

Pestic. fitomed. (Beograd), 25(3), 2010, 213-230
Pestic. Phytomed. (Belgrade), 25(3), 2010, 213-230

UDC: 632.38:635.61:58.038
Naučni rad * Scientific paper
DOI: 10.2298/PIF1003213V

Učestalost pojave i molekularna karakterizacija virusa mozaika lubenice poreklom iz Srbije

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

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

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

Primljen: 8. jula 2010.

Prihvaćen: 7. oktobra 2010.

REZIME

Virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) široko je rasprostranjen u usevima vrežastih kultura, mada se najčešće javlja na Mediteranu i regionima sa umerenom klimom. U Srbiji, WMV je detektovan u pojedinačnim i mešanim infekcijama sa virusom žutog mozaike kukuruz (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) i virusom mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) u usevima tikava i bundeva gajenim na otvorenom polju. Od virusa tikava, WMV je često prevalentan virus, kako po broju lokaliteta u kojima je dokazan, tako i po učestalosti u samom usevu. Iz ukupno 12 komercijalnih useva na osam lokaliteta, 2009. godine sakupljeno je 583 biljaka *Cucurbita pepo* cvs. Olinka, Beogradska tikvica i Tosca (kukuruzi forma), kao i *C. maxima* i *C. moschata*, sa simptomima virusnih zaraza, koje su analizirane na prisustvo šest najznačajnijih virusa tikava primenom DAS-ELISA metode. WMV je detektovan na manjem broju lokaliteta i u manjoj učestalosti u poređenju sa prethodne dve vegetacije. U pojedinačnim infekcijama, WMV je detektovan u 11% testiranih biljaka u tri useva, a u mešanim sa ZYMV u 9,9% testiranih biljaka u pet useva i sa CMV u 0,2% testiranih biljaka u jednom usevu. Deo gena za protein omotača virusa i deo 3' neprepisujućeg regiona dva odabrana izolata WMV poreklom iz različitih lokaliteta i biljaka domaćina umnožen je primenom RT-PCR metode, sekvencioniran i upoređen sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Dobijen je PCR produkt očekivane veličine od 1017 bp. Sekvence izolata 137-08 (Acc. No. GQ259958) i 159-08 (GU144020) pokazale su 94-99% nukleotidne identičnosti sa izolatima WMV iz drugih delova sveta. Sekvence ova dva izolata razlikovala su se jedna od druge samo u dva nukleotidna mesta što nije imalo za posledicu aminokiselinske supstitucije. Filogenetske analize 57 izolata, na osnovu 750 bp sekvence gena za protein omotača, nisu ukazale na korelaciju sa geografskim poreklom izolata, a pokazala su grupisanje izolata u tri molekularne grupe sojeva. Izolati WMV iz Srbije pripadaju grupi I, grupi koja obuhvata najrasprostranjenije izolate ovog virusa u svetu.

Ključne reči: Tikve; virus mozaika lubenice; molekularna identifikacija; genetički diverzitet; filogenetska analiza

UVOD

Različite biljne vrste koje pripadaju porodici Cucurbitaceae (vrežaste kulture) i često se nazivaju zbirnim imenom „tikve“, gaje se u svetu i kod nas kao povrtnarske i uljane biljke (Berenji, 1988; Popović, 1991). U Srbiji tikve se gaje tradicionalno u združenom usevu, kao pojedinačne biljke na okućnicama, a u poslednje vreme, sve češće i u čistom usevu, naročito uljana tikva, posebna forma obične tikve (*Cucurbita pepo*) (Berenji 1999, 2007). U svetu i kod nas tikve se dugo koriste u ishrani i u dekorativne svrhe, a proizvodi od ovih biljaka odavno su poznati kako u tradicionalnoj, tako i u alternativnoj medicini gde se upotrebljavaju za regulisanje nivoa holesterola, umanjenje tegoba pri benignoj hiperplaziji prostate, u prevenciji kancerogenih oboljenja i jačanju imuniteta (Wagner, 2000; Fruhwirth i Hermetter, 2007). Zbog visoke hranljive vrednosti, značajne dobiti koja se ostvaruje proizvodnjom uljane tikve usled sigurnog plasmana ulja izrazitog farmakološkog efekta, površine pod ovom kulturom poslednjih godina u Srbiji su u stalnom porastu. Pored toga, ova grupa biljaka smatra se jednom od okosnica organske proizvodnje (Bavec i sar., 2007), a nalazi i značajno mesto u sistemu održive poljoprivrede (Momirović i sar., 1998). Pored brojnih formi i varijeteta obične tikve, u Srbiji se od predstavnika porodice Cucurbitaceae gaje još i bundeva (*C. maxima*), muskatna tikva (*C. moschata*), smokvolisna tikva (*C. ficifolia*) i zimska tikva (*C. mixta*) i vrg (*Lagenaria siceraria*) (Berenji, 2000, 2007, 2010).

Na biljkama porodice Cucurbitaceae opisano je preko 200 bolesti različite etiologije (Zitter, 1996), ali se smatra da virusi prouzrokuju ekonomski najznačajnije gubitke (Provvidenti i Schroeder, 1970; Blanchard i sar., 1994; Lecoq i sar., 2003; Sevik i Arli-Sokmen, 2003). Broj virusa koji su opisani kao prouzrokovajući oboljenja raznih vrsta tikava stalno raste, tako da je do sada identifikovano više od 50 vrsta (Kucharek i Purcifull, 1997). Za većinu opisanih virusa tikava smatra se da su ekonomski štetni, mada se najčešće kao prevalentni za određene regione gajenja navode virusi koji se na neperzistentan način prenose vašima, kao što su virus žutog mozaika kukuruznice (*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) ili semenom tikava, kao što je virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Lovisolo, 1980; Kucharek i Purcifull, 1997; Dukić i sar., 2001, 2002; Tóbiás i Tulipán,

2002; Lecoq i sar., 2003; Bananej i sar., 2008; Vučurović i sar., 2009b, 2009c).

Prateći prisustvo i učestalost pojave virusa u usevima vrsta iz porodice Cucurbitaceae širom sveta, uočava se da su stalno prisutni i veoma destruktivni, tako da štete često dostižu i 100% (Ghorbani, 1988; Ullman, 1991; Vučurović i sar., 2009b). Uspesna kontrola ovih oboljenja veoma je otežana činjenicom da se većina ekonomski značajnih virusa prenosi na neperzistentan način biljnim vašima (Provvidenti, 1996). Jedan od najučestalijih virusa koji je stalno prisutan, a često i prevalentan u usevima vrežastih kultura je i WMV koji ponekad može veoma značajno da ugrozi prinos. Štete prouzrokovane ovim virusom mogu da dostignu čak 50-100% ako su infekcije ostvarene rano u toku vegetacije (Mansour i Al-Musa, 1982). U Srbiji WMV je prvo dokazan kao prouzrokovatelj oboljenja na dinji i lubenici (Stakić i Nikolić, 1966), a zatim na krastavcu (Tošić i sar., 1996). Na običnoj tikvi prvi put je uočen 2000. godine (Dukić i sar., 2001), kada su i započeta detaljnija istraživanja virusa tikava kod nas, u toku kojih je WMV dokazan kao patogen uljane tikve, vrga, bundeve, muskatne, džinovske i bizonske tikve i ukrasnih tikvica (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2006; Vučurović i sar., 2009a, 2009b).

