

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Katarina N. Milojević

**BIOLOŠKA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA VIRUSA MOZAIKA
KRSTAVCA (*Cucumber mosaic virus*)
U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Katarina N. Milojević

**BIOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Cucumber
mosaic virus* IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor:

dr Branka Krstić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Ivana Stanković, docent
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Smilja Teodorović, vanredni profesor
Kriminalističko-polijska akademija, Beograd

dr Ferenc Bagi, vanredni profesor
Univerzitet u Novom Sadu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Posebnu zahvalnost želim da izrazim svom mentoru dr Branki Krstić, red. prof., koja me je uvela u svet biljne virusologije i pružila neizmernu podršku, znanje i iskustvo, ne samo u izradi doktorske disertacije, već uopšte u naučnom radu. Zahvalna sam joj na strpljenju i razumevanju i ponasna sam što mi je dr Branka Krstić bila mentor.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Stanković, doc. i dr Aleksandri Bulajić, red. prof. na uloženom trudu, brojnim stručnim savetima, diskusijama i podršci koju su mi pružile tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i dr Smilji Teodorović, vanr. prof. i dr. Ferenc Bagiju, vanr. prof. na pomoći i sugestijama.

Takođe, želim da izrazim svoju zahvalnost kolegama, dr Ani Vučurović, naučnom saradniku, dr Danijeli Ristić, naučnom saradniku, Dušanu Nikoliću, dipl. inž. i Dragani Đurić, teh. saradniku zbog njihove podrške i pomoći koju su pružili tokom istraživanja i stvaranja ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici koja je tokom svih ovih godina uvek bila uz mene, jer bez nje ne bih bila ono što sam danas. Hvala vam za trud i razumevanje koje mi i dalje pružate.

Na kraju se zahvaljujem suprugu Radetu na ogromnoj podršci, izuzetnom strpljenju, stabilnosti i miru, kao i na ljubavi koju mi svakodnevno pruža.

BIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VIRUSA MOZAIKA KRSTAVCA (*Cucumber mosaic virus*) U SRBIJI

Rezime. Serološkim analizama primenom DAS-ELISA testa, u periodu od 2010. do 2013. godine, prisustvo virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) utvrđeno je u 29,68% testiranih uzoraka poreklom iz 32 različite vrste, varijeteta ili sorte povrtarskih, industrijskih, ukrasnih i korovskih biljaka sa 74 lokaliteta. U okviru ovih ispitivanja *Tulipa* sp. i *Peperomia tuisana* prvi put su otkrivene kao domaćini u našoj zemlji, a *Wisteria sinensis* i *Stenactis annua* su otkrivene kao novi domaćini CMV ne samo kod nas, već i u svetu.

Analiza genetičke strukture prirodne populacije CMV u Srbiji na osnovu biološke i molekularne karakterizacije obuhvatila je 44 odabrana izolata poreklom sa različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti sakupljenih na 30 lokaliteta tokom ovih istraživanja, kao i izolate iz prethodnih istraživanja iz perioda 2007-2009. godine. Molekularna karakterizacija na osnovu analize sekvence CP gena obuhvatila je 44 izolata, dok su molekularna proučavanja na osnovu analize sekvenci 2a, 2b i MP gena obuhvatila 19 izolata, a 1a gena 15 izolata CMV. Tokom ovih istraživanja uspostavljeni su ili unapređeni protokoli za amplifikaciju svih pet genskih regiona izolata CMV poreklom iz naše zemlje.

Stepen nukleotidne i aminokiselinske sličnosti, kao i filogenetske analize pokazale su varijabilnost prirodne populacije CMV u Srbiji kod četiri od pet genskih regiona. Najveća varijabilnost utvrđena je analizom dela 1a gena (grupisanje u tri podgrupe, IA, IB i II), delova MP i CP gena kao i celog 2b gena (grupisanje u dve podgrupe, IA i II), dok je analiza dela 2a gena pokazala homogenost populacije CMV i grupisanje svih ispitivanih izolata u IA podgrupu. Na osnovu filogenetskih analiza sekvenci pojedinačnih genskih regiona RNK 1, 2 i 3, kao i sekvenci RNK 3 i RNK 2 segmenta utvrđeno je prisustvo rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u populaciji ovog virusa u Srbiji i identifikovano šest različitih haplotipova. Najveći broj izolata po svim genskim regionima pripada IA podgrupi (haplotip: IA; IA-IA; IA-IA). Po brojnosti sledi haplotip: II; IA-II; II-II zastupljen sa tri izolata, dok su preostala četiri haplotipa utvrđeni kod pojedinačnih izolata (haplotip: IA; IA-IA; IA-II, haplotip: IB;

IA-IA; IA-IA, haplotip: II; IA-IA; II-II i haplotip: IB; IA-II; IA-IA). Ni jedan od ispitivanih izolata po svim genskim regionima ne pripada IB ili II podgrupi.

Primenom RFLP analize „*in silico*“ odabrani su restrikcioni enzimi tako da je uspostavljen brz i pouzdan protokol za karakterizaciju CMV. RFLP analizom „*in situ*“ potvrđeno je filogenetsko grupisanje, a isključeno je prisustvo mešanih infekcija i time potvrđeno postojanje rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u Srbiji.

Primenom RDP softvera analizirane su sekvence RNK 2 segmenta i potvrđeno je da su četiri izolata prirodni rekombinanti između IA (2a gen) i II (2b gena) podgrupa, a analiza sekvenci RNK 3 segmenta potvrdila je da je jedan izolat prirodni rekombinant između IA (MP gen) i II (CP gen) podgrupa CMV. Analiza prirodne selekcije, primenom „*codon-based*“ Z-testa, pokazala je da na sve testirane genske regione i parove sekvenci CMV deluje negativna selekcija, sa izuzetkom jednog para sekvenci CP gena, na koji utiče slaba pozitivna selekcija.

Biološka karakterizacija ukazala je na priličnu fenotipsku varijabilnost populacije CMV u Srbiji, pri čemu nije bilo moguće povezati fenotipske osobine sa genotipskim razlikama između podgrupa ispitivanih izolata.

Po prvi put u Srbiji, detektovano je prisustvo satRNK CMV koja je ispoljila genetičku varijabilnost. Dva izolata satRNK CMV se na osnovu filogenetskih analiza grupišu sa nekrogenim izolatima, a jedan sa običnim izolatima satRNK CMV.

Rezultati ovih istraživanja predstavljaju prva detaljnija saznanja o strukturi populacije i genetičkom diverzitetu CMV u našoj zemlji, kao i o evolutivnim mehanizmima koji oblikuju variranje i stepen promena u okviru populacije. Dobijeni rezultati omogućavaju dalji rad na izučavanju diverziteta ne samo ovog već i drugih ekonomski važnih fitopatogenih virusa u našoj zemlji.

Ključne reči: virus mozaika krastavca, struktura populacije, filogenetske analize, rekombinacije, pseudorekombinacije, RFLP analiza, RDP analiza, selekcionni pritisak, biološka karakterizacija, satRNK.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.38:635.05(043.3)

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cucumber mosaic virus* IN SERBIA

Abstract. During the period from 2010 to 2013, the serological analysis, using DAS-ELISA, detected the presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in 29,68% of tested samples originating from 32 different species, varieties or cultivars of vegetables, industrial crops, ornamentals and weeds collected at 74 localities. *Tulipa* sp. and *Peperomia tuisana* are discovered as new host plants of CMV in Serbia, while *Wisteria sinensis* and *Stenactis annua* are detected as two new natural host plants worldwide.

Analysis of genetic structure of CMV population in Serbia is based on biological and molecular characterization of 44 selected isolates from different host plants collected during this research at 30 localities, or collected in previous investigation during from 2007 to 2009. The molecular characterization based on the sequence analysis of CP gene included 44 isolates, while analysis of 2a, 2b and MP genes included 19 isolates and the analysis of 1a gene included 15 isolates of CMV. During this studies, the protocols for molecular amplification of all five genomic regions of CMV isolates from Serbia were either established or improved.

Nucleotide and amino acid sequence identity, as well as phylogenetic analyses showed variability in four out of five genomic regions of CMV population in Serbia. The highest variability was determined within the partial 1a gene (grouping into three subgroups, IA, IB and II), partial MP and CP genes and the complete 2b gene (grouping into two subgroups IA and II), while sequence analysis of the partial gene 2a showed that CMV population is homogeneous, and all isolates grouped within IA subgroup. Phylogenetic analysis of particular genetic regions of RNA 1, 2 and 3, as well as combined genetic regions of RNA 3 and RNA 2, revealed the presence of recombinants and reassortments within the population of CMV in Serbia and identified the presence of six different haplotypes. Based on the analysis of all genes, the majority of the isolates from Serbia belong to subgroup IA (haplotype: IA; IA-IA; IA-IA), followed by haplotype: II; IA-II; II-II represented by three isolates, while other haplotypes were represented by single isolates (haplotype: IA; IA-IA; IA-II, haplotype: IB; IA-IA; IA-IA, haplotype: II; IA-IA; II-II, and haplotype: IB; IA-II; IA-IA). Based on the analysis of all five genes, neither of the investigated isolates belongs to IB or II subgroup.

In silico RFLP analysis were used for the selection of suitable restriction enzymes which were used in fast and reliable protocols for the characterization of CMV, developed during this research. Furthermore, *in situ* RFLP analysis confirmed the phylogenetic grouping of Serbian CMV isolates and excluded the presence of mixed infection establishing the existence of recombinants and reassortments in CMV population in Serbia.

Sequence analysis of RNA 2 segment using RDP software confirmed that four isolates represents the natural recombinants between IA (2a gene) and II (2b gene) subgroups, while the analysis of RNA 3 segment confirmed that one isolate is a natural recombinant between IA (MP gene) and II (CP gene) subgroup. Using codon-based Z-test, purifying selection was determined as the major natural force influencing all genomic regions and pairs of sequences of CMV. The only exception is weak positive selection detected between one pair of sequences of the CP gene.

Biological characterization indicated considerable phenotypic variability of CMV population in Serbia, but it was not correlated to particular molecular subgroupings.

For the first time in Serbia, during this study the presence of several isolates of satRNK CMV was detected which exhibited significant variability. Based on the phylogenetic analyses, two isolates of satRNK CMV were grouped with necrogenic isolates and one with non-necrogenic isolates of satRNK CMV.

The results of this investigation represents first detailed characterization of the population structure and genetic diversity of CMV in Serbia, as well as evolutionary mechanisms that shape the genetic structure of population, sources of variation and rates of changes in the population. The obtained results are the foundation for the future research on diversity, not only of CMV, but also of other economically important plant viruses in our country.

Key words: *Cucumber mosaic virus*, population structure, phylogenetic analyses, recombination, reassortment, RFLP analyses, RDP analyses, selection pressure, satRNA, biological characterization.

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.38:635.05(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Taksonomski status.....	3
2.2. Rasprostranjenost.....	3
2.3. Prisustvo CMV u Srbiji.....	4
2.4. Ekonomski značaj.....	5
2.5. Domaćini.....	7
2.6. Identifikacija i karakterizacija CMV na osnovu biotesta.....	8
2.7. Morfologija virusnih čestica i organizacija genoma.....	10
2.8. Funkcije proteina.....	13
2.9. Simptomatologija.....	17
2.10. Epidemiologija.....	17
2.11. Varijabilnost i evolucija.....	20
2.12. Kontrola.....	26
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
4. MATERIJAL I METODE	30
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka.....	30
4.2. Serološka ispitivanja.....	31
4.3. Odabir izolata za molekularne analize.....	33
4.4. Amplifikacija genskih regiona odabranih izolata.....	38
4.4.1. Estrakcija ukupne RNA.....	38
4.4.2. Reverzna transkripcija praćena lanćanom reakcijom polimeraze (RT-PCR).....	39
4.4.3. Analiza PCR produkta.....	44
4.5. Sekvenciranje genskih regiona odabranih izolata.....	45
4.6. Filogenetske analize.....	45
4.7. Polimorfizam dućine restrikcionih fragmenata.....	49
4.7.1. Polimorfizam dućine restrikcionih fragmenata „ <i>in silico</i> ”.....	49
4.7.2. Polimorfizam dućine restrikcionih fragmenata „ <i>in situ</i> ”.....	49
4.8. Analiza rekombinacije.....	51
4.9. „ <i>Codon-based</i> “ Z-test selekcije.....	52
4.10. Bioloćka identifikacija i karakterizacija odabranih izolata CMV.....	53
4.11. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK.....	54
5. REZULTATI	57
5.1. Prisustvo i relativna ućestalost CMV.....	57
5.2. Simptomi na biljkama u polju i odabir izolata za dalja istraćivanja.....	59
5.3. Amplifikacija genskih regiona.....	65
5.3.1. Amplifikacija CP gena.....	65
5.3.2. Amplifikacija MP gena.....	67
5.3.3. Amplifikacija 2a gena.....	69
5.3.4. Amplifikacija 2b gena.....	70
5.3.5. Amplifikacija 1a gena.....	70
5.4. Molekularna identifikacija odabranih izolata.....	72
5.4.1. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence CP gena.....	76
5.4.2. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence MP gena.....	79
5.4.3. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 2a gena.....	80
5.4.4. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 2b gena.....	81

5.4.5. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 1a gena.....	83
5.5. Filogenetske analize izolata CMV.....	85
5.5.1. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci CP gena.....	85
5.5.2. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci MP gena.....	88
5.5.3. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 2a gena.....	91
5.5.4. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 2b gena.....	94
5.5.5. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 1a gena.....	96
5.5.6. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci RNK 3 segmenta.....	99
5.5.7. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci RNK 2 segmenta.....	102
5.5.8. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu kombinacije sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta.....	104
5.6. RFLP analiza.....	109
5.6.1. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “.....	109
5.6.1.1. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “ na osnovu CP gena.....	109
5.6.1.2. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “ na osnovu MP gena.....	112
5.6.1.3. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “ na osnovu 2a gena.....	114
5.6.1.4. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “ na osnovu 2b gena.....	115
5.6.1.5. RFLP analiza „ <i>in silico</i> “ i „ <i>in situ</i> “ na osnovu 1a gena.....	116
5.7. RDP analiza.....	118
5.8. Uticaj selekcije na sekvence izolata i genske regione CMV.....	121
5.9. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV.....	122
5.10. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK.....	134
5.10.1. Detekcija satRNK.....	134
5.10.2. Identifikacija satRNK.....	135
5.10.3. Filogenetska analiza satRNK.....	136
6. DISKUSIJA.....	138
6.1. Simptomi CMV na prirodno zaraženim biljkama.....	139
6.2. Amplifikacija izolata CMV.....	142
6.3. Molekularna identifikacija izolata CMV.....	144
6.4. Filogenetske analize CMV.....	148
6.5. Karakterizacija odabranih izolata primenom RFLP metode.....	155
6.6. RDP analize rekombinacije.....	158
6.7. Uticaj evolutivnih parametara na populaciju CMV.....	159
6.8. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV.....	160
6.9. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK.....	164
7. ZAKLJUČAK.....	168
8. LITERATURA.....	172
PRILOZI.....	190
BIOGRAFIJA.....	199
IZJAVE.....	200

1. UVOD

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) jedan je od pet ekonomski najznačajnijih fitopatogenih virusa koji pričinjava značajne štete u proizvodnji velikog broja poljoprivrednih kultura. Nekoliko velikih epidemija prouzrokovalo je ogromne ekonomske gubitke u proizvodnji različitih povrtarskih, ukrasnih, a i industrijskih biljaka u Italiji, Španiji, Japanu, Australiji i SAD (Tomlison, 1987; Gallitelli et al., 1988; Jordá et al., 1992; Latham et al., 1999; Jones, 2000; Garsía-Arenal and Palukaitis, 2008). U mediteranskom basenu ekonomski značaj CMV najčešće je povezan sa periodičnim epidemijama u usevu paradajza (Gallitelli et al., 1995; Varveri and Boutsika, 1999), dinje (Alonso-Prados et al., 1997; Luis-Arteaga et al., 1998) i paprike (Mnari Hattab et al., 1999).

CMV je tipski predstavnik roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae*. Rod *Cucumovirus*, pored CMV, sadrži još dva udaljena člana: *Peanut stunt virus* (PSV) i *Tomato aspermy virus* (TAV) (van Regenmortel et al., 2000). Pored PSV i TAV, koji su zvanično prihvaćeni članovi ovog roda, rod *Cucumovirus* sadrži i *Gay feather mild mottle virus* (GMMV). Za GMMV smatra se da je verovatno pripadnik ovog roda, jer još nije odobren kao vrsta (King et al., 2012).

CMV spada u grupu opšte rasprostranjenih virusa. Prvi put je detektovan na Američkom kontinentu i ubrzo nakon toga pronađen je na svim kontinentima (Tomlison, 1987). Njegovo dominantno rasprostranjenje vezuje se za umereno tople regione gde su povoljni uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši (Garsía-Arenal and Palukaitis, 2008).

U Srbiji, CMV je prvi put opisan na paprici 1956. godine (Šutić, 1959). Dosadašnja proučavanja u našoj zemlji, pre svega, odnose se na utvrđivanje pojave i rasprostranjenosti CMV na biljkama iz familije Cucurbitaceae i Solanaceae (Stakić i Nikolić, 1966; Petrović i sar., 2010a; Stanković et al., 2011; Vučurović et al., 2012). U našoj zemlji CMV je jedan od najraširenijih i najštetnijih virusa na paprici i paradajzu (Krstić i sar., 2007; Nikolić i sar., 2012; Milošević, 2013).

Smatra se da je CMV jedan od virusa sa najširim krugom domaćina. Broj biljnih vrsta koje su identifikovane kao domaćini ovog virusa veoma se brzo povećava. Prema najnovijim podacima broj domaćina CMV veći je čak od 1300 vrsta iz preko 500 rodova i više od 100 familija (Garsía-Arenal and Palukaitis, 2008).

Od prirodnih domaćina CMV kao najvažniji navode se povrtarske biljke, kao što su paprika, paradajz, zatim vrežaste kulture (krastavac, dinja, lubenica, razne vrste tikava), mrkva, celer, mirođija, peršun, paštrnak, cvekla, rotkva, grašak, pasulj, crni luk, zelena salata, spanać i artičoka. Značajni domaćini ovog virusa su i duvan i biljke iz familije Fabaceae, lucerka i crvena detelina (**Brunt et al., 1996**). CMV je prisutan i na velikom broju ukrasnih biljaka (**Parrella and Sorentino, 2009; Berniak et al., 2010; Davino et al., 2012**). Naročito je značajna činjenica da CMV ima širok krug domaćina među korovskim biljkama koje predstavljaju stalne izvore zaraze (**Brunt et al., 1996**). Ovaj virus prezimljava u svojim korovskim domaćinima, tako da oni predstavljaju primarni izvor zaraze za gajene biljke.

Izrazita varijabilnost izolata CMV koja se ogleda u različitim biološkim, antigenim i molekularnim osobinama, krugu domaćina i simptomatologiji dovela je do podele na podgrupe I (S-I, WT) i II (S-II, S) (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Najveći broj izolata CMV pripada podgrupi I. **Palukaitis and Zaitlin (1997)** su predložili, na osnovu homologije sekvenci gena za protein omotača (CP gen), izdvajanje podgrupe IB u koju bi bili svrstani izolati poreklom iz Azije, i podgrupe IA gde bi bili svrstani svi ostali izolati. Takođe, filogenetske analize na osnovu drugih gena CMV, kao što su MP, 2a, 2b i 1a gen ukazale su na postojanje tri podgrupe ovog virusa (IA, IB i II) (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Davino et al., 2012; Nouri et al., 2014**).

Velika individualna genetička varijabilnost unutar pojedinačne vrste odlika je svih fitopatogenih virusa koji imaju RNK genom, pa i CMV. Visoka varijabilnost RNK virusa uzrok je pojave novih sojeva i brze adaptacije na nove ili rezistentne domaćine. Karakterizacija polimorfnog modela genetičke varijabilnosti virusa presudna je u razumevanju filogenetskih međuodnosa, genetičke strukture populacije i epidemiološke istorije (poreklo, način i broj introdukcija, širenje), evolutivnih mehanizama koji omogućavaju pojavu novih vrsta i sojeva, povećanje značaja već postojećih virusa, kao i drugih faktora koji omogućavaju virusima prevazilaženje otpornosti i savlađivanje drugih strategija kontrole.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je da se dobije uvid u genetičku strukturu prirodne populacije CMV i prvi podaci o faktorima koji oblikuju populaciju ovog virusa u Srbiji.

2. PREGLED LITERATURE

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) jedan je od pet ekonomski najznačajnijih virusa povrća i ukrasnog bilja (Anonymous, 1998; Scholthof et al., 2011). Skoro istovremeno opisan je u Mičigenu 1916. godine kao prouzrokovatelj bolesti na krastavcu i muskatnoj tikvi (Doolittle, 1916; loc. cit. Palukaitis et al., 1992) i Njujorku na krastavcu (Jagger, 1916; loc. cit. Palukaitis et al., 1992).

2.1. Taksonomski status

Virus mozaika krastavca tipičan je predstavnik roda *Cucumovirus*, porodice *Bromoviridae* (van Regenmortel et al., 2000) koji pored ovog virusa sadrži još dva udaljena člana: *Peanut stunt virus* (PSV) i *Tomato aspermy virus* (TAV). TAV se zbog češćeg prisustva na hrizantemi nego na biljkama paradajza naziva i *Chrysanthemum aspermy virus* (Palukaitis et al., 2003). U okviru ovog roda 2009. godine opisan je još jedan potencijalni virus koji nosi naziv *Gay feather mild mottle virus* (GMMV) (Adams et al., 2009).

2.2. Rasprostranjenost

Ubrzo nakon prve detekcije u Severnoj Americi, CMV je pronađen na svim kontinentima. Jedan je od najvažnijih virusa mnogih gajenih biljaka u Francuskoj, Grčkoj, Italiji, Poljskoj, Portugaliji, Španiji, Švedskoj, Izraelu, Kini, Japanu, Egiptu, Argentini i SAD (Tomlison, 1987). Iako CMV spada u grupu opšte rasprostranjenih virusa, njegovo dominantno rasprostranjenje vezuje se za umereno tople regione, gde su povoljni uslovi za razvoj lisnih vaši, njegovih vektora (Palukaitis et al., 1992). Populacija CMV u svetu je veoma varijabilna i podeljena je u tri podgrupe koje se međusobno razlikuju i po rasprostranjenosti. Izolati iz podgrupa IA i II su prisutni širom sveta, dok su izolati IB podgrupe dominantni u Aziji, pre svega u njenom istočnom delu (Gallitelli, 2000; Lin et al., 2003; Moury, 2004). Međutim, usled veoma intenzivne razmene biljnog materijala došlo je do introdukcije izolata IB podgrupe i u druge delove sveta. Zabeleženo je prisustvo ove podgrupe u Italiji, Španiji, Grčkoj, Kaliforniji, Brazilu, Nigeriji i Australiji (Gallitelli, 2000; Lin et al., 2003; Eiras et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Sclavounos et al., 2006; Kayode et al., 2014). Pretpostavlja se da

izolati IB podgrupe vode poreklo iz istočne Azije, što ukazuje na puteve širenja ovog virusa (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Izolati podgrupe II pretežno su rasprostranjeni u hladnijim i oblastima sa umereno-kontinentalnom klimom (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Kao i izolati IA podgrupe i izolati II podgrupe su široko rasprostranjeni, znatno šire nego što se ranije pretpostavljalo (**Yu et al., 2005; Tian et al., 2009**), a što se može objasniti činjenicom da izolati I podgrupe izazivaju izraženije simptome, biološki su stabilniji i lakše uočljivi u polju u odnosu na izolate II podgrupe (**Afreen et al., 2009; Parrella and Sorrentino, 2009; Tian et al., 2009**).

Međutim, iako se dominantno rasprostanjenje CMV vezuje za umereno tople regione, virus se sve češće javlja i u tropskim zemljama (**Palukaitis et al., 1992**). Kao razlog tako širokog rasprostranjenja i postojanja velikog broj sojeva, navodi se brza i laka adaptacija ne samo na nove domaćine, nego i na nove uslove spoljašnje sredine (**Roossinck, 2002**).

2.3. Prisustvo CMV u Srbiji

Mnoge publikacije širom sveta govore o destruktivnosti oboljenja i značajnim ekonomskim štetama koje CMV prouzrokuje na različitim usevima. U našoj zemlji rasprostranjenost i eventualne štete u proizvodnji koje izaziva ovaj virus, proučavani su na različitim domaćinima. Od mnogobrojnih domaćina ovog virusa, proučavanja u Srbiji odnose se pre svega na utvrđivanje pojave i rasprostranjenosti CMV na biljkama iz familije tikava, duvanu, paprici, paradajzu i ukrasnim biljkama.

Prva istraživanja CMV u Srbiji odnosila su se na utvrđivanje prisustva virusa na biljkama iz familije tikava, kada je virus prvi put opisan na dinji (**Stakić i Nikolić, 1966**), nakon čega su usledila proučavanja prisustva ovog virusa i na drugim biljkama iz familije Cucurbitaceae (**Pejčinovski, 1978**). Problem virusnih oboljenja tikava prouzrokovan uništenom proizvodnjom u više lokaliteta gajenja u Srbiji 2000. godine podstakao je na istraživanja vezana za utvrđivanje etiologije oboljenja. Kao jedan od prouzrokovaca oboljenja obične tikve identifikovan je i CMV (**Dukić i sar., 2001**). Od tada je započeto detaljnije ispitivanje ovog virusa i oboljenja koje on prouzrokuje na različitim vrstama tikava, kao i redovno praćenje njegove pojave i rasprostranjenosti u našoj zemlji (**Dukić i sar., 2001; Dukić et al., 2002; Dukić i sar., 2002; Krstić et al.,**

2002, Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004a, 2004b; Dukić et al., 2006; Vučurović i sar., 2008; Vučurović i sar., 2011, Vučurović et al., 2012).

Na duvanu CMV je prvi put zabeležen na parcelama ogledne stanice Duvanskog instituta na Avali (**Tošić, 1960**), dok istraživanja koja su sproveli **Jasnić i sar. (2000)** upućuju na značajno prisustvo ovog virusa na duvanu u našoj zemlji tokom 1995-1999. godine. Međutim, u periodu od 2002. do 2006. godine, CMV nije bio u značajnoj meri prisutan u usevu duvana i nije predstavljao opasnost za njegovu proizvodnju u našoj zemlji (**Dukić i sar., 2006**). Novija ispitivanja pojave i rasprostranjenosti virusa duvana u Srbiji ukazuju na ponovno širenje ovog virusa. Tako je tokom 2007. godine, CMV bio prevalentan virus u mnogim lokalitetima gajenja duvana (**Đekić i sar., 2008a, 2008b; Stanković et al., 2011**), što ukazuje na ciklično smenjivanje godina u kojima je CMV bio zastupljen u visokom procentu, često i kao prevalentan virus, sa godinama u kojima je zastupljen u značajno nižem procentu.

U Srbiji je CMV na paprici prvi put opisan 1956. godine (**Šutić, 1959**). **Delević (1963)** je zabeležio prisustvo ovog virusa u okolini Niša, Leskovca, Zaječara i Čačka u visokom procentu, dok je u nekim lokalitetima Vojvodine utvrđena zaraza i do 100%. Istraživanja **Tomić i sar. (2007)** potvrdila su prisustvo CMV u usevu paprike, dok su najnovija istraživanja sprovedena 2009. godine pokazala da je CMV bio prevalentan virus u ovom usevu (**Petrović i sar., 2010a, 2010b**).

Istraživanjima **Aleksić i sar. (1980)** utvrđeno je prisustvo CMV u usevu paradajza, a pregledom stakleničko-plasteničke proizvodnje i proizvodnje na otvorenom polju i analizom ispitivanih uzoraka tokom 2007. i 2011. godine paradajza utvrđeno je da je CMV bio prevalentan virus u usevu paradajza (**Krstić i sar., 2007; Nikolić i sar., 2012**).

Istraživanja **Babović (1969)** i **Šutić (1975)** ukazuju na prisustvo ovog virusa i u usevu lucerke u našoj zemlji. Osim toga, CMV je opisan i na hibridnoj (švedskoj) i na crvenoj detelini (**Babović, 1974**).

2.4. Ekonomski značaj

Zbog velikih ekonomskih gubitaka zabeleženih u proizvodnji jednogodišnjih useva, CMV se smatra najznačajnijim virusom u Argentini, istočnoj Kini, Hrvatskoj, Francuskoj, Egiptu, Grčkoj, Izraelu, Italiji, Japanu, Poljskoj, Portugaliji, Španiji,

Švedskoj i u severoistočnom delu SAD, dok se u ostalim zemljama nalazi na drugom ili trećem mestu (Tomlison, 1987). U mediteranskom basenu ekonomski značaj CMV najčešće je povezan sa periodičnim epidemijama u usevu paradajza (Gallitelli et al., 1995; Varveri and Boutsika, 1999), dinje (Alonso-Prados et al., 1997; Luis-Arteaga et al., 1998) i paprike (Mnari Hattab et al., 1999) kada se javlja sa učestalošću od 30 do skoro 100%. Štetnost ovog virusa se ogleda u smanjenom prinosu i lošijem kvalitetu plodova, gde su najveći gubici u prinosu zabeleženi kod biljaka zaraženih u početnim fazama razvoja. Osim ranih infekcija osetljivih biljaka velike štete nastaju i u slučaju mešanih zaraza CMV sa drugim virusima, najčešće iz roda *Potyvirus* (Palukaitis and García-Arenal, 2003; Mascia et al., 2010).

CMV je jedan od najraširenijih i najštetnijih virusa na paprici i paradajzu u svetu i u Srbiji (Gaborjanyi et al., 1998; Sepulveda et al. 2005; Krstić i sar., 2007; Mijatović i sar., 2007; Tomić i sar., 2007; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Petrović i sar., 2010a, 2010b; Nikolić i sar., 2012; Milošević, 2013; Milošević i sar., 2013). Pojava jake nekroze paradajza prouzrokovane CMV dovela je do epidemija 1972. godine u Francuskoj, 1987. godine u Španiji i Italiji i 1993. godine u Hrvatskoj (Gallitelli et al., 1988; Jordá et al., 1992; Škorić et al., 1996), kada su u glavnim područjima proizvodnje ove kulture štete dostigle 100%.

U proizvodnji duvana u svetu CMV je jedan od najznačajnijih virusa (Gooding, 1991; Mayunga and Kaporia, 2003). CMV prouzrokuje velike štete u Aziji i Evropi, a naročito velike gubitke izazvao je u Španiji (Shew and Lucas, 1991). CMV je jedan od ekonomski važnijih virusa duvana u Srbiji (Đekić i sar., 2008a, 2008b; Stanković et al., 2011). Mada se kod nas zastupljenost CMV ciklično menja, pojedinih godina je prevalentan virus u usevu duvana i može naneti ozbiljne gubitke u proizvodnji duvana (Jasnić i sar., 2000; Dukić i sar., 2006; Đekić i sar., 2008a, 2008b; Stanković et al., 2011).

U usevima biljaka iz familije Cucurbitaceae CMV predstavlja jedan od pet ekonomski najznačajnijih virusa u svetu (Agrios, 2005). U Srbiji CMV pored WMV i ZYMV prouzrokuje velike gubitke u proizvodnji ovih kultura (Dukić i sar., 2006; Vučurović i sar., 2011; Vučurović et al., 2012; Milojević i sar., 2013).

Osim na pomenutim kulturama CMV je jedan od ekonomski najštetnijih virusa u proizvodnji celera i salate (Tomlison, 1987), a do velikih šteta dovodi i na

mahunarkama (Latham et al., 1999; Jones, 2000) i ukrasnim biljkama (Flasinski et al., 1995).

Pored šteta koje ovaj virus izaziva u pojedinačnim infekcijama dodatan problem predstavljaju mešane infekcije sa drugim virusima, kada dolazi do sinergističkog delovanja, usled čega se intezitet bolesti povećava tako da su i štete na zahvaćenim parcelama mnogo veće. Sinergističko delovanje CMV sa drugim virusima ustanovljeno je kod leguminoza, tikava i biljaka iz familije Solanaceae (Desbiez and Lecoq, 1997; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Wege and Siegmund 2007; Mascia et al., 2010). Tóbiás and Tulipan (2002) zabeležili su od 10%, pa do čak 100% zaraženih biljaka u različitim usevima tikava, pri čemu su najveće štete nastale u mešanim infekcijama sa drugim virusima tikava. Providenti and Schroeder (1970) zabeležili su smanjenje prinosa obične tikve za 60-70% u slučaju mešanih infekcija CMV, PRSV i WMV. Takođe, mešane infekcije CMV i ZYMV izazvale su pojavu jakih simptoma na biljkama dinje i cukinija (Wang et al., 2002). CMV se redovno javlja u usevima tikava u Srbiji, uglavnom u mešanim infekcijama sa ZYMV i/ili WMV, a naročito je značajna njegova visoka zastupljenost u epidemijskim godinama (Vučurović et al., 2012). U usevima paprike i paradajza najveće štete su zabeležene usled sinergističkog delovanja CMV i PVY (Mascia et al., 2010; Petrović i sar., 2010a), a velike štete mogu da nastanu i usled sinergističkog delovanja CMV sa *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Siddiqui et al., 2011).

2.5. Domaćini

Tokom godina, od prvog opisa, broj domaćina CMV se stalno povećavao tako da se danas smatra da je CMV jedan od virusa sa najširim krugom domaćina (Palukaitis et al., 1992). Prema najnovijim podacima broj domaćina CMV obuhvata više od 1300 vrsta iz preko 500 rodova i više od 100 biljnih familija (García-Arenal and Palukaitis, 2008).

Od prirodnih domaćina, kao najvažniji domaćini CMV navode se povrtarske biljke kao što su paprika, paradajz, zatim vrežaste kulture (krastavac, dinja, lubenica, razne vrste tikava), duvan, mrkva, celer, mirođija, peršun, paštrnak, cvekla, rotkva, grašak, pasulj, crni luk, zelena salata, spanać i artičoka (Wolf, 1972; Gooding, 1991; Gallitelli et al., 2004; Mijatović i sar., 2007; Afreen et al., 2009; Krstić i Bulajić,

2011; Sevik and Akcura, 2011; Nouri, 2012). Značajni domaćini ovog virusa su i biljke iz familije Fabaceae, lucerka i crvena detelina (Brunt et al., 1996; Zitter and Murphy, 2009).

CMV je prisutan i na velikom broju ukrasnih biljaka: *Alstroemeria* sp., *Anemone coronaria*, *Asclepias syriaca*, *A. tuberosa*, *Aster* sp., *Barbarea vulgaris*, *Crocus* sp., *Dahlia* sp., *Freesia* sp., *Gladiolus* sp., *Amaryllis* sp., *Hyacinthus* sp., *Iris* sp., *Lilium* sp., *Linaria vulgaris*, *Narcissus* sp., *Nerine bowdenii*, *N. sarniensis*, *Phlox drummondii*, *Dendrobium* sp., *Dianthus caryophyllus*, *Dianthus barbatus*, *Eustoma grandiflorum*, *Pelargonium hortorum*, *Impatiens wallerina*, *Hydrangea macrophylla*, *Dimorphotheca sinuata*, *Zantedeschia* sp., *Cyclamen persicum*, *Begonia tuberhybrida* 'Multiflora', *Mandevilla sanderi*, *Passiflora edulis*, *Petunia x hybrida*, *Lamium maculatum*, *Tulipa* sp. i *Saintpaulia ionantha* (Hakkaart, 1986; Loebenstein et al. 1995; Bellardi and Bertaccini, 1997; Davino et al., 2005; Parrella and Sorentino, 2009; Zitter and Murphy, 2009; Berniak et al., 2010; Gautam et al., 2012; Bešta-Gajević et al., 2013; Sochacki, 2013; Yoon, 2014).

Naročito je značajna činjenica da CMV ima širok krug domaćina među korovskim biljkama koje predstavljaju stalne izvore zaraze. Kao široko rasprostranjene korovske biljke, a ujedno i domaćini CMV ističu se: *Amaranthus* sp., *Anacyclus clavatus*, *Anthemis arvensis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Papaver rhoeas*, *Xanthium strumarium*, *Portulaca oleracea*, *Taraxacum* spp., *Cirsium arvense*, *Conyza* sp., *Diplotaxis eruroides*, *Lactuca seriola*, *Malva sylvestris*, *Medicago sativa*, *Plantago* sp., *Sonchus oleraceus*, *Trifolium pratense* i druge (Brunt et al., 1996; Sacristán, 2004). S obzirom da CMV prezimljava i održava se u svojim korovskim domaćinima, ove biljke često predstavljaju i primarni izvor zaraze za gajene biljke.

2.6. Identifikacija i karakterizacija CMV na osnovu biotesta

CMV jedan je od mehanički lako prenosivih virusa sa najširim krugom domaćina (García-Arenal and Palukaitis, 2008), pa je samim tim razumljivo da ima i veliki broj eksperimentalnih domaćina. Ranije je smatrano da se na osnovu reakcija različitih test biljaka može izvršiti preliminarno razlikovanje CMV od drugih virusa (Cohen and Nitzany, 1963; Lastra, 1968; Palukaitis et al., 1992; Tóbiás and

Tulipan, 2002) i kao dijagnostička biljka navodila se *Cucumis sativus* na kojoj CMV dovodi do pojave sistemičnog mozaika (**Francki et al., 1979**). Međutim, kasnija istraživanja pokazala su da *C. sativus* nije pogodna dijagnostička biljka, jer i drugi virusi poput virusa žutog mozaika kukuruz (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) i virusa mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) dovode do pojave istih simptoma (**Vučurović i sar., 2010; 2011**). Za biološku karakterizaciju, kao dijagnostičke biljke za CMV, najčešće se koriste *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Vigna unguiculata* i *Nicotiana glutinosa* (**Douine et al., 1979; Chou et al., 2009**). Iako je bilo pokušaja da se na osnovu pojave različitih simptoma na određenoj test biljci izvrši grupisanje izolata u odgovarajuću podgrupu ovog virusa (**Francki et al., 1979; Wahyuni et al., 1992; Zhang et al., 1994a**) veoma sličan krug domaćina doveo je do toga da takva test biljka do sada nije pronađena (**Rizos et al., 1992; Anonymous, 1998; Gallitelli, 1998; Chou et al., 2009**). U istraživanjima **Marrou et al. (1975)** navodi se da izolati koji pripadaju II podgrupi mogu razlikovati od izolata koji pripadaju podgrupi I CMV na osnovu simptoma na *Nicotiana tabacum* 'Xanthi', dok istraživanja **Carrère et al. (1999)** ukazuju da su simptomi na ovoj test biljci veoma slični između različitih podgrupa ovog virusa. Takođe, **Marrou et al. (1975)** kao pogodnu biljku za razlikovanje podgrupa CMV navode i kukuruz na kome izolati podgrupe I dovode do pojave sistemičnih simptoma, dok izolati podgrupe II najčešće ne dovode do pojave simptoma ili dovode do pojave lokalnih pega. Iako se kukuruz navodi kao pogodna biljka za razlikovanje podgrupa CMV, **Iqbal et al. (2011)** nisu uspjeli da izazovu pojavu simptoma na ovoj test biljci. Kod dikotiledonih biljaka, izolati iz podgrupe I najčešće dovode do pojave intenzivnijih simptoma, dok izolati iz II podgrupe pokazuju smanjenu virulentnost i dovode do pojave blagih simptoma. **Komuro (1973)** navodi *N. glutinosa* i *V. unguiculata* kao biljke koje se obično koriste za razlikovanje podgrupa CMV. Međutim, istraživanja su pokazala da se na *N. glutinosa* mogu javiti tri ili četiri tipa simptoma, kao i da tip simptoma nije u korelaciji sa određenom podgrupom CMV, kao ni sa prisustvom satRNK (**Chou et al., 2009; Zhang et al., 2011**). Iako su istraživanja **Wahyuni et al. (1992)** ukazala da pojavu sistemičnih simptoma na *V. unguiculata* mogu izazvati samo izolati koji pripadaju II podgrupi, a da je pojava lokalnih nekrotičnih pega karakteristična za izolate podgrupe I (**Wahyuni et al., 1992; Han et al., 2012**), istraživanja **Chou et al. (2009)** pokazala su da pojavu

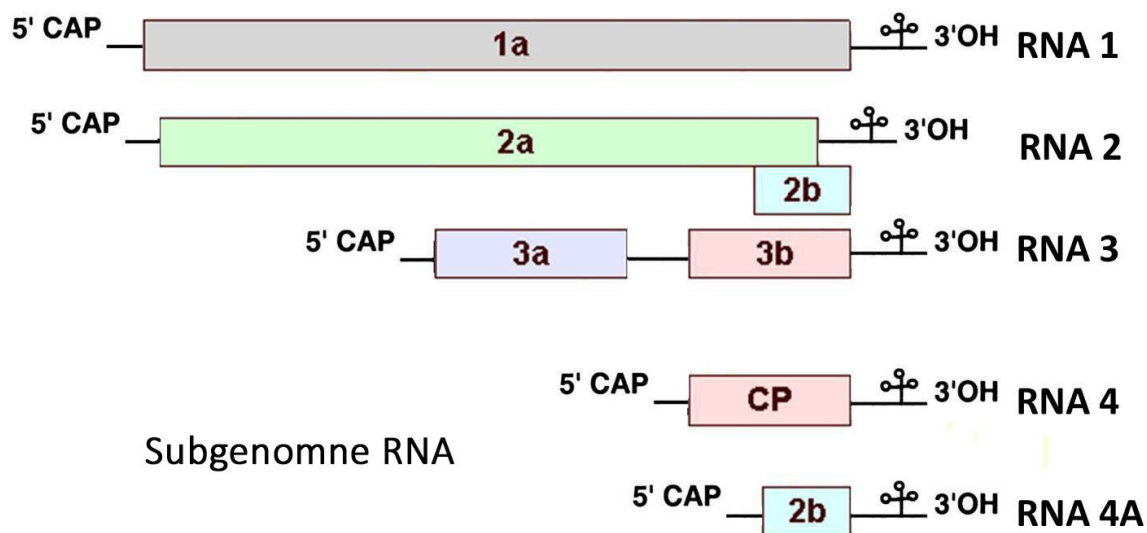
sistemičnih simptoma izazivaju izolati iz obe podgrupe CMV. Takođe, dugo se smatralo da simptome nitavosti na mehanički inokulisanim biljkama paradajza mogu da izazovu samo izolati koji pripadaju podgrupi I (**Sudhakar et al., 2006; Akhtar et al., 2008; Pratap et al., 2008**), međutim istraživanja **Geetanjal et al. (2011)** ukazala su da pojavu ovog simptoma izazivaju i izolati iz II podgrupe. **Zhang et al. (1994a)** navode da izolati koji pripadaju podgrupi I izazivaju izraženije simptome na test biljkama duvana za koje je karakteristično da se ranije ispoljavaju u poređenju sa podgrupom II. Iako izolati podgrupe II uglavnom izazivaju blaže simptome na testiranim eksperimentalnim biljkama **Carrère et al. (1999)** zabeležili su pojavu izražene nitavosti na *N. glutinosa*. Istraživanja **Tian et al. (2009)** ukazuju da veoma važan faktor za ekspresiju i vreme pojave simptoma, na biljkama duvana koje su inokulisane izolatima podgrupe II, predstavljaju temperaturni uslovi, vlažnost, kao i dužina dana i noći.

