, 2003.
- Lecoq, H., Wipf-Schibel, C., Chandeysson, C., Le Van, A., Fabre, F. and Desbiez, C.:** Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: An historical over-view. *Virus Research*, 141: 190-200, 2009.
- Lovisolo, O.:** Virus and viroid diseases of cucurbits. *Acta Horticulture*, 88: 33-71, 1980.
- Palukaitis, P. and Garcia-Arenal, F.:** Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62: 242-323, 2003.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B.:** *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research*, 41: 281-348, 1992.
- Pejčinovski, F.:** Virusot na mosaicot na krastavicata koj odgleduvanite rastenija od familijata Cucurbitaceae vo SR Makedonija. Godišen zbornik na Zemljodelskot fakultet, Skopje, XXVII-XXVIII: 97-116, 1978.
- Providenti, R. and Schroeder, W.T.:** Epiphytotic of water-melon mosaic among Cucurbitaceae in Central New York in 1969. *Plant Disease Reporter*, 54: 744-748, 1970.
- Rabimian, H. and Izadpanab, K.:** Identity and preva-lence of mosaic-inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran. *Phytopathologische Zeitschrift*, 92: 305-312, 1978.
- Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.:** Rearrange-ments in the 5' nontranslated region and phylogenetic anal-yses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolu-tion of three subgroups. *Journal of Virology*, 73: 6752-6758, 1999.
- Sevik, M.A. and Arli-Sokmen, M.:** Viruses infecting cu-curbits in Samsun, Turkey. *Plant Disease*, 87: 341-344, 2003.
- Shew, H.D. and Lucas, G.B.:** Compendium of Tobacco Diseases. APS Press, 1991.
- Stakić, D. i Nikolić, V.:** Virus mozaika lubenice – novo viro-zno oboljenje u Jugoslaviji. *Savremena poljoprivreda*, 3: 289-302, 1966.
- Šutić, D.:** Viroze biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, 1995.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.:** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011. 10.1093/molbev/msr121

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680, 1994.

Tóbiás, I. and Tulipán, M.: Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Növényvédelem*, 38(1): 23-27, 2002.

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickne, R.B.: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press, S. Diego, CA, USA, 2000, pp. 929-930.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J. i Krstić, B.: Virusi – stalni problem u usevu tikava u Srbiji. Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2008, str. 96-97.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B.: Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzja. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 85-94, 2009a.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B.: Biološka varijabilnost virusa žutog mozaika kukuruzja u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 271-280, 2009b.

Characterization of Cucumber Mosaic Virus Originating from Cucurbits in Serbia

SUMMARY

Cucumber mosaic virus (CMV) is considered one of the most economically important plant viruses and has a worldwide distribution and a very wide host range including plants from family Cucurbitaceae. In Serbia, on cucurbits CMV was detected in single and mixed infections with *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Watermelon mosaic virus* (WMV). Viruses, including CMV, are constantly present in cucurbit crops, but their frequency changes by year and locality. Surveys and sample collections were conducted in cucurbit crops in the period from 2008 to 2009 at 15 localities in Vojvodina province, and sample testing was carried out using the DAS-ELISA method and commercially available antisera for six economically most important cucurbit viruses. In 2008, a total of 51 samples were collected from 13 cucurbit crops of oilseed pumpkin Olinka variety, squash, and bottle gourd and CMV was detected in a total of 55% of tested samples with symptoms of viral infection. The most common infectious type was mixed infection with ZYMV and WMV (35.3%), and then mixed infection with ZYMV (17.7%) and WMV (2%). A total of 599 symptomatic samples of oilseed pumpkin Olinka variety, zucchini squash varieties Beogradska and Tosca, squash, and winter squash were collected in 15 cucurbits crops in 2009. CMV was present in 4.4% of total collected samples, in single infections in 1.3%, and in mixed with WMV or ZYMV in 1.3%, and 1.8%. Five CMV isolates were obtained by mechanical inoculations of *N. glutinosa* and one of them was selected for further biological characterization. Test plants which were described to be hosts of CMV expressed symptoms characteristic for those caused by CMV after inoculations by isolate 115-08. CMV specific primers Au1u/Au2d were used to amplify an 850 bp fragment using RT-PCR method. Amplified fragment encodes the entire viral coat protein (CP) gene and partial 5' and 3' UTRs of two selected CMV isolates. Amplified fragments were sequenced and deposited in the NCBI, where they were assigned accession numbers, HM065510 (115-08) and HM065509 (151-08). The sequences of CMV isolates from Serbia shared the highest nucleotide and amino acid identity with isolates from subgroup IA, from 99.5 to 97.4% and 99.1 to 97.4%, and the lowest identities were with the subgroup II isolates from 66.9 to 64, 5%, from 75.8 to 74.1%.

Keywords: Cucurbits; *Cucumber mosaic virus*; Serology; Sequence analysis; Distribution; Frequency