Virus mozaika lubenice član je *Potyvirus* roda, najvećeg roda biljnih virusa, koji obuhvata oko 25% svih biljnih virusa. U odnosu na ostale predstavnike ovog roda WMV se karakteriše širokim krugom domaćina (Dijkstra, 1992; Shukla i sar., 1994). Osim toga, ovaj virus je široko rasprostranjen, ali se najčešće javlja u zemljama sa umerenom klimom i mediteranskom regionu. Eksperimentalni domaćini ovog virusa su čak 170 vrsta iz 27 različitih porodica, uključujući mnoge korovske vrste koje služe za održavanje virusa između useva (Lovisolo, 1980; Purcifull i sar., 1984; Shukla i sar., 1994). Iako su razlike u serološkim, a pre svega u biološkim osobinama (krug domaćina) između WMV i *Soybean mosaic virus* (SMV) izražene, zbog visokog stepena homologije njihovih genoma WMV je dugo smatran sojem ovog virusa. Određivanje potpune genomne sekvence WMV pokazalo je da je ovaj virus nastao interspecijском rekombinacijom između SMV i *Bean common mosaic virus* (BCMV) (Shukla i sar., 1994; Desbiez i Lecoq, 2004). Smatra se da je do rekombinacije došlo u delu genoma koji kodira P1 protein i koji pokazuje 85% identičnosti sa BCMV, dok u ostalom, većem delu svog genoma WMV pokazuje visok stepen sličnosti sa SMV (Desbiez i Lecoq,

2004). U okviru populacije WMV dolazi i do intraspecijskih rekombinacija (Moreno i sar., 2004; Desbiez i Lecoq, 2008). Iako je često prevalentan u usevima tikava, dugo je zanemaran i smatran manje značajnim patogenom, zbog izazivanja veoma blagih simptoma na listovima, odsustvu simptoma na plodovima tikava i bez očiglednog uticaja na prinose i kvalitet plodova (Lecoq, 1992; Desbiez i sar., 2009). Međutim, pre dvadesetak godina u Evropi uočeni su izuzetno jaki simptomi na letnjoj tikvici forme cukini, prouzrokovani ovim virusom i od tada WMV privlači sve veću pažnju istraživača (Moreno i sar., 2004; Desbiez i sar., 2007, 2009).

Činjenica da se WMV javlja redovno u usevima tikava kod nas i da je često i najzastupljeniji virus tikava u Srbiji (Krstić i sar., 2002; Vučurović i sar., 2008, 2009a, 2009b), podstakla je ova istraživanja čiji cilj je bio: (i) utvrđivanje učestalosti pojave WMV na različitim vrstama tikava i na različitim lokalitetima tokom 2009. godine, kao nastavak kontinuiranog praćenja prisustva i rasprostranjenosti virusa tikava u našoj zemlji, (ii) razvijanje protokola za brzu i pouzdanu molekularnu detekciju WMV u prirodno zaraženim biljkama, (iii) utvrđivanje genetičke strukture populacije ovog virusa kroz određivanje stope genetičkog diverziteta u odnosu na izolate poreklom iz različitih delova sveta i (iv) rekonstrukcija filogenetskog stabla i određivanje mesta naših izolata u populaciji WMV u svetu.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka tikava

Tokom 2009. godine radi utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave WMV ukupno je pregledano 12 useva tikava na osam lokaliteta: Bački Petrovac, Budisava, Čenej, Srbobran, Zmajevo, Kisač, Sirig i Beška. Pregledani su usevi *Cucurbita pepo* cv. Olinka, *C. pepo* cv. Beogradska tikvica, *C. pepo* cv. Tosca (cukini forma), *C. maxima* i *C. moschata* pri čemu su sakupljena ukupno 583 uzorka koji su pokazivali simptome viroznih oboljenja.

Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA)

Uzorci tikava sa simptomima virusnih zaraza, sakupljenih tokom 2009. godine, testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA)

po protokolu koji su opisali Clark i Adams (1977) i uputstvu proizvođača (DSMZ, Germany) komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju odgovarajućih virusa. Uzorci su testirani na prisustvo šest najznačajnijih virusa tikava: WMV, CMV, ZYMV, SqMV, PRSV i *Tobacco ringspot virus* (TRSV), kako bi se utvrdile pojedinačne infekcije WMV ili mešane infekcije u koje je ovaj virus uključen. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 za sve testirane viruse, osim za CMV i PRSV kada su antitela razređena u odnosu 1:500, u odgovarajućem puferu. 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 očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcija na 405 nm dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole (komercijalno dostupna negativna kontrola i zdravo lišće tikava).

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije WMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata, čija je prethodna identifikacija obavljena DAS-ELISA testom, a koji su izolovani 2008. godine sa različitih lokaliteta i iz različitih biljaka domaćina: izolat 137-08 poreklom iz *C. pepo* cv. Olinka sa lokaliteta Kisač i 159-08 poreklom iz *C. maxima* sa lokaliteta Bački Petrovac.

Izolacija ukupnih RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka tikava obavljena je primenom RNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Za izolaciju ukupnih RNA iz lišća tikava korišćeno je 100 mg zamrznutog biljnog materijala prethodno čuvanog na -80°C. Ukupna izolovana RNA korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera WMVCPfwd/CPrev kojim se amplifikuje fragment cDNA finalne dužine oko 1017 bp i koji obuhvata deo gena za protein omotača virusa (CP) i deo 3' neprepisujućeg regiona (Duduk i sar., 2008).

Primenom OneStep RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača izvršena je

detekcija virusa mozaika lubenice. Reakciona smeša za RT-PCR (25 μ l) sadržala je: 5 μ l 5x Qiagen One-Step 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 (0,6 μ M finalne koncentracije), 14 μ l RNase-free vode i 1 μ l izolovane ukupne RNA. Kao negativna kontrola korišćena je DNase free voda, kao i ukupna RNA 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; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, elongacije 30 s na 50°C i ekstenzije 60 s na 72°C; finalna ekstenzija 72°C u trajanju od 10 min.

Dobijeni produkti cDNA su elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijumbromida finalne koncentracije 0,5 μ g/ml i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine od oko 1017 bp. Za određivanje veličine umnoženih fragmenata genoma WMV korišćen je marker, MassRulerTM DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Pre sekvencioniranja, PCR produkti izolata 137-08 i 159-08 prečišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification kita (Qiagen, Hilden, Germany) prateći uputstvo proizvođača. Uslužno sekvencioniranje urađeno je u BMR Genomics (Padova, Italy). Umnoženi

cDNA fragmenti odabranih izolata WMV sekvencionirani su u oba smera prajmerima koji su korišćeni za njihovo umnožavanje. Dobijene sekvence su obrađene u programu FinchTV Version 1.4.0., određene su konsenzus sekvence i podnete u National Center of Biotechnology Information (NCBI) banku podataka, posle čega im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number).

Poravnanje i međusobno poređenje dobijenih sekvenci urađeno je pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i softverskog paketa MEGA verzija 4.0 (Tamura i sar., 2007). Proračun genetičke sličnosti dobijenih sekvenci dela genoma izolata poreklom iz Srbije sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, kao i filogenetska analiza su urađeni korišćenjem istog MEGA programa. Za međusobno poređenje sekvenci WMV izolata dobijenih u toku ovog rada i sekvenci izolata iz NCBI baze podataka, odabrano je 19 izolata WMV. Parno poređenje nukleotidne i aminokiselinske divergentnosti određeno je na osnovu procenta identičnosti sekvenci u dužini od 658 nukleotida. Filogenetsko stablo rekonstruisano je na osnovu 57 delimičnih sekvenci CP gena (Tabela 1), koje su trimovane na 750 nukleotida, korišćenjem Neighbor-Joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa sojeva izolata u rekonstruisanom filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Kimura-2 parametra.