2.7. Morfologija virusnih čestica i organizacija genoma

Virioni CMV su ikozaedričnog oblika, prečnika oko 29 nm, izgrađeni su od 180 identičnih proteinski podjedinica kapsid proteina (CP) i oko 18% RNK (**Francki et al., 1979; Palukaitis et al., 1992; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012**). CMV ima bar tri vrste čestica, koje se morfološki ne razlikuju, ali sadrže različite RNK. RNK 1 i RNK 2 se nalaze u različitim česticama, RNK 3 i RNK 4 se nalaze u istoj čestici, dok neke čestice mogu da sadrže tri molekula RNK 4 (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Virusne čestice mogu da sadrže i manje količine RNK 4A, RNK 5 i RNK 6 (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Za ostvarivanje infekcije neophodno je prisustvo sve tri čestice (**Gallitelli, 2000**).

Genom CMV se sastoji od pet gena raspoređenih na tri jednolančane pozitivne genomne RNK označene brojevima od 1 do 3, na osnovu opadajućih veličina i na dve subgenomne RNK, RNK 4 i RNK 4A (**Palukaitis et al., 1992; Gallitelli, 2000; Palukaitis and García-Arenal, 2003; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012**). Ukupna dužina pojedinih RNK genoma CMV varira u zavisnosti od izolata ili podgrupe, međutim svaki otvoreni okvir čitanja (*open reading frame*, ORF) ima sličnu veličinu, osim okvira čitanja 2a proteina, koji je kod izolata II podgrupe manji u odnosu na izolate I podgrupe (**Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012**). Sve RNK (RNK 1, RNK 2, RNK 3, RNK 4, RNK 4A) (Slika 1)

imaju na 5' kraju vezan 7-metilganozin, dok je 3' kraj aminoaciliran tirozinom i može da obrazuje strukturu sličnu tRNK (Francki et al., 1979; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Sva tri velika RNK molekula (RNK 1, 2, 3) na 3' kraju imaju deo od oko 150 nukleotida koji su veoma slični i visoko konzervativni (Gould and Symons, 1977, 1978; Jacquemond, 2012).



Slika 1. Šema genoma virusa mozaika krastavca

Sve tri genomne RNK mogu se razmenjivati između izolata koji pripadaju istim ili različitim podgrupama ovog virusa, čime je omogućeno dobijanje novih izolata sposobnih da se održe u prirodi. Međutim, RNK 3 se može razmenjivati i između različitih virusa, koji pripadaju *Cucumovirus* rodu (Rao and Francki, 1981; Palukaitis and García-Arenal, 2003).

RNK 1 (3,3-3,4 kb) je monocistronska i kodira 1a protein molekulske mase 111 kDa. RNK 2 (3 kb) je bicistronska i kodira 2a protein molekulske mase 98 kDa, kao i 2b protein mase 13-15 kDa, koji kodira subgenomna RNK 4A (630-702 nukleotida) (García-Arenal and Palukaitis, 2008). RNK 3 (2,2 kb) je takođe bicistronska i kodira stvaranje 3a proteina molekulske mase 30 kDa i 3b proteina molekulske mase 25 kDa, koji se dobija translacijom subgenomne RNK 4 (1010-1250 nukleotida) (García-Arenal and Palukaitis, 2008). CMV ima i RNK 5, dužine oko 300 nt, čija funkcija nije poznata, a čiji 3' kraj ima istu sekvencu kao i 3' netranslirajući krajevi RNK 1 i RNK 2 (*co-terminal*) (Palukaitis and García-Arenal, 2003; García-Arenal and Palukaitis,

2008). RNK 4A i RNK 5 se samo nalaze u česticama izolata subgrupe II. U nekim česticama CMV se nalazi mala količina biljne tRNK i fragmenata CMV RNK dužine 70-80 nt, označena kao RNK 6, dok čestice nekih sojeva mogu da imaju i defektne RNK, nastale od RNK 3, a kojima nedostaje nekoliko stotina nukleotida od MP ili CP gena ili od oba (**Palukaitis et al., 1992; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012**).

Geni za sve proteine pronađeni su kod svih rodova familije *Bromoviridae*, osim gena za 2b protein koji se javlja samo kod *Cucumovirus* i *Ilarvirus* roda. Iako otvoreni okvir čitanja 2b proteina ima sličnu poziciju kod oba roda, njegova veličina kao i sekvenca se razlikuju (**Xin et al., 1998; Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Pozicija inicijalnog kodona za 2b gen kod roda *Cucumovirus* se razlikuje od vrste do vrste što ukazuje da je 2b gen nastajao više puta *de novo* prepisujući se sa 2a gena koji predstavlja ancestorski ORF (**Roossinck, 2002**).

Prisustvo satelitne RNK (satRNK) je karakteristika nekih sojeva ovog virusa. Do sada je pronađeno više od 100 varijanti satRNK vezanih sa više od 65 CMV izolata iz obe podgrupe populacije CMV (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). SatRNK su male nekodirajuće RNK dužine od 330 do 405 nukleotida (najčešće 332 do 342) i molekulske mase 1×10^5 Da, čije sekvence skoro da nemaju sličnosti sa virusnim genomom (najviše 6-8 nt u nizu), ali njihova replikacija, enkapsidacija, širenje, prenošenje i ostale funkcije potpuno zavise od proteina kodiranih virusnim genomom, dok same nisu neophodne za infekciju i replikaciju virusa (**Francki et al., 1979; Alonso-Prados et al., 1998; Gallitelli, 2000; Davino et al., 2005; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012**). Prisustvo satRNK može da utiče, u nekim slučajevima, na replikaciju kao i na patološku reakciju biljke (**Palukaitis et al., 1992**). SatRNK obično smanjuju akumulaciju CMV, a kod nekih domaćina smanjuju i virulentnost CMV, što nije uslovljeno kompeticijom za ograničenu količinu polimeraze ili proteinskog omotača (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Međutim, neke satRNK mogu da pojačaju efekte virusne infekcije, pa su se u nekim mediteranskim zemljama na biljkama paradajza zaraženim CMV, a kod kojih je utvrđeno prisustvo određenih satRNK ispoljili simptomi sistemične nekroze. Ova nekroza je bila posledica stvaranja velike količine komplementarnih lanaca satRNK nastalih prilikom njene replikacije (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Genetička struktura i dinamika

populacije CMV i njegovih satRNK nisu povezane, odnosno satRNK se šire epidemijski, kao hiperparaziti, u endemičnim populacijama CMV (Alonso-Prados et al., 1998). Iako su duže satRNK pronađene kod izolata prisutnih u istočnoj Aziji i Italiji, njihovo prisustvo se uvek povezuje sa azijskim izolatima.

Za sada nije utvrđena značajna sličnost između sekvenci satRNK i sekvenci CMV virusa pomoćnika (*helper virus*), takođe ni kod jedne biljne vrste u genomu nisu utvrđene sekvence slične satRNK (Simon et al., 2004; Hajimorad et al., 2009). Do sada je okarakterisano preko 100 izolata satRNK CMV u različitim geografskim područjima i na različitim biljnim vrstama, koje su grupisane u najmanje tri grupe na osnovu toga kako utiču na simptome na indikator biljkama paradajza (Kouadio et al., 2013). Iako ima različitih načina grupisanja satRNK CMV preovladava podela na osnovu tipa simptoma, odnosno u zavisnosti da li satRNK progresivno pojačava ili smanjuje simptome prouzrokovane CMV (García-Arenal et al., 1999). Pojava nekrotičnih simptoma kod izolata koji pripadaju nekrogenom (*necrogenic*) soju satRNK uslovljena je „konsenzus“ sekvencom GA-GCUAAGGCUUA---UGCUAUGCUGAU (Devic et al., 1990; Grieco et al., 1997; García-Arenal et al., 1999) koja ne postoji kod izolata običnog („ne nekrogenog“, *non necrogenic*) ili blagog (*benign*) soja. Kod biljaka duvana i paradajza kod kojih su primećeni intezivniji simptomi hloroze ustanovljena je „konsenzus“ sekvenca CCUUUCGAGGU odnosno „*chlorosis-inducing domains*“. Ova „konsenzus“ sekvenca nije detektovana kod svih satRNK koje su dovele do pojave ovog tipa simptoma, već kod malog broja satRNK (Kurath and Palukaitis, 1989).

2.8. Funkcije proteina

Protein 1a, koji nastaje translacijom RNK 1, je komponenta CMV replikaze (Hayes and Buck, 1990), a lokalizovan je na tonoplastu (Cillo et al., 2002). Dosadašnja ispitivanja su pokazala da protein 1a ima dva funkcionalna dela-domena (*domain-konzervativni* deo proteina koji može da se menja, funkcioniše i postoji nezavisno od ostatka proteina). Prvi domen se nalazi na N terminalnom kraju i smatra se da ima funkciju metiltransferaze, odnosno učestvuje u modifikaciji 5' kraja na početku procesa transkripcije dodavajući guanozin na 5' RNK, a zatim metilirajući guanozin, dok se na C terminalnom kraju nalazi drugi domen za koji se smatra da ima funkciju helikaze

(Gorbalenya et al., 1988; Hodgman, 1988; Habili and Symons, 1989; Rozanov et al., 1992). Pored ovih funkcija, smatra se da protein 1a ima ulogu i kod pojave hipersenzibilne reakcija duvana (Lakshman and Gonsalves, 1985; Palukaitis and García-Arenal, 2003) i prenošenja CMV semenom (Hampton and Francki, 1992).

Protein 2a, čije stvaranje kodira RNK 2, takođe se nalazi na tonoplastu (Cillo et al., 2002) i sadrži veći broj motiva koji su karakteristični za RNK zavisnu RNK polimerazu (Bruenn, 1991; Habili and Symons, 1989; Poch et al., 1989).

CMV replikacija se obavlja na tonoplastu (García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012). U replikaciji učestvuju proteini 1a i 2a formirajući virusnu komponentu kompleksa replikaze koja sa nekoliko proteina biljke, gradi enzimski kompleks koji ima funkciju RNK zavisne RNK polimeraze (Palukaitis and García-Arenal, 2003; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012). Prvi korak replikacije predstavlja sinteza (-) RNK, koja se koristi kao matrica za sintezu (+) RNK, koja će imati funkciju informacione RNK (mRNK) za translaciju, zatim, kao matrica za transkripciju (stvaranje novih molekula RNK) i na kraju za stvaranje novih viriona (García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012). Značajno je napomenuti da se tokom replikacije nagomilavaju molekuli dvolančanih RNK (*double-stranded* (ds) RNA) u zaraženim ćelijama, što je karakteristika (+) RNK virusa, za koje se pouzdano ne zna da li učestvuju u ciklusu virusa ili prosto služe za skladištenje viška RNK (Jacquemond, 2012). Kod CMV, (-) RNK dostižu maksimalnu brojnost neposredno posle infekcije, dok količina (+) RNK nastavlja da raste i može da dostigne čak 100 puta veću količinu u odnosu na (-) RNK (Seo et al., 2009a). Za sintezu (-) lanca RNK neophodno je prisustvo i 1a i 2a proteina, dok (+) lanac može nastati samo u prisustvu 2a proteina od (-) RNK matrice, od genomne ili subgenomne RNK (Seo et al., 2009a). Fosforilacija 2a proteina, onemogućava njegovo vezivanje sa 1a proteinom što može da utiče na prestanak transkripcije i početak translacije (+) RNK (Jacquemond, 2012). Na kraju, koncentracija virusa u zaraženim biljkama zavisiće od balansa između transkripcije i translacije, na šta će značajan uticaj imati i proces enkapsidacije (stvaranje novih čestica), a verovatno i širenje virusa kroz biljku (Jacquemond, 2012).

Stvaranje proteina 2b kodira subgenomna RNK 4A (Ding et al., 1994). Protein 2b ima ulogu supresora u post-transkripcijskom utišavanju gena. Ovaj protein utiče na proces utišavanja gena inhibirajući slanje signala za pokretanje samog mehanizma u

udaljenim tkivima i ometajući metilaciju DNK u tim tkivima (**Brigneti et al., 1998; Li et al., 1999**). Najverovatnije da lokalizacija 2b proteina u jedru mu omogućava da spreči DNK metilaciju (**Lucy et al., 2000; Mayers et al., 2000**), jer mutacije na 2b proteinu koje onemogućavaju njegovu lokalizaciju u jedru, onemogućavaju i njegovu ulogu u utišavanju gena (**Lucy et al., 2000**). Protein 2b učestvuje u širenju virusa i ispoljavanju virulentnosti, kao i aktivaciji transkripcije (**Ham et al., 1999; Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Delecije prvih 15-16 aminokiselina na C kraju 2b proteina dovele su do inhibicije aktivacije transkripcije, akumulacije virusa i ispoljavanja virulentnosti (**Ding et al., 1995**), međutim nisu uticale na njegovu lokalizaciju u jedru i funkciju supresora utišavanja gena (**Lucy et al., 2000**). Tako da ispoljavanje virulentnosti i funkcija supresora utišavanja gena ne moraju biti povezane funkcije 2b gena (**Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Protein 2b inhibira aktivnost malih ometajućih RNK (*small interfering RNA*, siRNA) i Agronaut-a (AGO, proteini koji se vezuju za male nekodirajuće RNK) tako što se direktno vezuje za njih (**Mochizuki, 2011**) i na taj način deaktivira signal za post-transkripciono utišavanje gena u udaljenim biljnim tkivima. Smatra se da 2b protein CMV može da utiče na pojavu sinergističkog efekta prilikom mešanih infekcija CMV i drugih virusa. Tako je utvrđeno da ekspresija ovog proteina u mešanim infekcijama sa TMV ili *Potato virus X* (PVX) povećava virulentnost ovih virusa (**Brigneti et al., 1998; Li et al., 1999**). Takođe, ovaj protein, inhibira salicilnu (**Ji and Ding, 2001**) i jasmonsku kiselinu (**Lewsey et al., 2010**) koje imaju funkciju u odbrambenim reakcijama biljaka pri napadu patogena (**Ji and Ding, 2001**). Ovaj protein ima i direktnu ulogu u sistemskom kretanju virusa kroz biljku (**Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012**). Pojedini izolati virusa koji su nastali supstitucijom 2b gena izolata poreklom iz II podgrupe sa 2b genom nekog virulentnijeg izolata poreklom iz IA podgrupe doveli su do nastanka hipervirulentnosti prvobitnog izolata, ali ne i do bržeg nakupljanja virusa u sistemsko zaraženom lišću (**Shi et al., 2002; Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Smatra se da virulentnost prouzrokovana 2b proteinom nije određena brzinom kretanja virusa (**Palukaitis and García-Arenal, 2003**), ali da bi nedostatak 2b proteina u genomu CMV smanjio brzinu širenja virusa u biljci ili bi čak i sprečio sistemsku infekciju, u zavisnosti od vrste biljke domaćina (**Ding et al., 1995; Soards et al., 2002**) i njene starosti (**Ji and Ding, 2001**). Ovaj protein se može smatrati neophodnim za širenje virusa kod sojeva nastalih

pseudorekombinacijama kod kojih RNK 1 i 2 potiču od CMV, a RNK 3 od TAV (Shi et al., 2003). Smatra se da 2b protein ima indirektnu ulogu u procesu rekombinacije, iako nije povezan sa ćelijskim komponentama koje grade replikacioni kompleks virusa, utiče na selekciju rekombinantnih ili pseudorekombinantnih virusnih RNK koji će se održati u prirodi (Mayers et al., 2000; Cillo et al., 2002; Palukaitis and García-Arenal, 2003; Shi et al., 2003).

Stvaranje proteina 3a kodira RNK 3 (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Iako svi virusni proteini mogu učestovati u kretanju virusa u biljci, za 3a protein se smatra da je transportni protein („*movement protein*“, MP) zbog toga što poseduje glavne karakteristike MP kao što su lokalizacija na plazmodezmama, sposobnost da poveća masu molekula koji pasivno mogu proći kroz plazmodezme (*size exclusion limit*, SEL), pospešuje kretanje ne samo RNK već i sebe samog kroz plazmodezme, ima sposobnost vezivanja za jednolančane RNK bez obzira na sekvencu, kao i za različite RNK virusa preko specifičnog dela na svom C kraju i dva mesta u sredini, a takođe ima mogućnost da veže RNK CMV izolata koji nemaju svoj MP (Jacquemon, 2012). Za razliku od 1a i 2a proteina, protein 3a (MP) nije neophodan za replikaciju virusa, ali je neophodan za njegovo kretanje (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Pored lokalizacije 3a proteina u plazmodezmama, gde omogućava kretanje od ćelije do ćelije, on se može naći i unutar sitastih cevi, što omogućava sistemično kretanje virusa kroz biljku (Blackman et al., 1998; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Kod nekih biljaka domaćina u kretanje od ćelije do ćelije su uključeni i proteini koje kodira RNK 2 (Jacquemon, 2012). Promene nekih od aminokiselina u okviru 3a proteina mogu dovesti do gubitka funkcije ovog proteina, bilo da se inhibira kretanje od ćelije do ćelije ili sistemično kretanje kroz biljku, što ukazuje da je ovaj protein neophodan za obe vrste kretanja (Li et al., 2001; Nagano et al., 2001; Palukaitis and García-Arenal, 2003).

Takođe, RNK 3 nosi i gen koji se prepisuje u subgenomnu RNK 4 i kodira sintezu 3b proteina, odnosno protein omotača virusa („*coat protein*“, CP) (Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemon, 2012). CP je jedini protein koji ulazi u sastav virusne čestice (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Pored MP, 3b je takođe potreban za kretanje virusa kako u biljci, tako i od biljke do biljke (Boccard and Baucombe, 1993; Canto et al., 1997). CP je neophodan za kretanje virusa od ćelije do ćelije, iako se čini da je njegova uloga u ovom procesu indirektna. CP pospešuje ovaj

način kretanja kroz interakciju ne samo sa delovima virusa, već i sa biljkom domaćinom (**Kaplan et al., 1998; Wong et al., 1999**). Takođe, jasno je da protein omotača učestvuje i u sistemskom kretanju, kao i prenošenju od biljke do biljke, gde njegova uloga nije samo zaštita virusne RNK od degradacije, što je pokazano njegovim uticajem na kretanje od ćelije do ćelije kod nekih biljaka domaćina, kao i time što ima ključnu ulogu u prenošenju virusa vašima od domaćina do domaćina (**Wong et al., 1999; Takeshita et al., 2001; Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Ispitivanja RNK 3 rekombinantnih izolata CMV i TAV pokazala su da je za efikasno kretanje virusa neophodna kompatibilnost između 29 amino kiselina C-terminusa MP sa 2/3 aminokiselina CP koje se nalaze na C-terminusu (**Salánki et al., 2004**). **Kim et al. (2004)** su dokazali da je kretanje unutar ćelije ostvarljivo i kod onih izolata kod kojih su izbrisane 33 amino kiseline na C-terminusu MP, ali je kod ovih izolata sistemsko kretanje veoma redukovano.

Takođe, dokazana je i interakcija 3b i 2a proteina, pri čemu ovaj kompleks verovatno učestvuje u kretanju virusnog potomstva od ćelije do ćelije (**Hwang et al., 2005; Salánki et al., 2011**).

2.9. Simptomatologija

CMV izaziva različite tipove simptoma u zavisnosti pre svega od biljke domaćina, vremena infekcije, soja virusa i uslova spoljašnje sredine. Simptomi koje izaziva CMV u vidu svetlozelenog i tamno zelenog mozaika, hloroze, redukcije lisne površine, nitavosti, uvijenosti lista, malformacija, kao i lokalnih nekrotičnih i hlorotičnih pega nisu karakteristični samo za zaraze izazvane CMV. Slične tipove simptoma mogu izazvati i drugi virusi, tako da se samo na osnovu simptoma ne može sa sigurnošću potvrditi prisustvo CMV (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**).

2.10. Epidemiologija

Širenje CMV u prirodi omogućavaju njegovi vektori, biljne vaši. Opisan je veliki broj vrsta biljnih vaši koje prenose virus na neperzistentan način. Smatra se da u prirodi CMV prenosi više od 80 vrsta biljnih vaši koje su sposobne da usvoje/prenesu virus ne samo hraneći se na svojim biljkama domaćinima, već i prilikom probne ishrane, kada vaš više puta na kratko ubada svoj stilet u biljku, ispitujući da li je to njena

biljka hraniteljka ili ne (**Gallitelli, 2000; Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Najčešći i najviše proučavani vektori su *Myzus persicae* i *Aphis gossypii*. Većina sojeva virusa može se preneti sa ove dve vrste vaši, jer je specifičnost prenošenja virusa u odnosu na vrstu vaši jako niska. Veoma efikasni vektori CMV su i *A. glycines*, *Acyrtosiphon pisum* i *Therioaphis trifolii* (**Gildow et al., 2008**). Efikasnost prenošenja virusa zavisi od soja virusa, biljke koja predstavlja izvor zaraze i biljke na kojoj se vektor kasnije hrani, kao i od vrste i biotipa vektora (**Palukaitis et al., 1992**), mada veza između efikasnosti prenošenja i akumulacije virusa u izvornoj biljci još nije dovoljno razjašnjena. Prisustvo satRNK kod zaraženih biljaka povezano je sa nižom koncentracijum virusa u biljci i sa smanjenom efikasnošću prenošenja vašima, a što je naročito izraženo kod izolata koji poseduju nekrogene satRNK (**Escriu et al., 2000**). Satelitne RNK značajno smanjuju replikaciju virusa, pa u tim slučajevima efikasnost prenošenja, kao i eventualna pojava epidemija u usevima zavise od gustine populacije vektora (**Escriu et al., 2000**).

Najveći broj sojeva CMV prenosi se vašima, međutim postoje i sojevi koji imaju veoma nisku efikasnost prenošenja vašima (**Palukaitis and García-Arenal, 2003; Jacquemond, 2012**). Neki od tih sojeva su iskorišćeni kao potvrda da je protein omotača jedini virusno kodirani faktor koji određuje mogućnost i efikasnost prenošenja vašima (**Gera et al., 1979; Chen and Francki, 1990**). Međutim, izolati koji imaju manju efikasnost prenošenja vašima, taj nedostatak mogu da prevaziđu koristeći delove genoma drugih izolata koji učestvuju u mešanim infekcijama, što može da dovede do pojave reasortmenta (pseudorekombinacija), odnosno izmene delova genoma između različitih izolata (**Perry and Francki, 1992**). Ispitivanjem sojeva koji se razlikuju u prenosivosti vašima utvrđeno je da različiti regioni CP različito utiču na prenošenje virusa, odnosno aminokiseline na različitim pozicijama odgovorne su za prenošenje CMV različitim vrstama vaši. Aminokiseline na pozicijama 25, 129, 214 odgovorne su za efikasno prenošenje pomoću *M. persicae*, dok su aminokiseline na pozicijama 129, 162 i 165 odgovorne za prenošenje pomoću *A. gossypii* (**Perry et al., 1998; García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Aminokiseline na ovim pozicijama u stvari su ključne za interakciju između stiletta vaši i virusne čestice, utičući na njenu stabilnost. **Ng et al. (2005)** su potvrdili uticaj aminokiseline na poziciji 162 na stabilnost i efikasnost prenošenja izolata ovog virusa, ali ne i aminokiseline na poziciji 129.

Na površini proteinskog omotača ustanovljeno je postojanje β H- β I petlje (β „stands” H and I, β H- β I loop), visoko konzervativnog regiona negativnog naelektrisanja, koji utiče na prenošenje virusa vašima. Taj visoko konzervativan deo predstavljaju šest do osam aminokiselina u β H- β I petlji koja je prisutna kod virusa iz *Cucumovirus* roda (Liu et al., 2002). Smatra se da građa kapsida virusa ima uticaj na stabilnost virusnih čestica, što se odražava i na sposobnost prenošenja vašima. Kod nekih sojeva ovog virusa potvrđena je veza između neprenošenja vašima i nestabilnosti virusnih čestica (Ng et al., 2005).

Pored prenošenja vašima, CMV može da se prenese u različitom stepenu i semenom najmanje 20 biljnih vrsta, kako gajenih tako i biljaka iz spontane flore (Sacristán, 2004). Prenošnje semenom gajenih biljaka uglavnom je vezano za biljke iz familije Fabaceae i Brassicaceae, ali i za neke predstavnike familije Cucurbitaceae (Gallitelli, 2000). CMV se može preneti semenom: *Glycine max* (30-100%), *Phaseolus vulgaris* (0,3-54%), *Spinacia oleracea* (15%), *Echinocystis lobata* (9-55%), *Lupinus angustifolus* (12-34%), *Sprengula arvensis* (1-40%), *Vinga unguiculata* (4-28%), *Stellaria media* (1-40%), *Lamium purpureum* (4%), *Cerastium holostoides* (2%), *Senecio vilgaris*, *Portulaca oleracea* (60-100%) i drugih (Palukaitis et al., 1992; Yang et al., 1997; Gallitelli, 2000). Iako je jednim ispitivanjem utvrđeno da se CMV prenosi i semenom krastavca (1,4%), opšte je prihvaćen stav da se ne prenosi, ali se prenosi semenom dinje (2,1%) i *C. moshata* (0,7%), dok se semenom različitih formi vrste *C. pepo* virus ne prenosi (Palukaitis et al., 1992). Međutim, Gumus et al. (2004) su utvrdili prenošenje CMV semenom dinje (18,5%) i obične tikve (18,5%). U proučavanju prenošenja CMV semenom uljane tikve golice postoje oprečni literaturni podaci. Nekim ispitivanjima nije dokazano prenošenje CMV (Tóbiás et al., 2003), dok druga potvrđuju tu mogućnost (Tóbiás et al., 2008). Iako postoji podatak da se CMV može preneti semenom pojedinih hibrida paradajza (Park and Cha, 2002), opšte je prihvaćen stav da se ne prenosi semenom ove biljne vrste (Zitter and Murphy, 2014). Noviji podaci ukazuju da se može preneti i semenom paprike (Ali and Kobayashi, 2010). Mehanizam prenošenja semenom još uvek nije poznat, ali je utvrđeno da se u semenu *Stellaria media* virusne čestice nalaze u embrionu, a u divljem krastavcu u endospermu (Palukaitis et al., 1992). Ispitivanja prenošenja virusa semenom spanaća, pokazala su da dolazi do replikacije virusa u embrionu, endospermu i polenu (Yang et

al., 1997). Smatra se da je prenošenje CMV semenom uslovljeno 1a proteinom koji predstavlja jednu od komponenti kompleksa replikaze, te njegov nedostatak u ćelijama embriona predstavlja glavni razlog nemogućnosti prenošenja virusa semenom kod mnogih domaćina (**Gallitelli, 2000**).

2.11. Varijabilnost i evolucija

Prema opšte prihvaćenim literaturnim podacima izolati CMV podeljeni su u dve podgrupe, označene kao podgrupa I (ekvivalentne podgrupama S-I, WT) i II (ekvivalentne podgrupama S-II, S), na osnovu bioloških, seroloških i molekularnih osobina (**Palukaitis et al., 1992; Rizos et al., 1992; Anonymous, 1998; Gallitelli, 1998**). Procenat nukleotidne identičnosti između izolata koji pripadaju različitim grupama iznosi od 69 do 77%, u zavisnosti od vrste RNK, dužine regiona koji se poredi, kao i od samih izolata koji se porede, a najveće razlike između sekvenci izolata prisutne su kod RNK 2. Procenat sličnosti sekvenci izolata u okviru podgrupe II veoma je visok i iznosi 96%, dok je između izolata podgrupe I nešto niži i iznosi 88%. Ovakva sličnost ukazuje na veću heterogenost podgrupe I u odnosu na podgrupu II, što potvrđuje dalju podelu podgrupe I na dve podgrupe (**Rizos et al., 1992; Davino et al., 2005; Chen et al., 2007; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Afreen et al., 2009**). **Palukaitis and Zaitlin (1997)** su predložili izdvajanje podgrupe IB u koju bi bili svrstani izolati poreklom iz Azije i podgrupe IA gde bi bili svrstani svi ostali izolati (**Roossinck et al., 1999; García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Izolati podgrupe I su podeljeni u podgrupu IA i IB na osnovu homologije sekvenci 5'NTR (netranslirajućeg regiona) RNK 3 i na osnovu razlika u patogenosti na vigni (*Vigna unguiculata*), pri čemu izolati IA podgrupe izazivaju sistemične simptome poput mozaika, dok izolati IB podgrupe izazivaju lokalne nekrotične lezije na inokulisanim listovima (**Daniels and Campbell, 1992**). Filogenetske analize CP gena potvrdile su ovo grupisanje i ukazale na tri najznačajnija događaja u evoluciji CMV. Prvi je izdvajanje izolata podgrupe II, drugi je doveo do odvajanja izolata u okviru podgrupe IB, a treći do izdvajanja izolata podgrupe IA (**Roossinck et al., 1999; Jacquemond, 2012**). Dalje analize, pre svega gena koji se nalaze na RNK 3 ukazale su da je podgrupa IA monofiletička za razliku od IB koja je polifiletička (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**). Analiza RNK 2 (2a i 2b gena) pokazuju da su IA i IB monofiletičke grupe, dok analize RNK 1, odnosno 1a gena ne

ukazuju na jasno poreklo podgrupa IA i IB. Sve ovo ukazuje da je svaka od ove tri RNK imala različitu evolutivnu istoriju (**Roossinck, 2002**).

Filogenetske analize na osnovu različitih gena CMV nisu u potpunosti podržale klasifikaciju zasnovanu na CP genu što potvrđuje da su različite RNK imale nezavisnu evoluciju, odnosno ukazuje na značajnu ulogu pseudrekombinacija u evoluciji CMV (**Roossinck, 2002**). Usled visoke varijabilnosti IB podgrupe, prema **Liu et al. (2009)** došlo je do izdvajanja i podgrupe IC u okviru postojeće IB na osnovu analiza 1a gena. Filogenetske analize 2a, 2b, CP i MP gena nisu pokazale ovakvu podeljenost podgrupe I, što potvrđuje teoriju odvojene evolucije različitih RNK (**Roossinck, 2002**). Dalja proučavanja većeg broja izolata dovela su do izdvajanja nove podgrupe III što je zasnovano na filogenetskim analizama CP, MP i 1a, kao i 2a gena. U ovu podgrupu, prema trenutnim podacima svrstana su samo dva izolata, BX i PHz poreklom iz Kine, a koji prema filogenetskom analizama 2b gena pripadaju IB podgrupi (**Liu et al., 2009; Jacquemond, 2012**). Filogenetska stabla rekonstruisana na osnovu aminokiselinskih sekvenci 1a, 2a, 3a i 3b ukazala su na istu podelu u okviru prirodne populacije CMV koja je podeljena na tri glavne podgrupe (I, II i III), kao i podelu podgrupe I na podgrupe IA, IB i IC na osnovu aminokiselinskih sekvenci 1a proteina (**Liu et al., 2009**). Međutim, ovakva podela IB na IB i IC podgrupu i nastanak nove podgrupe III za sada nije opšte prihvaćena od strane drugih autora.

Izvori varijabilnosti kod biljnih virusa su mutacije, rekombinacije i pseudorekombinacije, odnosno reasortment. Proučavanja koja se odnose na genetički diverzitet i moguće izvore varijacije u okviru populacije virusa imaju značaj za bolje razumevanje evolutivnih mehanizama koji su prouzrokovali varijabilnost. Podaci o proučavanju populacije CMV poreklom iz različitih regiona sveta ukazuju na varijabilnost genetičke strukture populacije ovog virusa (**Gallitelli, 2000; García-Arenal et al., 2001; Lin et al., 2003**). Detaljnije analize strukture populacije CMV u Španiji pokazuju da genetički sastav populacije varira značajno od godine do godine i od lokaliteta do lokaliteta, gde variranje nastaje kao posledica procesa rekombinacija (**Fraile et al., 1997**). Slično podacima iz Španije, izolati CMV iz Kalifornije pokazali su određene promene u geografski različitim populacijama, kao i populacijama iz različitih vegetacija ili biljaka domaćina (**Lin et al., 2003**). Interesantno je da su promene u strukturi populacije CMV u korelaciji sa promenama u populaciji njegovih najvažnijih

vektora (*Myzus persicae* i *Aphis gossypii*) (Martinez-Torres et al., 1998) ili sa pojavom satRNK (Grieco et al., 1997), pri čemu populacije u različitim regionima imaju drugačiju evolutivnu dinamiku nastanka.

Smatra se da mutacije, predstavljaju primarni izvor genetičkog variranja kod organizama, posebno kod biljnih virusa koji imaju genetičku informaciju zapisanu u obliku RNK, kao što je CMV (García-Arenal et al., 2001). Visoka stopa mutacija prouzrokovana je nepostojanjem mehanizma ispravljanja grešaka prilikom procesa transkripcije. Prema Palukaitis and García-Arenal (2003), učestalost mutacija kod CMV mnogo je veća nego kod većine drugih virusa, kao na primer TMV ili *Cowpea chlorotic mottle virus*.

Drugi izvor variranja kod CMV predstavljaju rekombinacije, razmene delova genoma na istoj RNK u procesu replikacije. Prilikom rekombinacija najčešće dolazi do promena dužih sekvenci nukleotida i uglavnom dovode do većih fenotipskih promena u populaciji u odnosu na većinu mutacija (Bonnet et al., 2005). Ovakve promene mogu da budu naročito značajne prilikom selekcije na otpornost, jer mogu značajno ili potpuno da smanje efikasnost korišćenja, do tada, otpornih sorti/hibrida (García-Arenal and McDonald, 2003). Uslov za pojavu rekombinacija je postojanje različitih izolata u istoj biljci u istom momentu. Proces replikacije je intenzivno proučavan kod roda *Bromovirus*, naročito u 3' NTR regionu (Bruyere et al., 2000; Bonnet et al., 2005). Rekombinacije intergenskog regiona („*intergenic region*”, IGR) CMV zabeležene su između izolata koji pripadaju podgrupama IA i IB u niskom procentu i jedino u eksperimentalnim uslovima (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Međutim, istraživanja sprovedena u Španiji pokazala su da ovaj vid rekombinacija postoji i u okviru prirodne populacije (Fraile et al., 1997). Analizom celog genoma CMV, Koundal et al. (2011) su utvrdili da se najveći broj mesta rekombinacije nalazi u okviru 2a gena, zatim u 2b, 1a i MP genu, a najmanje u CP genu. Kako su rekombinacije česte između izolata istog virusa, ali i između različitih virusa u okviru roda *Cucumovirus*, izolati nastali usled rekombinacija mogu imati važnu ulogu u daljoj evoluciji, što pre svega zavisi od same sposobnosti prilagođavanja rekombinanata. Postoje indikacije da su rekombinacije u 5' NTR regionu RNK 3 imale veliku ulogu u načinu grupisanja CMV (Roossinck et al., 1999). Bonnet et al. (2005) su proučavajući populaciju CMV u Španiji definisali 14 haplotipova izolata CMV. Većina haplotipova (98% populacije

virusa), predstavljaju izolati podgrupe I, od kojih je 64% izolata grupisano u 2 haplotipa koji pripadaju IA podgrupi, a 12% izolata grupisano u 3 haplotipa koji pripadaju podgrupi IB. Rekombinacije između IA i IB podgrupe, prisutne su kod 5% izolata ukupne populacije i grupisani su u 5 haplotipova, dok su rekombinacije između preostalih podgrupa prisutne kod 17% populacije grupisanih u 6 haplotipova. Prisustvo rekombinantnih izolata u prirodnoj populaciji CMV potvrđeno je od strane mnogih autora (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Tamarzizt et al., 2013; Nouri et al., 2014**).

Međusobna izmena celih genomnih segmenata, koja se naziva pseudorekombinacija ili reasortment, takođe je jedan od mogućih mehanizama varijabilnosti kod virusa sa višedelnim genomom, kakav je i CMV (**García Arenal et al., 2001**). Međusobna izmena tri genomne RNK koja se u eksperimentalnim uslovima veoma lako ostvaruje između izolata jednog virusa dovodi do većeg stepena akumulacije virusa u eksperimentalnim domaćinima (**Palukaitis et al., 1992**). Međutim, istraživanja **Fraile et al. (1997)** pokazala su da se pseudorekombinacije između izolata IA i IB podgrupe retko događaju, što ne znači da ovaj proces nije imao značajnu ulogu u evoluciji ovog virusa. Istraživanja **Fraile et al. (1997)**, **Hu and Ghabrial (1998)**, **Sarcristán et al. (2004)**, **Chen et al. (2007)**, **Maoka et al. (2010)** i **Nouri (2012)** potvrdila su postojanje pseudorekombinanata između različitih podgrupa CMV u prirodnoj populaciji ovog virusa u svetu.

Iako rekombinacije i pseudorekombinacije imaju sličnu istoriju, veća učestalost rekombinantnih izolata ukazuje na veći značaj razmene manjih delova genoma nego izmena celih genomnih segmenata u procesu pseudorekombinacije (**García-Arenal et al., 2001; García-Arenal and McDonald, 2003**).

Iako RNK virusi, koji čine najveći broj biljnih virusa, imaju veoma visoku stopu mutacija (**Drake and Holland, 1999; Malpica et al., 2002**), a najverovatnije i visoku stopu rekombinacija (**Aaziz and Tepfer, 1999; Bruyere et al., 2000**), održavanje genetičke stabilnosti kod biljnih virusa je pravilo, pa se nagomilavanje ovih promena ne favorizuje (**García-Arenal et al., 2001**). Genetička stabilnost populacije biljnih virusa rezultat je negativnog („*purifying*“) selekcionog pritiska, genetičkog drifta i efekta „uskog grla“ („*bottleneck*“) (**García-Arenal et al., 2001**). Poređenje nukleotidnih sekvenci različitih izolata virusa iz različitih geografskih regiona omogućilo je analiziranje strukture populacije na lokalnom i regionalnom nivou (**Rodríguez-Cerezo**

et al., 1991; Skotnicki et al., 1993; McNeil et al., 1996; Fraile et al., 1997; Azzam et al., 2000; Desbiez et al., 2002), što je fundamentalno za razumevanje evolutivnih mehanizama koji utiču na stvaranje i održavanje nastalih promena kao i za kontrolu patogena (Fraile et al., 1996; Higgins et al. 1999; Bousalem et al., 2000; Bateson et al., 2002; Ohsima et al., 2002; Krause-Sakate et al., 2002; Abubakar et al., 2003; Moreno et al., 2004).

Biljni RNK virusi se smatraju pogodnim za razumevanje osnovnih principa evolucije zbog činjenice da imaju kratak period replikacije, stvaraju veoma velike populacije, imaju visoku stopu genetičke varijabilnosti, kojoj doprinose greške prilikom procesa replikacije i visoka stopa mutacija (10^{-3} do 10^{-5} greške po nukleotidu i ciklusu replikacije, zbog nedostatka “*proofreading*” aktivnosti replikaze) (Domingo and Holland, 1997; Davino et al., 2012). Iako je prošlo više decenija od prvih proučavanja, za sada su ona više deskriptivnog karaktera (Roossinck, 2003). Međutim, za pojedine viruse poput *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Tsompana et al., 2005; Kaye et al., 2011), *Watermelon mosaic virus* (WMV) (Moreno et al., 2004), *Potato virus Y* (PVY) (Ogawa et al., 2008), *Soybean mosaic virus* SMV (Seo et al., 2009b), *Rice stripe virus* (RSV) (Wei et al., 2009) i CMV (Fraile et al., 1997; Lin et al., 2003, 2004; Moury et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Liu et al., 2009; Nouri et al., 2014) postoje i eksperimentalna proučavanja.

CMV se pokazao kao idealan model za proučavanje evolucije RNK virusa zbog brzih evolutivnih promena koje su prisutne u prirodnoj populaciji i koje negativno utiču na poljoprivredu (Roossinck, 2003), ali i zbog prisustva satelitna RNK (satRNK) koja je čest pratilac ovog virusa (García-Arenal et al., 2001) i koja dovodi do još većih šteta. Pojava epidemija u Španiji i Kaliforniji prouzrokovana CMV dovela je do ispitivanja strukture populacije ovog virusa u cilju pronalaženja efikasnih mera kontrole (Fraile et al., 1997; Lin et al., 2003). Na osnovu analiza strukture populacije utvrđeno je da populacija CMV odgovara metapopulaciji, odnosno genetička struktura svake subpopulacije se ne može povezati ni sa lokalitetom, ni sa godinom uzorkovanja i da su razlike u strukturi u odnosu na ta dva faktora najverovatnije nasumične. Takođe, ne može se predvideti gde i kada će se pojaviti određeni tip izolata (García-Arenal et al., 2001; Davino et al., 2012). Takva populacija odlikuje se povremenim nestankom određene populacije nakog koga sledi ponovno uspostavljanje nove populacije odnosno

rekolonizacija. Brojna istaživanja potvrdila su koncept metapopulacije kao i prisustvo rekombinanata i pseudorekombinanata u prirodnoj populaciji CMV širom sveta (**Fraile et al., 1997; García-Arenal et al., 2000; Lin et al., 2003, 2004; Sacristán et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Chen et al., 2007; Liu et al., 2009; Davino et al., 2012; Tamarzizt et al., 2013; Nouri et al., 2014**). Rezultati istraživanja **Bonnet et al. (2005)** pokazala su promene u strukturi populacije CMV u Španiji u kojoj je došlo do nestanka izolata IB podgrupe, što ukazuje na metapopulaciju ovog virusa. Analiza sekvenci izolata IB podgrupe CMV iz Španije i Italije pokazala je visoku međusobnu sličnost, te se pretpostavlja da je ova podgrupa introdukovana u Mediteranski basen iz Azije krajem 80-tih godina prošlog veka (**Gallitelli, 2000**). Istraživanja **Sacristán et al. (2004)** nisu pokazala povezanost između dinamike promena populacije CMV u korovskim i gajenim biljkama u toku istog perioda istraživanja. Učestalost CMV u korovima najviše je zavisila od habitusa biljne vrste, vegetacije i od razuđenosti biljaka na uzorkovanom području. Uprkos tome, biološka i molekularna karakterizacija nije pokazala značajne razlike u genotipovima CMV i njihovoj učestalosti. Ovo ukazuje da postoji razmena genetičkog materijala između izolata CMV iz različitih biljaka domaćina koja sprečava razlike u populaciji ovog virusa kod različitih domaćina (**Sacristán et al., 2004**). Međutim, uprkos činjenici da RNK virusi imaju visok potencijal u pogledu varijabilnosti, većina je genetički stabilna sa veoma malim diverzitetom (**García-Arenal et al., 2001**). Iako je CMV veoma varijabilan, većina istraživanja pokazuje da na oblikovanje populacije CMV u najvećem broju slučajeva utiče negativna selekcija (**Lin et al. 2004; Koundal et al. 2011; Nouri et al., 2014**), genetički drift (**Davino et al., 2012**) i efekat „uskog grla” čineći je stabilnom, što se slaže sa pravilom genetičke stabilnosti u prirodnim populacijama virusa (**García-Arenal et al., 2001; Nouri et al., 2014**). Međutim, istraživanja prirodne populacije CMV takođe pokazuju da selekcija različito utiče na rekombinovane izolate, u zavisnosti od toga na kojoj od tri RNK je došlo do promene (**Bonnet et al., 2005**), favorizujući jedne, a potiskujući druge čime direktno deluje na oblikovanje prirodne populacije CMV (**Maoka et al., 2010**). Analize strukture populacije CMV pokazale su i da je IA podgrupa prevalentna u odnosu na IB i II podgrupu ovog virusa (**Lin et al., 2003; Eiras et al., 2004; Davino et al., 2012; Tamarzizt et al., 2013; Nouri et al., 2014**).

Nastanak novih fenotipova može ugroziti efikasnost, pre svega, otpornih sorti kao najefikasnije mere kontrole, zbog čega je bitno pratiti promene u populaciji virusa nastale kroz procese mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija. Podizanje nivoa rezistentnosti biljaka domaćina predstavlja najznačajniji korak ka efikasnoj kontroli biljnih virusa, a selekcija na otpornost se zasniva na poznavanju prevalentnih i agresivnih haplotipova u populaciji određenog virusa u nekom regionu.

2.12. Kontrola

Teškoće u kontroli oboljenja koje CMV izaziva uslovljene su pre svega velikom varijabilnošću virusa, izraženom polifagnošću, kao i velikim brojem vektora-vaši koje virus prenose na neperzistentan način. Kao najznačajnije mere kontrole, **Krstić i Vico (2004)** navode proizvodnju zdravog rasada, odstranjivanje zaraženih i dosađivanje novih biljaka, uništavanje biljnih ostataka, primenu plodoreda, određivanje vremena rasađivanja, uništavanje korova i hemijsku kontrolu vektora. Međutim, kako vaši mogu da obave svoju vektorsku ulogu i pre nego što primenjeni insekticidi deluju na njih, otporne sorte i unakrsna zaštita predstavljaju najbolji način kontrole virusnih oboljenja koje izazivaju neperzistentni virusi, kakav je i CMV. Konvencionalnim metodama oplemenjivanja i selekcije, dobijeni su genotipovi spanaća, paprike i nekih tikava koji su rezistentni na CMV. Genotipovi paradajza rezistentni na CMV još uvek nisu dobijeni, iako otpornost postoji u nekim bliskim srodnicima paradajza. Kako navode **Sanford and Johnston (1985)** rezistentni genotipovi dobijeni na ovaj način još uvek nisu komercijalno dostupni i široko primenjivani, pa su razvijeni novi prilazi koji se zasnivaju na rezistentnosti koja potiče od patogena (**loc. cit. Krstić i Vico, 2004**). Ugrađivanjem CP gena CMV podgrupe I u genom biljke dobijene su biljke paradajza koje pokazuju široku otpornost na sojeve podgrupe I, ali i na sojeve podgrupe II (**Gielen et al., 1996**).

Drugi vid podizanja nivoa otpornosti biljke domaćina, unakrsna zaštita, zasniva se na postizanju zaštite od virulentnijih sojeva preinokulacijom biljaka blagim sojem virusa sa ili bez satRNK. Upotreba blagih sojeva bez satRNK ograničena je na regione gajenja osetljivih biljaka gde nema rizika od pojave CMV sojeva sa satRNK. Unakrsna zaštita u regionima gde su prisutni sojevi koji nose satRNK postiže se preinokulacijama blagih sojeva sa satRNK (**Gallitelli, 2000**).

Zbog široke rasprostranjenosti i mnogobrojnih domaćina CMV može se pogrešno zaključiti da karantinska inspekcija i testiranje nisu ni potrebni. Mere nadzora treba da budu usmerene na seme, jer na taj način moguće je sprečiti slučajne introdukcije novih sojeva kao što se desilo u slučaju pojave izolata IB podgrupe CMV u Evropi (**Gallitelli, 2000**).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) prouzrokovatelj je učestalih i veoma štetnih oboljenja povrtarskih, industrijskih i ukrasnih biljaka svuda u svetu, koja se pojedinih godina javljaju u epidemijskim razmerama. Dosadašnja proučavanja pojave, prisustva i rasprostranjenosti CMV u Srbiji pokazala su da je ovaj virus ekonomski značajan za važne poljoprivredne kulture u našoj zemlji. S obzirom na izraženu varijabilnost CMV, uslovljenu mutacijama, rekombinacijama i pseudorekombinacijama i nedovoljnim informacijama zasnovanim na molekularnim analizama, koje bi opisale strukturu populacije i rasprostranjenost određenih podgrupa CMV u Srbiji, ova doktorska disertacija će dati veoma precizna saznanja o strukturi populacije i genetičkom diverzitetu ovog virusa u našoj zemlji. Osim filogenetskih/taksonomskih analiza, disertacija će dati statistički potvrđen opis genetičke strukture populacije CMV preko određenih parametara populacione genetike. Na taj način omogućit će se utvrđivanje izvora genetičkog variranja što predstavlja osnovu za razumevanje faktora koji utiču na evolutivne promene i koji oblikuju variranje i stepen promena u prirodnoj populaciji ovog virusa u Srbiji. Nova saznanja o strukturi populacije CMV doprineće boljem poznavanju ovog virusa u našoj zemlji, pre svega razumevanju epidemioloških aspekata koji omogućavaju njegovu rasprostranjenost i štetnost. U praktičnom smislu, informacije dobijene izradom ove doktorske disertacije biće korisne za iznalaženje i primenu efikasnijih strategija kontrole oboljenja koja ovaj virus izaziva.

U cilju ostvarenja ovako složenog osnovnog zadatka, neophodno je ostvariti detaljnu karakterizaciju velikog broja izolata CMV poreklom sa različitih lokaliteta, iz različitih biljaka domaćina i izolovanih u različitim godinama, primenom širokog spektra metoda zasnovanih na različitim osobinama virusa. Postavljeni zadatak zahteva ispunjavanje sledećih ciljeva:

- serološka identifikacija CMV primenom DAS-ELISA testa u uzorcima sakupljenim tokom četvorogodišnjih istraživanja na teritoriji naše zemlje;
- biološka identifikacija i karakterizacija odabranih izolata CMV na širokom krugu eksperimentalnih biljaka-domaćina;

- molekularna identifikacija odabranih izolata amplifikacijom pet genskih regiona virusa i analiza dobijenih sekvenci kroz proračun genetičkog diverziteta;
- analiza rekonstruisanih filogenetskih stabala na osnovu kompletnih ili delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona trodelnog genoma CMV;
- analiza sekvenci genskih regiona odabranih izolata korišćenjem metode polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata;
- analiza rekombinacije korišćenjem RDP softvera;
- utvrđivanje uticaja selekcionog pritiska na prirodnu populaciju CMV
- molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK

Zahvaljujući široko planiranim vizuelnim pregledima, serološkim i molekularnim testovima, koji su dopunjeni analizom sekvenci različitih delova genoma virusa, dobiće se prvi podaci o genetičkoj strukturi prirodne populacije CMV izolacijom virusa sa različitih domaćina, lokaliteta i godina. Takođe, dobiće se i prvi podaci o faktorima koji oblikuju populaciju ovog virusa u Srbiji.

Postavljenim ciljevima, ova disertacija doprineće ne samo proučavanju populacije ovog virusa, nego će predstavljati i model sistem za proučavanje populacija drugih fitopatogenih virusa u našoj zemlji na načelima molekularne populacione genetike.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka

Tokom četvorogodišnjeg perioda (2010-2013), na velikom broju lokaliteta u Srbiji, obavljani su pregledi različitih povrtarskih, industrijskih i ukrasnih biljaka, u cilju sakupljanja uzoraka kako na otvorenom polju, tako i u zaštićenom prostoru (staklenici i plastenici). Ukupno je pregledano 130 različitih lokaliteta pri čemu je sakupljeno 1378 uzorka 97 različitih biljnih vrsta. Prilikom pregleda različitih useva, za dalje analize, sakupljeni su uzorci lišća i plodova biljaka sa simptomima koji su ukazivali na virusnu zarazu. Pored gajenih biljaka, sakupljene su i korovske vrste koje su se nalazile u usevima ili u neposrednoj blizini, na utrinama i ivicama parcela. Sakupljeni uzorci spakovani su u plastične kese, obeleženi i transportovani u laboratoriju i čuvani na temperaturi -80°C do analize.

Pregled terena tokom 2010. godine obuhvatio je 45 lokaliteta i 47 različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti: *Cucurbita pepo* 'Genovese', *C. pepo*-nepoznata sorta, *C. pepo* var. *styriaca* ('Olinka', 'Horgoš', 'Gleisdorfer Ölkürbis', 'Weis 371', 'Wrinkle bat' i 'Long of Nepal'), *C. maxima*, *C. mixta*, *Lagenaria siceraria*, *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Citrullus lanatus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Petunia* sp., *Gerbera* sp., *Chrysanthemum* sp., *Impatiens walleriana*, *Impatiens hawkeri*, *Vinca* sp., *Begonia* sp., *Gloxinia* sp., *Dahlia* sp., *Dianthus* sp., *Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Wisteria sinensis*, *Hibiscus trionum*, *Mentha piperita*, *Stellaria media*, *Papaver rhoeas*, *Chenopodium album*, *Solanum nigrum*, *Sinapis alba*, *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Lamium* sp., *Plantago lanceolata*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus* sp., *Polygonum aviculare*, *Datura stramonium*, *Portulaca oleracea*, *Abutilon theophrasti* i *Ambrosia artemisiifolia*. Ukupno je sakupljeno 326 uzoraka sa simptomima koji su upućivali na virusnu infekciju.

U 2011. godini pregledano je ukupno 37 različitih lokaliteta i sakupljeno 607 uzoraka 44 različite biljne vrste, njihovih varijeteta ili sorti: *Cucurbita pepo* var. *styriaca* ('Olinka' i 'Gleisdorfer Ölkürbis'), *C. pepo* ('Beogradska' i 'Cue Ball'), *C. pepo*-nepoznata sorta, *C. moschata*, *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Phaseolus vulgaris*, *Lactuca serriola*, *Apium graveolens*, *Rosa* sp., *Ocimum basilicum*, *Mentha longifolia*,

Hibiscus trionum, *Salvia verticillata*, *Juglans regia*, *Chrysanthemum* sp., *Cirsium arvense*, *Epilobium parviflorum*, *Rumex* sp., *Euphorbia salicifolia*, *Sinapis arvensis*, *Stenactis annua*, *Solanum nigrum*, *Rorippa austriaca*, *Polygonum persicaria*, *Amaranthus retroflexus*, *Xanthium strumarium*, *Chenopodium album*, *C. hybridum*, *Datura stramonium*, *Plantago lanceolata*, *Atriplex patula*, *Geranium dissectum*, *Ballota nigra*, *Artemisia vulgaris*, *Erigeron canadensis*, *Convolvulus arvensis* i *Lepidium draba*.

Na 46 lokaliteta gajenja, tokom 2012. godine, ukupno je sakupljeno 272 uzorka 23 različite biljne vrste: *C. pepo*-nepoznata sorta, *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Apium graveolens*, *Medicago sativa*, *Peperomia tuisana*, *Brugmansia* sp., *Begonia x tuberhybrida*, *Vinca* sp., *Pelargonium* sp., *Heracleum sphondylium*, *Urtica dioica*, *Polygonum aviculare*, *Viola odorata*, *Malva sylvestris*, *Stenactis annua* i *Taraxacum officinale*.

Tokom 2013. godine pregledano je 42 lokaliteta i sakupljeno 173 uzorka 11 različitih biljnih vrsta: *C. pepo*-nepoznata sorta, *Cucumis melo*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Petunia* sp., *Peperomia tuisana*, *Tulipa* sp., *Iris* sp. i *Hyacinthus orientalis*.

4.2. Serološka ispitivanja

Serološka testiranja sakupljenih uzoraka obavljena su primenom imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) uz korišćenje komercijalnog poliklonalnog antiseruma specifičnog za detekciju virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Bioreba AG, Švajcarska), po protokolu koju su opisali **Clark and Adams (1977)**.

Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u odgovarajućem puferu, u razređenju 1:6.

DAS-ELISA izvedena je po sledećem postupku: polistirenske ploče obložene su unošenjem u svaki bunarčić po 200 µl razređenja IgG (1:1000) u puferu za prekrivanje, a prema preporuci proizvođača. Obložene ploče su inkubirane 4 h na 37°C, a potom isprane 4 puta puferom za ispiranje. U bunarčiće je dodato po 200 µl pripremljenog ekstrakta ispitivanih uzoraka, komercijalne negativne i pozitivne kontrole i ploče su

inkubirane na 4°C preko noći. Posle ispiranja, u bunarčice je uneto po 200 µl antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (*antibody-AP-conjugate*) u konjugatnom puferu razređenja preporučenog od strane proizvođača, a zatim su ploče inkubirane 4 h na 37°C. Posle inkubacije, mikrotitarske ploče ispirane su kako je napred navedeno, a zatim je u svaki bunarčić uneto po 200 µl pripremljenog supstrata (p-nitrofenilfosfata) rastvorenog u supstratnom puferu (20 µl/20 ml). Ploče su inkubirane 1-2 h na sobnoj temperaturi do pojave bojene reakcije.

Hidroliza supstrata, odnosno promena boje ocenjena je vizuelno, a zatim i merenjem apsorpcije na 405 nm svakog pojedinačnog uzorka na spektrofotometru (Microplate reader-DAS s.r.l., Italy), 1-2 h po nanošenju supstrata. Vrednost apsorpcije izračunata je kao srednja vrednost apsorpcije dva bunarčića jednog uzorka, a kao pozitivni smatrani su oni uzorci čija je vrednost apsorpcije na 405 nm bila dva i više puta veća od srednje vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Za izvođenje ove metode korišćeni su sledeći puferi:

Pufer za prekrivanje ploča (*Coating buffer*), pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
dH ₂ O	1 l

Pufer za ispiranje (*Wash buffer*), pH 7,4

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	2,5 ml
dH ₂ O	5 l

Ekstrakcioni pufer (*Extraction buffer*), pH 7,4

TRIS	2,4 g
NaCl	8,0 g
PVP (viscosity K25)	20 g

NaN ₃	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	1 l

Konjugatni pufer (*Conjugate buffer*), pH 7,4

PVP (viscosity K25)	20 g
bovine serum albumin	2 g
NaN ₃	0,2 g
NaCl	8,0 g
TRIS	2,4 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	1 l

Supstratni pufer (*Substrate buffer*), pH 9,8

diethanolamine	97 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
dH ₂ O	125 ml

4.3. Odabir izolata za molekularne analize

Izolati za proučavanje genetičke strukture populacije CMV dobijeni su iz 44 uzorka različitih biljnih vrsta sakupljenih na 30 različitih lokaliteta (Tabela 1). Odabir uzoraka vršen je tako da obuhvati što veći broj biljaka domaćina ili istih domaćina sa različitim simptomima prirodne zaraze poreklom sa što većeg broja lokaliteta na teritoriji naše zemlje, sakupljenih tokom različitih godina.

Na taj način odabrano je osam uzoraka različitih formi obične tikve (četiri uzorka uljane tikve (*Cucurbita pepo* 'Olinka'), dva uzorka cukini tikvice (*C. pepo* 'Tosca' i 'Genovese') i po jedan uzorak beogradske tikvice (*C. pepo* 'Beogradska') i obične tikve nepoznate sorte (*C. pepo*-nepoznate sorte)), po sedam uzoraka paradajza

(*Solanum lycopersicum*) i paprike (*Capsicum annuum*), pet uzoraka vrga (*Lagenaria siceraria*), po tri uzorka duvana (*Nicotiana tabacum*) i krastavca (*Cucumis sativus*), po dva uzorka lubenice (*Citrullus lanatus*), dinje (*Cucumis melo*) i peperomije (*Peperomia tuisana*), kao i po jedan uzorak bundeve (*Cucurbita maxima*), pasulja (*Phaseolus vulgaris*), ukrasnog bagrema (*Wisteria sinensis*), lale (*Tulipa* sp.) i krasolike (*Stenactis annua*). Oznaka uzorka sastoji se iz broja pod kojim se uzorak vodi u tabeli uzoraka Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet) i godine sakupljanja, a spisak odabranih uzoraka, njihovo poreklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani su u tabeli 1.

Za dalju molekularnu karakterizaciju na osnovu analize sekvence CP gena odabrano je 36 uzoraka 16 biljaka domaćina poreklom sa 26 lokaliteta sakupljenih tokom ovih istraživanja ili iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju sakupljenih od 2007. do 2009. godine, kao i dva izolata poreklom iz duvana (650-07 i 702-07) i šest izolata poreklom iz biljaka familije Cucurbitaceae (115-08, 151-08, 717-11, 720-11, 270-09 i 500-10) koji su na osnovu analize sekvence CP gena i stepena nukleotidne sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta prethodno identifikovani kao CMV (Đekić, 2009; Vučurović, 2012).

Za dalja molekularna proučavanja na osnovu analize sekvenci 2a, 2b i MP gena odabrano je ukupno 19 uzoraka 17 različitih biljaka domaćina poreklom sa 15 različitih lokaliteta. Za svaku biljnu vrstu odabran je po jedan uzorak, izuzev za paradajz i papriku gde su odabrana po dva uzorka odnosno običnu tikvu, gde je odabrano pet uzorka različitih formi obične tikve, zbog velikog ekonomskog značaja ovih biljnih vrsta za našu zemlju.

Kako se 1a gen smatra manje varijabilnim u odnosu na druge gene CMV (Liu et al., 2009), proučavanje prirodne populacije CMV na osnovu analize sekvence ovog gena obuhvatilo je izolate dobijene iz 15 uzoraka 13 različitih biljaka domaćina poreklom sa 12 različitih lokaliteta.

U cilju dobijanja i održavanja izolata CMV obavljene su mehaničke inokulacije test biljaka *Chenopodium quinoa* i *Nicotiana glutinosa* inokulumom pripremljenim od lišća, stabla ili plodova odabranih uzoraka po standardnoj proceduri (Krstić i Tošić, 1994). Postupak mehaničkih inokulacija izveden je homogenizacijom biljnog materijala

u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera (pH 7) u odnosu 1:1 i korišćenjem karborundum praha (finoće 400 meša). Tako pripremljenim inokulumom obavljene su najpre mehaničke inokulacije *C. quinoa* u cilju biološkog kloniranja izolata kroz pojedinačne pege na inokulisanim listovima, a nakon toga dobijeni izolati su održavani u biljkama *N. glutinosa*.

Tabela 1. Pregled izolata *Cucumber mosaic virus* iz Srbije korišćenih za molekularne analize

Oznaka izolata	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Analiziran genski region				
				1a gen	2a gen	2b gen	MP gen	CP gen
415-07 ^{1,4}	2007	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Irmovo	+	+	+	+	+
115-08 ^{2,3}	2008		Gardinovci	-	-	-	-	+
151-08 ^{2,3}			Kulpin	-	-	-	-	+
171-08 ^{1,3}			Staro selo	-	-	-	-	+
270-09 ^{2,4}	2009	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	-	+	+	+	+
230-10 ⁴	2010	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	Hetin	-	+	+	+	+
201-11 ⁴	2011	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Mačkovac	-	+	+	+	+
500-10 ^{2,4}	2010	<i>Cucurbita pepo</i> - nepoznata sorta	Porodin	-	+	+	+	+
242-09 ^{1,3}	2009	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	-	-	-	-	+
514-11 ³	2011	<i>Cucumis sativus</i>	Kupusina	-	-	-	-	+
570-11 ⁴			Debrc	+	+	+	+	+
283-12 ³			2012	Porodin	-	-	-	-
449-12 ³	2012	<i>Citrullus lanatus</i>	Silbaš	-	-	-	-	+
473-12 ⁴			Gornji Tavankut	+	+	+	+	+
610-11 ³			2011	<i>Cucumis melo</i>	Togočevce	-	-	-
286-12 ⁴	2012		Porodin	+	+	+	+	+
163-08 ^{1,3}	2008	<i>Lagenaria siceraria</i>	Bački Petrovac	-	-	-	-	+
674-11 ⁴	2011		Porodin	+	+	+	+	+
717-11 ^{2,3}	2012			-	-	-	-	+
720-11 ^{2,3}				-	-	-	-	+
280-12 ³				-	-	-	-	+
477-07 ^{1,3}	2007	<i>Capsicum annuum</i>	Apatin	-	-	-	-	+
598-07 ^{1,3}	2008		Novi Kneževac	-	-	-	-	+
542-08 ^{1,3}			Donji	-	-	-	-	+

			Tavankut					
471-09 ^{1,3}	2009		Prigrevica	-	-	-	-	+
723-10 ⁴	2010		Smederevo	+	+	+	+	+
581-11 ⁴	2011		Cekavica	+	+	+	+	+
581p-11 ³				-	-	-	-	+
746-07 ^{1,3}	2007	<i>Solanum lycopersicum</i>	Obrenovac	-	-	-	-	+
101-08 ^{1,4}	2008		Družetić	+	+	+	+	+
670-08 ^{1,4}			Stajkovce	+	+	+	+	+
207-09 ^{1,3}	2009		Mačkovac	-	-	-	-	+
647-10 ³	2010		Togočevce	-	-	-	-	+
533-2-11 ³	2011		Kopusina	-	-	-	-	+
AR1-12 ³	2012		Aradac	-	-	-	-	+
650-07 ^{2,4}	2007	<i>Nicotiana tabacum</i>	Bački Petrovac	+	+	+	+	+
702-07 ^{2,3}			Futog	-	-	-	-	+
202-08 ^{1,3}	2008		Lapotince	-	-	-	-	+
267-13 ⁴	2013	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vladičin Han	+	+	+	+	+
1-12 ⁴	2012	<i>Peperomia tuisana</i>	Beograd	+	+	+	+	+
52-13 ³	2013			-	-	-	-	+
540-10 ⁴	2010	<i>Wisteria sinensis</i>	Porodin	+	+	+	+	+
79-13 ⁴	2013	<i>Tulipa sp.</i>	Krnjača	+	+	+	+	+
58-12 ⁴	2012	<i>Stenactis annua</i>	Beograd	+	+	+	+	+

Legenda: ¹ - Izolati CMV iz kolekcije Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet); ² - Izolati CMV iz prethodnih istraživanja (Đekić, 2009; Vučurović, 2012); ³ - Izolati CMV analizirani tokom ovih istraživanja samo na osnovu sekvence CP gena; ⁴ - Izolati CMV analizirani tokom ovih istraživanja na osnovu sekvenci višegenskih regiona.

4.4. Amplifikacija genskih regiona odabranih izolata

Amplifikacija različitih genskih regiona odabranih izolata obavljena je primenom metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse transcription polimerase chain reaction*, RT-PCR) uz korišćenje odgovarajućih prajmera dizajniranih tokom ovih istraživanja ili prethodno opisanih u literaturi.

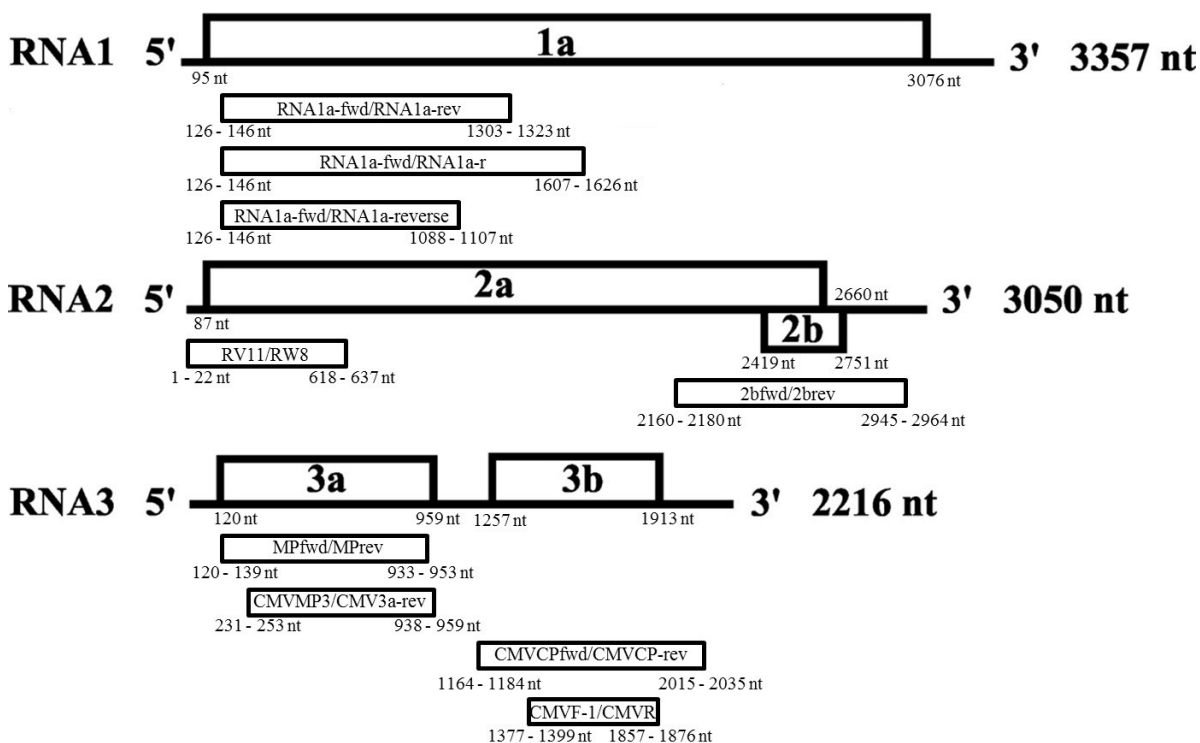
4.4.1. Estrakcija ukupne RNK

RT-PCR metodi prethodilo je ekstrahovanje ukupnih RNK iz zaraženog biljnog materijala primenom RNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Hilden, Germany). Izolacija ukupnih RNK obavljena je usitnjavanjem 100 mg izvornog biljnog materijala odabranih izolata u avanu pomoću tučka uz dodavanje tečnog azota. Usitnjen biljni materijal i tečni azot prebačeni su u ependorf tubicu od 2 ml i nakon isparavanja tečnog azota, dodato je 450 μ l RLT pufera, a zatim je sadržaj tubice kratko izmešan vorteksovanjem. U cilju što efikasnije razgradnje biljnog tkiva, tubice su inkubirane 3 min u vodenom kupatilu na 56°C. Nakon inkubacije uzorak je prebačen na QIAshredder spin filter u tubice od 2 ml i centrifugiran 3 min na maksimalnom broju obrtaja (14 000 obrtaja/min) u cilju odstranjivanja ćelijskih delova i dodatne homogenizacije lizata. Za dalji rad korišćen je supernatant pipetiran u novu ependorf tubicu u koju je dodato 225 μ l 96% etanola u cilju prosvetljavanja. Sadržaj tubice je zatim pipetiran na RNase spin filter smešten u nove kolekcione tubice od 2 ml. Centrifugiranjem uzorka 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm obezbeđeno je izdvajanje i vezivanje RNK za filter kao i uklanjanje većeg dela DNK koji se odbacuje zajedno sa supernatanom. Nakon toga, RNase spin filter smešten je u kolekcionu tubicu i više puta ispiran različitim puferima. Prvo je pipetirano 700 μ l RW1 pufera za ispiranje, a zatim je ponovo centrifugirano 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm. Tečna faza je odbačena, a na RNase spin filter pipetirano je 500 μ l RPE pufera, nakon čega je tubica centrifugirana 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm. Tečna faza je odbačena, a ispiranje RNase spin filtera ponovljeno je sa novih 500 μ l RPE pufera i centrifugiranjem 2 min na $\geq 10\ 000$ rpm. Nakon centrifugiranja RNase spin filter je prebačen u novu kolekcionu tubicu i centrifugiran 1 min na maksimalnom broju obrtaja da bi se uklonili ostaci etanola i pufera. U cilju rastvaranja izolovanih RNK na RNase spin filter pipetirano je 50 μ l

RNase free vode. Tako dobijena i izolovana RNK čuvana je na -80°C i korišćena za dalji rad.

4.4.2. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR)

RT-PCR metoda korišćena je u cilju umnožavanja različitih genskih regiona odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije. Amplifikacija svih genskih regiona (Slika 2) uključujući CP, MP, 2a, 2b i 1a gen, obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) uz korišćenje različitih parova prajmera koji omogućavaju amplifikaciju navedenih gena (Tabela 2).



Slika 2. Šematski prikaz mesta vezivanja prajmera i genskih regiona *Cucurbiturica mosaaaica virus* analiziranih u ovim istraživanjima određenih na osnovu izolata FNY

Sve RT-PCR reakcije obavljane su u 25 µl zapremine RT-PCR smeše, koja je sadržala: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 µl dNTP Miks-a (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP finalne koncentracije u smeši 400 µM), 1 µl RT-PCR enzimskog miksa (koji sadrži Omniscript Reverse transkriptazu, Sensiscript Reverse transkriptazu i HotStar Taq DNA polimerazu), 1,5-6 µl svakog

prajmera u zavisnosti od broja degenerativnih mesta u korišćenom prajmeru, 2 μ l izolovanih ukupnih RNK i RNase-free vode do ukupne zapremine od 25 μ l.

Reakcije umnožavanja izvedena su korišćenjem termosajklera (Thermocycler T-1, Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, praćena korakom u kom se odvija denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStart Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C. Nakon toga sledi trostruki korak ciklusa, koji se ponavlja određeni broj puta, a čine ga denaturacija, hibridizacija prajmera (*annealing*) i elongacija određeni vremenski period na određenoj temperaturi prilagođenoj ili preporučenoj za svaki od korišćenih prajmera (Tabela 2) i finalna elongacija 72°C 10 min.

(1) Amplifikacija CP gena. Umnožavanje CP gena odabranih izolata obavljeno je korišćenjem dva različita para prajmera. Prajmeri CMVCPfwd i CMVCPrev koji obuhvataju ceo CP gen kao i deo 5' i 3' NTR i omogućavaju amplifikaciju fragmenta očekivane veličine 871 bp, dizajnirani su tokom ovih istraživanja na osnovu 71 sekvence CP gen CMV izolata poreklom iz različitih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka, a odabranih tako da pripadaju različitim podgrupama ovog virusa. Sve sekvence su prvobitno upoređene u CLUSTAL *W* programu, integrisanom unutar softvera MEGA verzija 5.0 (Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2011), nakon čega su određeni konzervativni regioni koji su iskorišćeni za određivanje prajmerskih mesta. Kako svi izolati CMV iz Srbije nisu mogli biti amplifikovani primenom ovih prajmera, za amplifikaciju CP gena izolata 230-10 korišćen je par specifičnih prajmera CMVF-1/CMVR (Yu et al., 2005) koji omogućavaju amplifikuju dela CP gena veličine 500 bp. Na slici 2 dat je šematski prikaz amplifikovanih fragmenata koji obuhvataju ceo ili parcijalan CP gen kao i pozicija prajmerskih mesta na osnovu sekvence referentnog izolata FNY (pristupni broj D10538).

Za ova ispitivanja odabrano je 36 izolata poreklom iz 16 biljaka domaćina sakupljenih na 26 lokaliteta, a spisak odabranih izolata, njihovo poreklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani su u tabeli 1. Kao pozitivna kontrola korišćeni su izolati 115-08 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka' (Vučurović, 2012) i 650-07 iz *Nicotiana tabacum* (Đekić, 2009), koji su na osnovu analize sekvence CP gena i stepena

nukleotidne sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta prethodno identifikovani kao CMV, a kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda.

(2) Amplifikacija MP gena. Za umnožavanje dela MP gena dizajnirana su dva para specifičnih prajmera MPfwd/MPrev i CMVMP3/CMV3a-rev. Prajmeri MPfwd i MPrev koji obuhvataju deo MP gena i omogućavaju amplifikaciju fragmenta očekivane veličine 834 bp, dizajnirani su na osnovu 44 sekvence MP gena CMV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka odabranih tako da pripadaju različitim podgrupama ovog virusa. Zbog varijabilnosti populacije CMV u Srbiji i nemogućnosti umnožavanja svih odabranih izolata, na osnovu istog seta sekvenci dizajniran je i drugi par prajmera, CMVMP3/CMV3a-rev, ali korišćenjem konzervativnijih delova sekvence unutar samog MP gena. Par prajmera CMVMP3/CMV3a-rev omogućava amplifikaciju dela MP gena veličine 728 bp. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat 650-07 iz *N. tabacum*, koji je uspešno umnožen korišćenjem prvog para prajmera, a kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda. Na slici 2 dat je šematski prikaz amplifikovanih fragmenata koji obuhvataju deo MP gena kao i pozicija prajmerskih mesta na osnovu sekvence referentnog izolata FNY (pristupni broj D10538).

Za ova ispitivanja odabrano je ukupno 19 izolata poreklom iz 17 različitih biljaka domaćina i 15 različitih lokaliteta, a spisak odabranih izolata, njihovo poreklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani su u tabeli 1.

Tabela 2. Prajmeri i uslovi trostrukog koraka korišćeni za amplifikaciju genskih regiona odabranih izolata *Cucumber mosaic virus*

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca (5' do 3')	Uslovi trostrukog koraka (temperatura/vreme)			Broj ciklusa	Veličina amplikona (bp)
CP gen	CMVCPfwd	TGCTTCTCCRCGARWTTGCGT	94°C/60 s	52°C/60 s	72°C/60 s	35	871
	CMVCPrev	CGTAGCTGGATGGACAACCCG					
	CMVF-1	CGACTTAATAAGACGTTAGCAGC	94°C/60 s	46°C/60 s	72°C/60 s	5	500
	CMVR	TGCTCRAYGTCRACATGAAG	94°C/60 s	50°C/60 s	72°C/60 s	30	
MP gen	MPfwd	ATGGCTTTYCAAGGTACCAG	94°C/60 s	52°C/60 s	72°C/60 s	35	834
	Mprev	ACCGTTAACCACCTGCGGTCT					
	CMVMP3	GAGTGYGACCTAGGYCGRCATCA	94°C/60 s	60°C/60 s	72°C/60 s	35	728
CMV3a-rev	CTAARGACCGTTAACCACCTGC						
2a gen	RV11	GTTTATTTACAAGAGCGTACGG	94°C/30 s	53°C/60 s	72°C/120 s	35	650
	RW8	GGTTCGAARRWATAACCGGG					
2b gen	2bfwd	TTTGTTGAYMGRYTGAAGTTT	94°C/60 s	46°C/60 s	72°C/60 s	5	804
	2brev	CCTTCCGAAGAAAYCYAGGA	94°C/60 s	50°C/60 s	72°C/60 s	30	
1a gen	RNA1a-fwd	TGGTAGCCTCCCACGGCGATA	94°C/60 s	51°C/60 s	72°C/60 s	35	1198
	RNA1a-rev	GAYTGCATRGACATACCATT					
	RNA1a-fwd	TGGTAGCCTCCCACGGCGATA	94°C/60 s	55°C/60 s	72°C/60 s	35	1500
	RNA1a-r	GCDGATGATATCACGTCCCA					
RNA1a-fwd	TGGTAGCCTCCCACGGCGATA	94°C/60 s	51°C/60 s	72°C/60 s	35	981	
CMV1a-reverse	GAGGGGAACCARAYRCAATG						

(3) Amplifikacija 2a gena. Umnožavanje 2a gena odabranih izolata obavljeno je korišćenjem ranije opisanih prajmera RV11/RW8 (Finetti Sialer et al., 1999) koji omogućavaju amplifikaciju fragmenta veličine 650 bp koji obuhvata 5' NTR i deo 2a gena. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda. Na slici 2 dat je šematski prikaz amplifikovanih fragmenata koji obuhvataju deo 2a gena kao i pozicija prajmerskih mesta na osnovu sekvence referentnog izolata FNY (pristupni broj D00355).

I za ova istraživanja odabrano je 19 izolata poreklom iz 17 različitih biljaka domaćina i 15 različitih lokaliteta, čiji su poreklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani u tabeli 1.

(4) Amplifikacija 2b gena. Za umnožavanje 2b gena 19 odabranih izolata poreklom iz 17 različitih biljaka domaćina i 15 različitih lokaliteta (Tabela 1), dizajniran je jedan par prajmera 2bfwd/2brev (Tabela 2). Prajmeri su dizajnirani na osnovu 42 sekvence izolata CMV dostupne u GenBank bazi odabranih tako da pripadaju različitim podgrupama ovog virusa i omogućavaju amplifikaciju fragment RNK 2 veličine 804 bp, koji obuhvata ceo 2b gen, kao i deo 2a gena i 3' NTR. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda. Na slici 2 dat je šematski prikaz amplifikovanih fragmenata koji obuhvataju ceo 2b gen kao i pozicija prajmerskih mesta na osnovu sekvence referentnog izolata FNY (pristupni broj D00355).