Tabela 1. Sekvence CP gena izolata *Watermelon mosaic virus* korišćene za filogenetske analize

Izolat	Geografsko poreklo	Domaćin	Pristupni broj	Referenca
SG99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579518	Moreno i sar., 2004.
SG99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579517	Moreno i sar., 2004.
SG99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579519	Moreno i sar., 2004.
SG99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579481	Moreno i sar., 2004.
BAD95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579503	Moreno i sar., 2004.
Tonga	Tonga	<i>Vanilla tahitensis</i>	L22907	Wang i sar., 1993.
USA	USA	/*	D13913	Quemada i sar., 1990.
/	Novi Zeland	/	AY995215	Wei i sar., 2009.
Pak	Pakistan	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	AB127934	Ali i sar., 2004.
C05-337	Francuska	<i>C. pepo (zucchini)</i>	EU660589	Desbiez i Lecoq, 2008.
BAD95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579502	Moreno i sar., 2004.
WMV-FR	Francuska	<i>C. pepo (zucchini)</i>	AY437609	Desbiez i Lecoq, 2008.
MAD95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579506	Moreno i sar., 2004.
MAD95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579507	Moreno i sar., 2004.
MAD95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579508	Moreno i sar., 2004.
MAD95.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579510	Moreno i sar., 2004.
MAD95.6	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579509	Moreno i sar., 2004.
MAD95.8	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579512	Moreno i sar., 2004.
ZAR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579483	Moreno i sar., 2004.
ZAR95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579484	Moreno i sar., 2004.
BAD95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579504	Moreno i sar., 2004.
ZAR99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579487	Moreno i sar., 2004.
ZAR99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579489	Moreno i sar., 2004.
MUR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579499	Moreno i sar., 2004.
MUR95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579501	Moreno i sar., 2004.
MAL99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579520	Moreno i sar., 2004.
MAL99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579522	Moreno i sar., 2004.
MAL99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579524	Moreno i sar., 2004.
MAD95.7	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579511	Moreno i sar., 2004.
MAD99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579513	Moreno i sar., 2004.
MAD99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579514	Moreno i sar., 2004.
MAD99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579515	Moreno i sar., 2004.
MAD99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579516	Moreno i sar., 2004.
BAR99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579492	Moreno i sar., 2004.

Izolat	Geografsko poreklo	Domaćin	Pristupni broj	Referenca
BAR99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579493	Moreno i sar., 2004.
BAR99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579494	Moreno i sar., 2004.
BAR99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579495	Moreno i sar., 2004.
BAR99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579496	Moreno i sar., 2004.
VAL95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579497	Moreno i sar., 2004.
VAL95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579498	Moreno i sar., 2004.
BAR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579491	Moreno i sar., 2004.
BAD95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579505	Moreno i sar., 2004.
MUR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579500	Moreno i sar., 2004.
MAL99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579523	Moreno i sar., 2004.
MAL99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579521	Moreno i sar., 2004.
ITA00-G	Italija	<i>C. pepo (zucchini)</i>	EU660590	Desbiez i Lecoq, 2008.
ZAR99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579486	Moreno i sar., 2004.
ZAR99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579485	Moreno i sar., 2004.
ZAR99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579488	Moreno i sar., 2004.
BAR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579490	Moreno i sar., 2004.
FMF00-LL2	Francuska	<i>C. pepo (zucchini)</i>	EU660578	Desbiez i Lecoq, 2008.
ZAR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579482	Moreno i sar., 2004.
Habenaria	Japan	<i>Habenaria radiata</i>	AB001994	Gara i sar., 1997.
WMV-CHN	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	DQ399708	neobjavljeno
WMV-HLJ	Kina	/	AY464948	neobjavljeno
137-08	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i>	GQ259958	Vučurović i sar., 2009a
159-08	Srbija	<i>Cucurbita maxima</i>	GU144020	ova istraživanja

* /-nema podataka

REZULTATI

Simptomi u polju

Simptomi uočeni 2009. godine na biljkama tika-va u polju bili su raznoliki i uključivali su mozaik, hlorotična prošaravanja i klobučavost na listovima, kao i prošaravanje i malformacije plodova. Na pojedinim lokalitetima, usled očiglednih ranih infekcija, uočene su biljke koje su zaostajale u porastu u odnosu na zdrave biljke, listovi zaraženih biljaka bili su veoma redukovane lisne površine što je dovodilo do nitavosti lista. Pored toga, česta je bila i pojava izrazite

deformisanosti i promene boje plodova. Međutim, biljke za koje je serološkim analizama dokazano da su zaražene WMV u pojedinačnim zarazama, nisu ispoljavale izražene simptome virusnih zaraza. Simptomi su se uglavnom manifestovali na lišću u vidu blagog zelenog mozaika (Slika 1), zadržavanja zelene boje oko nerava (Slika 2 i 3), što nije ometalo da listovi dostignu punu veličinu. Biljke u kojima je WMV dokazan u mešanim infekcijama pokazivale su intenzivnije simptome na lišću u vidu jakog šarenila (Slika 4), izraženog mozaika i uvijanja ivica lisne na gore (Slika 5), kao i promene na plodovima u vidu promene boje i pojave ispupčenja na površini (Slika 6).



Slika 1. WMV: zeleni mozaik



Slika 2. WMV: biljka sa blagim mozaikom i zadržavanjem zelene boje oko nerava



Slika 3. WMV: zadržavanje zelene boje oko nerava (detalj)



Slika 4. Mešana infekcija WMV i ZYMV: hlorotično šarenilo lišća



Slika 5. Mešana infekcija WMV i ZYMV: izraženi mozaik i uvijenost lišća



Slika 6. Mešana infekcija WMV i ZYMV: bradavičavost i promena boje ploda

Serološka detekcija

Ispitivanjima sprovedenim tokom 2009. godine prisustvo WMV u pojedinačnim infekcijama dokazano je u 64 uzorka (11%) u tri useva različitih lokaliteta: Srbobran, Sirig i Beška (Tabela 2). Samo na lokalitetu Srbobran WMV je detektovan u više od 50% testiranih uzoraka. Tokom 2009. godine nisu dokazane

mešane infekcije svim trima virusima prisutnim u Srbiji, a i procenat testiranih biljaka zaraženih mešanom infekcijom dva virusa bio je nizak. Mešana infekcija WMV i ZYMV dokazana je na pet lokaliteta u 9,9%, a WMV i CMV na lokalitetu Beška u samo 0,2% ukupno testiranih uzoraka.

Prisustvo PRSV, SqMV i TRSV nije dokazano ni u jednom testiranom uzorku tikava.

Tabela 2. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa mozaika lubenice (WMV) u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2009. godine

Genotip	Lokalitet	Broj useva	Broj uzoraka	Pojedinačne infekcije	Mešane infekcije	
				WMV*	ZYMV+ WMV	WMV+ CMV
<i>C. pepo</i> cv. Olinka	Bački Petrovac	1	3	0	0	0
	Budisava	1	111	0	13 (11,7)	0
	Čenej	1	104	0	2 (1,9)	0
	Srbobran	1	107	58 (54,2)**	37 (34,6)	0
	Zmajevo	1	105	0	0	0
	Kisač	1	110	0	0	0
<i>C. pepo</i> cv. Tosca	Bački Petrovac	1	1	0	0	0
<i>C. pepo</i> cv. Beogradska tikvica	Sirig	1	5	1 (20)	1 (20)	0
	Beška	1	25	5 (20)	5 (20)	1 (4)
<i>C. maxima</i>	Bački Petrovac	1	7	0	0	0
	Zmajevo	1	3	0	0	0
<i>C. moschata</i>	Bački Petrovac	1	2	0	0	0
Ukupno		12	583	64 (11)	58 (9,9)	1 (0,2)

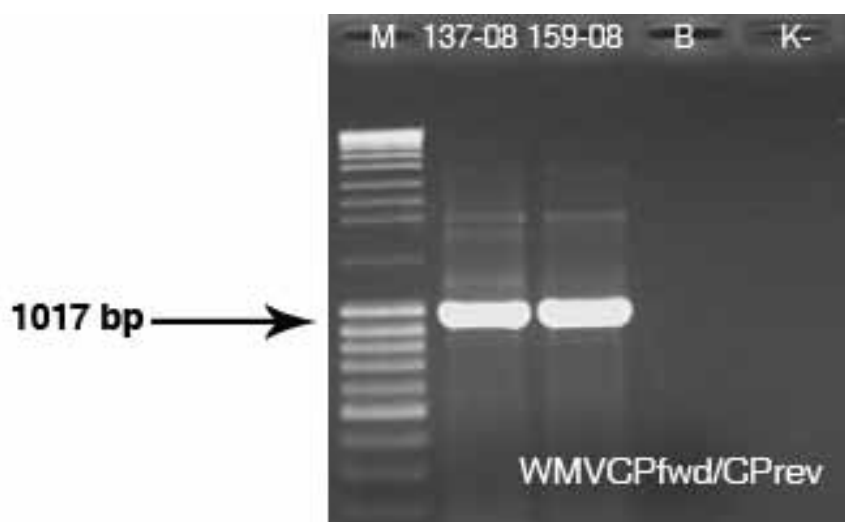
* *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV)

**broj pozitivnih uzoraka (procent zaraze)

Molekularna detekcija virusa mozaika lubenice

Rezultati seroloških analiza prisustva WMV u usevima tikava u Srbiji potvrđeni su molekularnom RT-PCR metodom uz korišćenje specifičnih prajmera WMVC-Pfwd/CPrev. Kod oba testirana uzorka (137-08 i 159-08) došlo je do uspešne amplifikacije regiona genoma

koji obuhvata deo CP gena i deo 3' neprepisujućeg regiona bez nespecifičnih reakcija. Uspešnost amplifikacije potvrđena je prisustvom pojedinačnog fragmenta veličine oko 1017 bp (Slika 7) kod oba ispitivana uzorka. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća uljane tikve, kao ni u negativnoj kontroli, odnosno PCR smeši sa vodom.



Slika 7. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem WMV specifičnog seta prajmera CPfwd/CPrev. Kolone: M – MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 2 – izolat 137-08 iz *C. pepo*, 3 – izolat 159-08 iz *C. maxima*, 4 – negativna kontrola - PCR mix sa vodom, 5 – negativna kontrola sa zdravim lišćem uljane tikve

Molekularna identifikacija i karakterizacija virusa mozaika lubenice

Po obavljenom sekvencioniranju konsenzus sekvence amplifikovanih cDNK produkata odabranih izolata WMV su deponovane u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojem GQ259958 za izolat 137-08 iz *Cucu-*

rbita pepo cv. Olinka (lokalitet Kisač) i GU144020 za izolat 159-08 iz *C. maxima* (lokalitet Bački Petrovac).

Molekularna identifikacija i karakterizacija odabranih izolata WMV iz Srbije je pokazala 99% međusobne identičnosti, a 99 do 94% identičnosti sa sekvencama 19 drugih izolata WMV deponovanih u NCBI bazi podataka (Tabela 3).

Tabela 3. Procenat identičnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale, istaknuto) ispitivanih izolata poreklom iz Srbije (istaknuto) i sekvenci nekih izolata *Watermelon mosaic virus* deponovanih u NCBI bazi podataka

Pristupni brojevi	GQ259958	GU144020	EU660578	AY437609	EU660590	GQ421160	GQ421159	GQ421156	AJ579521	AJ579490	AJ579523	AJ579486	AJ579485	AJ579488	AJ579496	AJ579491	AJ579482	AJ579494	AJ579524	AJ579498	EU660583
GQ259958*	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
GU144020	99.7	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
EU660578	99.5	99.5	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AY437609	99.1	99.1	99.2	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
EU660590	99.2	99.2	99.7	98.9	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
GQ421160	99.1	99.1	99.2	99.1	98.9	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
GQ421159	99.1	99.1	99.2	99.1	98.9	100	/	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
GQ421156	99.1	99.1	99.2	99.1	98.9	100	100	/	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579521	99.5	99.2	99.7	98.9	99.4	98.9	98.9	98.9	/	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579490	99.5	99.5	100	99.2	99.7	99.2	99.2	99.2	99.7	/	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579523	99.4	99.4	99.8	99.1	99.5	99.1	99.1	99.1	99.8	99.8	/	100	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579486	99.4	99.4	99.8	99.1	99.5	99.1	99.1	99.1	99.5	99.8	99.7	/	100	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579485	99.4	99.4	99.8	99.1	99.5	99.1	99.1	99.1	99.5	99.8	99.7	100	/	100	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579488	99.4	99.4	99.8	99.1	99.5	99.1	99.1	99.1	99.5	99.8	99.7	100	100	/	100	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579496	99.2	99.2	99.7	98.9	99.4	98.9	98.9	98.9	99.4	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	/	99.5	99.5	100	100	100	97.7
AJ579491	99.2	99.2	99.7	99.2	99.4	98.9	98.9	98.9	99.4	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	99.4	/	99.1	99.5	99.5	99.5	97.3
AJ579482	99.2	99.2	99.7	98.9	99.4	98.9	98.9	98.9	99.4	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	99.4	99.4	/	99.5	99.5	99.5	97.3
AJ579494	99.1	99.1	99.5	98.8	99.2	98.8	98.8	98.8	99.2	99.5	99.4	99.4	99.4	99.4	99.8	99.2	99.2	/	100	100	97.7
AJ579524	98.6	98.6	99.1	98.6	98.8	98.6	98.6	98.6	98.8	99.1	98.9	98.9	98.9	98.9	98.8	98.8	98.8	98.6	/	100	97.7
AJ579498	98.8	98.8	99.2	98.5	98.9	98.5	98.5	98.5	98.9	99.2	99.1	99.1	99.1	99.1	99.5	98.9	98.9	99.4	98.3	/	97.7
EU660583	93.6	93.9	93.8	93.3	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	93.8	93.6	93.6	93.6	93.6	93.5	93.5	93.5	93.3	92.9	93.6	/

* Pristupni brojevi sekvenci izolata *Watermelon mosaic virus* u NCBI bazi podataka

Poređenje sekvenci izolata 137-08 i 159-08 pokazalo je 99,7% sličnosti, sa razlikom u dva nukleotida, što nije uticalo na promenu aminokiselinskog sastava, tako da je identičnost aminokiselinske sekvence bila 100%. Najviši stepen identičnosti od 99,5%, sekvenca pod pristupnim brojem GQ259958 za izolat 137-08 pokazala je sa tri sekvence iz NCBI baze podataka: EU660578 (izolat FMF00-LL2 iz *C. pepo* cukini forma, iz Francuske), AJ579521 (izolat MAL99.2 iz *Cucumis melo* iz Španije) i AJ579490 (izolat BAR95.2 iz *Cucumis melo* iz Španije). Sekvenca izolata 159-08 pokazala je najviši stepen identičnosti od 99,5%, sa dve sekvence deponovane u NCBI bazi podataka: EU660578 i AJ579490. Sličnost sekvenci izolata poreklom iz Srbije sa sekvencama AJ579524 i AJ579498, poreklom iz *Cucumis melo* iz Španije, od 98,6%, odnosno 98,8% nije izazvala promene u aminokiselinskoj sekvenci, tako da je identičnost bila 100%. Najveću nukleotidnu različitost izolati iz Srbije pokazali su sa izolatom FMF03-141 pod pristupnim brojem EU660583 poreklom iz *C. pepo* (cukini forma) iz Francuske. Sličnost između ove sekvence i GQ259958 od 93,6% i 93,9% sa sekvencom GU144020 rezultirala je u 97,7% aminokiselinske sekvence (supstitucija 5 aminokiselina).