(5) Amplifikacija 1a gena. Za amplifikaciju 1a gena odabranih izolata, dizajnirana su četiri prajmera: jedan nizvodni (*forward*) i tri uzvodna (*reverse*) prajmera (Tabela 2). Par prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-rev koji omogućavaju amplifikaciju fragmenta veličine 1198 bp, a koji obuhvata deo 1a gena, dizajnirani su na osnovu 40 sekvenci 1a gena CMV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, a odabranih tako da pripadaju različitim podgrupama ovog virusa. Zbog varijabilnosti populacije CMV u Srbiji i nemogućnosti umnožavanja svih odabranih izolata, na osnovu istog seta sekvenci dizajnirana su još dva uzvodna prajmera, RNA1a-r ili CMV1a-reverse, koji u kombinaciji sa prethodno dizajniranim prajmerom RNA1-fwd omogućavaju amplifikaciju dela 1a gena očekivane veličina 1500 bp, odnosno 981 bp. Kao pozitivna kontrola kod drugog i trećeg para prajmera korišćen je izolat 650-07 iz *N. tabacum*, koji

je uspešno umnožen korišćenjem prvog para prajmera, a kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda. Na slici 2 dat je šematski prikaz amplifikovanih fragmenata koji obuhvataju deo 1a gena kao i pozicija prajmerskih mesta na osnovu sekvence referentnog izolata FNY (pristupni broj D00356).

Za ova ispitivanja odabrano je ukupno 15 izolata poreklom iz 13 različitih biljaka domaćina i 15 različitih lokaliteta, a spisak odabranih izolata, njihovo poreklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani su u tabeli 1.

4.4.3. Analiza PCR produkta

Vizuelizacija produkata PCR reakcije obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1x TBE puferu, u aparatu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Bojenje dobijenih produkata obavljeno je etidijum bromidom i posmatrano pod UV-svetlom pomoću transiluminatora. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 0,4 g agaroze u 40 ml 1x TBE pufera (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA) i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature od oko 60°C, gel je razlivan u kalup u koji je prethodno postavljen češalj. Nakon očvršćavanja gela i uklanjanja češlja, kalup je uronjen u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1x TBE puferom. Uzorci su pripremljeni tako što je na parafilmu pomešano 5 µl produkta PCR reakcije i 1 µl boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i odmah su unošeni u bunarčiće po odgovarajućem rasporedu.

Elektroforeza je obavljena pri konstantnoj struji od 40 mA u trajanju od približno 60 min, a za određivanje veličine amplifikovanih produkata PCR korišćen je marker MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas).

Posle završene elektroforeze, gel je inkubiran 15 min u rastvoru za bojenje etidijum bromida u destilovanoj vodi u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori na transiluminatoru pomoću UV-svetla. Pojava traka očekivane veličine smatrana je pozitivnom reakcijom, a dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela korišćenjem žutog filtera.

4.5. Sekvenciranje genskih regiona odabranih izolata

Molekularna identifikacija odabranih izolata CMV poreklom iz naše zemlje obavljena je, nakon sekvenciranja svih pet genskih regiona, višestrukim uparivanjem sekvenci izolata sa sekvencama odgovarajućih genskih regiona dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti.

Nakon uspešne sinteze, PCR produkti svih pet genskih regiona izolata odabranih za molekularne analize poslani su na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje u MACROGEN Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Južna Koreja) na ABI 3730XL automatskom kapilarnom sekvencinatoru. Umnoženi fragmenti odabranih izolata sekvencirani su u oba pravca upotrebom prajmera koji su korišćeni za njihovo umnožavanje. Nakon sekvenciranja, dobijene sekvence odabranih izolata obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0, a konsenzus sekvence su dobijene međusobnim poređenjem obrađenih sekvenci uzvodnog i nizvodnog prajmera u CLUSTAL *W* programu, implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0 (Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2011). Po obradi, sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, gde su im dodeljeni pristupni brojevi (*GenBank Accession Number*).

Tako dobijene konsenzus sekvence prvo su analizirane pomoću BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) analize, poređenjem sekvenci svih pet genskih regiona odabranih izolata poreklom iz Srbije sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Proračun prosečne stope genetičkog diverziteta između odabranih izolata i sekvenci izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka obavljen je pomoću MEGA 5.0 softvera.

4.6. Filogenetske analize

Molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala čiji je cilj bio da pruže uvid u evolutivnu povezanost odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Filogenetska proučavanja CMV obavljena su na osnovu analiza sekvenci informativnih za pet genskih regiona (CP, MP, 2a, 2b i 1a gena), kao i na osnovu

kombinacije sekvenci 2a i 2b gena (segment RNK 2), kombinacije sekvenci MP i CP gena (segment RNK 3) i kombinacije sekvenci svih pet genskih regiona.

Filogenetska stabla rekonstruisana su na osnovu sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja i sekvenci 38 izolata ovog virusa preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 3). Nakon uparivanja, sve sekvence su skraćene na dužinu najkraće sekvence i to: za CP gen na dužinu od 471 bp, za MP gen na dužinu od 590 bp, za 2a gen na dužinu od 564 bp, za 2b gen na dužinu od 343 bp i za 1a gen na dužinu od 735 bp. Sva filogenetska stabla rekonstruisana su primenom Maximum parsimony metode sa „*bootstrap*“ podrškom u 1000 ponavljanja, a kao „*outgrupa*“ korišćena je sekvenca odgovarajućeg genskog regiona izolata virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3).

Radi lakšeg uočavanja grupisanja izolata, rekonstruisana su i filogenetska stabla na osnovu sekvenci izolata CMV poreklom iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S referentni izolati za II podgrupu), primenom Maximum parsimony metode sa „*bootstrap*“ podrškom u 1000 ponavljanja, izuzev filogenetskog stabla za kombinaciju sekvenci svih pet genskih regiona kada je korišćena UPGMA metoda (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Kao „*outgrupa*“ za rekonstrukciju filogenetskih stabala korišćena je sekvenca odgovarajućeg genskog regiona izolata virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3).

Nakon rekonstrukcije stabala u MEGA 5.0 programu, sproveden je test pronalaženja najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije metodom maksimalne verodostojnosti, na osnovu najniže vrednosti BIC (Bayesian Information Criterion). Po dobijanju parametra koji najbolje karakteriše odabrane sekvence, izračunate su prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskim stablima. Kod stabala na osnovu gena 2a, 2b i CP, korišćen je Kimura 2-parametar sa Gamma distribucijom (K2+G), dok je kod stabala za 1a i MP gen, najbolje prilagođen model bio Tamura 3-parametar sa Gamma distribucijom (T92+G). Sličnost na aminokiselinskom nivou izražena je preko vrednosti p, prosečne stope genetičkog diverziteta.

Tabela 3. Sekvence izolata *Cucumber mosaic virus* dostupne u GenBank korišćene za filogenetske analize

Virus	Izolati ¹	Zemlja porekla	Biljka domaćin	Pristupni broj		
				RNK 1 (1a gen)	RNK 2 (2a i 2b gen)	RNK 3 (MP i CP gen)
CMV	TFN	Italija	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y16924	Y16925	Y16926
	Vir		<i>Capsicum annuum</i>	HE962478	HE962479	HE962480
	P1-1	Španija	<i>S. lycopersicum</i>	AM183114	AM183115	AM183116
	Ri-8		<i>S. lycopersicum</i>	AM183117	AM183118	AM183119
	RS	Mađarska	<i>Raphanus sativus</i>	AJ511988	AJ517801	AJ517802
	NS		<i>Nicotiana glutinosa</i>	AJ580953	AJ511989	AJ511990
	Trk7		<i>Trifolium repens</i>	AJ007933	AJ007934	L15336
	I17F	Francuska	<i>S. lycopersicum</i>	HE793683	HE793684	Y18137
	FNY	SAD	<i>Cucumis melo</i>	D00356	D00355	D10538
	LS		<i>Lactuca sativa</i>	AF416899	AF416900	AF127976
	ND1	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414793	EU414798	EU414788/EU414785
	LW		<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414792	EU414797	EU414787/EU414784
	QZ		<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414795	EU414800	EU414790/DQ916111
	RZ		<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414796	EU414801	EU414791/EF159146
	SD		<i>Nicotiana tabacum</i>	AF071551	D86330	AB008777
	Tsh		<i>S. lycopersicum</i>	EF202595	EF202596	EF202597
	Cb7		<i>S. lycopersicum</i>	EF216866	DQ785470	EF216867
	NT9		<i>S. lycopersicum</i>	D28778	D28779	D28780
	CS		<i>Arachis hypogaea</i>	AY429435	AY429436	AY429437
	Ca		<i>Arachis hypogaea</i>	AY429434	AY429433	AY429432
	CTL		<i>Brassica chinensis</i>	EF213023	EF213024	EF213025
	Phy		/	DQ402477	DQ412731	DQ412732
	Cah1		<i>Canna sp.</i>	FJ268744	FJ268745	FJ268746
	Pepo	Japan	<i>Cucurbita pepo</i>	AB124834	AB124835	AF103991
	TN		<i>S. lycopersicum</i>	AB176849	AB176848	AB176847
	PF		<i>S. lycopersicum</i>	AB368499	AB368500	AB368501

D8		<i>R. sativus</i>	AB179764	AB179765	AB004781	
Y		<i>N. tabacum</i>	D12537	D12538	D12499	
42CM		<i>Cucumis sativus</i>	AB368496	AB368497	AB368498	
Ly2	Koreja	<i>Lilium longiflorum</i>	AJ535913	AJ535914	AJ296154	
Mf		<i>Melandryum firmum</i>	AJ276479	AJ276480	AJ276481	
Li		<i>Lilium tsingtauense</i>	AB506795	AB506796	AB506797	
LiCB		<i>Lily sp.</i>	AB506798	AB506799	AB506800	
IA	Indonezija	/	AB042292	AB042293	AB042294	
Ixora	Filipini	<i>S. lycopersicum</i>	U20220	U20218	U20219	
Q	Australija	<i>C. annuum</i>	X02733	X00985	M21464	
LY		<i>Lupinus angustifolius</i>	AF198101	AF198102	AF198103	
S	Južna Afrika	<i>C. pepo</i>	Y10884	Y10885	U37227/AF063610	
PSV	P	Poljska	<i>Lupinus luteus</i>	EU570236	EU570237	EU570238

Legenda: ¹ - Podaci preuzeti iz GenBank baze podataka; / - Nema podataka.

4.7. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) primenjena je u cilju potvrde grupisanja odabranih izolata u odgovarajuće podgrupe u okviru populacije CMV na koje su ukazale filogenetske analize, kao i za pronalaženje brze i pouzdane metode za karakterizaciju izolata CMV. RFLP detektuje varijabilnost između homologih DNK sekvenci na osnovu prisustva fragmenata različitih dužina nastalih nakon digestije DNK uzorka specifičnim restrikcionim enzimima, endonukleazama. Restrikcioni enzimi katalizuju hidrolizu-prekidanje DNK na mestu u sekvenci koje specifično prepoznaju i koje se naziva restrikciono mesto, a čini ga sekvenca dužine od 4-6 nukleotida.

4.7.1. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata „*in silico*”

Virtuelna „*in silico*” RFLP analiza DNK sekvenci (*computer-simulated*) obavljena je korišćenjem pDRAW32 DNA analysis softvera (<http://www.aacclone.com/>) u cilju pronalaženja restrikcionih enzima koji vrše digestiju umnoženih DNK fragmenata tako da se dobije različiti broj fragmenata ili fragmenti različite veličine kod izolata koji pripadaju različitim podgrupama ovog virusa. U cilju odabira odgovarajućih restrikcionih enzima izvršena je analiza digestije svih sekvenciranih izolata za svaki genski region, kao i digestija sekvenci po tri referentna izolata za svaku podgrupu CMV (FNY, I17F i Y koji pripadaju IA podgrupi, Vir, TFN i CTL koji pripadaju IB podgrupi i LY, Q i S koji pripadaju II podgrupi), korišćenjem navedenog softvera za svaki poznati restrikcioni enzim. Nakon odabira restrikcionih enzima za svaki segment genoma CMV u pDRAW32 programu generisani su virtuelni profili, za čije prikazivanje je odabran 1,5% agarozni gel, a veličina fragmenata je određivana pomoću markera Invitrogen 1kD DNA ladder.

4.7.2. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata „*in situ*”

Nakon virtuelne RFLP analize DNK sekvenci i utvrđivanja specifičnih enzima za svaki od pet genskih regiona, amplifikovani fragmenti ispitivanih izolata su podvrgnuti digestiji sa odabranim restrikcionim enzimima u pravoj, „*in situ*” RFLP analizi. Za ove analize korišćeni su izolati dobijeni u toku ovih istraživanja, kao i izolat TFN poreklom iz Italije koji pripada IB podgrupi, dobijen ljubaznošću profesora dr

Donato Gallitelli (Univerisità degli Studi and Istituto di Virologia Vegetale del CNR-sezione di Bari).

Sve RFLP reakcije obavljene su u 15 μ l zapremine RFLP smeše koja je sadržala 0,1 μ l restrikcionog enzima (koncentracije 1 U/ μ l), 1,5 μ l 10 x RFLP pufera, 3,4 μ l RNase-free vode i 10 μ l PCR produkta razređenog u RNase-free vodi u odnosu od 1:9 do 3:7, u zavisnosti od prinosa PCR produkta. RFLP smeša se jedino razlikovala kod restrikcionog enzima *BaeI* i sadržala je 0,1 μ l SAM (S-Adenozil metionin) koji omogućava optimalnu aktivnost ovog enzima, 0,1 μ l restrikcionog enzima (koncentracije 1 U/ μ l), 1,5 μ l 10 x RFLP pufera, 3,3 μ l RNase-free vode i 10 μ l PCR produkta razređenog u RNase-free vodi u odnosu od 1:9 do 3:7 u zavisnosti od prinosa PCR produkta. Za pripremu RFLP smeše korišćeni su različiti puferi u zavisnosti od enzima, a po preporuci odgovarajućeg proizvođača (Tabela 4).

Tabela 4. Restrikcioni enzimi korišćeni u „*in situ*” RFLP i odgovarajući puferi po preporuci proizvođača

Restrikcioni enzim	Pufer	Proizvođač
<i>BssSI</i>	10x Tango pufer	Thermo Scientific, Japan
<i>SfcI</i>		
<i>HaeIII</i>	10x R pufer	
<i>MluI</i>		
<i>HindIII</i>		
<i>PflMI</i>		
<i>SacII</i>	10x B pufer	
<i>StuI</i>		
<i>SalI</i>	10x O pufer	
<i>BaeI</i>	10x CutSmart pufer	

Digestija restrikcionim enzimima *BssSI*, *SfcI*, *MluI*, *PflMI*, *SacII* i *SalI* vršena je u termosajkleru na temperaturi od 37°C u trajanju od 3 h, dok je digestija restrikcionim enzimom *BaeI* vršena na 25°C u trajanju od 15 min. Deaktivacija restrikcionih enzima vršena je na temperaturi od 65°C u trajanju od 20 min. Digestija restrikcionim enzimima *HaeIII*, *HindIII* i *StuI* obavljena je takođe na temperaturi od 37°C u trajanju od 3 h, dok je deaktivacija enzima izvedena na temperaturi 80°C u trajanju od 20 min.

Vizuelizacija produkata dobijenih nakon digestije obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1,2% agaroznom gelu u 1x TBE puferu, bojenjem etidijum bromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Način pripreme gela i

očitanja rezultata opisan je u poglavlju 4.4.3., a pojava odgovarajućih restriktivnih profila ukazala je na pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV.

4.8. Analiza rekombinacije

Rekombinacije i pseudorekombinacije predstavljaju jedan od najvažnijih evolutivnih mehanizama izmene genetičkog materijala, pre svega kod virusa sa višedelnim genomom, kakav je i CMV. Postojanje rekombinacija kod izolata CMV poreklom iz Srbije, kod kojih je ustanovljeno da se filogenetski grupišu u različite podgrupe u zavisnosti od analiziranog gena, ispitivano je i primenom RDP (Recombination Detection Program) v4.36 softvera (**Martin et al., 2005b**). Ovaj softver, pored osnovnog RDP programa, koristi istovremeno još šest različitih programa koji detektuju postojanje rekombinacije: BOOTSCAN/RECSCAN (**Salminien et al., 1995; Martin et al., 2005a**), GENECONV (**Padidam et al., 1999**), MAXCHI (Maximum Chi Square) (**Maynard Smith, 1992; Posada and Crandall, 2001**), CHIMAERA (**Posada and Crandall, 2001**), SISCAN (Sister Scanning) (**Gibbs et al., 2000**), 3SEQ (**Boni et al., 2007**) i LARD (Likelihood Assisted Recombination Detection) (**Holmes et al., 1995**). Za ove analize korišćene su sekvence RNK 2 i RNK 3 segmenta 19 odabranih izolata (Tabela 1) dobijene kombinacijom sekvenci 2a i 2b, odnosno MP i CP gena, koje su prethodno skraćivane na dužinu najkraće sekvence za svaki region posebno, kao i sekvence po tri referentna izolata za svaku podgrupu CMV (FNY, I17F i Y koji pripadaju IA podgrupi, Vir, TFN i CTL koji pripadaju IB podgrupi i LY, Q i S koji pripadaju II podgrupi). Ukupna dužina RNK 2 i 3 fragmenata nakon spajanja odgovarajućih regiona iznosila je 854 nt (520 nt za 2a gen i 334 nt za 2b gen), odnosno 1058 nt (590 nt za MP gen i 468 nt za CP gen).

Prilikom analize rekombinacija za najvišu prihvatljivu P vrednost korišćena je verovatnoća od 0,05, koja predstavlja mogućnost javljanja greške u stepenu identičnosti potencijalno rekombinovanog regiona i roditeljske sekvence, a izolat je smatran rekombinantnim ukoliko su četiri ili više programa detektovala postojanje rekombinacije sa vrednošću P manjom od 1.0×10^{-2} . U suprotnom, ukoliko je P vrednost veća od 1.0×10^{-2} ili manje od četiri programa pokažu postojanje rekombinacije, izolati se smatraju nesigurnim ili nejasnim rekombinantima (**Tomitaka et al., 2006; Nouri et al., 2014**).

Početno i krajnje mesto rekombinacije program je odredio na osnovu pozicije nukleotida u setu sekvenci koja je odgovarala početnoj i krajnjoj tački rekombinovanog fragmenta. Kod svakog izolata kod koga je program ukazao na rekombinaciju utvrđeni su i roditelji analizirane sekvence koji su poticali iz seta analiziranih sekvenci. Glavnog roditelja predstavlja izolat od koga potiče veći deo rekombinovanog izolata, dok je sporedni roditelj onaj izolat za koji je ustanovljeno da od njega potiče rekombinovani fragment. Pored roditeljskih sekvenci dobijeni su i podaci koji pokazuju sa kolikom tačnošću je izvršeno utvrđivanje roditeljskog para rekombinovanog izolata.

4.9. „Codon-based“ Z-test selekcije

U cilju utvrđivanja uticaja selekcionog pritiska na populaciju izolata CMV poreklom iz Srbije primenjen je „codon-based“ Z-test selekcije, implementiran u MEGA 5.0, koji poredi broj nesinonimnih supstitucija (promene nukleotida koje menjaju aminokiselinsku sekvencu proteina) i sinonimnih supstitucija (promene nukleotida koje ne dovode do promene aminokiselinske sekvence proteina). Vrednost Z izračunata je primenom formule $Z=(d_N-d_S)/\text{SQRT}(\text{Var}(d_S)+\text{Var}(d_N))$ (Tamura et al., 2011) gde je d_S procenjeni broj sinonimnih supstitucija po sinonimnom mestu i d_N procenjeni broj nesinonimnih supstitucija po nesinonimnom mestu, a $\text{Var}(d_S)$ i $\text{Var}(d_N)$ njihove varijanse. Analize su sprovedene korišćenjem Nei-Gojobori supstitucionog modela, a odgovarajuće varijanse izračunate su korišćenjem „bootstrap“ metode u 1000 ponavljanja (Nei and Kumar, 2000). Ukoliko je vrednost $Z>1$ (odnos $d_N/d_S>1$) smatra se da se te sekvence/gen nalaze pod uticajem pozitivne selekcije, odnosno pod uticajem negativne („purifying“) selekcije ukoliko $Z<1$ (odnos $d_N/d_S<1$), dok se za $Z=1$ (odnos $d_N/d_S=1$) smatra da je selekcija neutralna. Veoma bitan parametar za određivanje uticaja selekcije predstavlja i p vrednost za testiranje hipoteze (verovatnoća nastanka greške prve vrste, odnosno odbacivanja ispravne nulte hipoteze) (Nei and Kumar, 2000).

„Codon-based“ Z-test selekcije primenjen je na svakom paru sekvenci jednog gena za svaki od pet genskih regiona, ali i ukupno na setu sekvenci svih izolata pojedinačnih gena. Testiran je uticaj pozitivne selekcije, odnosno nulta hipoteza $H_0: d_N=d_S$ nasuprot alternativne hipoteze $H_a: d_N>d_S$, a sekvence/gen smatrane su se nalaze pod uticajem pozitivne selekcije ukoliko je $Z>1$ i $p<0,05$ (Hall, 2008).

4.10. Biološka identifikacija i karakterizacija odabranih izolata CMV

U cilju provere mogućnosti razlikovanja izolata različitih podgrupa CMV na osnovu reakcije test biljaka obavljena je i biološka karakterizacija odabranih izolata.

Biološka karakterizacija odabranih izolata obavljena je mehaničkim inokulacijama indikator i test biljaka po standardnoj proceduri (Krstić i Tošić, 1994). Za ova istraživanja odabrano je ukupno devet izolata i to: izolat 449-12 poreklom iz lubenice (*Citrullus lanatus*), izolat 201-11 poreklom iz letnje tikvice (*Cucurbita pepo* 'Beogradska'), izolat 570-11 poreklom iz krastavca (*Cucumis sativus*), izolat 723-10 poreklom iz paprike (*Capsicum annuum*), izolat 670-08 poreklom iz paradajza (*Solanum lycopersicum*) i izolat 650-07 poreklom iz duvana (*Nicotiana tabacum*) čija je pripadnost IA podgrupi prethodno potvrđena filogenetskim analizama na osnovu sekvence CP gena, kao i izolat 581-11 poreklom iz paprike (*Capsicum annuum*), izolat 101-08 poreklom iz paradajza (*Solanum lycopersicum*) i izolat 1-12 poreklom iz peperomije (*Peperomia tuisana*) za koje prethodnim filogenetskim analizama na osnovu sekvence CP gena utvrđeno da pripadaju II podgrupi.

Postupak mehaničkih inokulacija izveden je homogenizacijom prirodno zaraženog biljnog materijala u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera (pH 7) u odnosu 1:1 korišćenjem abraziva, karborundum praha finoće 400 meša. Tako pripremljenim inokulumom za svaki od ispitivanih izolata obavljene su mehaničke inokulacije po pet biljaka jedne vrste eksperimentalnog domaćina.

U ispitivanje kruga domaćina uključene su 33 biljne vrste: *N. tabacum* 'Banat', 'Prilep' i 'Samsun', *N. debneyii*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. clevelandi*, *N. alata*, *N. sylvestris*, *Datura metel*, *D. stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *C. foetidum*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum*, *S. nigrum*, *Physalis floridana*, *Gomphrena globosa*, *Petunia x hybrida*, *Cucumis sativus* 'Delikates', *C. melo* 'Ananas', *Citrullus lanatus* 'Sugar baby', *Cucurbita pepo* 'Olivija', 'Olinka', 'Ezra F1', 'Beogradska' i 'Zucchini', *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac' i *Pisum sativum* 'Mali provansalac'.

Test biljke su inokulisane u fenofazi 2-3 lista i održavane u uslovima staklenika. Pojava simptoma praćena je na inokulisanom lišću i lišću formiranom posle inokulacije, u periodu do mesec dana po inokulaciji. Prisustvo virusa u test biljkama sa i bez simptoma potvrđeno je DAS-ELISA metodom.

4.11. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK

RT-PCR metoda primenjena je i u cilju provere prisustva satRNK u uzorcima odabranim za molekularne analize. Provera prisustva satRNK obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i prajmera CMVsat-fwd (5'-AAG GAT CCG GGT CCT GBD DDG GAA TG-3') i CMVsat-rev (5'-AAG GAT CCG TTT TGT TTG WTR GAG AAT TGC GYR GAG-3') (Škorić et al., 1996) koji omogućavaju amplifikaciju fragmenta veličine od 334 do 390 bp, a koji obuhvata celu satRNK.

RT-PCR reakcije obavljane su u zapremini RT-PCR smeše od 25 µl, čiji je sadržaj opisan u poglavlju koje se odnosi na amplifikaciju genskih regiona odabranih izolata.

Reakcija je izvedena po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStart Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C, denaturacija 1 min na 94°C, hibridizacija 60 s na 42°C, elongacija 1 min na 72°C (2 ciklusa), denaturacija 1 min na 94°C, hibridizacija 1 min na 55°C i elongacija 1 min na 72°C (35 ciklusa) praćeno finalnom ekstenzijom 10 min na 72°C. Vizuelizacija umnoženih PCR produkata obavljena je na način opisan u poglavlju 4.4.3..

Nakon uspešne amplifikacije satRNK kod tri odabrana izolata (101-08 i AR1-12 poreklom iz paradajza i 1-12 poreklom iz peperomije, dobijeni produkti poslani su na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje (Macrogen, Južna Korea) u oba smera korišćenjem istog para prajmera kao u RT-PCR reakciji. Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0 i međusobno upoređene pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson et al., 1994) integrisanog unutar MEGA 5.0 softvera (Tamura et al., 2011). Tako dobijene konsenzus sekvence su zatim podnete u GenBank bazu podataka i obavljena je njihova identifikacija prvo upotrebom BLAST analize, a zatim je izvršen i proračun nukleotidne sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Filogenetska proučavanja satRNK obavljena su rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu sekvenci tri izolata poreklom iz Srbije i 36 izolata poreklom iz različitih delova sveta (Tabela 5), korišćenjem Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ podrškom u 1000 ponavljanja.

Tabela 5. Sekvence izolata satRNK *Cucumber mosaic virus* korišćene za filogenetske analize

Izolat¹	Zemlja porekla	Biljka domaćin	Pristupni broj		
101-08 ²	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KT270486		
AR1-12 ²			KM358138		
1-12 ²			KT270485		
T4	Italija	<i>S. lycopersicum</i>	X86415		
T1			X86409		
T22			X86412		
TTS			X69136		
T8A			X86408		
T27			X86419		
T2			X86410		
T8			X86420		
T18			X86708		
T57			X86418		
T59			X86423		
TFN			X65455		
T16			X86413		
PG			X86426		
T12			X86416		
T6			X86414		
T7			X86411		
CE				<i>Apium graveolens</i>	X86425
TO80				<i>Nicotiana tabacum</i>	X86421
TO77					X86422
To79			X86417		
NG71		<i>Nicotiana glauca</i>	X86424		
F2	Hrvatska	<i>S. lycopersicum</i>	X89003		
FG			X89004		
/ ^{***}			DQ839133		
PoSA4	Sirija	<i>Solanum tuberosum</i>	AB448702		
SD	Kina	<i>N. tabacum</i>	D89673		
To/1990/21.1	Španija	<i>S. lycopersicum</i>	Z75880		
Y	Japan	<i>N. tabacum</i>	D00542		
E		/	M20844		
OY2		/	M20845		
Sb-WI	SAD	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KC415034		
Ir-WI			JF834526		
D27-CARNA-5			<i>S. lycopersicum</i>	U31661	
N1-02-satRNA		<i>Vinca minor</i>	JF918972		
CA8	Brazil	<i>Capsicum annum</i>	AF172648		

Legenda: ¹ - Podaci preuzeti iz GenBank baze podataka; ² - Izolati poreklom iz Srbije; / - Nema podataka.

Po sprovođenju testa za pronalaženje najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije metodom maksimalne verodostojnosti, na osnovu najniže vrednosti BIC u MEGA 5.0 dobijen je parametar koji najbolje karakteriše odabrane sekvence. Prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stabu izračunate su na osnovu Kimura 2-parametra sa Gamma distribucijom (K2+G).

5. REZULTATI

5.1. Prisustvo i relativna učestalost CMV

Utvrđivanje prisustva CMV u sakupljenim uzorcima tokom četvorogodišnjih istraživanja sprovedeno je serološkim ispitivanjima primenom DAS-ELISA testa uz korišćenje poliklonalnih antiseruma pogodnih za detekciju svih opisanih genotipova CMV. Od ukupno 1378 uzoraka sakupljenih u toku četvorogodišnjih istraživanja prisustvo CMV dokazano je u 409 uzoraka (29,68%).

Tokom 2010. godine od 326 sakupljenih uzoraka CMV je dokazan u 62, odnosno u 18,96% testiranih uzoraka. Od 45 lokaliteta prisustvo CMV je potvrđeno u 18 (Slika 3), a njegovo prisustvo je dokazano u 12 od 47 različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti: *Cucurbita pepo* var. *styriaca* ('Olinka', 'Horgoš', 'Gleisdorfer Ölkürbis', 'Weis 371'), *C. pepo* 'Genovese', *Cucurbita maxima*, *Cucumis melo*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Wisteria sinensis*, *Lamium* sp. i *Mentha piperita*.

U 2011. godini, od pregledanih 37 lokaliteta u Srbiji, CMV je dokazan u 30 (Slika 3). Prisustvo CMV potvrđeno je u 236 od 607 sakupljenih uzoraka, odnosno u 38,88% testiranih uzoraka. Prisustvo CMV dokazano je u 17 od 44 testiranih različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti: *Cucurbita pepo* var. *styriaca* 'Olinka', *C. pepo* ('Beogradska' i 'Cue Ball'), *C. pepo*-nepoznata sorta, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Lactuca serriola*, *Hibiscus trionum*, *Salvia verticillata*, *Stenactis annua*, *Polygonum persicaria*, *Chenopodium hybridum* i *Datura stramonium*.

Tokom 2012. godine od 272 uzoraka CMV je dokazan u 76 (27,94%) testiranih uzoraka, odnosno u 23 (Slika 3) od 46 pregledanih lokaliteta. Prisustvo CMV dokazano je u 14 od 23 različitih biljnih vrsta: *Cucurbita pepo*-nepoznata sorta, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Phaseolus vulgaris*, *Peperomia tuisana*, *Hyacinthus sphenodylium*, *Polygonum aviculare*, *Stenactis annua*, *Viola odorata* i *Malva sylvestris*.

U 2013. godini, od pregledanih 42 lokaliteta u Srbiji, CMV je dokazan u 17 (Slika 3). Prisustvo CMV dokazano je u 35 (20,23%) od 173 uzoraka poreklom iz sedam od 11 različitih biljnih vrsta: *Cucurbita pepo*-nepoznata vrsta, *Cucumis melo*,

Solanum lycopersicum, *Capsicum annuum*, *Peperomia tuisana*, *Tulipa* sp. i *Phaseolus vulgaris*.



Slika 3. Lokaliteti na kojima je CMV detektovan tokom četvorogodišnjih istraživanja

5.2. Simptomi na biljkama u polju i odabir izolata za dalja istraživanja

Sakupljene biljke u kojima je dokazan CMV ispoljile su različite tipove simptoma, u zavisnosti od vrste domaćina i vremena infekcije. Najučestaliji simptomi bili su u vidu svetlo i tamno zelenog mozaika, hloroze, redukcije lisne površine, nitavosti, uvijenosti lista, malformacija, kao i lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pega. Za dalja istraživanja odabrano je 44 izolata (Tabela 1) dobijena iz 18 različitih biljnih vrsta sakupljenih na 30 različitih lokaliteta u Srbiji. Odabir izolata je bio takav da je obuhvatio što veći broj domaćina ili iste domaćine sa različitim simptomima prirodne zaraze poreklom sa što većeg broja lokaliteta na teritoriji naše zemlje, sakupljenih tokom različitih godina.

Na biljkama paradajza u kojima je detektovano prisustvo CMV, najčešće uočeni simptomi na listu bili su u vidu blagog do izraženog mozaika (Slika 4), deformacija lisne površine u vidu klobučavosti i redukcije lisne površine do nitavosti, dok su na plodovima uglavnom bile izražene deformacije i nekroza (Slika 5). Takođe, na plodovima pored nekrotičnog prošaravanja zabeleženo je i neravnomerno sazrevanje. Uočene su i biljke koje su zaostajale u porastu, a kod pojedinih biljaka paradajza bili su prisutni i simptomi na stablu u vidu hlorotičnog ili nekrotičnog prošaravanja (Slika 6). Osim toga, na peteljkama lista i ploda uočena je nekroza u vidu tamnosmeđih traka, a pojedine biljke su usled skraćanja internodija dobijale žbunolik izgled često praćen zaostajanjem u porastu. Za dalja istraživanja odabrani su uzorci 647-10 (lokalitet Togočevce) i 533-2-11 (Kupusina) sakupljeni tokom 2010. i 2011. godine, a iz 2012. godine uzorak AR1-12 (Aradac). Osim ovih uzoraka za analizu prirodne populacije CMV, odabrani su i uzorci 746-07 (Obrenovac), 101-08 (Družetić), 670-08 (Stajkovce) i 207-09 (Mačkovac) sakupljeni od 2007. do 2009. godine (Kolekcija biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju, Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet).

Na lišću biljaka paprike zabeležena je pojava blagog do izraženog mozaika, hloroze (Slika 7), prstenastih pega ili hrastolikih nekrotičnih šara (Slika 8). Kod pojedinih biljaka paprike prisutne su bile i deformacije lisne površine, klobučavost (Slika 9) i redukcija lisne površine, a uočene su i biljke sa znatno sitnijim lišćem. Osim na listovima, zabeleženi su simptomi i na plodovima i stablu. Zaraženi plodovi bili su neravnomerno obojeni, često zahvaćeni mozaičnim šarenilom ili kržljavi, deformisani i

sa nekrozom površinskog tkiva (Slika 10). Duž stabla pojedinih biljaka zabeležena su i nekrotična prošaravanja. Za dalja istraživanja odabrani su: uzorak 723-10 sa lokaliteta Smederevo sakupljen 2010. godine i uzorci 581-11 i 581p-11 sa lokaliteta Cekavica sakupljeni 2011. godine. Osim ovih uzoraka, za istraživanja populacije CMV iz Kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju odabrani su uzorci 477-07 (Apatin), 598-07 (Novi Kneževac), 542-08 (Donji Tavankut) i 471-09 (Prigrevica) sakupljeni od 2007. do 2009. godine.

Iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju odabrani su uzorci iz duvana sakupljeni na lokalitetu Bački Petrovac (uzorak 650-07) i Futog (uzorak 702-07) tokom 2007. godine i Lapotince (uzorak 202-08) tokom 2008. godine. Zaražene biljke ispoljavale su simptome u vidu različitih tipova mozaika, od blagog do izraženog, sužavanje liske, a biljke su pored izraženih deformacija lista koje su se manifestovale u vidu klobučavosti (Slika 11), zaostajale i u porastu.

Na biljkama familije Cucurbitaceae, uključujući različite vrste tikava, lubenicu, dinju, krastavac i vrg, zabeležene su raznovrsne morfološke i hromatske promene na listovima i plodovima. Na biljkama krastavca u kojima je detektovano prisustvo CMV, najčešće uočeni simptomi na listu bili su u vidu blagog do izraženog mozaika, hloroze lisnih nerava kao i uvijenost lišća. Kod pojedinih biljaka krastavca zapaženi su i simptomi hlorotičnog i nekrotičnog šarenila (Slika 12), a primećeno je i zadržavanje zelene boje oko nerava. Za dalja istraživanja odabrani su uzorci 514-11 (Kupusina) i 570-11 (Debre) sakupljeni tokom 2011. godine i 283-12 (Porodin) sakupljen tokom 2012. godine. Najučestaliji simptomi na listovima lubenice bili su različiti vidovi mozaika, od blagog do izraženog (Slika 13), ali zabeležena su i različita hlorotična prošaravanja kao i blaga deformisanost lista sa manje ili više izraženom klobučavosti. Uočene su i biljke koje su zaostajale u porastu, dok su pojedine zaraže biljke imale veoma redukovanu lisnu površinu što je kasnije dovelo do nitavosti lista. Uzorci 449-12 (Silbaš) i 473-12 (Gornji Tavankut) sakupljeni tokom 2012. godine odabrani su za dalja istraživanja. Na biljkama dinje najčešće uočeni simptomi na listu bili su u vidu žutog, odnosno izraženog mozaika. Uzorci 610-11 (Togočevce) i 286-12 (Porodin) sakupljeni tokom 2011. odnosno 2012. godine odabrani su za dalja istraživanja. Na lišću svih biljaka uljane tikve sorte 'Olinka' zabeležena je pojava izraženog mozaika ili hlorotičnog prošaravanja, dok se na pojedinim biljkama uočavala i kovrdžavost. Osim

na listovima zabeleženi su simptomi i na plodovima. Kod zaraženih plodova uočavale su se deformacije i to najčešće u vidu ulegnuća (Slika 14). Iz Kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju odabrani su za dalja istraživanja uzorci 415-07 (Irmovo), 115-08 (Gardinovci), 151-08 (Kulpin) i 171-08 (Staro Selo) sakupljeni tokom 2007. i 2008. godine. Na biljkama 'Beogradske tikvice' konstantovani su simptomi izraženog mozaika i blage klobučavosti lista (Slika 15), a uzorak 201-11 uzorkovan tokom 2011. godine na lokalitetu Mačkovac odabran je za dalja istraživanja. Na listovima cukini tikvica 'Genovese' zabeležena je pojava umerenog mozaika, a za dalju karakterizaciju odabran je uzorak 230-10 (Hetin) sakupljen tokom 2010. godine. Iz Kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju odabran je uzorak 270-09 (Ruma) poreklom iz cukini tikvice 'Tosca' sakupljen tokom 2009. godine sa simptomom izraženog mozaika praćenog deformacijama lišća. Na biljkama vrga u kojima je detektovano prisustvo CMV, najčešće uočeni simptomi bili su u vidu izraženog mozaika, naboranosti lisne površine, kao i izražena deformisanost lista (Slika 16). Kod pojedinih biljaka uočavali su se slabiji simptomi u vidu zadržavanja zelene boje oko nerava lista (Slika 17). Za dalja istraživanja odabrani su uzorci 674-11, 717-11 i 720-11 (Porodin) sakupljeni tokom 2011. godine, kao i uzorak 163-08 (Bački Petrovac) iz Kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju sakupljen tokom 2008. godine. Na biljkama ukrasne tikve, uzorkovanim na lokalitetu Porodin, zabeleženi su simptomi blagog mozaika, deformacija, klobučavosti lista, a za dalja istraživanja odabran je uzorak 500-10 sakupljen tokom 2010. godine. Iz Kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju odabran je uzorak bundeve 242-09 (Bački Petrovac) sakupljen tokom 2009. godine. Na lišću bundeve uočeni su simptomi žutog mozaika i zadržavanje zelene boje oko nerava.

Biljke pasulja ispoljavala su simptome u vidu blagog mozaika i hloroze lista, a uzorak 267-13 sakupljen tokom 2013. godine na lokalitetu Vladičin Han odabran je za dalja istraživanja.

Biljke peperomije (*Peperomia tuisana*) ispoljile su veoma intenzivne simptome nekrotičnog prošaravanja različitog oblika i površine (Slika 18 i 19), kao i pojavu koncentričnih krugova (Slika 20), a zabeležena je i nekroza lisnih drški (Slika 18). Za dalja istraživanja odabrani su uzorci 1-12 i 52-13 poreklom iz staklenika Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu sakupljeni tokom 2012., odnosno 2013. godine.

Tokom pregleda useva lale (*Tulipa* sp.) na otvorenom polju na lokalitetu Krnjača 2013. godine uočena je pojava izraženih simptoma na svim nadzemnim organima. Najčešće uočeni tipovi simptoma na lišću bili su u vidu hlorotičnih crtičastih pega (Slika 21), svetlo-tamne prugavosti i deformacije listova. Zaražene biljke zaostajale su u porastu, cvetovi su bili sitniji i često neravnomerno obojeni, a uzorak 79-13 odabran je za dalja istraživanja.

Na listovima krasolike (*Stenactis annua*), tokom 2012. godine na jednom ruderalnom staništu na lokalitetu Beograd, zabeleženi su simptomi izraženog mozaika, nekrotičnih pega, kao i deformacije i žbunolokost vrha (Slika 22). Za dalju karakterizaciju odabran je uzorak 58-12.