Filogenetska analiza

Filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbor-Joining metodom iz 750 bp fragmenta CP gena 57 odbačenih sekvenci prikazano je na slici 8, pri čemu su neke grane stabla sa izolatima koji nisu od značaja za ova ispitivanja kompresovane zbog bolje preglednosti. Filogenetsko stablo pokazuje jasno izdvajanje 3 molekularne grupe, odnosno grupisanje izolata WMV u tri genetička soja, što je podržano visokom homologijom između sekvenci iste grupe i visokim bootstrap vrednostima. Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa ustanovljena je veća varijabilnost unutar grupe III (0,042), nego grupe I (0,013) i grupe II (0,013). Intergrupna varijabilnost bila je najveća između grupa II i III (0,059), i nešto manja između grupa I i III (0,055) i I i II (0,052). Većina izolata, 39 iz Španije, tri iz Francuske i po jedan iz Italije i Pakistana, izdvojila se u grupu I. Ovoj grupi genetičkih sojeva pripala su i dva ispitivana izolata iz Srbije, 159-08 i 137-08. Drugu grupu čini pet izolata iz Španije, po jedan iz Tonge, SAD i Novog Zelanda. Trećoj grupi sojeva WMV pripali su izolat iz Japana i dva iz Kine.

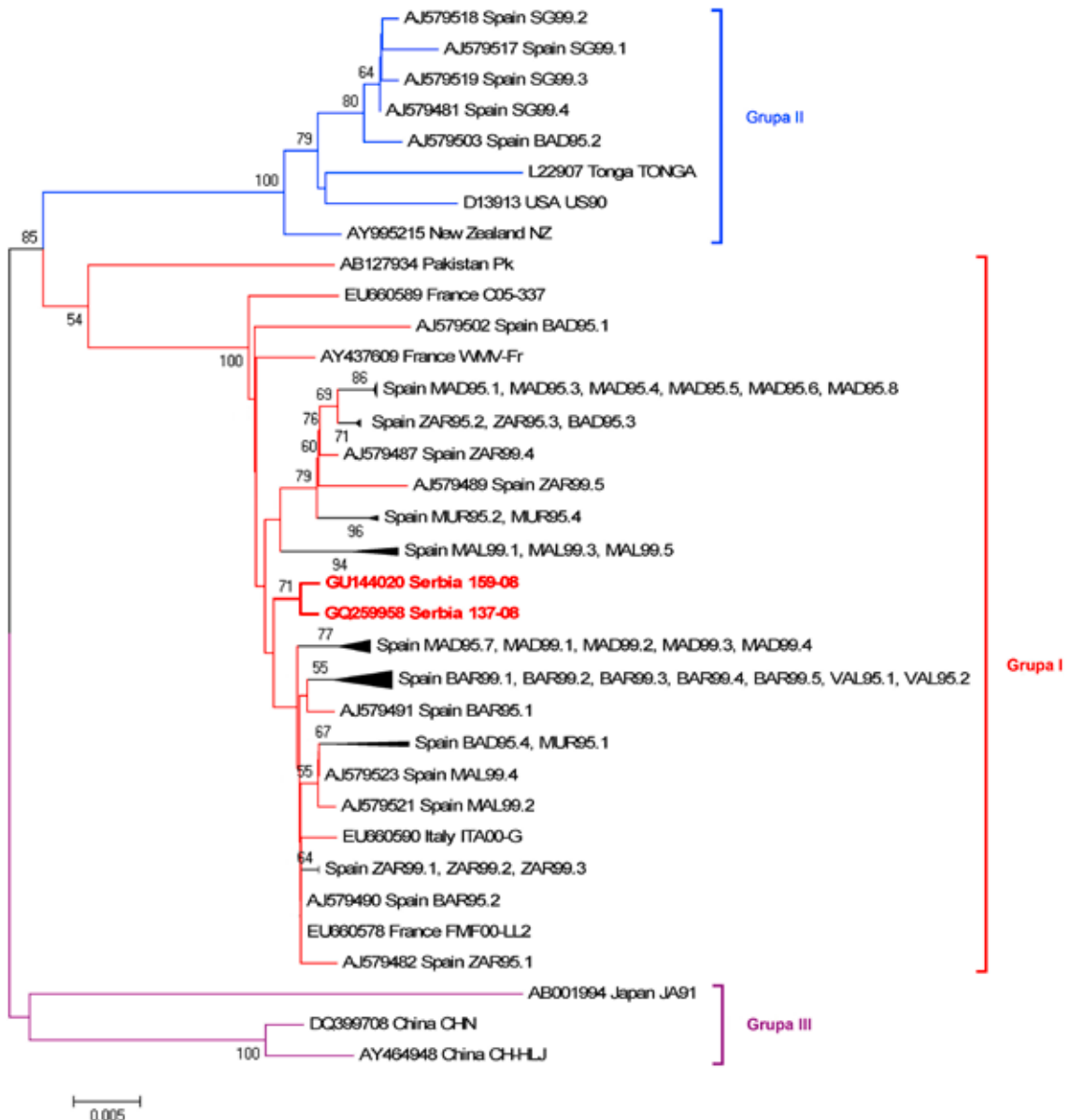
DISKUSIJA

Virus mozaika lubenice smatra se opšte rasprostranjenim virusom umereno toplih i tropskih regiona. U Evropi uglavnom je prisutan u zemljama mediteranskog regiona (Purcifull i sar., 1984; Desbiez i sar., 2007), mada je 2009. godine prvi put njegovo prisustvo otkriveno i u Poljskoj (Borodynko i sar., 2009). Ispitivanja sprovedena u Srbiji, nakon prvog nalaza ovog virusa na običnoj tikvi (Dukić i sar., 2001), pokazala su da se WMV redovno javlja u usevima raznih vrsta, varijeteta i formi tikava i da se njegova učestalost značajno menja u zavisnosti od godine i lokaliteta (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2006; Vučurović i sar., 2008, 2009a, 2009b).

Ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa u usevu uljane tikve, bundeve i vrga u Srbiji sprovedena 2007. godine pokazala su da je WMV bio najčešće detektovan virus (94,2%), da se javio u svim pregledanim lokalitetima, bilo u pojedinačnim (24,64%) ili u mešanim infekcijama CMV i ZYMV (69,56%). Sledeće, 2008. godine, bio je drugi po zastupljenosti (58,82%) posle ZYMV, javio se na svim lokalitetima, mada ne i u svim pregledanim usevima i uvek u mešanim, a najčešće infekcijama sva tri virusa (35,29%) (Vučurović i sar., 2009b). Tokom obe godine ispitivanja WMV je u svim usevima u kojima je dokazan bio zastupljen u izuzetno visokom procentu, čak i do 100%. Na osnovu istraživanja sprovedenih u prethodne dve godine (Vučurović i sar., 2008, 2009a, 2009b), kao i u ranijem periodu (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004) može se zaključiti da se WMV javlja svake godine, ali različite učestalosti i prilično visokim intenzitetom zaraze useva.

U istraživanjima nastavljenim tokom 2009. godine, od pregledanih 12 useva na 8 lokaliteta, virus je detektovan u pojedinačnim infekcijama samo u tri useva, a u mešanim infekcijama ZYMV u pet useva na različitim lokalitetima i jednom usevu u mešanoj infekciji sa CMV. WMV je dokazan i u relativno malom broju testiranih uzoraka (21,1%). Dobijeni rezultati ukazuju da je WMV bio prisutan u pojedinačnim i mešanim infekcijama u usevu tikava u Srbiji 2009. godine, slabije rasprostranjen u odnosu na prethodne dve godine i slabijom učestalošću, koja je samo u jednom usevu bila neznatno viša od 50%.

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., 2009b) iz čega se može zaključiti da ova tri ekonomski veoma značajna virusa tikava nisu prisutna u Srbiji. Uzimajući u obzir njihovu rasprostranjenost i značaj u svetu, neophodno je nastaviti sa naporima da se eventualna introdukcija detektuje.



Slika 8. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu delimičnih sekvenci CP gena 57 izolata WMV korišćenjem MEGA4 softvera i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja. Dužina grana je proporcionalna broju promena baznih parova. Izolati iz Srbije označeni su crvenom bojom.

Razlike u pojavi, rasprostranjenosti i učestalosti virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način zavise 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 2009. godine bila je iznenađujuća zbog pojave WMV u malom broju lokaliteta, malom broju useva i malom broju testiranih uzoraka. Za viruse tikava navodi se da su ne samo složeni već i izrazito promenljivi patološki sistemi zbog

stalne pojave novih vrsta ili sojeva u okviru vrste (Lecoq i sar., 2009). Složenosti ovog promenljivog sistema doprinosi i promena učestalosti virusa karakterističnih za određeni region, od prevalentnog statusa pojedinih godina do pojave u neznatnim razmerama. Dobijeni rezultati ukazuju na neophodnost daljih epidemioloških ispitivanja koja bi ukazala na razlog različitog nivoa zastupljenosti WMV u različitim godinama. Ispitivanja bi trebalo da budu, pre svega, u pravcu utvrđivanja

efikasnosti pojedinih vrsta vaši i praćenju njihove populacije, kao i praćenja njihove specifične efikasnosti vezane za pojedine viruse, jer su mnoge vrste biljnih vaši, koje se čak i ne razmnožavaju na tikvama, sposobne da prenose viruse. Najznačajnije vektorske vrste se razlikuju od regiona do regiona (Castel i sar., 1992; Palukaitis i sar., 1992). Iako WMV ima izrazito širok krug domaćina (Dijkstra, 1992; Shukla i sar., 1994), utvrđivanje najznačajnijih korovskih biljaka domaćina kao prirodnih rezervoara WMV, pored tikava i leguminoznih gajenih biljaka, takođe je jedan od bitnih epidemioloških faktora. Mada se uglavnom smatra da se WMV ne prenosi semenom gajenih tikava (Purcifful i sar., 1984; Shukla i sar., 1994), podatak o prenošenju WMV semenom *Cucurbita maxima* sa procentom zaraze od 0,5-6% (Fletcher i sar., 2000), upućuje na potrebu daljeg testiranja radi rasvetljavanja mogućnosti ovog načina širenja WMV. Poznavanje svih epidemioloških aspekata oboljenja koje virusi izazivaju u određenom regionu gajenja tikava može da doprinese razvoju programa integralne kontrole za useve tikava i strategija koje se mogu primeniti u kontroli uvođenja virusa u usev tikava. Molekularna epidemiologija omogućila je poslednjih godina rasvetljavanje mnogih epidemioloških pitanja, kao što su određivanje porekla i puteva introdukcije virusa, detektovanje promena u populaciji virusa i analizu interakcije virusa, patogena i biljke domaćina na različitim nivoima od pojedinačne biljke, useva ili regiona gajenja tikava (Lecoq i sar., 2009). Zbog toga je deo ovih istraživanja, osim razvijanja protokola za brzu i pouzdanu molekularnu detekciju WMV u prirodno zaraženim biljkama, uključio i molekularnu karakterizaciju izolata WMV poreklom iz Srbije.

WMV je jedan od prvih *Potyvirus*-a opisan kao patogen biljaka iz familije Cucurbitaceae (Webb i Scott, 1965), jedan od ekonomski najznačajnijih članova *Potyvirus* roda, vrlo često najzastupljeniji virus u usevima različitih vrežastih kultura (Lecoq, 1992; Grafton-Cardwell i sar., 1996) i virus kod koga je u poslednjoj deceniji zabeležena pojava novih i bitno drugačijih izolata koji izazivaju neobično izražene simptome na lišću i plodovima i na taj način imaju izraženiji uticaj na prinos i kvalitet plodova (Moreno i sar., 2004; Desbiez i sar., 2007, 2009). Zbog toga je uspostavljanje brze i pouzdane molekularne metode bilo neophodno ne samo za detekciju WMV, već i za praćenje varijabilnosti u okviru populacije WMV u Srbiji i detektovanje virulentnijih sojeva virusa, ako se pojave na prostorima naše zemlje. U tom smislu primenjena RT-PCR metoda uz upotrebu specifičnih prajmera WMVCPfwd/CPprev pokazala se uspešnom za detekciju i identifikaciju izolata WMV iz Srbije.

Prema predlogu Adamsa i sar. (2005) da 76-77% nukleotidne identičnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Potyvirus* i prema predlogu Aleman-Verdaguera i sar. (1997) i Shukla i Warda (1989) da je identičnost aminokiselinske sekvence između izolata istog *Potyvirus*-a veća od 90%, a između različitih vrsta manja od 70%, potvrđeno je da proučavani izolati iz *Cucurbita pepo* cv. Olinka i *C. maxima* iz Srbije pripadaju vrsti *Watermelon mosaic virus*. BLAST analiza je pokazala 99% međusobne identičnosti ispitivanih sekvenci, a 99 do 94% nukleotidne identičnosti sa dostupnim sekvencama drugih izolata WMV deponovanih u NCBI bazi podataka.

Ispitivani izolati WMV poreklom iz različitih vrsta tikava i sa različitih lokaliteta pokazali su visok stepen nukleotidne sličnosti, odnosno nizak stepen genetičkog diverziteta koji je rezultirao u 100% identičnosti aminokiselinske sekvence, što govori da postojeće supstitucije dva nukleotida nisu od evolutivnog značaja. Identičnost sekvenci od 99,5% između izolata WMV iz Srbije sa tri, odnosno dve sekvence deponovane u NCBI bazi podataka, odnosno razlika u broju nukleotida od tri, takođe nije rezultovala promenom aminokiselinskog sastava ispitivanog dela sekvence CP gena od 658 nukleotida. Supstitucija devet, odnosno osam nukleotida uočena poređenjem sekvenci ispitivanih izolata i dve deponovane sekvence u NCBI bazi podataka čija je nukleotidna sličnost bila niža od 99% (98,6%, odnosno 98,8%), takođe se nije nalazila na mestima koja bi izazvala kvalitativnu promenu aminokiselina, tako da je aminokiselinski sastav pokazao 100% identičnosti. Najniži stepen homologije ispitivanih izolata od 93,6% i 93,9% nukleotidne identičnosti (97,7% aminokiselinske identičnosti) ispoljen je sa sekvencom izolata iz letnje tikvice cugini forme (EU660583) iz Francuske.

Rezultati analize sekvenci dva izolata WMV iz različitih biljnih vrsta i različitih lokaliteta poreklom iz Srbije potvrđuju činjenicu da je populacija ovog virusa visoko homogena, sa niskim genetičkim diverzitetom nukleotidne sekvence CP regiona genoma koji je odgovoran za sintezu proteina omotača. Nije utvrđeno ni prostorno diferenciranje ova dva izolata, ni diferenciranje u odnosu na biljku domaćina. Proučavajući veći broj izolata WMV iz dinje sa različitih lokaliteta, Moreno i sar. (2004) su, na osnovu reakcija niza domaćina, utvrdili postojanje jednog patotipa u okviru populacije ovog virusa u Španiji i na osnovu analize sekvenci tri genoma regiona, visok stepen homologije sekvenci gena za PI protein, gena za cilindrične inkluzije (CI) i gena za protein omotača (CP), što je ukazalo da populaciju WMV čine izolati koji su genetički veoma uniformni.

Analizirajući sekvence CP gena 18 izolata iz Irana, Sharifi i sar. (2008) su, takođe, utvrdili visok stepen homologije između ispitivanih sekvenci, koja se za 17 sekvenci kretala od 99,9 do 96,1% identičnosti, a samo sekvenca jednog izolata pokazala je niži stepen nukleotidne identičnosti od 94,9% do 92,7% u odnosu na ostale sekvence.

Iako je WMV široko rasprostranjen i često prevalentan virus u usevu, dugo je smatran manje značajnim patogenom svojih biljaka domaćina. Iz tog razloga, varijabilnost i struktura populacije ovog virusa su slabije proučavani (Lecoq, 1992). Međutim, pojava virulentnije populacije WMV u usevu *C. pepo* cukini forme u Francuskoj, koja je izazvala drastične simptome, podstakla je intenzivnija proučavanja WMV u cilju razumevanja mogućeg porekla jakih sojeva u odnosu na evoluciju i prostorne i vremenske izmene ove dve različite populacije WMV (Desbiez i sar., 2007).