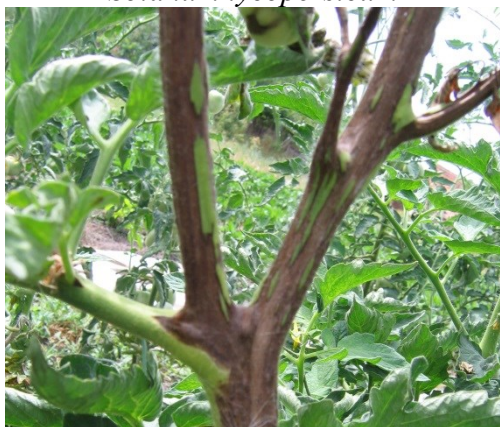
Na biljkama ukrasnog bagrema (*Wisteria sinensis*) zapaženi su simptomi u vidu hloroze praćene deformacijom listova i izraženom nitavošću. Uzorak 540-10 (Slika 23) sakupljen tokom 2010. godine na lokalitetu Porodin odabran je za dalju karakterizaciju.



Slika 4. Izolat 647-10: Mozaik na listu *Solanum lycopersicum*



Slika 5. Izolat AR1: Deformacije i nekroza ploda *Solanum lycopersicum*



Slika 6. Izolat AR1: Nekroza stabla *Solanum lycopersicum*



Slika 7. Izolat 542-08: Izraženi mozaik i hloroza na listu *Capsicum annuum*



Slika 8. Izolat 471-09: Nekrotična prošaravanja na listu *Capsicum annuum*



Slika 9. Izolat 581-11: Izraženi mozaik, klobučavost i deformacije na listu *Capsicum annuum*



Slika 10. Izolat 542-08: Nekroza i deformacije na plodu *Capsicum annuum*



Slika 11. Izolat 650-07: Mozaik i klobučavost na listu *Nicotiana tabacum*



Slika 12. Izolat 570-11: Hlorotično i nekrotično šarenilo na listu *Cucumis sativus*



Slika 13. Izolat 449-12: Mozaik na listu *Citrullus lanatus*



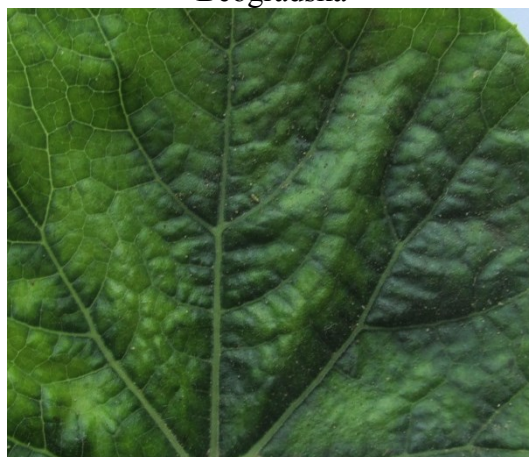
Slika 14. Izolat 415-07: Ulegnuće i kvrgavost na plodu *Cucurbita pepo* 'Olinka'



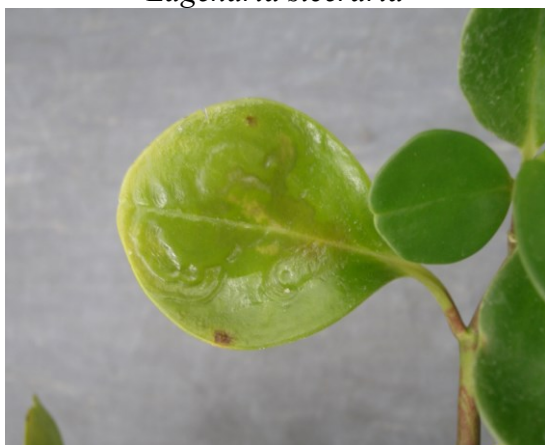
Slika 15. Izolat 201-11: Izraženi mozaik i blaga klobučavost na listu *Cucurbita pepo* 'Beogradska'



Slika 16. Izolat 163-08: Naboranost, izraženi mozaik i deformacije na listu *Lagenaria siceraria*



Slika 17. Izolat 674-11: Zadržavanje zelene boje oko nerava na listu *Lagenaria siceraria*



Slika 18. Izolat 1-12: Nekroza lista i lisne drške *Peperomia tuisana*



Slika 19. Izolat 1-12: Nekrotična prošaravanja na listu *Peperomia tuisana*



Slika 20. Izolat 1-12: Nekrotična prošaravanja i koncentrični krugovi na listu *Peperomia tuisana*



Slika 21. Izolat 79-13: Crtičasti mozaik na listu *Tulipa* sp.



Slika 22. Izolat 58-12: Izraženi mozaik, deformacije i žbunikolost vrha *Stenactis annua*



Slika 23. Izolat 540-10: Nitavost i deformacije na listu *Wisteria sinensis*

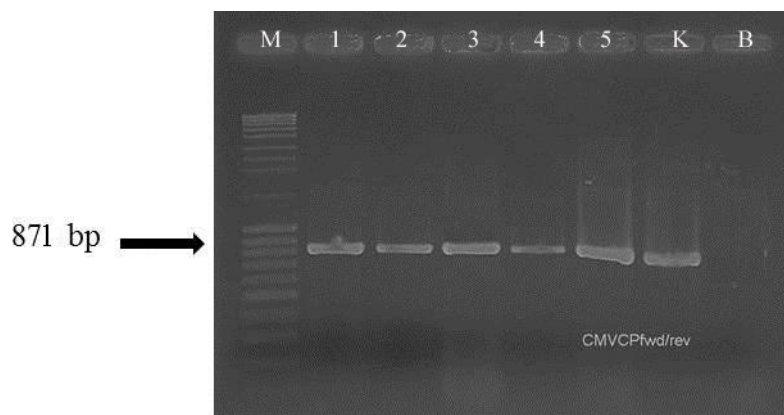
5.3. Amplifikacija genskih regiona

Amplifikacija pet genskih regiona odabranih izolata CMV obavljena je primenom metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse transcription polimerase chain reaction*, RT-PCR) uz korišćenje devet različitih parova prajmera, dizajniranih tokom ovih istraživanja ili prethodno opisanih u literaturi.

5.3.1. Amplifikacija CP gena

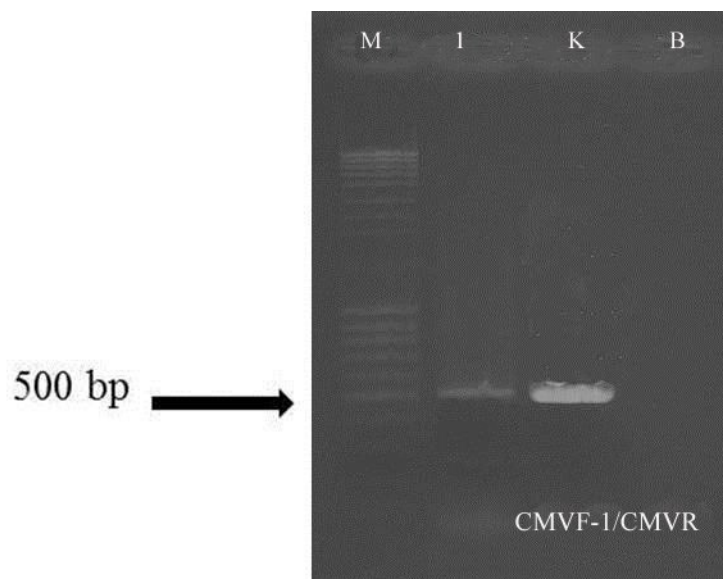
Amplifikacija CP gena odabranih izolata CMV obavljena je korišćenjem jednog od dva para prajmera, CMVCPfwd/CMVCPrev ili CMVF-1/CMVR. Primenom prajmera CMVCPfwd/CMVCPrev koji omogućavaju amplifikaciju celog CP gena kao i

delova 5' i 3' NTR i poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata i pozitivne kontrole (izolat 115-08 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka' ili 650-07 iz *Nicotiana tabacum*) sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 871 bp kod 35 od 36 testiranih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod izolata 230-10 poreklom iz *C. pepo* 'Genovese' i negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom). Na slici 24 prikazani su amplikoni CP gena dela ispitivanih izolata.



Slika 24. Vizuelizacija amplikona CP gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera CMVCPfwd/CMVCPrev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 2-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat 581-11 iz *Capsicum annuum*; 4-izolat 415-07 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka'; 5-izolat 674-11 iz *Lagenaria siceraria*; K-pozitivna kontrola-izolat 115-08 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka'; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

Za amplifikaciju CP gena kod izolata 230-10 korišćen je drugi par prajmera CMVF-1/CMVR (Yu et al., 2005), koji omogućava amplifikaciju dela CP gena i obuhvata konzervativniji region unutar samog gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranog izolata i pozitivne kontrole (izolat 115-08 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka') sa korišćenim markerom (M), prisustvo fragmenta očekivane veličine od 500 bp utvrđeno je kako kod ispitivanog izolata tako i kod pozitivne kontrole (slika 25). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

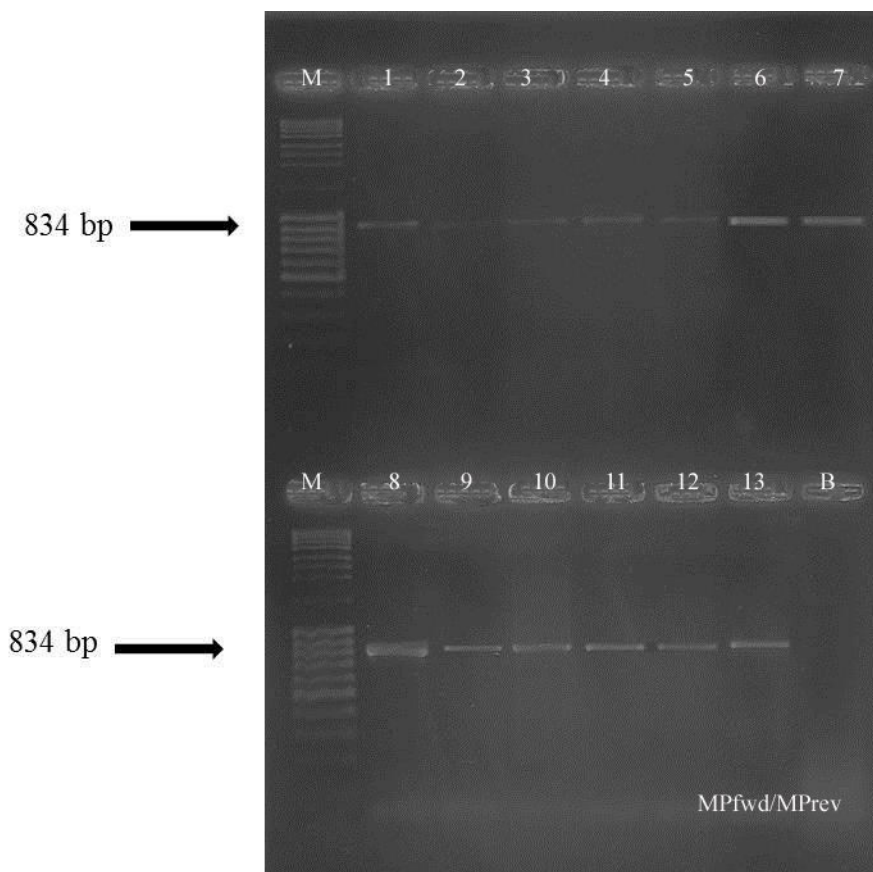


Slika 25. Vizuelizacija amplikona CP gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera CMVF-1/CMVR. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); I-izolat 230-10 iz *Cucurbita pepo* ‘Genovese’; K-pozitivna kontrola-izolat 115-08 iz *Cucurbita pepo* ‘Olinka’; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

Kako prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju parcijalnog MP, 2a i 1a gena, kao i kompletnog 2b gena, nisu doveli do amplifikacije ovih regiona kod izolata 242-09 poreklom iz *Cucurbita maxima*, ovaj izolat je izostavljen iz daljih istraživanja. U toku istraživanja, amplifikovani su gore pomenuti regioni izolata 52-13 poreklom iz *Peperomia tuisana*, ali je i ovaj izolat izostavljen iz daljih istraživanja jer je imao identičnu sekvencu CP gena sa izolatom 1-12 koji je uzorkovan godinu dana ranije na istom lokalitetu.

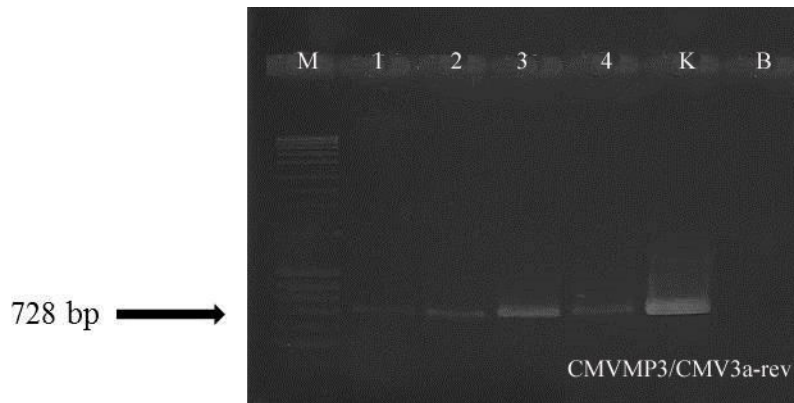
5.3.2. Amplifikacija MP gena

Amplifikacija MP gena 19 odabranih izolata CMV obavljena je korišćenjem jednog od dva para prajmera, MPfwd/MPrev i CMVMP3/CMV3a-rev. Primenom prajmera MPfwd/MPrev koji omogućavaju amplifikaciju dela MP gena od 834 bp i poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine kod 15 od 19 testiranih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod izolata 230-10, 540-10, 581-11 i 58-12, kao i negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom). Na slici 26 prikazani su ampliconi MP gena dela ispitivanih izolata.



Slika 26. Vizuelizacija amplikona MP gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera MPfwd/MPrev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 415-07 iz *Cucurbita pepo* ‘Olinka’; 2-izolat 270-09 iz *Cucurbita pepo* ‘Tosca’; 3-izolat 500-10 iz *Cucurbita pepo*-nepoznata sorta; 4-izolat 201-11 iz *Cucurbita pepo* ‘Beogradska’; 5-izolat 570-11 iz *Cucumis sativus*; 6-izolat 286-12 iz *Cucumis melo*; 7-izolat 473-12 iz *Citrullus lanatus*; M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 8-izolat 723-10 iz *Capsicum annuum*; 9-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 10-izolat 670-08 iz *Solanum lycopersicum*; 11-izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*; 12-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 13-izolat 79-13 iz *Tulipa* sp.; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

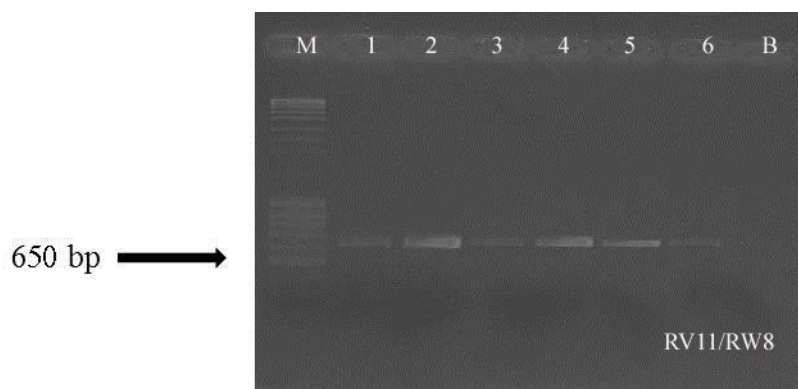
Za amplifikaciju MP gena kod izolata 230-10, 540-10, 581-11 i 58-12 korišćen je drugi par prajmera CMVMP3/CMV3a-rev, koji omogućava amplifikaciju dela MP gena i obuhvata konzervativniji region unutar samog gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata i pozitivne kontrole (izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*) sa korišćenim markerom (M), prisustvo fragmenta očekivane veličine od 728 bp utvrđeno je kako kod ispitivanih izolata tako i kod pozitivne kontrole (Slika 27). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 27. Vizuelizacija amplicona MP gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera CMVMP3/CMV3a-rev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 58-12 iz *Stenactis annua*; 2-izolat 230-10 iz *Cucurbita pepo* ‘Genovese’; 3-izolat 540-10 iz *Wisteria sinensis*; 4-izolat 581-11 iz *Capsicum annum*; K-pozitivna kontrola-izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

5.3.3. Amplifikacija 2a gena

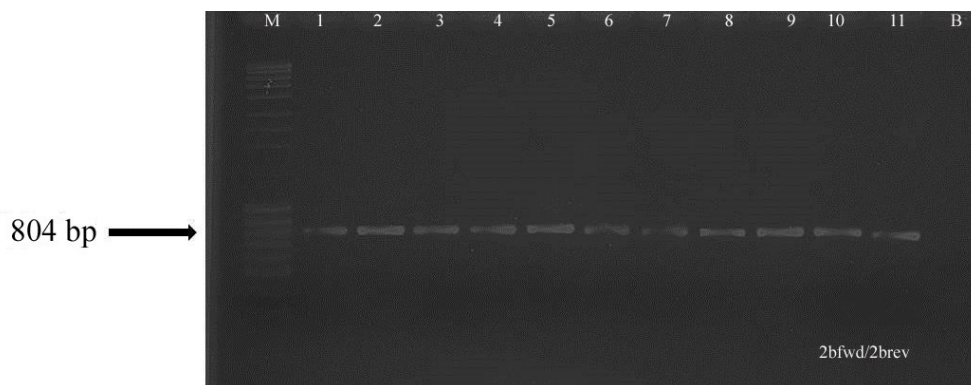
Amplifikacija 2a gena odabranih izolata CMV obavljena je korišćenjem prajmera RV11/RW8 (Finetti Sialer et al., 1999) koji omogućavaju amplifikaciju 5’ NTR i deo 2a gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 650 bp kod svih testiranih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom). Deo uspešno amplifikovanih fragmenta prikazan je na slici 28.



Slika 28. Vizuelizacija amplicona 2a gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera RV11/RW8. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 2-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat 581-11 iz *Capsicum annum*; 4-izolat 415-07 iz *Cucurbita pepo* ‘Olinka’; 5-izolat 674-11 iz *Lagenaria siceraria*; 6-izolat 58-12 iz *Stenactis annua*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

5.3.4. Amplifikacija 2b gena

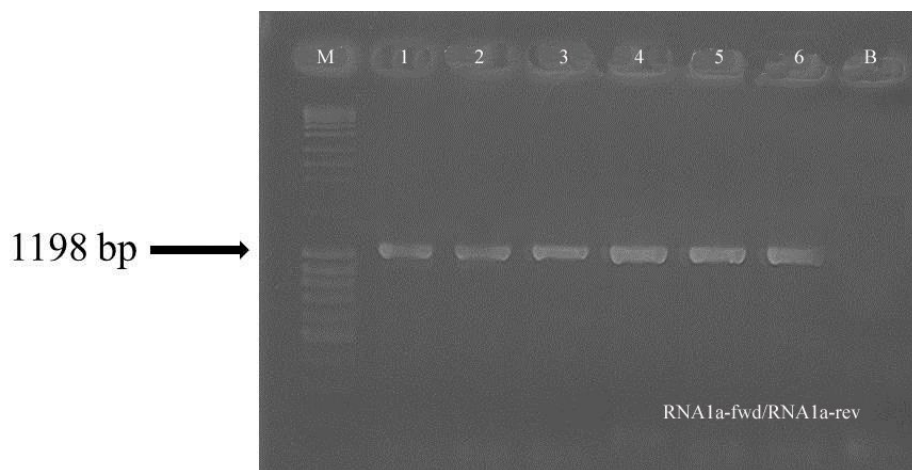
Amplifikacija 2b gena odabranih izolata CMV obavljena je korišćenjem prajmera 2bfwd/2brev koji omogućavaju amplifikaciju celog 2b gena, kao i deo 2a gena i 3' NTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata sa korišćenim markerom (M), prisustvo fragmenta očekivane veličine od 804 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom). Deo dobijenih rezultata prikazan je na slici 29.



Slika 29. Vizuelizacija amplikona 2b gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera 2bfwd/2brev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 201-11 iz *Cucurbita pepo* 'Beogradska'; 2-izolat 570-11 iz *Cucumis sativus*; 3-izolat 670-08 iz *Solanum lycopersicum*; 4-izolat 723-10 iz *Capsicum annuum*; 5-izolat 581-11 iz *Capsicum annuum*; 6-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 7-izolat 473-12 iz *Citrullus lanatus*; 8-izolat 415-07 iz *Cucurbita pepo* 'Olinka'; 9-izolat 674-11 iz *Lagenaria siceraria*; 10-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 11-izolat 286-12 iz *Cucumis melo*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

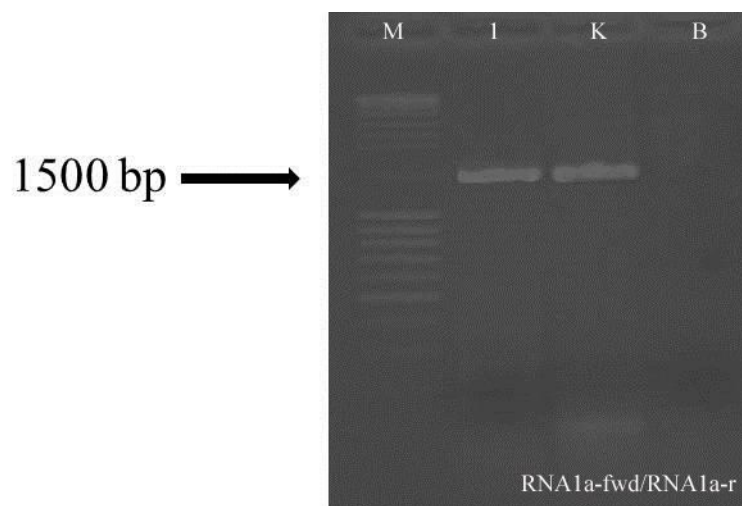
5.3.5. Amplifikacija 1a gena

Amplifikacija dela 1a gena odabranih izolata CMV obavljena je korišćenjem jednog od tri para prajmera, RNA1a-fwd/RNA1a-rev ili RNA1a-fwd/RNA1a-r ili RNA1a-fwd/CMV1a-reverse. Primenom prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-rev koji omogućavaju amplifikaciju dela 1a gena i poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenata očekivane veličine od 1198 bp kod 13 od 15 testiranih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod izolata 540-10 poreklom iz *Wisteria sinensis* i 79-13 poreklom iz *Tulipa* sp., kao i negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom). Deo dobijenih rezultata prikazan je na slici 30.



Slika 30. Vizuelizacija amplicona 1a gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-rev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 2-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat 581-11 iz *Capsicum annuum*; 4-izolat 415-07 iz *Cucurbita pepo* ‘Olinka’; 5-izolat 674-11 iz *Lagenaria siceraria*; 6-izolat 286-12 iz *Cucumis melo*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

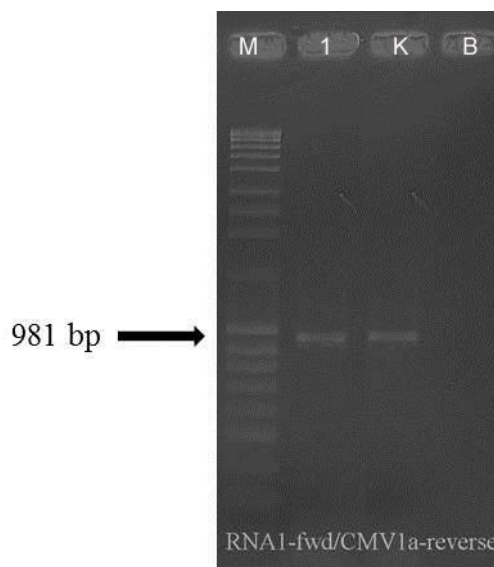
Za amplifikaciju 1a gena kod izolata 540-10 i 79-13 korišćen je drugi par prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-r. Promenom reverznog prajmera, koji obuhvata drugi konzervativan region unutar samog 1a gena i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata i pozitivne kontrole (izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*) sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 1500 bp kod ispitivanog izolata 79-13 i pozitivne kontrole (Slika 31). Do amplifikacije nije došlo kod izolata 540-10 i negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 31. Vizuelizacija amplicona 1a gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-r. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 79-13 iz *Tulipa* sp.; K-pozitivna kontrola-

izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

Za amplifikaciju 1a gena kod izolata 540-10 korišćen je treći par prajmera RNA1a-fwd/CMV1a-reverse. Promenom reverznog prajmera, koji obuhvata različit konzervativan region unutar samog 1a gena u odnosu na prethodno korišćene reverzne prajmere, i poređenjem amplifikovanog fragmenata testiranih izolata i pozitivne kontrole (izolat 650-07 iz duvana) sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 981 bp kod ispitivanog izolata 540-10 i pozitivne kontrole (Slika 32). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 32. Vizuelizacija amplikona 1a gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera RNA1a-fwd/CMV1a-reverse. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 540-10 iz *Wisteria sinensis*; K-pozitivna kontrola-izolat 650-07 iz *Nicotiana tabacum*; B-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

5.4. Molekularna identifikacija odabranih izolata

U cilju proučavanja strukture populacije CMV u Srbiji, kao i poređenja populacije ovog virusa poreklom iz Srbije sa izolatima iz drugih delova sveta, dalja istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila su usmerena ka karakterizaciji odabranih izolata CMV na osnovu svih pet genskih regiona. Nakon amplifikacije, svi dobijeni amplikoni ispitivanih izolata poslani su na uslužno sekvenciranje. Sekvence različitih gena ili fragmenata gena CMV svih odabranih izolata obrađene su u programu

FinchTV Version 1.4.0, a konsenzus sekvence su dobijene međusobnim poređenjem obrađenih sekvenci uzvodnog i nizvodnog prajmera u CLUSTAL W programu, implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0 (**Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2011**). Po obradi, sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, posle čega su im dodeljeni pristupni brojevi (*GenBank Accession Number*) (Tabela 6).

Tabela 6. Pregled GenBank pristupnih brojeva sekvenci analiziranih genskih regiona izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Biljka domaćin	Lokalitet	GenBank pristupni broj				
				CP gen	MP gen	2a gen	2b gen	1a gen
415-07	2007	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Irmovo	KC847072	KT270496	KT270515	KT270534	KT270557
115-08	2008		Gardinovci	HM065510	/	/	/	/
151-08			Kulpin	HM065509	/	/	/	/
171-08			Staro selo	KC832498	/	/	/	/
270-09 ¹	2009	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	JX262137	KT270494	KT270513	KT270532	/
230-10	2010	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	Hetin	KT270561	KT270492	KT270511	KT270530	/
201-11	2011	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Mačkovac	KC847070	KT270491	KT270510	KT270529	/
500-10 ¹	2010	<i>Cucurbita pepo</i> - nepoznata sorta	Porodin	JX262138	KT270498	KT270517	KT270536	/
242-09	2009	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	KT270562	/	/	/	/
514-11	2011	<i>Cucumis sativus</i>	Kupusina	KT270567	/	/	/	/
570-11			Debre	KT270569	KT270500	KT270519	KT270538	KT270551
283-12			2012	Porodin	KT270565	/	/	/
449-12	2012	<i>Citrullus lanatus</i>	Silbaš	JX280942	/	/	/	/
473-12			Gornji Tavankut	KC878465				
610-11	2011	<i>Cucumis melo</i>	Togočevce	KT270571	/	/	/	/
286-12	2012		Porodin	KT270566	KT270495	KT270514	KT270533	KT270548
163-08	2008	<i>Lagenaria siceraria</i>	Bački Petrovac	JX127304	/	/	/	/
674-11	2011		Porodin	JX127305	KT270504	KT270523	KT270542	KT270554
717-11 ¹				JX262139	/	/	/	/
720-11 ¹				JX262140	/	/	/	/
280-12	2012			KT270564	/	/	/	/
477-07	2007	<i>Capsicum annuum</i>	Apatin	JX127307	/	/	/	/
598-07			Novi Kneževac	JX127306	/	/	/	/

542-08	2008		Donji Tavankut	KC847074	/	/	/	/
471-09	2009		Prigrevica	KC847073	/	/	/	/
723-10	2010		Smederevo	KC847075	KT270505	KT270524	KT270543	KT270555
581-11	2011		Cekavica	KC414926	KT270501	KT270520	KT270539	KT270552
581p-11				KT270570	/	/	/	/
746-07	2007	<i>Solanum lycopersicum</i>	Obrenovac	JX127309	/	/	/	/
101-08	2008		Družetić	KC414925	KT270490	KT270509	KT270528	KT270546
670-08			Stajkovce	KC847077	KT270503	KT270522	KT270541	KT270558
207-09	2009		Mačkovac	KC847071	/	/	/	/
647-10	2010		Togočevce	KC847076	/	/	/	/
533-2-11	2011		Kupusina	JX127308	/	/	/	/
AR1-12	2012		Aradac	KT270572	/	/	/	/
650-07 ¹	2007	<i>Nicotiana tabacum</i>	Bački Petrovac	EU921757	KT270502	KT270521	KT270540	KT270553
702-07 ¹			Futog	GQ340670	/	/	/	/
202-08	2008		Lapotince	KC847069	/	/	/	/
267-13	2013	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vladičin Han	KT270563	KT270493	KT270512	KT270531	KT270547
1-12	2012	<i>Peperomia tuisana</i>	Beograd	KC505441	KT270487	KT270506	KT270525	KT270544
52-13	2013			KT270559	/	/	/	/
540-10	2010	<i>Wisteria sinensis</i>	Porodin	KT270568	KT270499	KT270518	KT270537	KT270550
79-13	2013	<i>Tulipa sp.</i>	Krnjača	KJ854451	KT270489	KT270508	KT270527	KT270556
58-12	2012	<i>Stenactis annua</i>	Beograd	KT270560	KT270488	KT270507	KT270526	KT270545

Legenda: ¹Izolati CMV analizirani tokom istraživanja Đekić (2009) i Vučurović (2012) na osnovu sekvence CP gena.

5.4.1. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence CP gena

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su kompletne ili delimične sekvence CP gena ispitivanih izolata CMV. Za većinu odabranih izolata uključujući 415-07, 115-08, 151-08, 171-08, 270-09, 201-11, 500-10, 514-11, 570-11, 283-12, 449-12, 473-12, 286-12, 163-08, 674-11, 717-11, 720-11, 280-12, 477-07, 598-07, 542-08, 471-09, 723-10, 581-11, 581p-11, 746-07, 101-08, 670-08, 207-09, 647-10, 533-2-11, AR1-12, 650-07, 702-07, 202-08, 267-13, 1-12, 52-13, 79-13 i 58-12 dobijena je sekvenca kompletnog CP gena, dok je kod izolata 230-10, 610-11, 242-09 i 540-10 dobijena delimična sekvenca CP gena zbog nepotpunog uspeha sekvenciranja ili nemogućnosti amplifikacije celog CP gena. Dobijene sekvence upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka primenom MEGA softvera verzija 5.0.

Međusobna nukleotidna (nt) sličnost 44 izolata poreklom iz Srbije, čije su sekvence trimovane na dužinu od 468 nt koja odgovara dužini najkraće sekvence (izolat 230-10), iznosila je od 76,3% (111 nt razlike) do 100%, dok je aminokiselinska (aa) sličnost bila od 79,5% (32 aa razlike) do 100% (Prilog 1). Na osnovu genetičke sličnosti izolati iz Srbije mogu se podeliti u dve grupe. U okviru prve grupe od 36 izolata (415-07, 115-08, 151-08, 171-08, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 514-11, 570-11, 283-12, 449-12, 473-12, 610-11, 286-12, 163-08, 674-11, 717-11, 720-11, 280-12, 477-07, 598-07, 542-08, 471-09, 723-10, 746-07, 670-08, 207-09, 647-10, 533-2-11, AR1-12, 650-07, 702-07, 202-08, 267-13 i 58-12) nt sličnost se kretala od 94,2% (27 nt razlike) do 100%, odnosno aa sličnost od 90,4% (15 aa razlike) do 100%. U okviru druge grupe koju je činilo osam izolata (242-09, 581-11, 581p-11, 101-08, 1-12, 52-13, 540-10 i 79-13) nt sličnost se kretala od 96,6% (16 nt razlike) do 100%, odnosno od 96,2% (6 aa razlike) do 100% aa sličnosti. Nukleotidna sličnost između ove dve grupe izolata kretala se od 76,3 do 80,6% (91 do 111 nt razlike), a aa sličnost od 79,5 do 88,5% (18 do 32 aa razlike).

BLAST analiza pokazala je 79 do 99% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama CP gena izolata CMV iz drugih delova sveta. Stepem najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0 i kretao se od 97 do 100% (93,6 do 100% aa sličnosti)

(Tabela 7). Nukleotidnu identičnost od 100% pokazali su izolati 647-10 i 267-13 sa izolatima iz Australije (U22821) i SAD (D10538 i U20668), dok je najniži stepen nt sličnost od 97% (93,6% aa sličnosti) ispoljio izolat 202-08 sa izolatom iz Bosne i Hercegovine (JX436358).

Tabela 7. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka na osnovu sekvence CP gena primenom MEGA softvera verzija 5.0

Izolat	Nukleotidna sličnost (razlika u nt)	Aminokiselinska sličnost (razlika u aa)	Izolat/i iz GenBank (zemlja porekla)
415-07	99,2% (5)	100% (0)	AJ829770 i AJ829776 (Španija); KC559757 (BiH); X16386 (Francuska); U22821 (Australija); U20668 (SAD)
115-08	99,4% (4)	99,5% (1)	AM183119 (Španija)
151-08	99,5% (3)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD); AM183119 (Španija)
171-08	99,2% (5)	100% (0)	D10538 (SAD)
270-09	99,5% (3)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
230-10	99,8% (1)	100% (0)	KC288146, 8 (Srbija); JX112022 (Iran); KC559757 (BiH); AB448691-5 (Japan); U22821 i AJ585517 (Australija); D10538, U20668 (SAD)
201-11	99,8% (1)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538, U20668 (SAD)
500-10	99,5% (3)	100% (0)	AM183119 (Španija); U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
242-09	97,3% (16)	95,4% (8)	AB006813 (Japan)
514-11	99,5% (3)	99,5% (1)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
570-11	99,7% (2)	100% (0)	KC288148 (Srbija); DQ018292 i EU191027 (Poljska)
283-12	99,7% (2)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
449-12	98,9% (7)	99,1% (2)	AJ829777 (Španija); AY871071 (Iran)
473-12	99,8% (1)	100% (0)	KC288146 (Srbija); U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
610-11	99,5% (3)	98,4% (1)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
286-12	99,4% (4)	99,1% (2)	KC288147 (Srbija); AJ829777 (Španija)
163-08	99,8% (1)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538, U20668 (SAD)

674-11	99,7% (2)	100% (0)	KC288146 (Srbija); U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
717-11	97,7% (16)	97,7% (5)	AJ585517 (Australija)
720-11	99,7% (2)	100% (0)	D10538 i U20668 (SAD)
280-12	99,7% (2)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
477-07	99,5% (3)	100% (0)	KC288146 (Srbija); AJ829770, AJ829776 i AM183119 (Španija); KC559757 (BiH); X16386 (Francuska); U22821 (Australija); U20668 (SAD)
598-07	99,7% (2)	100% (0)	AJ829770, AJ829776 (Španija); X16386 (Francuska)
542-08	99,1% (6)	99,1% (2)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
471-09	98,9% (9)	97,7% (6)	KC288147 (Srbija)
723-10	98,8% (5)	100% (0)	AJ585517 (Australija)
581-11	99,7% (2)	100% (0)	DQ018292 i EU191027 (Poljska)
581p-11	99,7% (2)	100% (0)	DQ018292 i EU191027 (Poljska)
746-07	99,5% (3)	100% (0)	AJ511990 (Mađarska); U22821 (Australija); U20668 (SAD)
101-08	99,8% (1)	100% (0)	DQ018292 i EU191027 (Poljska)
670-08	99,7% (2)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
207-09	99,8% (1)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
647-10	100% (0)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
533-2-11	99,7% (2)	99,1% (2)	KC288148 (Srbija)
AR1-12	99,2% (5)	100% (0)	KC288146 (Srbija); U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
650-07	99,2% (5)	99,1% (2)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
702-07	99,7% (2)	100% (0)	AJ829770, AJ829776 i AM183119 (Španija); KC559757 (BiH); X16386 (Francuska); U22821 (Australija); U20668 (SAD)
202-08	97,0% (20)	93,6% (14)	JX436358 (BiH)
267-13	100% (0)	100% (0)	U22821 (Australija); D10538 i U20668 (SAD)
1-12	99,1% (6)	99,1% (2)	AB006813 (Japan)
52-13	99,1% (6)	99,5% (1)	AB006813 (Japan)
540-10	99,1% (6)	98,1% (3)	AB006813 (Japan)
79-13	99,2% (5)	99,0% (2)	AB006813 (Japan); S70105 (SAD)
58-12	99,7% (2)	100% (0)	KC288146 (Srbija)

5.4.2. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence MP gena

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su delimične sekvence MP gena ispitivanih izolata CMV. Dobijene sekvence upoređene su međusobno, kao i sa sekvencama izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Međusobna nt sličnost 19 izolata poreklom iz Srbije na osnovu sekvenci dela MP gena CMV skraćene na dužinu od 590 nt, prema dužini najkraćih sekvenci izolata 58-12 i 581-11, odnosno 500-10 u okviru ovog regiona, kretala se od 76,6% (138 nt razlike) do 100%, dok je aa sličnost iznosila od 85,7% (28 aa razlike) do 100% (Prilog 2). Na osnovu genetičke sličnosti izolati iz Srbije se mogu podeliti u dve grupe. U okviru prve grupe u koju se svrstalo 15 izolata (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 267-13, 540-10 i 58-12), nt sličnost se kretala od 98,3% (12 nt razlike) do 100%, odnosno aa sličnost od 98,5% (3 aa razlike) do 100%. U okviru druge grupe koju je činilo četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 79-13), nt sličnost se kretala od 97,6 do 98,8% (7 do 14 nt razlike), odnosno od 99,0% (2 aa razlike) do 100% aa sličnost. Nukleotidna sličnost ove dve grupe kretala se od 76,6 do 78% (130 do 138 nt razlike), a aa sličnost od 85,7 do 86,2% (27 do 28 aa razlike).

BLAST analiza pokazala je 78 do 99% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama MP gena izolata CMV iz drugih delova sveta. Stepem najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0 i kretao se od 89,9 do 100% (89,9 do 100% aa sličnosti) (Tabela 8). Nukleotidnu identičnost od 100% pokazao je izolat 570-11 sa izolatom iz Mađarske (AJ517802), dok je najniži stepen nt sličnosti od 89,9% (99,6% aa sličnost) ispoljio izolat 230-10 sa izolatom iz Španije (AJ829769).

Tabela 8. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka na osnovu sekvence MP gena primenom MEGA softvera verzija 5.0

Izolat	Nukleotidna sličnost (razlika u nt)	Aminokiselinska sličnost (razlika u aa)	Izolat/i iz GenBank (zemlja porekla)
415-07	99,1% (7)	100% (0)	AJ517802 (Mađarska)
270-09	99,3% (6)	89,9% (3)	AJ517802 (Mađarska)
230-10	89,9% (8)	99,6% (1)	AJ829769 (Španija)
201-11	99,5% (4)	99,6% (1)	AJ517802 (Mađarska)
500-10	99,3% (5)	99,6% (1)	AM183119 (Španije) i D10538 (SAD)
473-12	99,6% (3)	99,6% (1)	AJ517802 (Mađarska)
286-12	99,1% (7)	99,2% (2)	AJ517802 (Mađarska)
674-11	99,6% (3)	100% (0)	AJ517802 (Mađarska)
570-11	100% (0)	100% (0)	AJ517802 (Mađarska)
723-10	99,5% (4)	99,6% (1)	JX025994 (Iran)
581-11	98,8% (8)	100% (0)	AB176847 (Japana)
101-08	98,5% (12)	98,9% (4)	EF202597 (Kina)
670-08	98,7% (11)	99,6% (1)	AJ517802 (Mađarska)
650-07	99,3% (6)	99,6% (1)	AJ517802 (Mađarska)
267-13	99,6% (3)	100% (0)	AM183119 (Španije) i AJ585517 (Australije)
1-12	99,0% (8)	98,9% (4)	JF918960 (SAD)
540-10	99,6% (3)	100% (0)	AJ829769 (Španija)
79-13	99,5% (4)	100% (0)	EU301796 (Poljska)
58-12	99,4% (4)	99,6% (1)	AJ829769 (Španija)

5.4.3. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 2a gena

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su delimične sekvence 2a gena ispitivanih izolata CMV. Dobijene sekvence upoređene su međusobno, kao i sa sekvencama izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Međusobna nt sličnost 19 izolata poreklom iz Srbije, čije su sekvence trimovane na osnovu dužine najkraće sekvence 2a gena izolata 79-13 od 511 nt, kretala se od 96,7% (17 nt razlike) do 100%, dok se aa sličnost kretala od 97,1% (5 aa razlike) do 100% (Prilog 3). Na osnovu genetičke sličnosti izolati iz Srbije svrstali su se u istu grupu.