Rekonstruisano filogenetsko stablo jasno pokazuje 3 različite grupe, koje odgovaraju genetičkim sojevima WMV. Saglasno rezultatima ovih ispitivanja, kao i ispitivanjima drugih autora (Moreno i sar., 2004; Sharifi i sar., 2008) najveći broj izolata WMV pripada grupi I, pa se smatra da su izolati ove grupe najrasprostranjeniji u svetu. Ovoj grupi, pored većine izolata iz Evrope, pripadaju i dva ispitivana izolata iz Srbije. Međutim, ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su da molekularnoj grupi II pripadaju izolati WMV iz udaljenih delova sveta, čak sa tri kontinenta. Analiza sekvenci celog ili šireg regiona CP gena, koji uključuje i N-terminalni (NIb) deo CP gena (Desbiez i sar., 2007; Sharifi i sar., 2008), kao i filogenetske analize zasnovane na genu za CI i P1 proteine (Moreno i sar., 2004; Desbiez i sar., 2007) pokazale su da se izolati sa dva ili tri različita kontinenta nalaze u svakoj od tri molekularne grupe, potvrđujući da molekularno grupisanje izolata WMV nije u korelaciji sa njihovim geografskim poreklom.

Moreno i sar. (2004) utvrdili su da evropski izolati izvan prve grupe sojeva pripadaju grupi sojeva II, ali za sada su u ovoj grupi samo izolati poreklom iz Španije. Trećoj grupi sojeva od evropskih izolata WMV pripada samo izolat FMF00-LL1 iz Francuske (Desbiez i sar., 2007). Pojava evropskog izolata u trećoj grupi sojeva WMV usko je vezana sa pojavom veoma destruktivnih i izraženih simptoma na tikvicama forme kukuruz. Smatra se da je verovatnije da je ovaj izolat na evropski kontinent došao putem nove introdukcije, nego da je nastao evolucijom lokalnih populacija ovog virusa.

Vrednost genetičke udaljenosti između izolata u okviru I i II grupe relativno je niska, što ukazuje na nizak nivo različitosti, dok više vrednosti genetičke udaljenosti između izdvojenih grupa sojeva ukazuju na

viši stepen divergentnosti i potvrđuju grupisanje u filogenetskom stablu. Prosečna vrednost genetičke udaljenosti unutar III grupe sojeva je viša u odnosu na grupe I i II, i nešto je niža od vrednosti između grupa. Viši stepen divergentnosti u okviru III grupe može biti rezultat starije populacije izolata WMV. Po teoriji, očekuje se da starije populacije imaju veći genetski diverzitet od mlađih (Garcia-Arenal i sar., 2001).

Slična situacija, nemogućnost uočavanja jasne genetičke strukture populacije, javlja se i kad je u pitanju ZYMV, takođe *Potyvirus* i značajni patogen tikava (Desbiez i sar., 2002). Izvesno grupisanje izolata na osnovu geografskog porekla koje ukazuje na migraciju virusa i uticaj različitih evolutivnih faktora na formiranje današnje populacije virusa, uočeno je za PRSV, treći *Potyvirus* koji je infektivan za biljke iz familije Cucurbitaceae (Bateson i sar., 2002), ali za sada takve informacije nisu dostupne za WMV. Svi ovi podaci ukazuju na neophodna dalja izučavanja genetičke strukture populacije WMV i definisanje novih kriterijuma, uključujući proučavanje drugih delova genoma ovog virusa, kako bi se pronašli oni koji najbolje reflektuju već uočenu razliku u patogenim osobinama različitih izolata. Zbog toga je određivanje varijabilnosti u okviru populacije ovog virusa i drugih virusa infektivnih za tikve u Srbiji veoma značajno za bolje poznavanje epidemiologije ovih patogena, a sve u cilju osmišljavanja i sprovođenja što efikasnijih mera kontrole, kao i prevencije mogućih novih introdukcija u našu zemlju usled veoma intenzivne razmene biljnog materijala.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta BTR 200089 „Unapređenje sortimenta, tehnologije proizvodnje i primarne dorade uljane tikve-golice i nevena“, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Adams, M.J., Antoniw, J.F. and Fauquet, C.M.*: Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. Archives of Virology, 150: 459-479, 2005.
- Aleman-Verdaguer, M.E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R.N. and Fauquet, C.*: Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. Journal of General Virology, 78: 1253-1264, 1997.

- Ali, A., Natsuaki, T. and Okuda, S.:** Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. *Journal of Phytopathology*, 152: 677-682, 2004.
- 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.
- Bateson, M.F., Lines, R.E., Revill, P., Chaleprom, W., Ha, C.V., Gibbs, A.J. and Dale, J.L.:** On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ring-spot virus. *Journal of General Virology*, 83: 2575-2585, 2002.
- Bavec, F., Grobelnik Mlakar, S., Rozman, Č. and Bavec, M.:** Oil pumpkins: Niche for organic producers. In: *Trends in New Crops and New Uses* (Janick J., Whipkey A., eds.), ASHS Press, Alexandria, VA., 2007, pp. 185-189.
- Berenji, J.:** Poznavanje tikava *Cucurbita sp.* Zbornik referata 3. Poljedelski dnevi ABC Pomurka, Murska Sobota, 1988, str. 24-27.
- Berenji, J.:** Tikve – hrana, lek i ukras. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 31: 63-75, 1999.
- Berenji, J.:** Breeding, production, and utilization of oil pumpkin in Yugoslavia. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 23: 105-109, 2000.
- Berenji, J.:** Hemijska, nutritivna i farmakološka vrednost uljane tikve-golica (*Cucurbita pepo* L.). Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 43: 149-159, 2007.
- Berenji, J.:** Uljana tikva i njena proizvodnja. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 2010, str. 1-63.
- Blanchard, D., Lecoq, H. and Pitrat, M.:** A Color Atlas of Cucurbit Diseases. Manson Publishing/John Wiley, New York, 1994.
- Borodynko, N., Hasiów-Jaroszewska, B., Rymelska, N. and Pospieszny, H.:** Watermelon mosaic virus reported for the first time in Poland. *Plant Pathology*, 58: 783, 2009.
- Castel, S.J., Perring, T.M., Farrar, C.A. and Kishaba, A.N.:** Field and laboratory transmission of watermelon virus 2 and zucchini yellow mosaic virus by various aphid species. *Phytopathology*, 82: 235-240, 1992.
- 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.
- Desbiez, C. and Lecoq, H.:** The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Archives of Virology*, 149: 1619-1632, 2004.
- Desbiez, C. and Lecoq, H.:** Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*). *Archives of Virology*, 153: 1749-1754, 2008.
- Desbiez, C., Costa, C., Wipf-Scheibel, C., Girard, M. and Lecoq, H.:** Serological and molecular variability of watermelon mosaic virus (genus *Potyvirus*). *Archives of Virology*, 152: 775-781, 2007.
- Desbiez, C., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C. and Lecoq, H.:** Emergence of new strains of *Watermelon mosaic virus* in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. *Virus Research*, 141: 201-208, 2009.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H.:** Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. *Virus Research*, 85: 5-16, 2002.
- Dijkstra, J.:** Importance of host range and other biological properties for the taxonomy of plant viruses. *Archives of Virology (Suppl)*, 5: 279-289, 1992.
- Duduk, N., Finetti Sialer, M.M., Gallitelli, D. i Krstić, B.:** Unapređenje detekcije virusa mozaika lubenice dizajniranjem novih prajmera. Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2008, str. 99.
- 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., Papavassilious, C., Berenji, J. i Vico, I.:** Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2001, str. 85.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavassilious, C. and Berenji, J.:** Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Science*, 47: 149-160, 2002.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavassilious, C. and Berenji, J.:** First Report of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Bottlegourd (*Lagenaria siceraria*) in Serbia. *Plant Disease*, 90: 380, 2006.
- Fletcher, J.D., Wallace, A.R. and Rogers, B.T.:** Potyvirus in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV2 virus infections. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 17-26, 2000.
- Fruhvirth, G.O. and Hermetter, A.:** Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 1128-1140, 2007.