BLAST analiza pokazala je 90 do 99% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama 2a gena izolata CMV iz drugih delova sveta. Stepenn najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa

sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0 i kretao se od 99,4 do 100% (98,3 do 100% aa sličnosti) (Tabela 9). Nukleotidnu identičnost od 100% pokazao je izolat 650-07 sa izolatom iz SAD (D00355), dok su najniži stepen nt sličnosti od 99,4% (98,9 do 99,4% aa sličnost) ispoljili izolati 201-11, 473-12 i 1-12 sa izolatom iz SAD (D00355), odnosno izolat 286-12 sa izolatima iz Japana (AB188236, AB079891, AB188232 i AB188230).

Tabela 9. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka na osnovu sekvence 2a gena primenom MEGA softvera verzija 5.0

Izolat	Nukleotidna sličnost (razlika u nt)	Aminokiselinska sličnost (razlika u aa)	Izolat/i iz GenBank (zemlja porekla)
415-07	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
270-09	99,6% (2)	100% (0)	D00355 (SAD)
230-10	99,6% (2)	99,6% (1)	D00355 (SAD)
201-11	99,4% (3)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
500-10	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
473-12	99,4% (3)	98,9% (2)	D00355 (SAD)
286-12	99,4% (3)	98,9% (2)	AB188236, AB079891, AB188232 i AB188230 (Japan)
674-11	99,8% (1)	99,4% (1)	AB188236, AB079891, AB188232 i AB188230 (Japan)
570-11	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
723-10	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
581-11	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
101-08	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
670-08	99,6% (3)	98,3% (3)	AB188236, AB079891, AB188232 i AB188230 (Japan)
650-07	100% (0)	100% (0)	D00355 (SAD)
267-13	99,6% (2)	99,4% (1)	AB188236, AB079891, AB188232 i AB188230 (Japan)
1-12	99,4% (3)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
540-10	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
79-13	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)
58-12	99,6% (2)	99,4% (1)	D00355 (SAD)

5.4.4. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 2b gena

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su kompletne sekvence 2b gena ispitivanih izolata CMV. Dobijene sekvence

upoređene su međusobno, kao i sa sekvencama izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Međusobna nt sličnost 19 izolata poreklom iz Srbije na osnovu dužine sekvence celog 2b gena od 333 nt iznosila je od 63,4% (112 nt razlike) do 100%, dok se aa sličnost kretala od 53,1% (45 aa razlike) do 100% (Prilog 4). Na osnovu genetičke sličnosti izolati iz Srbije se mogu podeliti u dve grupe. U okviru prve grupe u koju se svrstalo 15 izolata (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 79-13 i 58-12), nt sličnost se kretala od 94,4% (16 nt razlike) do 100%, odnosno aa sličnost od 93,8% (6 aa razlike) do 100%. U okviru druge grupe koju je činilo četiri izolata (101-08, 581-11, 1-12 i 267-13), nt sličnost se kretala od 98,3% do 99,7% (1 do 5 nt razlike), odnosno od 98,9% (1 aa razlike) do 100% aa. Nukleotidna sličnost ove dve grupe kretala se od 63,4 do 68,7% (105 do 112 nt razlike), a aa sličnost od 53,1 do 58,9% (42 do 45 aa razlike).

BLAST analiza pokazala je 78 do 99% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama 2b gena izolata CMV iz drugih delova sveta. Stepen najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0 i kretao se od 89,8 do 100% (97,3 do 100% aa sličnosti) (Tabela 10). Nukleotidnu identičnost od 100% pokazali su izolati 670-08, 230-10 i 58-12 sa izolatom iz Irana (JX025979, JX025980, JX025982 i JX025984) i 101-08 i 1-12 sa izolatima iz Japana (AB479214) i SAD (AF416900). Najniži stepen nt sličnosti od 89,8% (97,3% aa sličnost) ispoljio je izolat 79-13 sa izolatom iz Japana (AB188229).

Tabela 10. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka na osnovu sekvence 2b gena primenom MEGA softvera verzija 5.0

Izolat	Nukleotidna sličnost (razlika u nt)	Aminokiselinska sličnost (razlika u aa)	Izolat/i iz GenBank (zemlja porekla)
415-07	99,7% (2)	100% (0)	HE971541, HE971545 i HE971558 (Tunis)
270-09	97,9% (7)	98,2% (2)	JX025972, JX025973 i JX025983 (Iran)
230-10	100% (0)	100% (0)	JX025979, JX025980, JX025982 i JX025984 (Iran)
201-11	99,4% (2)	100% (0)	JX025979, JX025982 i JX025984 (Iran)
500-10	99,1% (3)	97,3% (2)	HE793684 (Francuska) i D00355 (SAD)
570-11	99,7% (2)	100% (0)	HE971541, HE971545 i HE971558 (Tunis)
473-12	98,8% (4)	97,3% (3)	HE971536, HE971541, HE971545, HE971558 i HE971558 (Tunis)
286-12	99,4% (2)	98,2% (2)	AB188229 (Japan)
674-11	99,4% (2)	99,1% (1)	AB188229 (Japan)
723-10	98,5% (5)	97,3% (3)	HE793684 (Francuska) i D00355 (SAD)
581-11	97,3% (3)	99,0% (2)	AB479214 (Japan) i AF416900 (SAD)
101-08	100% (0)	100% (0)	AB479214 (Japan) i AF416900 (SAD)
670-08	100% (0)	100% (0)	JX025979, JX025980, JX025982 i JX025984 (Iran)
650-07	99,7% (2)	100% (0)	HE971541, HE971545 i HE971558 (Tunis)
267-13	99,7% (1)	100% (0)	AB479214 (Japan) i AF416900 (SAD)
1-12	100% (0)	100% (0)	AB479214 (Japan) i AF416900 (SAD)
540-10	99,7% (2)	100% (0)	HE971541, HE971545 i HE971558 (Tunis)
79-13	89,8% (4)	97,3% (3)	AB188229 (Japan)
58-12	100% (0)	100% (0)	JX025979, JX025980, JX025982 i JX025984 (Iran)

5.4.5. Identifikacija odabranih izolata CMV na osnovu sekvence 1a gena

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su delimične sekvence 1a gena ispitivanih izolata CMV. Dobijene sekvence upoređene su međusobno kao i sa sekvencama izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

Međusobna nt sličnost 15 izolata poreklom iz Srbije, na osnovu dela 1a gena CMV skraćene na 735 nt, prema dužini najkraćih sekvenci izolata 58-12 i 650-07 u okviru ovog regiona, kretala se od 79,3 do 99,9% (1 do 152 nt razlike), dok je aa sličnost iznosila od 85,3% (36 aa razlike) do 100% (Prilog 5). Na osnovu genetičke

sličnosti izolati iz Srbije se mogu podeliti u tri grupe. U okviru prve grupe u koju se svrstalo devet izolata (415-07, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 670-08, 650-07, 540-10 i 58-12), nt sličnost se kretala od 95,5 do 99,9% (1 do 33 nt razlike), odnosno aa sličnost od 98,2% (3 aa razlike) do 100%. U okviru druge grupe koju je činilo dva izolata (723-10 i 267-13), nt sličnost je iznosila 99,2% (6 nt razlike), dok je aa sličnost bila 100%. U okviru treće grupe koju je činilo četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 79-13), nt sličnost se kretala od 98,9 do 99,6% (3 do 8 nt razlike), odnosno aa sličnost od 99,2% (2 aa razlike) do 100%. Nukleotidna sličnost između prve i druge grupe izolata kretala se od 90,7 do 92,1% (58 do 68 nt razlike) i aa sličnost od 93,1 do 93,9% (15 do 17 aa razlike), nt sličnost između prve i treće od 79,3 do 80,5% (143 do 152 nt razlike) i aa sličnost od 86,9 do 88,2% (29 do 32 aa razlike), a između druge i treće grupe izolata nt sličnost se kretala od 80,5 do 81,4% (137 do 143 nt razlike) i aa sličnost od 85,3 do 86,1% (34 do 36 aa razlike).

BLAST analiza pokazala je 81 do 99% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama 1a gena izolata CMV iz drugih delova sveta. Stepen najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0 i kretala se od 89,1 do 99,7% (89,2 do 100% aa sličnosti) (Tabela 11). Nukleotidnu sličnost od 99,7% (99,5% aa sličnosti) pokazao je izolat 570-11 sa izolatom iz Mađarske (AJ511988), dok je najniži stepen nt sličnosti od 89,1% (89,2% aa sličnosti) ispoljio izolat 58-12 sa izolatima iz Francuske (HE793683) i Mađarske (AJ511988).

Tabela 11. Nukleotidna i aminokiselinska sličnost izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka na osnovu sekvence 1a gena primenom MEGA softvera verzija 5.0

Izolat	Nukleotidna sličnost (razlika u nt)	Aminokiselinska sličnost (razlika u aa)	Izolat/i iz GenBank (zemlja porekla)
415-07	99,4% (6)	100% (0)	AJ511988 (Mađarska)
570-11	99,7% (3)	99,5% (2)	AJ511988 (Mađarska)
473-12	99,3% (7)	99,7% (1)	AJ511988 (Mađarska)
286-12	98,6% (18)	100% (0)	AB188234 (Japan)
674-11	98,6% (15)	100% (0)	AB188234 (Japan)
723-10	99,1% (10)	99,2% (3)	HE962480 (Francuska)
581-11	99,3% (7)	99,2% (3)	HE793685 (Francuska)
101-08	99,6% (4)	99,7% (1)	HE793685 (Francuska)
670-08	99,6% (4)	100% (0)	AJ511988 (Mađarska)
650-07	99,3% (7)	99,7% (1)	AJ511988 (Mađarska)
267-13	89,5% (16)	99,2% (3)	HE962480 (Francuska)
1-12	99,3% (7)	99,2% (3)	HE793685 (Francuska) i HE650150 (Indija)
540-10	99,3% (6)	99,3% (2)	AJ511988 (Mađarska) i D00356 (SAD)
79-13	99,3% (10)	98,9% (4)	AB176849 (Japan)
58-12	89,1% (19)	89,2% (4)	HE793683 (Francuska) i AJ511988 (Mađarska)

5.5. Filogenetske analize izolata CMV

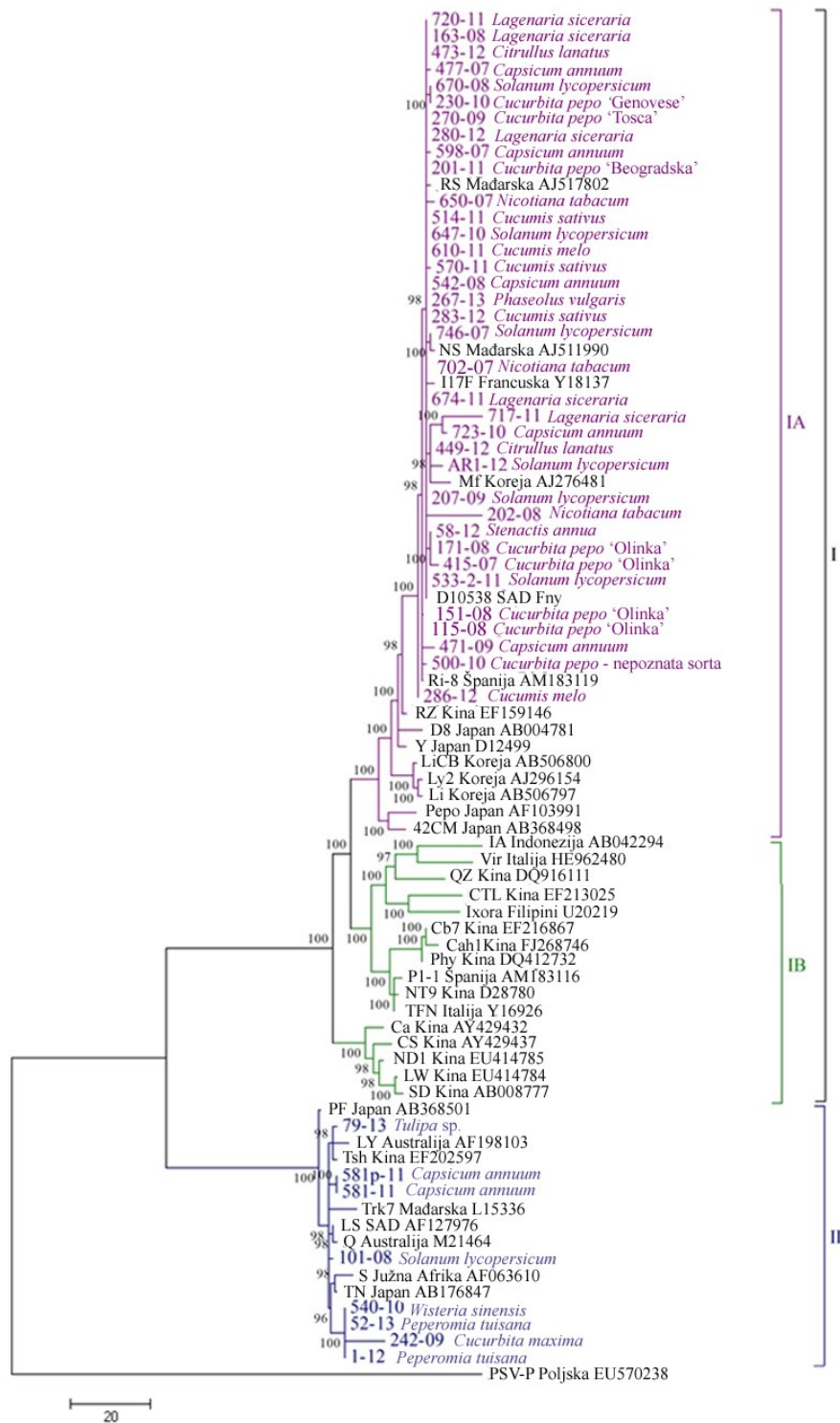
Molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala čiji je cilj bio da pruži uvid u evolutivnu povezanost odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije sa izolatima iz drugih delova sveta dostupnim u GenBank bazi podataka, omogućiti dalja proučavanja strukture populacije ovog značajnog virusa i ukaže na njegovu varijabilnost, kao i na prisustvo rekombinantnih i preudorekombinantnih izolata. Filogenetska proučavanja CMV obavljena su na osnovu analiza sekvenci informativnih za pet genskih regiona (CP, MP, 2a, 2b i 1a gen), kao i na osnovu kombinacije sekvenci koje pripadaju određenim genskim segmentima (RNK 2 i RNK 3). Pored toga, filogenetska proučavanja ovog virusa obavljena su i na osnovu kombinacije sekvenci svih pet genskih regiona.

5.5.1. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci CP gena

Sekvence parcijalnog ili kompletnog CP gena 44 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci CP gena izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi

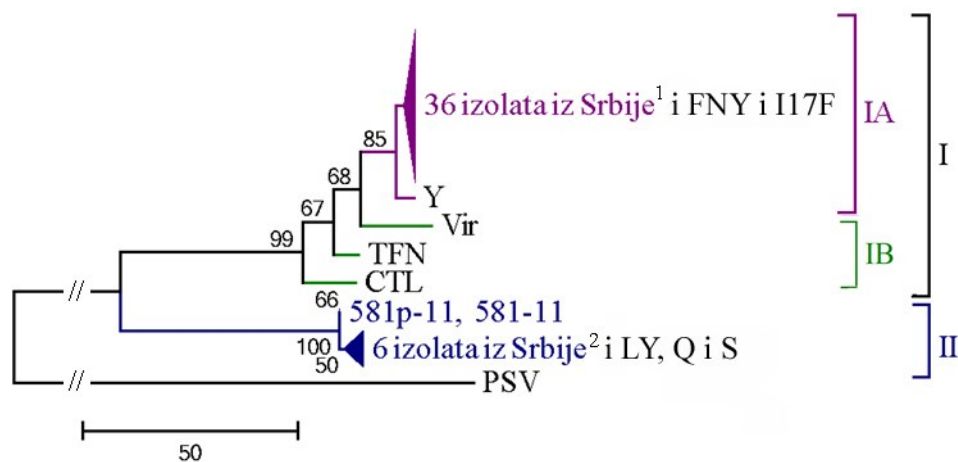
podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV su zatim uparene sa sekvencom CP gena virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3) i skraćene na dužinu najkraće sekvence. Tako su, sekvence CP gena CMV izolata skraćene na 471 nt, prema dužini sekvence izolata 230-10, nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo prikazano na slici 33, dobijeno od 90 generisanih stabala, pokazalo je jasno izdvajanje dve glavne molekularne podgrupe, I i II. Ovakva podela CMV podržana je visokim „bootstrap“ vrednostima od 100%. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci parcijalnog CP gena pokazuje da se odabrani izolati iz Srbije grupišu u dve odvojene podgrupe CMV. U okviru podgrupe I svrstalo se 36 izolata (415-07, 115-08, 151-08, 171-08, 270-09, 230-10, 201-11 500-10, 514-11, 570-11, 283-12, 449-12, 473-12, 610-11, 286-12, 163-08, 674-11, 717-11, 720-11, 280-12, 477-07, 598-07, 542-08, 471-09, 723-10, 746-07, 670-08, 207-09, 647-10, 533-2-11, AR1-12, 650-07, 702-07, 202-08, 267-13 i 58-12), dok se osam izolata (242-09, 581-11, 581p-11, 101-08, 1-12, 52-13, 540-10 i 79-13) grupisalo u okviru podgrupe II CMV. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci u stablu bio je $0,113 \pm 0,013$, dok su unutargrupni diverziteti iznosili $0,037 \pm 0,005$ za podgrupu I i $0,015 \pm 0,003$ za podgrupu II. Međugrupno variranje između I i II podgrupe u stablu iznosilo je $0,278 \pm 0,035$.

Podgrupa I se dalje deli u dve podgrupe, IA i IB, čiji unutargrupni diverziteti iznose $0,014 \pm 0,002$, odnosno $0,059 \pm 0,008$. Podgrupa IA je monofiletička sa visokom „bootstrap“ vrednošću od 100% i u nju su se svrstali svi izolati iz Srbije koji se nalaze u okviru podgrupe I, kao i većina izolati iz raznih delova sveta. Podgrupa IB je polifiletička i u njoj se nalaze izolati koji najčešće vode poreklo iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Indonezija i Filipini), ali i dva izolata iz Italije (Y16926 i HE962480) i jedan izolat iz Španije (AM183116). Međugrupni diverzitet između ovih podgrupa iznosio je $0,068 \pm 0,010$.



Slika 33. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog CP gena dužine 471 nt na osnovu sekvenci 82 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog parcijalnog dela CP gena obuhvatilo je 44 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 34 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa.



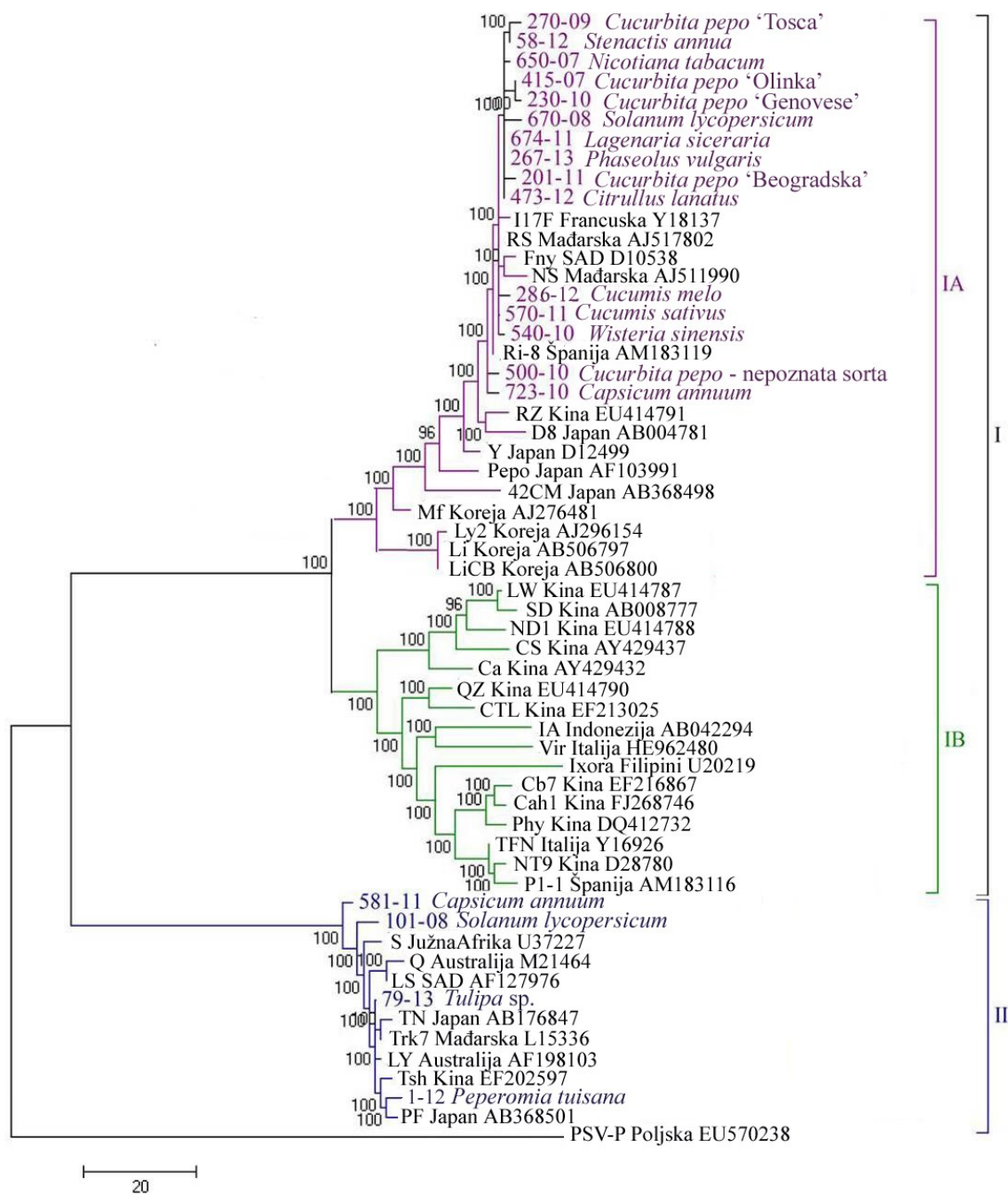
Slika 34. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog CP gena dužine 471 nt na osnovu sekvenci 53 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom. Legenda: ¹ Srpski izolati: 471-09, 115-08, 286-12, 151-08, 500-10, 514-11, 270-09, 650-07, 702-07, 720-11, 201-11, 202-08, 647-08, 746-07, 283-12, 533-2-11, 415-07, 171-08, 58-12, 542-08, 267-13, 674-11, 207-09, 473-12, 610-11, 163-08, 598-07, 477-09, 280-12, 570-11, 670-08, 230-10, 449-12, 717-11, 723-10 i AR1-12; ² Srpski izolati: 101-08, 242-09, 1-12, 540-10, 79-13 i 52-13.

5.5.2. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci MP gena

Sekvence parcijalnog MP gena 19 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci MP gena izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV su zatim uparene sa sekvencom MP gena virusa kržljavosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3) i skraćene na dužinu najkraće sekvence. Tako su, sekvence MP gena CMV izolata skraćene na 590 nt, prema dužini sekvenci izolata 58-12 i 581-11, odnosno 500-10,

nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo prikazano na slici 35, dobijeno od 31 generisanog stabala, pokazalo je jasno izdvajanje dve glavne molekularne podgrupe, I i II. Ovakva podela podržana je visokim „*bootstrap*“ vrednostima od 100%. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci parcijalnog MP gena pokazuje da se odabrani izolati iz Srbije grupišu u dve odvojene podgrupe CMV. U okviru podgrupe I svrstalo se 15 izolata (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 267-13, 540-10 i 58-12), dok se preostalih četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12, i 79-13) grupisalo u okviru podgrupe II CMV. Ukupni nukleotidni diverzitet u stablu iznosio je $0,151 \pm 0,015$, dok su unutargrupni diverziteti za podgrupu I i II iznosili $0,061 \pm 0,011$, odnosno $0,014 \pm 0,003$. Međugrupna variranja između I i II podgrupe u stablu bila su $0,332 \pm 0,040$.

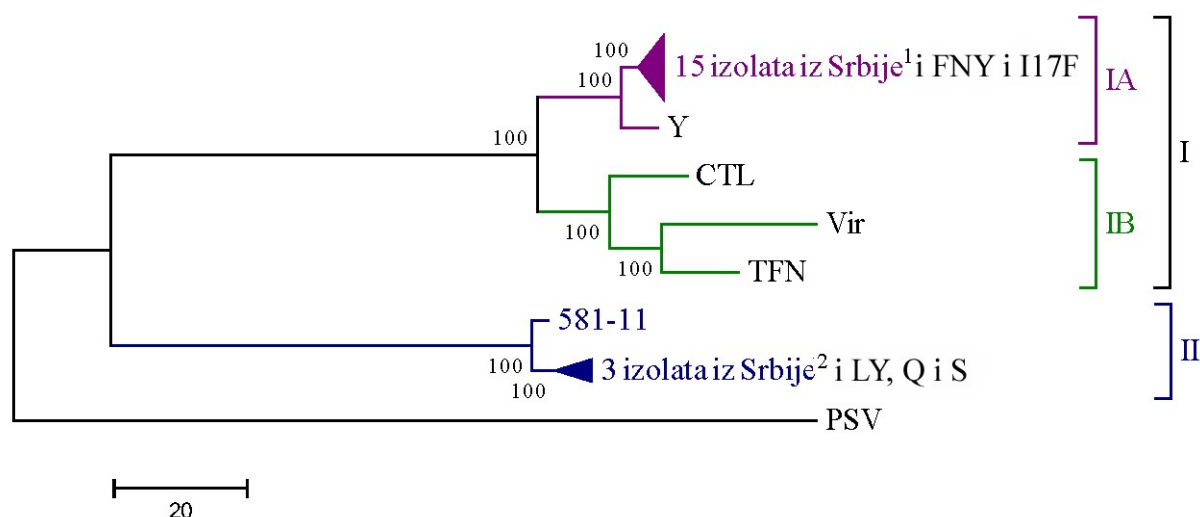
Filogenetske analize zasnovane na parcijalnim sekvencama MP gena pokazale su jasno izdvajanje dve podgrupe u okviru podgrupe I, IA i IB. Izdvajanje ovih podgrupa takođe je podržano visokim „*bootstrap*“ vrednostima koje su iznosile 100%. Međugrupno variranje između ovih podgrupa iznosilo je $0,088 \pm 0,012$, dok je unutargrupni diverzitet za podgrupu IA bio $0,030 \pm 0,004$, a za podgrupu IB $0,066 \pm 0,008$. U okviru podgrupe IA svrstali su se svi izolati iz Srbije koji se nalaze u okviru podgrupe I. U filogenetskom stablu na slici 35 uočava se i IB podgrupa u kojoj se nalaze izolati koji najčešće vode poreklo iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Indonezija i Filipini), ali i dva izolata iz Italije (Y16926 i HE962480) i jedan izolat iz Španije (AM183116).



Slika 35. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog MP gena dužine 590 nt na osnovu sekvenci 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog parcijalnog dela MP gena obuhvatilo je 19 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu

ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 36 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa.



Slika 36. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog MP gena dužine 590 nt na osnovu sekvenci 28 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

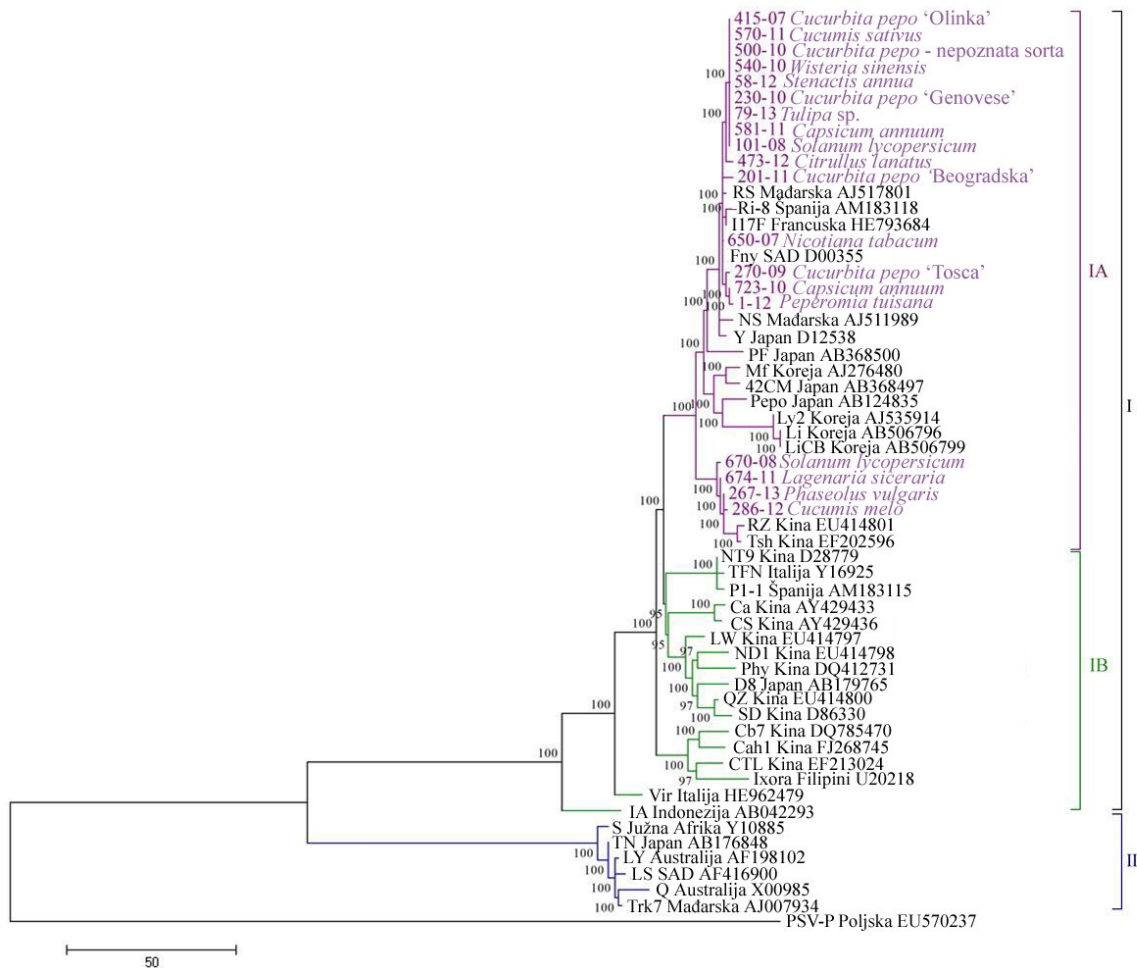
Legenda: ¹ Srpski izolati: 201-11, 674-11, 267-13, 670-08, 540-10, 650-07, 473-12, 415-07, 230-10, 58-12, 270-09, 286-12, 570-11, 723-10 i 500-10; ² Srpski izolati: 101-08, 79-13 i 1-12.

5.5.3. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 2a gena

Sekvence parcijalnog 2a gena 19 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci 2a gena izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV su zatim uparene sa sekvencom 2a gena virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3) i skraćene na dužinu najkraće sekvence. Tako su, sekvence 2a gena CMV izolata skraćene na 564 nt, prema dužini sekvence izolata 79-13, nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo prikazano na slici 37, dobijeno od 40 generisanih stabala, pokazalo je jasno izdvajanje dve glavne molekularne podgrupe, I i II. Ovakva

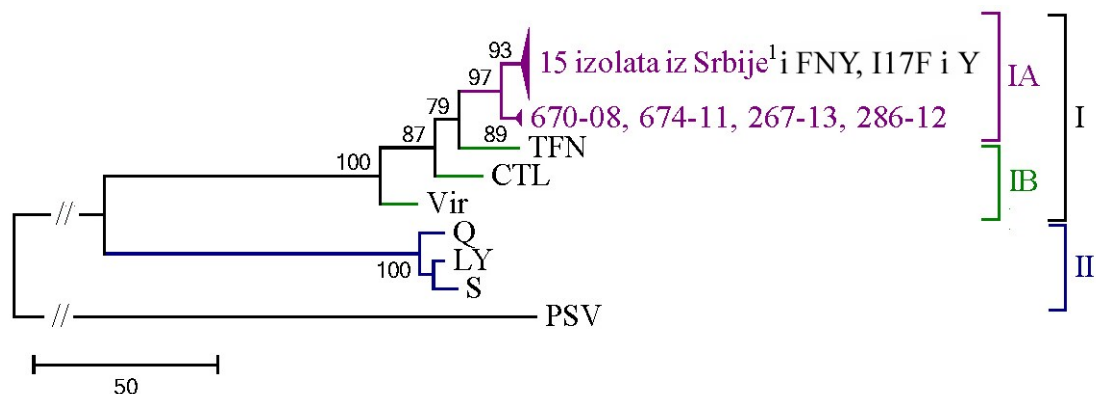
podela podržana je visokim „*bootstrap*“ vrednostima, koja je za obe podgrupe iznosila 100%. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci u stablu iznosio je $0,146\pm 0,013$, dok su unutargrupni diverziteti iznosili $0,056\pm 0,006$ za podgrupu I i $0,016\pm 0,004$ za podgrupu II. Međugrupno variranje između I i II podgrupe u stablu bilo je $0,526\pm 0,057$. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci parcijalnog 2a gena pokazuje da se svi odabrani izolati poreklom iz Srbije grupišu u okviru I podgrupe CMV.

Podgrupa I se dalje deli u dve podgrupe, IA i IB. Unutargrupni diverzitet podgrupe IA iznosio je $0,027\pm 0,004$, a izdvajanje ove podgrupe u okviru podgrupe I podržano je visokom „*bootstrap*“ vrednošću od 100%. U ovu podgrupu su se svrstali svi izolati iz Srbije kao i većina izolata prikazanih u filogenetskom stablu poreklom iz raznih delova sveta. U podgrupu IB čiji unutargrupni diverzitet iznosi $0,073\pm 0,007$ svrstali su se izolati koji najčešće vode poreklo iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Indonezija i Filipini), kao i izolati iz Italije (Y16925 i HE962479) i Španije (AM183115). Međugrupni diverzitet između IA i IB podgrupe bio je $0,080\pm 0,009$.



Slika 37. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog 2a gena dužine 564 nt na osnovu sekvenci 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupu su obojeni ljubičastom bojom.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog parcijalnog dela 2a gena obuhvatilo je 19 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 38 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u istu podgrupu CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa.



Slika 38. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog 2a gena dužine 564 nt na osnovu sekvenci 28 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom bojom.

Legenda: ¹ Srpski izolati: 101-08, 570-11, 500-10, 58-12, 581-11, 230-10, 415-07, 79-13, 540-10, 473-12, 650-07, 201-11, 270-09, 723-10 i 1-12.

5.5.4. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 2b gena

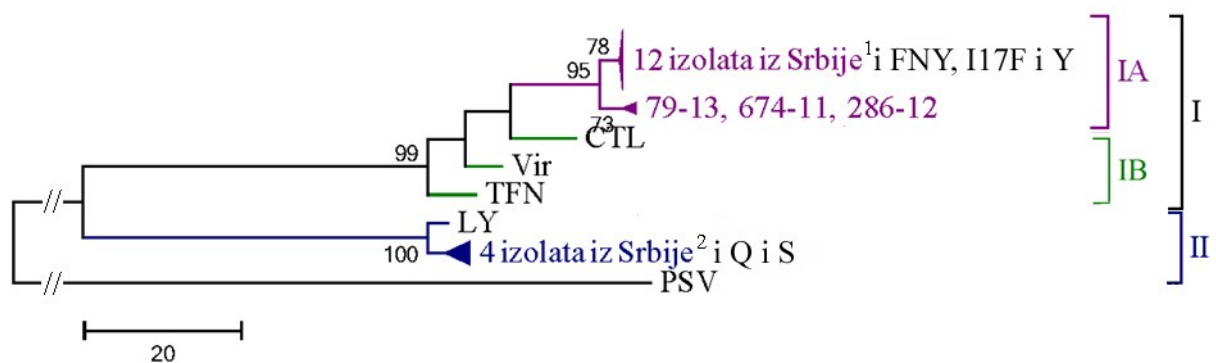
Sekvence kompletnog 2b gena 19 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci 2b gena izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV su zatim uparene sa sekvencom 2b gena virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3) nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom, implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo dobijeno od 56 generisanih stabala (Slika 39), rekonstruisano na osnovu kompletnih sekvenci 2b gena dužine 343 nt, pokazalo je jasno razdvajanje odabranih izolata CMV u dve glavne molekularne podgrupe, I i II. Ovakva podela podržana je visokim „bootstrap“ vrednostima koja je za svaku od njih iznosila 100%. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci u stablu bio je $0,257 \pm 0,032$, dok su unutargrupni diverziteti iznosili $0,083 \pm 0,011$ za podgrupu I i $0,019 \pm 0,004$ za podgrupu II. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci 2b gena pokazuje da se odabrani izolati poreklom iz Srbije grupišu u dve odvojene podgrupe CMV. U okviru podgrupe I svrstalo se 15 izolata (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 79-13 i 58-12), dok se četiri izolata (101-08, 581-11, 1-12 i 267-13) grupisalo u okviru podgrupe II CMV.

Podgrupa I se dalje deli u dve podgrupe IA i IB čiji unutargrupni diverziteti iznose $0,032 \pm 0,005$, odnosno $0,086 \pm 0,012$. „*Bootstrap*“ vrednost za podgrupu IA iznosila je 100% i u nju su se svrstali svi izolati iz Srbije koji se nalaze u okviru podgrupe I, kao i većina izolata iz raznih delova sveta. U podgrupi IB se nalaze izolati koji najčešće vode poreklo iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Indonezija i Filipini), ali i izolati iz Italije (Y16925 i HE962479) i jedan izolat iz Španije (AM183115). Međugrupni diverzitet između podgrupa IA i IB bio je $0,126 \pm 0,019$.



Slika 39. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog 2b gena dužine 343 nt na osnovu sekvenci 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „*bootstrap*“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „*bootstrap*“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „*outgroup*“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu kompletnog 2b gena obuhvatilo je 19 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 40 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa.



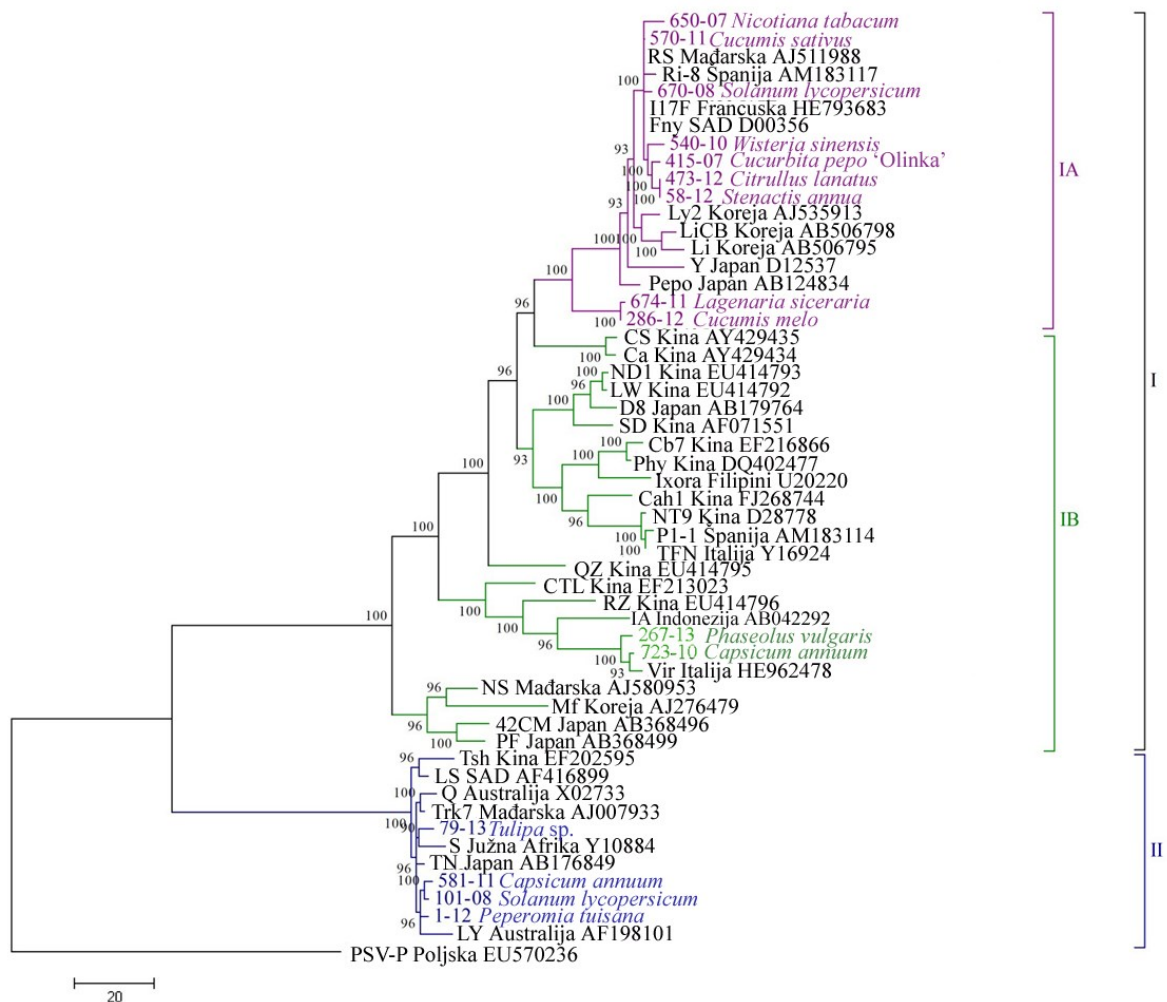
Slika 40. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog 2b gena dužine 343 nt na osnovu sekvenci 28 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom. Legenda: ¹ Srpski izolati: 270-09, 473-12, 58-12, 230-10, 201-11, 650-07, 570-11, 540-10, 500-10, 230-10, 670-08 i 415-07; ² Srpski izolati: 581-11, 101-08, 267-13 i 1-12.

5.5.5. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci 1a gena

Sekvence parcijalnog 1a gena 15 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci 1a gena izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV su zatim uparene sa sekvencom 1a gena virusa kržljivosti kikirikija (*Peanut stunt virus*, PSV) (Tabela 3) i skraćene na dužinu najkraće sekvence. Tako su, sekvence 1a gena CMV izolata skraćene na 735 nt, prema dužini sekvence izolata 58-12, odnosno 650-07, nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo prikazano na slici 41, dobijeno od 28 generisanih stabala, pokazalo je jasno izdvajanje dve glavne molekularne

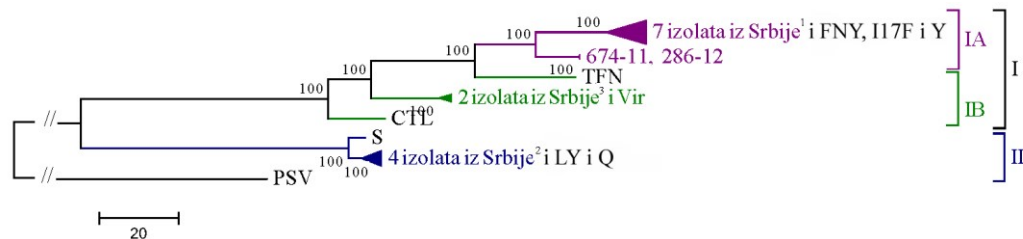
podgrupe, I i II. „*Bootstrap*“ podrška za ovo grupisanje bila je visoka za obe podgrupe i iznosila je 100%. Ukupni diverzitet u stablu bio je $0,134\pm 0,011$, dok je genetički diverzitet između podgrupa iznosio $0,263\pm 0,024$. Unutargrupni diverziteti iznosili su $0,072\pm 0,007$ za podgrupu I, odnosno $0,014\pm 0,002$ za podgrupu II. U okviru podgrupe I svrstalo se 11 izolata poreklom iz Srbije (415-07, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 267-13, 540-10 i 58-12), dok se četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12, i 79-13) grupisalo u okviru podgrupe II CMV.

Podgrupa I se dalje deli u dve podgrupe, podgrupu IA i podgrupu IB. Unutargrupni diverzitet IA podgrupe iznosi $0,021\pm 0,003$ i u okviru ove podgrupe svrstano je devet izolata poreklom iz Srbije (415-07, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 670-08, 650-07, 540-10 i 58-12). Ova podgrupa ima i visoku „*bootstrap*“ vrednost koja iznosi 100%. U okviru IB podgrupe svrstala su se dva izolata (723-10 i 267-13) poreklom iz Srbije. Unutargrupni diverzitet ove podgrupe u kojoj se nalaze izolati koji najčešće vode poreklo iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Indonezija i Filipini), ali i manji broj izolata iz drugih delova sveta poput Španije i Italije, kao i Mađarske i Srbije iznosi $0,082\pm 0,007$. Međugrupni diverzitet između podgrupa IA i IB bio je $0,083\pm 0,008$.



Slika 41. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog 1a gena dužine 735 nt na osnovu sekvenci 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, izolati koji pripadaju IB podgrupi zelenom i izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog parcijalnog dela 1a gena obuhvatilo je 15 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 42 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa.

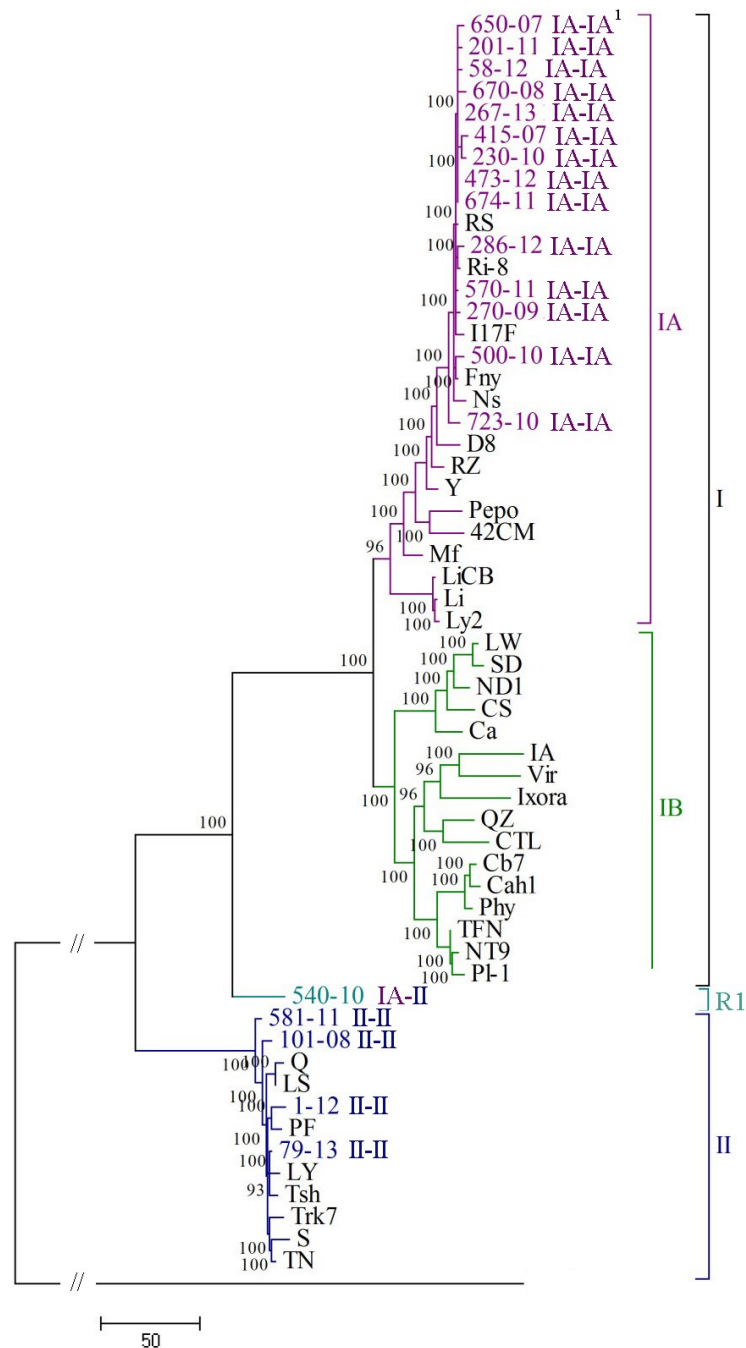


Slika 42. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog 1a gena dužine 735 nt na osnovu sekvenci 24 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, izolati koji pripadaju IB podgrupi zelenom i izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom.

Legenda: ¹ Srpski izolati: 650-07, 670-08, 415-07, 473-12, 58-12, 570-11 i 540-10; ² Srpski izolati: 79-13, 1-12, 581-11, 101-08; ³ Srpski izolati: 723-10 i 267-13.

5.5.6. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci RNK 3 segmenta

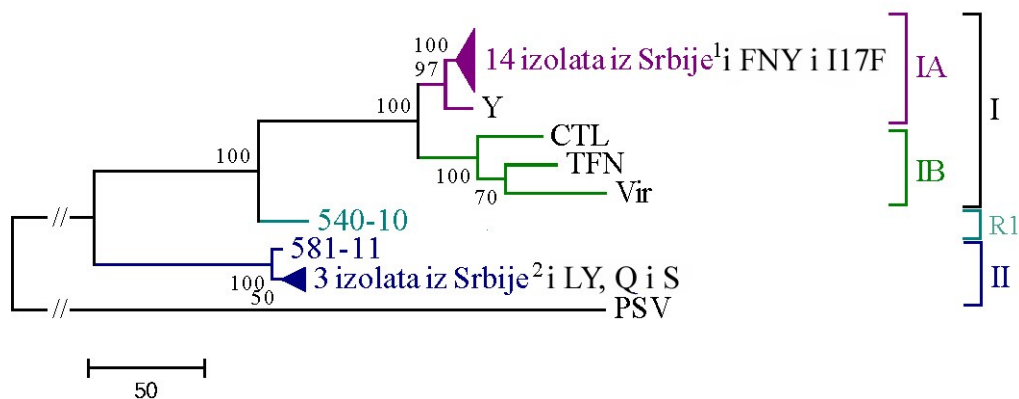
Sekvence RNK 3 segmenta 19 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci RNK 3 segmenta izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Sekvence za RNK 3 segment od 1061 nt dobijene su prostim spajanjem sekvenci MP i CP gena CMV i PSV koje su prethodno skraćivane na dužinu koja je odgovarala najkraćoj sekvenci za svaki gen posebno, nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom. Konsenzus stablo prikazano na slici 43, dobijeno je od 32 generisana stabla. Ukupni diverzitet u stablu bio je $0,137 \pm 0,010$. U stablu su se izdvojile dve velike molekularne podgrupe (I i II) i jedna podgrupa, označena kao podgrupa R1 (rekombinantna podgrupa), predstavljena samo jednim izolatom (540-10) koji se na osnovu MP gena grupisao u podgrupu IA (Slika 35), a na osnovu CP gena u II podgrupu CMV (Slika 33). U podgrupu I svrstalo se 14 izolata poreklom iz Srbije (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 267-13 i 58-12), a u podgrupu II svrstalo se četiri srpska izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 79-13). Ovakvo grupisanje podržano je visokim „bootstrap“ vrednostima od 100% kako za obe velike podgrupe, tako i za izdvajanje izolata 540-10 u podgrupu R1. Genetički diverzitet između podgrupa I i II iznosio je od $0,301 \pm 0,025$, a unutargrupni $0,054 \pm 0,005$ za podgrupu I i $0,013 \pm 0,002$ za podgrupu II. Genetični diverzitet između izolata 540-10 sa podgrupama I i II iznosio je $0,147 \pm 0,014$, odnosno $0,138 \pm 0,014$.



Slika 43. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RNK 3 segmenta (koji je nastao spajanjem parcijalnih MP i CP gena) od 1061 nt na osnovu 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom i izolat koji pripada R1 podgrupi tirkiznom bojom. Legenda: ¹ Pripadnost srpskih izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence MP/pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence CP gena.

Podgrupa I se dalje deli u dve podgrupe (IA i IB). Unutargrupni diverzitet IA podgrupe iznosi $0,024 \pm 0,003$ i u okviru ove podgrupe svrstano je 14 izolata poreklom iz Srbije. Ova podgrupa ima i visoku „*bootstrap*“ vrednost koja iznosi 96%. Unutargrupni diverzitet podgrupe IB iznosi $0,062 \pm 0,005$, a međugrupno variranje između podgrupa IA i IB iznosi $0,078 \pm 0,008$.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „*bootstrap*“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog RNK 3 segmenta obuhvatilo je 19 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 44 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa. Izolat (540-10) za koji je prethodno filogenetskim analizama utvrđeno da po MP genu pripada podgrupi IA, a po CP genu podgrupi II, izdvojio se u posebnu podgrupu označenu R1 (rekombinantni izolat).

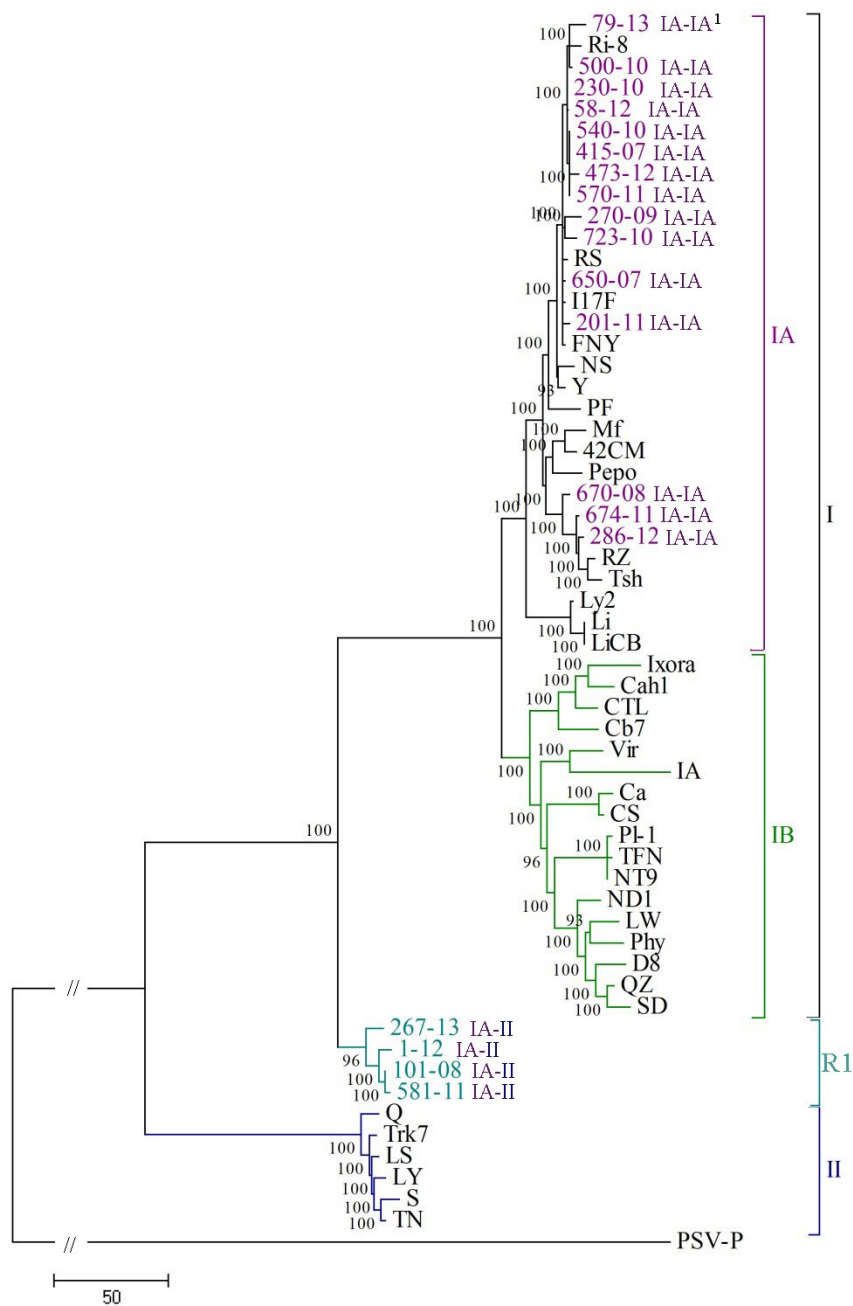


Slika 44. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RNK 3 segmenta (koji je nastao spajanjem parcijalnih MP i CP gena) od 1061 nt na osnovu 28 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „*bootstrap*“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „*bootstrap*“ vrednosti ($>50\%$) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „*outgroup*“. Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, izolati koji pripadaju II podgrupi plavom bojom i izolat koji pripada R1 podgrupi tirkiznom bojom. Legenda: ¹ Srpski izolati: 267-13, 674-11, 201-11, 58-12, 670-08, 473-12, 650-07, 415-07, 230-10, 570-11, 270-09, 286-12, 500-10 i 723-10; ² Srpski izolati: 1-12, 101-08 i 79-13.

5.5.7. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu sekvenci RNK 2 segmenta

Sekvence RNK 2 segmenta 19 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci RNK 2 segmenta izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane su za filogenetsku analizu. Sekvence za RNK 2 segment od 907 nt dobijene su prostim spajanjem sekvenci parcijalnog 2a i kompletnog 2b gena CMV i PSV koje su prethodno skraćivane na dužinu koja je odgovarala najkraćoj sekvenci za svaki gen posebno. Nakon toga je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom. Na slici 45 prikazano je konsenzus stablo dobijeno od 29 generisanih stabala. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci u stablu bio je $0,175 \pm 0,011$. U stablu se izdvajaju dve velike molekularne podgrupe (I i II) i jedna podgrupa predstavljena sa četiri izolata poreklom iz Srbije (581-11, 101-08, 1-12 i 267-13), označena kao podgrupa R1 (rekombinantna podgrupa). Izolati iz podgrupe R1 se na osnovu 2a gena grupišu u podgrupu IA (Slika 37), a na osnovu 2b gena u II podgrupu CMV (Slika 39). U podgrupi I, čiji unutargrupni diverzitet iznosi $0,068 \pm 0,006$, svrstalo se 15 izolata poreklom iz Srbije (415-07, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 79-13 i 58-12), dok je unutargrupni diverzitet podgrupe II iznosio $0,020 \pm 0,003$. Unutargrupni diverzitet podgrupe R1 iznosio je $0,016 \pm 0,003$. Međugrupno variranje između podgrupa I i II u stablu bilo je $0,579 \pm 0,045$, dok je između podgrupe I i R1 iznosilo $0,265 \pm 0,019$, odnosno između II i R1 $0,226 \pm 0,020$. Ovakva podela podržana je visokom „bootstrap“ podrškom (I-100%, II-100%, R1-96%).

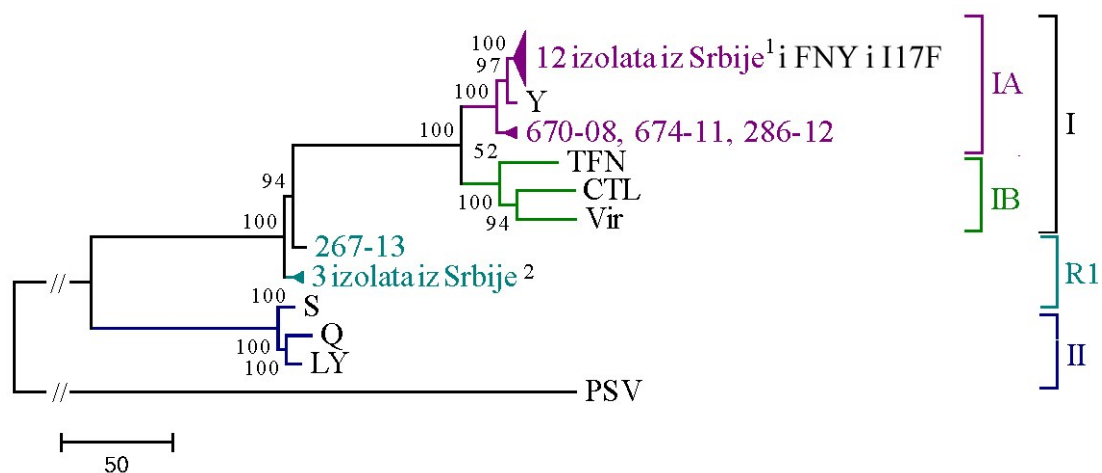
Podgrupa I se deli u dve podgrupe (IA i IB). U podgrupi IA, čiji unutargrupni diverzitet iznosi $0,030 \pm 0,003$, nalazi se 15 izolata iz Srbije, dok unutargrupni diverzitet podgrupe IB iznosi $0,078 \pm 0,007$. Ni jedan izolat poreklom iz Srbije nije se svrstao u podgrupu IB. Međugrupno variranje između podgrupa IA i IB bilo je $0,099 \pm 0,009$.



Slika 45. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RNK 2 segmenta (koji je nastao spajanjem parcijalnih 2a i kompletnog 2b gena) od 907 nt na osnovu 57 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju R1 podgrupi tirkiznom bojom.

Legenda: ¹ Pripadnost srpskih izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence 2a/pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence 2b gena.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu istog RNK 2 segmenta obuhvatilo je 19 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Na filogenetskom stablu prikazanom na slici 46 lakše se uočava grupisanje izolata poreklom iz Srbije koji su se grupisali u iste podgrupe CMV kao i u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu većeg broja sekvenci ovog virusa. Izolati (581-11, 101-08, 1-12 i 267-13) za koje je prethodno filogenetskim analizama utvrđeno da po 2a genu pripadaju podgrupi IA, a po 2b genu podgrupi II, izdvojili su se u posebnu podgrupu označenu R1 (rekombinantni izolati).



Slika 46. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RNK 2 segmenta (koji je nastao spajanjem parcijalnih 2a i kompletnog 2b gena) od 907 nt na osnovu 28 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju R1 podgrupi tirkiznom bojom.

Legenda: ¹ Srpski izolati: 500-10, 79-13, 230-10, 58-12, 570-11, 415-07, 540-10, 473-12, 650-07, 201-11, 270-09 i 723-10; ² Srpski izolati: 1-12, 101-08 i 581-11.

5.5.8. Filogenetska analiza izolata CMV na osnovu kombinacije sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta

Maximum parsimony metoda implementirana u okviru MEGA softvera verzija 5.0 korišćena je za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu kombinacije sekvenci svih pet genskih regiona. Kombinacije sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta dužine 2703 nt

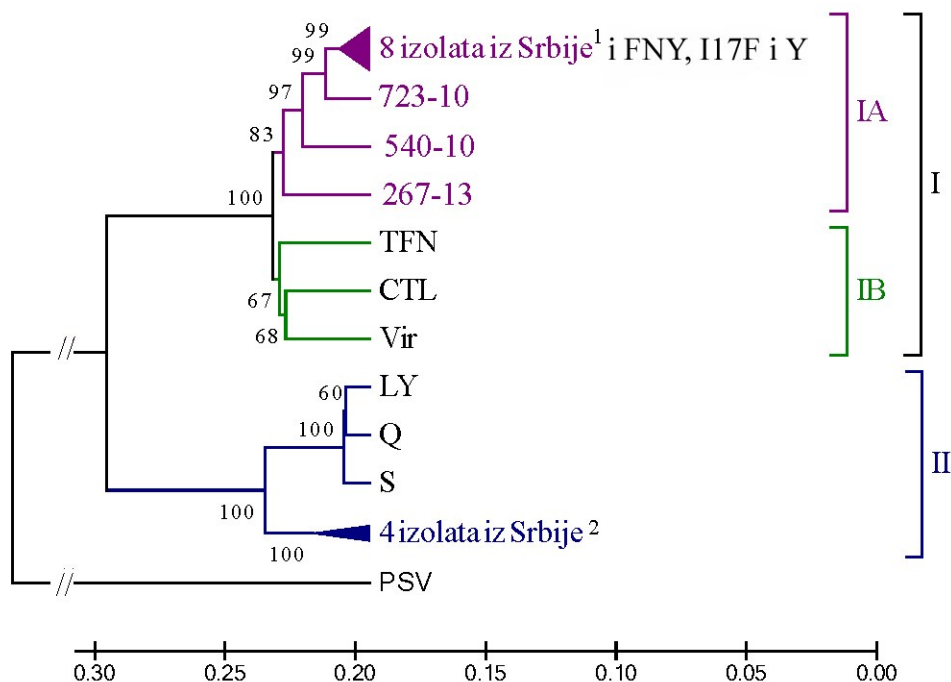
15 izolata CMV poreklom iz Srbije i 38 sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabele 3 i 6) odabrane za filogenetsku analizu dobijene su prostim spajanjem sekvenci parcijalnih 1a i 2a gena, kompletnog 2b gena i parcijalnih MP i CP gena CMV i PSV. Konsenzus stablo prikazano na slici 47 čiji ukupni diverzitet iznosi $0,149 \pm 0,008$, dobijeno je od 5 generisanih stabala. U stablu je došlo do jasnog izdvajanja molekularnih podgrupa ovog virusa (IA, IB i II), ali su se pored izdvojile i podgrupe R1 i R2. U podgrupi R1 svrstalo se sedam izolata od kojih su pet poreklom iz Srbije (101-08, 540-10, 581-11, 1-12 i 79-13), jedan iz Japana (PF) i jedan iz Kine (Tsh). Izolati 101-08, 581-11 i 1-12 odnosno 79-13 i Tsh se na osnovu RNK 1 i 3 segmenta grupišu u podgrupi II (Slike 41 i 43), a na osnovu RNK 2 segmenta u R1 podgrupi odnosno u IA podgrupi CMV (Slika 45). Izolat 540-10 se na osnovu RNK 1 i 2 segmenta grupiše u podgrupi IA (Slike 41 i 45), a na osnovu RNK 3 segmenta u R1 podgrupi CMV (Slika 43), dok se izolat PF na osnovu RNK 1 segmenta grupiše u podgrupi IB (Slika 41), na osnovu RNK 2 segmenta u podgrupi IA (Slika 45) i na osnovu RNK 3 segmenta u podgrupi II CMV (Slika 43). Genetički diverzitet između podgrupa I i II iznosio je od $0,365 \pm 0,023$, a unutargrupni $0,067 \pm 0,004$ za podgrupi I i $0,014 \pm 0,001$ za podgrupi II. Genetični diverzitet između podgrupe R1 sa podgrupama I i II je iznosio $0,205 \pm 0,014$, odnosno $0,139 \pm 0,008$, dok je unutargrupni diverzitet podgrupe R1 iznosio $0,062 \pm 0,004$.

Najveći broj izolata iz Srbije grupisao se u okviru podgrupe I (415-07, 570-11, 473-12, 286-12, 674-11, 723-10, 670-08, 650-07, 267-13 i 58-12). Rekonstrukcijom filogenetskog stabla u okviru podgrupe I izdvojile su ranije opisane podgrupe IA i IB, kao i pri analizi pojedinačnih genskih regiona. Najveći značaj ove analize je izdvajanje dodatne podgrupe označene kao R2 u koju se svrstalo sedam izolata od kojih su po dva poreklom iz Srbije (723-10 i 267-13) i Japana (42CM i D8) i po jedan poreklom iz Kine (RZ), Koreje (Mf) i Mađarske (NS). Izolati 723-10, 42CM, RZ, Mf i NS se na osnovu RNK 1 segmenta grupišu u podgrupi IB (Slika 41), dok se na osnovu RNK 2 i 3 segmenta grupišu u IA podgrupi CMV (Slike 43 i 45). Izolat D8 se na osnovu RNK 1 i 2 segmenta grupiše u podgrupi IB (Slike 41 i 45), a na osnovu RNK 3 segmenta u IA podgrupi CMV (Slika 43), dok se izolat 267-13 na osnovu RNK 1 segmenta grupiše u podgrupi IB (Slika 41), na osnovu RNK 2 segmenta u podgrupi R1 (Slika 45) i na osnovu RNK3 segmenta u podgrupi IA CMV (Slika 43). Unutargrupni diverzitet

Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju R1 i R2 podgrupi tirkiznom bojom.

Legenda: ¹ Pripadnost srpskih izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence 1a gena; pripadnost srpskih izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence 2a/2b gena; pripadnost srpskih izolata određenoj podgrupi CMV na osnovu sekvence MP/CP gena.

Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano UPGMA metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0 sa „bootstrap“ analizom u 1000 ponavljanja na osnovu iste kombinacije sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta obuhvatilo je 15 izolata CMV iz Srbije i po tri referentna izolata za svaku podgrupu ovog virusa (FNY, I17F i Y-referentni izolati za IA podgrupu, Vir, TFN i CTL-referentni izolati za IB podgrupu i LY, Q i S-referentni izolati za II podgrupu). Rekonstruisano filogenetsko stablo na slici 48 prikazuje da su se izolati grupisali u okviru dve glavne molekularne podgrupe CMV (I i II podgrupa), pri čemu su se rekombinantni izolati, 723-10, 267-13 i 540-10 grupisali u okviru podgrupe I, a izolati 581-11, 101-08, 1-12 i 79-13 u okviru podgrupe II. Međutim, u stablu se uočava da su se rekombinantni i pseudorekombinantni izolati 723-10, 267-13 i 540-10 delimično izdvojili u odnosu na izolate iz IA, odnosno izolati 581-11, 101-08, 1-12 i 79-13 iz II podgrupe.



Slika 48. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu kombinaciji nukleotidnih sekvenci sekvenci RNK 1, 2 i 3 segmenta dužine 2703 nt na osnovu 24 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0 softvera i UPGMA metode sa bootstrap

analizom u 1000 ponavljanja gde su „bootstrap“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije koji pripadaju IA podgrupi su obojeni ljubičastom, a izolati koji pripadaju R1 i R2 podgrupi tirkiznom bojom.

Legenda: ¹ Srpski izolati: 473-12, 58-12, 415-07, 570-11, 650-07, 670-08, 286-12 i 674-11; ² Srpski izolati: 79-13, 1-12, 101-08 i 581-11.

U tabeli 12 prikazano je grupisanje izolata CMV poreklom iz Srbije u filogenetske podgrupe na osnovu sekvenci različitih genskih regiona.

Tabela 12. Svrstavanje izolata *Cucumber mosaic virus* iz Srbije u filogenetske podgrupe na osnovu sekvenci različitih genskih regiona

Izolat	Biljka domaćin	Godina izolacije	Lokalitet	Gen				
				1a	2a	2b	MP	CP
415-07 ²	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	2007	Irmovo	IA	IA	IA	IA	IA
270-09 ¹	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	2009	Ruma	/	IA	IA	IA	IA
230-10 ¹	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	2010	Hetin	/	IA	IA	IA	IA
201-11 ¹	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	2011	Mačkovac	/	IA	IA	IA	IA
500-10 ¹	<i>Cucurbita pepo</i>	2010	Porodin	/	IA	IA	IA	IA
570-11 ²	<i>Cucumis sativus</i>	2011	Debrc	IA	IA	IA	IA	IA
473-12 ²	<i>Citrullus lanatus</i>	2012	Gornji Tavankut	IA	IA	IA	IA	IA
286-12 ²	<i>Cucumis melo</i>		Porodin	IA	IA	IA	IA	IA
674-11 ²	<i>Lagenaria siceraria</i>	2011		IA	IA	IA	IA	IA
723-10 ^{2,3}	<i>Capsicum annuum</i>	2010	Smederevo	IB	IA	IA	IA	IA
581-11 ^{2,4}		2011	Cekavica	II	IA	II	II	II
101-08 ^{2,4}	<i>Solanum</i>	2008	Družetić	II	IA	II	II	II
670-08 ²	<i>lycopersicum</i>		Stajkovce	IA	IA	IA	IA	IA
650-07 ²	<i>Nicotiana tabacum</i>	2007	Bački Petrovac	IA	IA	IA	IA	IA
267-13 ^{2,5}	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2013	Vladičin Han	IB	IA	II	IA	IA
1-12 ^{2,4}	<i>Peperomia tuisana</i>	2012	Beograd	II	IA	II	II	II
540-10 ^{2,4}	<i>Wisteria sinensis</i>	2010	Porodin	IA	IA	IA	IA	II
79-13 ^{2,3}	<i>Tulipa sp.</i>	2013	Krnjača	II	IA	IA	II	II
58-12 ²	<i>Stenactis annua</i>	2012	Beograd	IA	IA	IA	IA	IA

Legenda: ¹ - Izolati CMV analizirani tokom ovih istraživanja na osnovu sekvenci 4 genska regiona; ² - Izolati CMV analizirani tokom ovih istraživanja na osnovu sekvenci 5 genskih regiona; ³ - Pseudorekombinantni izolati CMV na osnovu filogenetskih analiza; ⁴ - Rekombinantni izolati CMV na osnovu filogenetskih analiza; ⁵ - Pseudorekombinantni i rekombinantni izolati CMV na osnovu filogenetskih analiza.

5.6. RFLP analiza

Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) primenjena je radi potvrde rezultata dobijenih filogenetskim analizama koje su ukazale na postojanje rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u okviru prirodne populacije CMV u Srbiji i provere da izmene genetičkog materijala kod odabranih izolata CMV nisu nastale kao posledica mešanih infekcija između izolata koji pripadaju različitim podgrupama ovog virusa. RFLP analiza primenjena je i u cilju razvijanja jednostavnih, brzih i pouzdanih protokola za identifikaciju i karakterizaciju izolata CMV koji će služiti kao alternativa sekvenciranju.

5.6.1. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“

U cilju razvoja pouzdanih protokola za karakterizaciju izolata CMV najpre je obavljena RFLP analiza „*in silico*“ na osnovu koje su odabrani restrikcioni enzimi koji katalizuju endonukleolitičko „sečenje“ DNK u okviru sekvence koje specifično prepoznaju. Restrikcioni enzimi odabrani su tako da njihovo restrikciono mesto na umnoženim DNK fragmentima predstavlja varijabilnu poziciju pri čemu se nakon digestije dobija različit broj restrikcionih fragmenta različitih veličina koji predstavljaju restrikcioni profil ili RFLP obrazac („*RFLP pattern*“), a koji omogućava razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV za svaki od ispitivanih gena. Veličina PCR dobijenog fragmenta nakon digestije odgovarajućim restrikcionim enzimom određivana je na osnovu markera, a dobijeni profili upoređivani su sa RFLP profilima referentnih izolata.

Radi potvrde rezultata virtuelne („*in silico*“) RFLP analize dobijenih korišćenjem pDRAW32 programa sprovedena je i RFLP analiza „*in situ*“ korišćenjem odabranih restrikcionih enzima. Poređenjem amplifikovanih restrikcionih profila testiranih izolata dobijenih nakon digestije PCR produkata odgovarajućim enzimima i pozitivne kontrole za IB podgrupu (izolat TFN iz Italije) sa markerom, određena je veličina dobijenih fragmenata.

5.6.1.1. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“ na osnovu CP gena

Za razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV na osnovu fragmenta veličine 871 bp, koji obuhvata ceo CP gen kao i delove 5' i 3'NTR, odabrani su restrikcioni enzimi *BssSI*, *SfcI* i *HaeIII*. Kombinacijom restrikcionih profila koji daju restrikcioni

enzimi *BssSI* i *SfcI* ili *SfcI* i *HaeIII* (Slika 49 A) moguće je izvršiti razlikovanje izolata koji pripadaju različitim podgrupama CMV. Enzim *BssSI* kao restrikciono mesto prepoznaje CACGAG redosled nukleotida, pri čemu lanac koji je orijentisan u 5'-3' smeru seče između C i A nukleotida što je označeno kao C|ACGAG restrikciono mesto, a komplementaran lanac odnosno lanac orijentisan u 3'-5' smeru seče između T i C nukleotida (GTGCT|C). Restrikcioni enzim *SfcI* seče nukleotidni lanac na mestu sa sekvencom C|TRYAG, odnosno GAYRT|C na komplementarnom lancu, dok enzim *HaeIII* seče mesto sa sekvencom 5'-GG|CC-3', odnosno 3'-CC|GG-5'. Kod enzima *BssSI* uočavaju se dva restrikciona profila, jedan koji odgovara izolatima podgrupe I i drugi koji odgovara izolatima podgrupe II. Kod svih izolata podgrupe I prisutno je jedno mesto sečenja tako da se dobijaju dva fragmenta koja se neznatno razlikuju u veličini kod izolata IA i IB podgrupe. Izolatima IA podgrupe odgovaraju fragmenti veličine 649 i 222 bp, dok je veličina fragmenata koja odgovara izolatima IB podgrupe 648 i 223 bp. Kod izolata podgrupe II nema restrikcionog mesta, te jedini vidljivi fragment odgovara fragmentu početne veličine (Tabela 13). Restrikcioni enzim *SfcI* vrši razlikovanje izolata iz podgrupe IA od izolata iz podgrupa IB i II CMV, zato što sekvence izolata IA podgrupe seče na jednom mestu pri čemu se dobijaju dva fragmenta veličine 589 i 282 bp, dok sekvence izolata IB i II podgrupe ne seče zbog čega se javlja samo jedan fragment početne veličine (871 bp). Kao i *BssSI* i enzim *HaeIII* omogućava razlikovanje izolata I i II podgrupe CMV. Kod svih izolata podgrupe I ne dolazi do sečenja nukleotidnog lanca, tako da se dobija jedan fragment početne veličine, dok se kod izolata podgrupe II dobijaju dva fragmenta veličine 563 i 308 bp, što znači da enzim *HaeIII* seče nukleotidni lanac na jednom mestu.

Tabela 13. Pregled odabranih restrikcionih enzima i profili koji se dobijaju nakon digestije PCR produkata izolata *Cucumber mosaic virus* iz različitih podgrupa u okviru različitih RNK

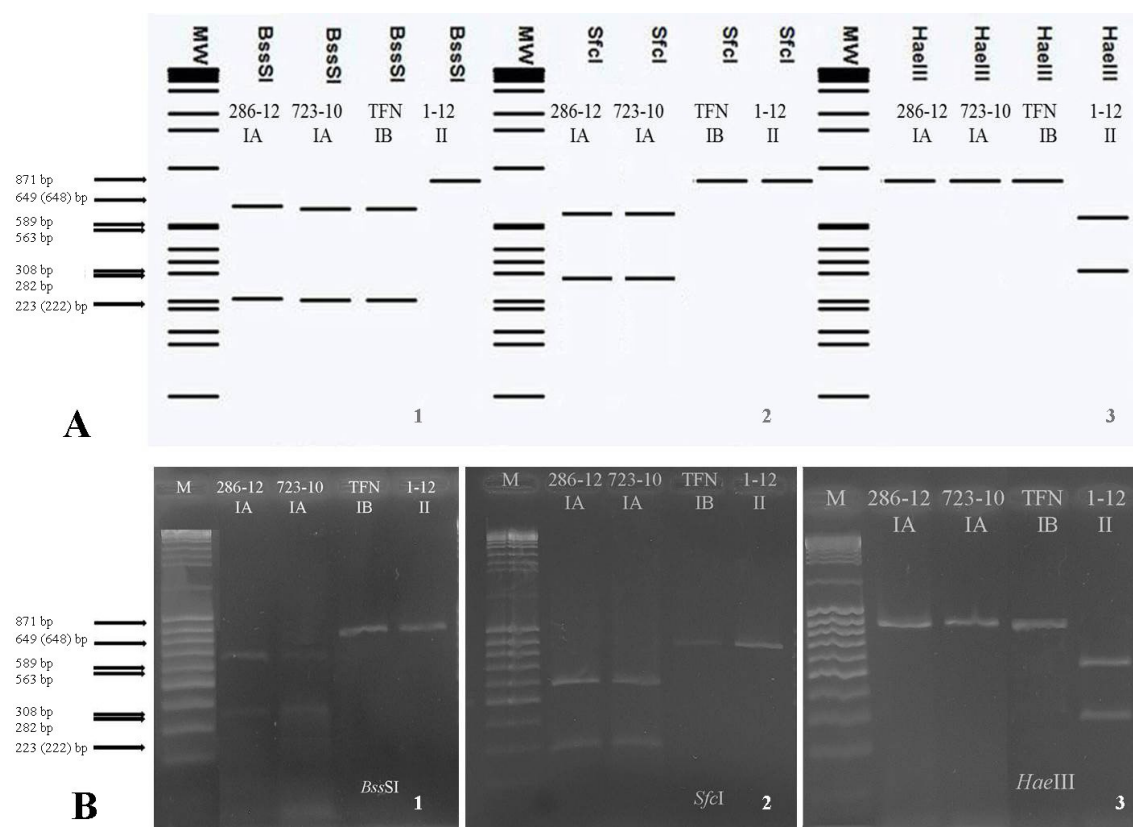
Ciljna RNK (gen)	Korišćeni prajmeri ¹ u „in situ“ RFLP	Restriktion i enzim	Veličine PCR produkta nakon digestije (bp)		
			Podgrupa IA (Fny ²)	Podgrupa IB (TFN)	Podgrupa II (S)
RNK 1 (1a)	RNA1a-fwd/	<i>HindIII</i>	720, 478	1198	1195
	RNA1a-rev	<i>SacII</i>	863, 337	863,337	1195
RNK 2 (2a)	RV11/RW8	<i>MluI</i>	639	470, 161	312,149, 147
		<i>StuI</i>	503, 301	805	780
RNK 2 (2b)	2bfwd/2brev	<i>SalI</i>	804	805	500, 280
		<i>BaeI</i>	563, 165	728	387, 341
RNK 3 (MP)	CMV MP3/	<i>PflMI</i>	728	728	472, 256
	CMV3a-rev	<i>BssSI</i>	649, 222	648, 223	871
RNK 3 (CP)	CMVCPfwd/	<i>HaeIII</i>	871	871	563, 308
	CMVCPrev	<i>SfcI</i>	589, 282	871	871

¹Sekvence prajmera se nalaze u tabeli 2;

²Dobijeni fragmenti nakon digestije PCR produkata odnose se na referentne izolate: Fny-za IA podgrupu, TFN-za IB podgrupu i S-za II podgrupu CMV.