- Gara, I.W., Kondo, H., Maeda, T., Inouye, N. and Tamada, T.:** Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of *Watermelon mosaic virus*. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 63: 113-117, 1997.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J.M.:** Variability and genetic structure of plant virus populations. Annual Review of Phytopathology, 39: 157-186, 2001.
- Ghorbani, S.:** Isolation of Zucchini yellow mosaic virus in the Tehran province. Iranian Journal of Plant Pathology, 24: 13-15, 1988.
- Grafton-Cardwell, E.E., Perring, T.M., Smith, R.F., Valencia, J. and Farrar, C.A.:** Occurrence of mosaic viruses in melons in Central Valley of California. Plant Disease, 80: 1092-1097, 1996.
- 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 viruses of cucurbits in Florida. Florida Cooperative Extension Service Circular, No. 1184. University of Florida, Gainesville, 1997, pp. 11.
- Lecoq, H.:** Les virus des cultures de melon et de courgette de plein champ (I). PHM Revue Horticole, 324: 15-25, 1992.
- Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C. and Girard, M.:** Potential involvement of melon fruit in long distance dissemination 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 overview. Virus Research, 141: 190-200, 2009.
- Lovisol, O.:** Virus and viroid diseases of cucurbits. Acta Horticulturae, 88: 33-71, 1980.
- Mansour, A. and Al-Musa, A.:** Incidence, economic importance and prevention of watermelon mosaic virus-2 in squash (*Cucurbita pepo*) fields in Jordan. Phytopathologische Zeitschrift, 103: 35-40, 1982.
- Momirović, N., Oljača, S., Vasić, G., Kovačević, D. i Radošević, Z.:** Effects of intercropping pumpkins (*Cucurbita maxima* DUCH.) and maize (*Zea mays* L.) under different farming systems. Proceedings of the 2nd Balkan Symposium on Field Crops, Novi Sad, 1998, pp. 251-254.
- Moreno, I.M., Malpica, J.M., Diaz-Pendon, J.A., Moriones, E., Fraile, A. and Garcia-Arenal, F.:** Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. Virology, 318: 451-460, 2004.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B.:** Cucumber mosaic virus. Advances in Virus Research, 41: 281-348, 1992.
- Popović, M.:** Povrtarstvo. Nolit, Beograd, 1991, str. 1-431.
- Providenti, R.:** Diseases caused by viruses. In: Compendium of Cucurbit Diseases (Zitter T.A., Hopkins D.L., Thomas C.E., eds), St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, 1996, pp. 37-45.
- Providenti, R. and Schroeder, W.T.:** Epiphytotic of watermelon mosaic among Cucurbitaceae in Central New York in 1969. Plant Disease Reporter, 54: 744-748, 1970.
- Purcifull, D.E., Hiebert, E. and Edwardson, J.:** Watermelon mosaic virus 2. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 293, Kew, Surrey (GB), 1984.
- Quemada, H., Seiu, L.C., Siemieniak, D.R., Gonsalves, D. and Slighton, J.L.:** Watermelon mosaic virus 2 and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences and phylogenetic relationships. Journal of General Virology, 71: 1451-1460, 1990.
- Sevik, M.A. and Arli-Sokmen, M.:** Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. Plant Disease, 87: 341-344, 2003.
- Sharifi, M., Massumi, J.H., Hosseini Pour, A., Shaabani, M. and Rahimian, H.:** Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. Virus Genes, 37: 304-313, 2008.
- Shukla, D.D. and Ward, C.W.:** Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Archives of Virology, 106: 171-200, 1989.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. and Brunt, A.A.:** The Potyviridae. CAB INTERNATIONAL, Wellingford, UK, 1994, pp. 1-528.
- Stakić, D. i Nikolić, V.:** Virus mozaika lubenice – novo virožno oboljenje u Jugoslaviji. Savremena poljoprivreda, 3: 289-302, 1966.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.:** MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599, 2007.
- Tóbiás, I. and Tulipán, M.:** Results of virological assay on cucurbits in 2001. Növényvédelem, 38(1): 23-27, 2002.
- Tošić, M., Providenti, R., Vujić, S. i Krnjaja, V.:** Contribution to the study of viral diseases of cucumber in Yugoslavia. Zaštita bilja, 47: 343-349, 1996.
- Ullman, D.E.:** Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. Plant Disease, 75: 367-370, 1991.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J. i Krstić, B.:** Virusi – stalni problem u sevu 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., Jović, J., Krnjajić, S. i Krstić, B.:** *Watermelon mosaic virus* – destruktivni patogen uljane tikve u Srbiji. Zbornik

rezimea VI kongresa o zaštiti bilja sa Simpozijumom o biološkom suzbijanju invazivnih organizama, Zlatibor, 2009a, str. 46-47.

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, 2009b.

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, 2009c.

Zitter, T.A.: Cucurbit diseases. In: *Compendium of Cucurbit Diseases* (Zitter T.A., Hopkins D.L., Thomas C.E., eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1996, pp. 1-2.

Wagner, F.S.: The health value of styrian pumpkin seed oil-science and fiction. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 23: 122-123, 2000.

Wang, Y.Y., Beck, D.L., Gardner, R.C. and Pearson, M.N.: Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of watermelon mosaic virus II. *Archives of Virology*, 129: 93-103, 1993.

Webb, R.E. and Scott, H.A.: Isolation and identification of watermelon mosaic virus 1 and 2. *Phytopathology*, 55: 895-900, 1965.

Wei, T., Pearson, M.N., Blohm, D., Nölte, M. and Armstrong, K.: Development of a short oligonucleotide microarray for the detection and identification of multiple potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 162: 109-118, 2009.

Frequency and Molecular Characterization of Watermelon Mosaic Virus from Serbia

SUMMARY

Watermelon mosaic virus (WMV) is widespread in cucurbit crops, most commonly occurring in temperate and Mediterranean regions. In Serbia WMV has been detected in single and mixed infections with *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in field-grown pumpkin and squash crops. Among pumpkin-affecting viruses WMV is the most frequent one, both by the number of localities and its incidence at each location. During the growing season of 2009, samples from 583 plants of *Cucurbita pepo* cvs. Olinka, Belgrade zucchini and Tosca (Zucchini group), as well as from *C. maxima* and *C. moschata* showing symptoms of virus infection were collected from 12 commercial fields at eight localities and analyzed by DAS-ELISA using polyclonal antisera specific to six most important cucurbit viruses. Interestingly, WMV was detected at fewer sites and had lower incidence rate than in two previous years. In single infections, WMV was found in 11% of tested plants in three fields; in mixed infections with ZYMV, it was recorded in 9.9% of plants in five fields and with CMV in only 0.2% in one field. The partial coat protein gene and 3' non-translated region from two representative isolates of WMV originating from different localities and host plant species were amplified by RT-PCR, sequenced, and compared with the sequences available in GenBank database. The PCR-amplified fragment of predicted size of approximately 1017 bp was obtained. The sequences of isolates 137-08 (Acc. No. GQ259958) and 159-08 (GU144020) proved to be 94-99% identical at the nucleotide level with those from other parts of the world. The sequences of these two isolates differed from each other only at two nucleotide positions, without any amino acid substitution. Phylogenetic analysis of 57 isolates based on 750 bp sequences of the coat protein gene showed no correlation between isolates and their geographic origin, and it also indicated that these isolates fell into three molecular groups of strains. Serbian WMV isolates belong to group I, the most widespread group of isolates of this virus in the world.

Keywords: Pumpkin; *Watermelon mosaic virus*; Molecular identification; Genetic diversity; Phylogeny