RFLP analizom „in situ“ digestija PCR produkta, dobijenog korišćenjem prajmera CMVCPfwd/CMVCPrev, koji omogućavaju amplifikuju celog CP gena kao i delova 5' i 3' NTR, izvršena je restrikcionim enzimima *BssSI*, *SfcI* i *HaeIII* u pet nezavisnih ponavljanja. Kod 35 izolata (449-12, 473-12, 286-12, 201-11, 163-08, 674-11, 717-11, 720-11, 280-12, 415-07, 115-08, 151-08, 171-08, 270-09, 500-10, 570-11, 514-11, 610-11, 283-12, 477-07, 598-07, 542-08, 471-09, 723-10, 746-07, 670-08, 207-09, 647-10, 533-2-11, AR1-12, 58-12, 650-07, 702-07, 202-08 i 267-13), nakon digestije PCR produkata restrikcionim enzimima *BssSI* i *HaeIII* dobijeni su restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe I, dok je digestija enzimom *SfcI* ukazala da svi ovi izolati poseduju restrikcioni profil koji odgovara izolatima podgrupe IA. Veličina fragmenata restrikcionog profila nakon digestije PCR produkta izolata 230-10 dobijenog korišćenjem prajmera CMVF/CMVR1, koji omogućavaju amplifikaciju dela CP gena, neznatno se razlikovala u odnosu na prethodnih 35 izolata. Tako je restrikcionim enzimima *BssSI* i *HaeIII*, odnosno *SfcI* dobijen restrikcioni profil koji odgovara izolatima podgrupe I, odnosno IA. Kod osam izolata (101-08, 242-09, 540-10, 581-11, 581p-11, 1-12, 52-13 i 79-13), nakon digestije PCR produkata restrikcionim enzimima *BssSI*, *SfcI* i *HaeIII*, dobijeni su profili koji odgovaraju izolatima II podgrupe. Restrikcioni profili dobijeni nakon digestija restrikcionim enzimima *BssSI*, *SfcI* i *HaeIII*

bili su isti u svim ponavljanjima. Vizuelizacija dela restrikcioni profila ispitivanih izolata CMV, kao i pozitivne kontrole za IB podgrupu (izolat TFN iz Italije), restrikcionim enzimima *BssSI*, *SfcI* i *HaeIII* prikazana je na slici 49 B.



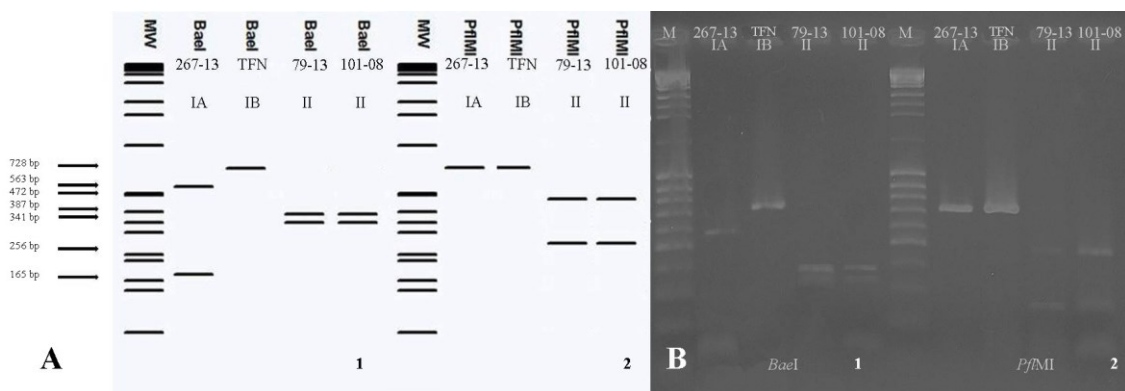
Slika 49. „*In silico*“ (A) i „*in situ*“ (B) restrikcioni profili izolata 286-12, 723-10, TFN i 1-12 CMV, amplifikovani specifičnim parom prajmera CMVCPwd/rev koji omogućavaju ceo CP gen kao i delove 5' i 3' NTR ukupne veličine od 871 bp, nakon digestije restrikcionim enzimima *BssSI* (1), *SfcI* (2) i *HaeIII* (3).

5.6.1.2. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“ na osnovu MP gena

Restrikcioni enzimi *BaeI* i *PfI*MI odabrani su za razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV na osnovu dela MP gena veličine 728 bp. Enzim *BaeI* seče nukleotidni lanac na mestu sa sekvencom $10(N)AC(N)_4GTAYC(N)_{12}$, odnosno $15(N)TG(N)_4CATRG(N)_7$ na komplementarnom lancu, dok enzim *PfI*MI seče mesto sa sekvencom 5'- CCANNNN|NTGG-3', odnosno 3'-GGTNNNNNACC-5'. Restrikcioni enzim *BaeI* omogućava razlikovanje izolata IA, IB i II podgrupe CMV tako što sekvence izolata IA podgrupe seče na jednom mestu pri čemu se dobijaju dva fragmenta veličine 563 i 165 bp, sekvence izolata IB podgrupe ne seče pri čemu se dobija jedan

fragment početne veličine (728 bp), a sekvence izolata II podgrupe seče takođe na jednom mestu, ali se pri ovom sečenju dobijaju dva fragmenta veličine 387 i 341 bp (Tabela 13). Kod restriktionog enzima *PflMI* uočavaju se dva restriktiona profila, jedan koji odgovara izolatima podgrupe I i drugi koji odgovara izolatima podgrupe II. Kod svih izolata podgrupe I ne postoji mesto sečenja te jedini vidljivi fragment odgovara fragmentu početne veličine (Tabela 13), dok je kod izolata podgrupe II prisutno jedno mesto sečenja tako da se dobijaju dva fragmenta veličine 472 i 256 bp. Enzim *PflMI* primenjen je radi potvrde grupisanja izolata CMV u I ili II podgrupu ovog virusa, jer se korišćenjem više od jednog restriktionog enzima izbegava pogrešna interpretacija rezultata. Na slici 50 A prikazani su generisani virtuelni profili, za deo ispitivanih izolata CMV, dobijeni digestijom restriktionih enzima *BaeI* i *PflMI* korišćenjem pDRAW32 programa.

RFLP analizom „*in situ*“ digestija PCR produkta, dobijenog korišćenjem prajmera CMVMP3/CMV3a-rev, koji omogućavaju amplifikaciju dela MP gena, izvršena je restriktionim enzimima *BaeI* i *PflMI* u pet nezavisnih ponavljanja. Kod 15 izolata (473-12, 286-12, 201-11, 674-11, 415-07, 270-09, 230-10, 500-10, 570-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 58-12 i 267-13), nakon digestije PCR produkata restriktionim enzimom *BaeI* dobijeni su restriktioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe IA, a digestija enzimom *PflMI* potvrdila je da svi ovi izolati poseduju restriktioni profil koji odgovara izolatima podgrupe I. Kod četiri izolata (1-12, 101-08, 581-11 i 79-13), nakon digestije PCR produkta restriktionim enzimima *BaeI* i *PflMI* dobijeni su profili koji odgovaraju izolatima II podgrupe. Restriktioni profili dobijeni nakon digestija restriktionim enzimima *BaeI* i *PflMI* bili su isti u svim ponavljanjima. Vizuelizacija dela restriktionih profila ispitivanih izolata CMV, kao i pozitivne kontrole za IB podgrupu (izolat TFN iz Italije), enzimima *BaeI* i *PflMI* prikazana je na slici 50 B.



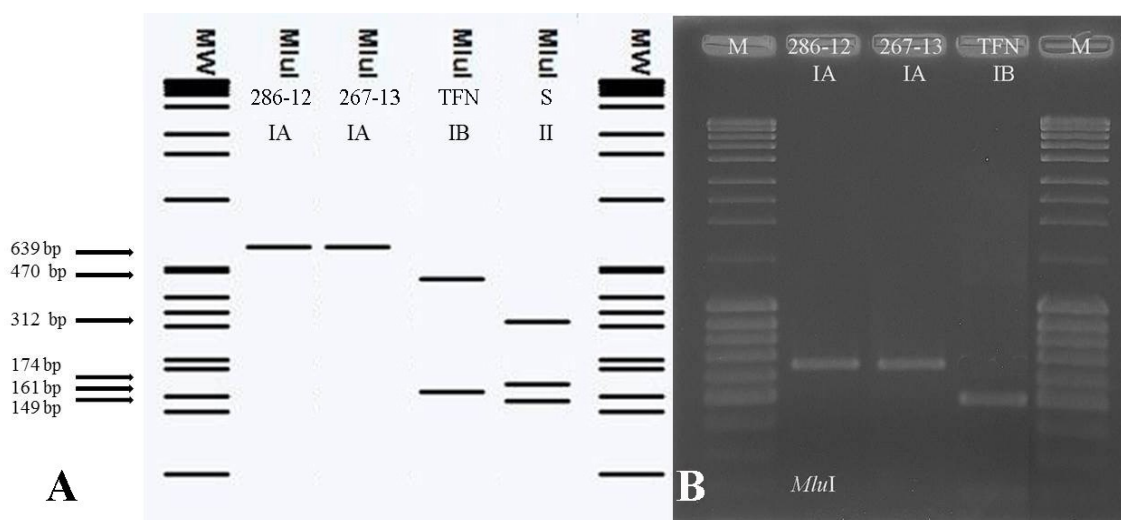
Slika 50. „*In silico*“ (A) i „*in situ*“ (B) restrikcioni profili izolata 267-13, TFN, 79-13 i 101-08 CMV, amplifikovani specifičnim parom prajmera CMVMP3/CMV3a-rev koji omogućavaju deo MP gena ukupne veličine od 728 bp, nakon digestije restrikcionim enzimima *BaeI* (1) i *PflMI* (2).

5.6.1.3. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“ na osnovu 2a gena

Razlikovanje izolata IA, IB i II podgrupe CMV na osnovu fragmenta od oko 650 bp, koji obuhvata 5' NTR i deo 2a gena izvršeno je *MluI* restrikcionim enzimom koji seče nukleotidni lanac na mestu sa sekvencom A|CGCGT, odnosno na komplementarnom lancu TGCGC|A. Nakon digestije restrikcionim enzimom *MluI* korišćenjem pDRAW32 programa dobijeni su različiti restrikcioni profili koji su omogućili razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV (Tabela 13). Sekvence izolata IA podgrupe restrikcioni enzim *MluI* ne seče pri čemu se dobija jedan fragment početne veličine (639 bp), sekvence izolata IB podgrupe seče na jednom mestu pri čemu se dobijaju dva fragmenta veličine 470 i 161 bp, dok sekvence izolata II podgrupe seče na dva mesta pri čemu se dobijaju tri fragmenta veličine 312, 149 i 147 bp. Na slici 51 A prikazani su generisani virtuelni profili za deo ispitivanih izolata i referentnih izolata (TFN i S) CMV, čime su potvrđeni rezultati dobijeni filogenetskim analizama.

RFLP analizom „*in situ*“ digestija PCR produkta, dobijenog korišćenjem prajmera RV11/RW8, koji omogućavaju amplifikaciju 5' NTR i deo 2a gena, izvršena je restrikcionim enzimom *MluI* u pet nezavisnih ponavljanja. Kod 19 izolata (473-12, 286-12, 201-11, 674-11, 415-07, 270-09, 230-10, 500-10, 570-11, 723-10, 581-11, 101-08, 670-08, 650-07, 540-10, 1-12, 58-12, 79-13 i 267-13), nakon digestije PCR produkata restrikcionim enzimom *MluI*, dobijeni su restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe IA. Restrikcioni profili dobijeni nakon digestija restrikcionim

enzimom *MluI* bili su isti u svim ponavljanjima. Vizuelizacija dela restrikcioni profila ispitivanih izolata, korišćenim enzima *MluI* za digestiju prikazana je na slici 51 B.



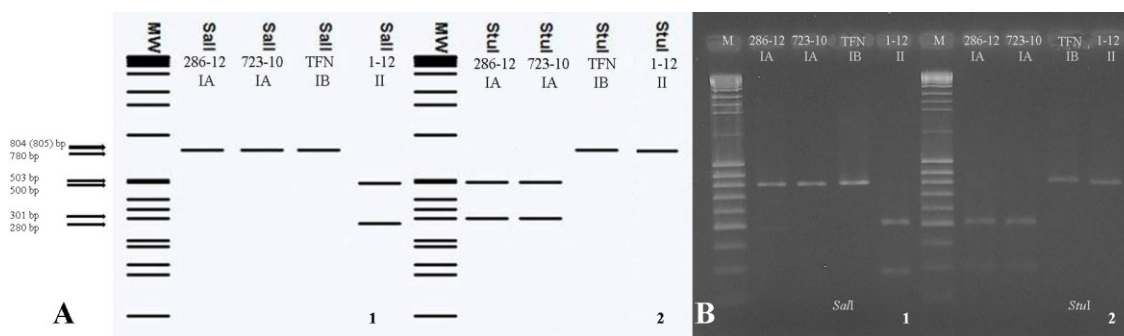
Slika 51. „*In silico*“ restrikcioni profili izolata (A) 286-12, 267-13, TFN i S i „*in situ*“ (B) restrikcioni profili izolata 286-12, 267-13 i TFN CMV, amplifikovani specifičnim parom prajmera RV11/RW8 koji omogućavaju delove 5' NTR i 2a gena ukupne veličine od oko 650 bp, nakon digestije restrikcioni enzimom *MluI*.

5.6.1.4. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“ na osnovu 2b gena

Za razlikovanje izolata podgrupa CMV na osnovu fragmenta veličine 804 bp, koji obuhvata ceo 2b gena, kao i deo 2a gena i 3' NTR odabrani su restrikcioni enzimi *SalI* i *StuI*. Kombinacijom restrikcioni profila koji daju restrikcioni enzimi *SalI* i *StuI* (Slika 52 A) dobijeni su jedinstveni restrikcioni profili na osnovu kojih je moguće izvršiti razlikovanje izolata koji pripadaju različitim podgrupama CMV. Restrikcioni enzim *SalI* seče nukleotidni lanac na mestu sa sekvencom G|TCGAC, odnosno CAGCT|G na komplementarnom lancu, dok enzim *StuI* seče mesto sa sekvencom 5'-AGG|CCT-3', odnosno 3'-TCC|GGA-5'. Nakon digestije PCR produkta enzimom *SalI* uočavaju se dva restrikciona profila, jedan koji odgovara izolatima podgrupe I i drugi koji odgovara izolatima podgrupe II. Kod svih izolata podgrupe I nema restrikcionog mesta, te jedini vidljivi fragment odgovara fragmentu početne veličine koji se neznatno razlikuju u veličini dobijenih fragmenta kod izolata IA i IB podgrupe koja iznosi 804 bp, odnosno 805 bp. Kod izolata podgrupe II prisutno je jedno mesto sečenja tako da se dobijaju dva fragmenta veličine 500 i 280 bp. Restrikcioni enzim *StuI* vrši razlikovanje izolata iz podgrupe IA od izolata iz podgrupa IB i II CMV, tako što sekvence izolata IA podgrupe seče na jednom mestu pri čemu se dobijaju dva fragmenta veličine 503 i 301

bp, dok sekvence izolata IB i II podgrupe ne seče zbog čega se javlja se samo jedan fragment koji odgovara veličini umnoženog PCR produkta (Tabela 13).

RFLP analizom „*in situ*“ digestija PCR produkta, dobijenog korišćenjem prajmera 2bfwd/2brev, koji omogućavaju amplifikaciju celog 2b gena, kao i dela 2a gena i 3' NTR, izvršena je restrikcionim enzimima *SalI* i *StuI* u pet nezavisnih ponavljanja. Kod 15 izolata (473-12, 286-12, 201-11, 674-11, 415-07, 270-09, 230-10, 500-10, 570-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 58-12 i 79-13), nakon digestije PCR produkata restrikcionim enzimom *SalI* dobijeni su restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe I, dok je digestija enzimom *StuI* ukazala da svi ovi izolati poseduju restrikcioni profil koji odgovara izolatima podgrupe IA. Kod četiri izolata (1-12, 101-08, 581-11 i 267-13), nakon digestije PCR produkta restrikcionim enzimom *StuI* dobijeni su restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe IB ili II, dok je restrikcionim enzimom *SalI* utvrđeno da dobijeni restrikcioni profili odgovaraju izolatima II podgrupe. Restrikcioni profili dobijeni nakon digestija restrikcionim enzimima *SalI* i *StuI* bili su isti u svim ponavljanjima. Vizuelizacija dela restrikcionih profila ispitivanih izolata enzimima *SalI* i *StuI*, kao i pozitivne kontrole za IB podgrupu (izolat TFN iz Italije), prikazana je na slici 52 B.



Slika 52. „*In silico*“ (A) i „*in situ*“ (B) restrikcioni profili izolata 286-12, 723-10, TFN i 1-12 CMV, amplifikovani specifičnim parom prajmera 2bfwd/2brev koji omogućavaju deo 2a gena, ceo 2b gen i deo 3' NTR ukupne veličine od 804 bp, nakon digestije restrikcionim enzimima *SalI* (1) i *StuI* (2).

5.6.1.5. RFLP analiza „*in silico*“ i „*in situ*“ na osnovu 1a gena

Za razlikovanje izolata podgrupa CMV na osnovu dela 1a gena veličine oko 1198 bp odabrani su restrikcioni enzimi *HindIII* i *SacII*. Kombinacijom restrikcionih profila koji daju restrikcioni enzimi *HindIII* i *SacII* (Slika 53 A) dobijeni su jedinstveni restrikcioni profili na osnovu kojih je moguće izvršiti razlikovanje izolata koji pripadaju

različitim podgrupama CMV. Restrikcioni enzim *HindIII* seče nukleotidni lanac na mestu sa sekvencom A|AGCTT, odnosno TTCGA|A na komplementarnom lancu, dok enzim *SacII* seče mesto sa sekvencom 5'-CCGC|GG-3', odnosno 3'-GG|CGCC-5' na komplementarnom lancu. Restrikcioni enzim *HindIII* vrši razlikovanje izolata iz podgrupe IA od izolata iz podgrupa IB i II, tako što sekvence izolata IA podgrupe seče na jednom mestu pri čemu se dobijaju dva fragmenta veličine 720 i 478 bp, dok izolate IB i II podgrupe ne seče zbog čega se javlja se samo jedan fragment koji odgovara veličini umnoženog PCR produkta (Tabela 13). Kod enzima *SacII* uočavaju se dva restrikciona profila, jedan koji odgovara izolatima podgrupe I i drugi koji odgovara izolatima podgrupe II. Kod svih izolata podgrupe I prisutno je jedno mesto sečenja tako da se dobijaju dva fragmenta veličine 863 i 337 bp, dok kod izolata iz II podgrupe nema restrikcionog mesta, te jedini vidljivi fragment odgovara fragmentu početne veličine (1195 bp).

RFLP analizom „*in situ*“ digestija PCR produkta, dobijenog korišćenjem prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-rev, koji omogućavaju amplifikaciju dela 1a gena, izvršena je restrikcijom enzimima *HindIII* i *SacII* u pet nezavisnih ponavljanja. Kod 11 izolata (473-12, 286-12, 674-11, 415-07, 570-11, 723-10, 670-08, 650-07, 540-10, 58-12 i 267-13), nakon digestije PCR produkata restrikcijom enzimom *SacII* dobijeni su restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe I, dok su kod četiri izolata (101-08, 581-11, 1-12 i 79-13), dobijeni restrikcioni profili koji odgovaraju izolatima podgrupe II. Digestija PCR produkata restrikcijom enzimom *HindIII* ukazala je da izolati 473-12, 286-12, 674-11, 415-07, 570-11, 670-08, 650-07, 540-10 i 58-12 poseduju restrikcioni profil koji odgovara izolatima podgrupe IA, dok izolati 723-10 i 267-13 poseduju restrikcioni profil koji odgovara izolatima podgrupe IB. Veličina fragmenata restrikcionog profila nakon digestije PCR produkta izolata 79-13 i 540-10 dobijenih korišćenjem prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-r odnosno RNA1a-fwd/CMV1a-reverse, koji omogućavaju amplifikaciju dela 1a gena, neznatno se razlikovala u odnosu na odgovarajuće restrikcione profile. Restrikcioni profili dobijeni nakon digestija restrikcijom enzimima *HindIII* i *SacII* bili su isti u svim ponavljanjima. Vizuelizacija dela restrikcionih profila ispitivanih izolata, kao i pozitivne kontrole za IB podgrupu (izolat TFN iz Italije), enzimima *HindIII* i *SacII* prikazana je na slici 53 B.



Slika 53. „*In silico*“ (A) i „*in situ*“ (B) restrikcioni profili izolata 286-12, 723-10, TFN i 1-12 CMV, amplifikovani specifičnim parom prajmera RNA1a-fwd/ RNA1a-rev koji omogućavaju deo 1a gena ukupne veličine od 1198 bp, nakon digestije restrikcionim enzimima *Hind*III (1) i *Sac*II (2).

5.7. RDP analiza

Pored filogenetskih analiza postojanje rekombinacija kod ispitivanih izolata CMV poreklom iz Srbije potvrđeno je i primenom RDP v4.26 softvera. Analizom segmenata RNK 2 i 3 dobijenih spajanjem sekvenci 2a i 2b gena, odnosno MP i CP gena ispitivanih izolata, primenom RDP4 programa, postojanje rekombinacija potvrđeno je kod izolata 101-08, 540-10, 581-11, 1-12 i 267-13. Program ni kod jednog izolata nije mogao da odredi tačnu početnu i krajnju tačku rekombinacije, jer set sekvenci koji je korišćen za ove analize ne sadrži kompletne sekvence RNK 2, odnosno RNK 3 segmenata CMV, već je odredio približne tačke rekombinacije.

Analiza RNK 2 segmenta pokazala je da je kod izolata 101-08, 581-11, 1-12 i 267-13 došlo do izmene fragmenta veličine 334 nt. Početno mesto rekombinacije odgovaralo je poziciji 520 u setu sekvenci, koja odgovara nukleotidu koji se nalazi na poziciji 2421 referentnog izolata FNY (Pristupni broj D00355), dok je završna tačka bila na poziciji 854 u setu sekvenci, koja odgovara nukleotidu koji se nalazi na poziciji 2751 referentnog izolata FNY (Tabela 14). Na osnovu dužine izmenjenog fragmenta i njegove pozicije u setu sekvenci utvrđena je izmena sekvence 2b gena. Kod ovih izolata RDP analiza pokazala je da roditelj izmenjenog segmenta, odnosno sporedni roditelj, izolat Q (Pristupni broj X00985) pripada II podgrupi CMV (sa tačnošću od 98,3% za izolat 1-12, 98,7% za izolat 581-11, 99,0% za izolat 267-13 i 99,3% za izolat 101-08), dok glavni roditelj, izolat 415-07, (sa tačnošću od 97,1% za izolat 267-13, 99,0% za izolat 1-12 i 100% za izolate 101-08 i 581-11) pripada IA podgrupi. Kako pozicija u

setu sekvenci, tako i dužina izmenjenih fragmenta ukazuje da kod izolata 101-08, 581-11, 1-12 i 267-13 fragment koji odgovara sekvenci 2a gena potiče od izolata koji pripada podgrupi IA, dok fragment koji odgovara sekvenci 2b gena potiče od izolata koji pripada II podgrupi ovog virusa. Na osnovu rezultata analize RNK 2 segmenta korišćenjem RDP4 programa izolati 101-08, 581-11, 1-12 i 267-13 predstavljaju rekombinante između podgrupe IA i II, što predstavlja potvrdu rezultata dobijenih filogenetskim i RFLP analizama.

Analiza RNK 3 segmenta pokazala je da je kod izolata 540-10 došlo do izmene fragmenta dužine 468 nt. Početak rekombinacije odgovarao je poziciji 590 u setu sekvenci, koja odgovara nukleotidu koji se nalazi na poziciji 839 referentnog izolata FNY (Pristupni broj D10538), dok je završna tačka bila na poziciji 1058 u setu sekvenci, koja odgovara nukleotidu koji se nalazi na poziciji 1859 referentnog izolata FNY (Tabela 14). Na osnovu dužine izmenjenog fragmenta i njegove pozicije u setu sekvenci utvrđena je izmena sekvence CP gena. Kod izolata 540-10 RDP je analiza pokazala da roditelj izmenjenog segmenta, odnosno sporedni roditelj, izolat 1-12 (sa tačnošću od 100%) pripada II podgrupi CMV, dok glavni roditelj izmenjenog fragmenta, izolat 650-07 (sa tačnošću od 99,7%) pripada IA podgrupi. Rezultati analiza RNK 3 segmenta ukazuju da MP gen potiče od izolata koji pripada IA podgrupi, a CP gen od izolata koji pripada II podgrupi CMV. Ovi podaci pokazuju da je izolat 540-10 rekombinant između IA i II podgrupe CMV i predstavlja potvrdu rezultata dobijenih filogenetskim i RFLP analizama.

Tabela 14. Rezultati RDP analiza sekvenci RNK 2 i 3 segmenata *Cucumber mosaic virus* iz Srbije na prisustvo rekombinacija

Rekombinantni izolati	Ciljna RNK	Tačka rekombinacije u setu sekvenci		Roditelji		Programi koji su detektovali rekombinaciju ²	P vrednost
		Početna	Krajnja	Glavni	Sporedni		
101-08	RNK2	520 (2421 ¹)	854 (2751)	415-07	Q	RGBMCS3	1,144x10 ⁻²²
581-11	RNK2	520 (2421)	854 (2751)	415-07	Q	RGBMCS3	1,144x10 ⁻²²
1-12	RNK2	520 (2421)	854 (2751)	415-07	Q	RGBMCS3	1,144x10 ⁻²²
267-13	RNK2	520 (2421)	854 (2751)	415-07	Q	RGBMCS3	1,144x10 ⁻²²
540-10	RNK3	590 (839)	1058 (1859)	650-07	1-12	GBMCS3	2,087x10 ⁻²¹

¹ Pozicija nukleotida referentnog izolata FNY (Pristupni broj D00355-za RNK 2 segment i D10538-za RNK 3 segment) koja odgovara tačkama rekombinacije u setu sekvenci;

² Programi koji su pokazali da je došlo do rekombinacije: R=RDP; G=GeneConv; B=Bootscan; M=MaxChi; C=CHIMAERA; S=SisScan; 3=3SEQ. Potvučena oznaka programa predstavlja najvišu P vrednost i data je u sledećoj koloni.

5.8. Uticaj selekcije na sekvence izolata i genske regione CMV

U cilju utvrđivanja uticaja selekcije na gene odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije najpre je određen broj sinonimnih supstitucija po sinonimnom mestu (d_S) i nesinonimnih supstitucija po nesinonimnom mestu (d_N), kao i njihove varijanse $\text{Var}(d_S)$ i $\text{Var}(d_N)$, a zatim je primenom Z testa testirana nulta hipoteza $H_0: d_N=d_S$ nasuprot alternativne hipoteze $H_a: d_N>d_S$. Dobijene ukupne prosečne vrednosti d_N/d_S i p vrednosti za svaki od pet genskih regiona CMV, prikazane u tabeli 15, ukazale su da je broj nesinonimnih promena bio je manji od broja sinonimnih, te je dobijena Z vrednost bila manja od 1, a p vrednost jednaka 1. Ovakve Z i p vrednosti, odnosno $Z<1$ i $p>0,05$ ukazuju da na sve testirane genske regione CMV deluje negativna („purifying“) selekcija. Niže Z vrednosti od -13,501 do -9,004 dobijene kod 1a, MP i CP gena ukazuju da su pomenuti geni pod jakim selekcionim pritiskom, dok viša Z vrednost koja je prisutna kod 2a i 2b gena (-3,314 i -4,267) ukazuje na veću toleranciju na aminokiselinske supstitucije. Odnos d_N/d_S i p vrednosti za svaki par sekvenci CMV za sve testirane genske regione, dobijene primenom Z testa, testiranjem nulte hipoteze $H_0: d_N=d_S$ nasuprot alternativne hipoteze $H_a: d_N>d_S$, prikazane su u tabelama 6-10 u prilogu. Dobijene Z vrednosti, za svaki par sekvenci kod svih analiziranih gena, manje su od 1, a p vrednosti veća od 0,05 ukazale su da sve testirane grupe sekvenci podležu negativnoj selekciji. Jedini izuzetak primećen je kada su testirane međusobno sekvence izolata 115-08 i 471-09, na osnovu analiza sekvenci CP gena, gde je Z vrednost iznosila 1,781, a p vrednost bila manja od 0,05. Dobijena Z vrednost ove dve sekvence ukazuje da one podležu pozitivnoj selekciji.

Tabela 15. Ukupna prosečna vrednost d_N/d_S i p vrednost za svaki od pet genskih regiona CMV dobijena na osnovu „codon-based“ Z-testa selekcije testiranjem nulte hipoteze $H_0: d_N=d_S$ nasuprot alternativne hipoteze $H_a: d_N>d_S$

Gen	Broj sekvenci	d_N/d_S vrednost ¹	p vrednost ²
1a	15	-13,501	1,00
2a	19	-3,314	1,00
2b	19	-4,267	1,00
MP	19	-10,261	1,00
CP	44	-9,004	1,00

¹ Odnos d_N/d_S je u korelaciji sa jačinom selekcije gde vrednosti >1 ukazuju na pozitivnu selekciju, pri čemu veće vrednosti ukazuju na jači uticaj selekcije;

² P vrednost za svaki odnos d_N/d_S predstavlja nivo značajnosti Z testa. Geni koji imaju d_N/d_S veću od 1 i statistički značajnu Z vrednost ($<0,05$) se smatraju da su pod uticajem pozitivne selekcije.

5.9. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV

Biološka karakterizacija izolata koji su pripadali različitim molekularnim podgrupama, utvrđenih na osnovu filogenetske analize sekvenci CP gena, obavljena je u cilju provere mogućnosti razlikovanja izolata različitih podgrupa CMV na osnovu reakcije test biljaka. Iz IA podgrupe odabrani su izolati 449-12, 201-11, 570-11, 723-10, 670-08 i 650-07, a iz II podgrupe izolati 581-11, 101-08 i 1-12. Biološka karakterizacija odabranih izolata CMV obavljena je mehaničkim inokulacijama 33 test biljake. Sve test biljke su uniformno reagovale na inokulaciju ispitivanim izolatima u svih pet ponavljanja. Kod većine test biljaka došlo je do pojave različitih tipova simptoma posle različitog perioda inkubacije u zavisnosti od izolata (Tabela 16), dok određene test biljke nisu reagovale pojavom simptoma.

Tabela 16. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije odabranim izolatima *Cucumber mosaic virus*

Test biljke	Izolati (pripadnost odgovarajućoj podgrupi na osnovu CP gena)								
	449-12 (IA)	201-11 (IA)	570-11 (IA)	723-10 (IA)	581-11 (II)	101-08 (II)	670-08 (IA)	650-07 (IA)	1-12 (II)
<i>N. glutinosa</i>	IM, K, N	IM, K, N, DL	BM, K	BM, UL	BM, UL	BM	BM, K	BM	IM, K, N
<i>N. tabacum</i> ‘Banat’	BM	BM, K	BM, K, RLP	BM	BM, HP	BM, HP	BM	BM, HP	IM, ZBN, K
<i>N. tabacum</i> ‘Prilep’	BM	BM, ZBN	IM, K, ZBN	BM, HP	IM	BM	BM	BM	IM
<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	IM, DL	IM, K, N, DL	BM	BM, HP	BM, HP	BM, HP	BM	BM, HP	BM, PN
<i>N. debneyii</i>	BM	IM, UL, K	BM	IM, K	IM, K	IM	BM	IM	IM
<i>N. rustica</i>	IM, K	IM, K, RLP	IM	IM, K	IM, K	BM	BM	BM	BM
<i>N. benthamiana</i>	IM, UL	IM, K, UL	IM, UL	IM, UL	IM, UL	IM, UL	BM, UL, DL	IM, UL	IM, K
<i>N. clevelandii</i>	IM, NL	IM, DL	IM	IM	IM	BM	IM	IM	IM, NL
<i>N. alata</i>	IM	IM	BM	BM	BM	BM	-	BM	BM, ZBN
<i>N. sylvestris</i>	BM	BM	BM	IM	BM	IM	-	BM	IM, DL
<i>C. foetidum</i>	LHP, LNP, N	LHP, LNP, N, Kr	-	LHP, LNP, N	LHP, LNP, N	LHP, LNP, N	LHP, LNP, N	-	LHP, LNP, N, Kr
<i>C. annuum</i> ‘Dukat’	BM	IM, K, DL, NL	BM	IM	BM	BM	IM, K	BM	IM
<i>S. lycopersicum</i> ‘San Pjer’	BM	IM, K	IM	BM	IM	IM	IM, K, DL	IM	IM

<i>S. nigrum</i>	BM	IM, K	BM	BM	BM	BM	BM	BM	IM
<i>Physalis floridana</i>	BM	IM, DL, UL	IM, K, N, DL	BM	BM	IM	IM, K	IM	IM
<i>Gomphrena globosa</i>	LNP	LNP	LNP	LNP	LNP	-	-	LNP	-
<i>C. sativus</i> ‘Delikates’	BM	BM, UL, NL	BM	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM
<i>C. melo</i> ‘Ananas’	BM	BM, UL, NL	BM	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM, UL, NL	BM
<i>C. lanatus</i> ‘Sugar baby’	BM, ZBN	BM	BM	-	BM	-	-	BM	-
<i>C. pepo</i> ‘Olivija’	IM, UL, LNPk	IM, UL, HP	IM	IM, HP, UL	IM, HP, UL	IM, HP, UL	BM	IM, HP, UL	IM, UL
<i>C. pepo</i> ‘Olinka’	IM, UL, LNPk	IM, UL, HP	IM	BM, ZBN	IM, HP, UL	IM, HP, UL	IM, UL	IM, HP, UL	IM, UL
<i>C. pepo</i> ‘Ezra F1’	IM, UL	IM, LNPk	IM	IM	BM	IM	IM, LNPk	IM, UL	IM, UL
<i>C. pepo</i> ‘Beogradska’	BM	BM	IM	IM	IM	-	BM, UL	IM	-
<i>C. pepo</i> ‘Zucchini’	BM	BM	IM	IM	BM	BM	-	IM	-

Legenda: LHP=lokalne hlorotične pege; LNP=lokalne nekrotične pege; LNPk=lokalne nekrotične pege na kotiledonim listovima; BM=blag mozaik; IM=izraženi mozaik; PN=prosvetljavanje nerava; K=klobučavost; N=nitavost; Kr=kržljivost; HP=hlorotične pege; UL=uvijanje listova; NL=nekroza lista; DL=deformacije lista; ZBN=zadržavanje zelene boje oko nerava; RLP=redukcija lisne površine; - = bez simptoma.

Biljke *Nicotiana glutinosa* reagovale su pojavom simptoma sedam do 10 dana po inokulaciji kod svih ispitivanih izolata. Izolati 650-07 (Slika 54) i 101-08 izazvali su pojavu simptoma u vidu blagog mozaika koji je zabeležen i za izolate 570-11 i 670-08, ali kod kojih je primećena i klobučavost lista. Pojava blagog mozaika praćena uvijanjem lista bila je karakteristična za izolate 723-10 (Slika 55) i 581-11. Izolati 201-11, 1-12 i 449-12 doveli su do pojave simptoma u vidu izraženog mozaika koji je bio praćen deformacijama lisne površine u vidu klobučavosti i nitavosti (Slike 56, 57, 58 i 59).

Osam od devet izolata na biljkama *Nicotiana tabacum* 'Banat' izazvalo je simptome blagog mozaika. Pored blagog mozaika, izolat 201-11 izazvao je i pojavu klobučavosti lista (Slika 60), dok je izolat 570-11 pored klobučavosti izazvao i redukciju lisne površine. Izolati 581-11, 101-08 i 650-07 su pored blagog mozaika izazvali i hlorotično prošaranje lisne površine. Izolat 1-12 jedini je izazvao intenzivnije simptome pri čemu su zabeleženi simptomi u vidu izraženog mozaika, zadržavanje zelene boje oko nerava i klobučavosti lista. Pojava simptoma uočavana je sedam do 14 dana po inokulaciji što je uglavnom zavisilo od vremenskih uslova i perioda u kojem su vršene inokulacije.

Svi izolati izazvali su pojavu mozaika na biljkama *Nicotiana tabacum* 'Prilep' osam do 15 dana po inokulaciji. Pojavu blagog mozaika izazvali su izolati 449-12, 101-08, 670-08 i 650-07, kao i izolati 201-11 i 723-10 koji su dodatno izazvali zadržavanje zelene boje oko nerava, odnosno hlorotično prošaranje lista. Izolati 581-11, 1-12 i 570-11 doveli su do pojave izraženog mozaika. Pored mozaika, izolat 570-11 izazvao je klobučavost lista (Slika 61) i simptome u vidu zadržavanja zelene boje oko nerava.

Svi izolati izazvali su pojavu mozaika na biljkama *Nicotiana tabacum* 'Samsun' osam do 14 dana po inokulaciji. Izolat 449-12 izazvao je pojavu izraženog mozaika i deformaciju lisne površine (Slika 62), dok je izolat 201-11 još dodatno izazvao nitavost i klobučavost lista. Pojavu blagog mozaika izazvali su izolati 670-08 (Slika 63) i 570-11, a kod izolata 723-10, 581-11, 101-08 i 650-07 konstatovana je pojava i hlorotičnih pega na neinokulisanom lišću. Izolat 1-12 izazvao je pojavu blagog mozaika i pojavu simptoma u vidu prosvetljavanja nerava.

Biljke *Nicotiana debneyii* reagovale pojavom mozaika sedam dana po inokulaciji kod svih ispitivanih izolata. Izražen mozaik izazvali su izolati 201-11, 723-10, 581-11, 101-08, 650-07 i 1-12, dok su izolati 449-12, 570-11 i 670-08 doveli do

pojave blagog mozaika. Izolat 723-10 je pored mozaika izazvao i klobučavost lista, a izolat 201-11 i uvijenost lista (Slika 64).

Simptome tipa mozaika na biljkama *Nicotiana rustica* izazvali su svi odabrani izolati CMV sedam do 15 dana po inokulaciji. Izolati 449-12, 201-11, 570-11, 723-10 i 581-11 (Slika 65) izazvali su izražen mozaik koji je kod svih izolata bio praćen deformacijama u vidu klobučavosti lista sem kod izolata 570-11, dok je izolat 201-11 izazvao još i redukciju lisne površine. Pojavu blagog mozaika izazvali su izolati 101-08 670-08, 650-07 i 1-12.

Većina ispitivanih izolata (osam od devet) izazvalo je na *Nicotiana benthamiana* pojavu izraženog mozaika i uvijenost lista. Uvijenost lista jedino nije uspeo da izazove izolat 1-12. Od ovih osam izolata, 201-11 i 1-12 (Slika 66) izazvali su i klobučavost lista. Simptome blagog mozaika koji je bio praćen deformacijama i uvijenošću lista izazvao je samo izolat 670-08. Pojava simptoma uočena je od devetog do 15 dana po inokulaciji.

Biljke *Nicotiana clevelandii* reagovala su pojavom mozaika osam do 14 dana po inokulaciji. Izražen mozaik izazvali su izolati 570-11, 723-10, 581-11 i 650-07. Izražen mozaik praćen nekrozom ili deformacijama lisne površine bio je karakterističan za izolate 449-12 i 1-12, odnosno izolat 201-11 (Slika 67). Izolat 101-08 je jedini izazvao simptome blagog mozaika.

Na biljkama *Nicotiana glauca* izolati su se ponašali različito. Od svih ispitivanih izolata, izolat 670-08 nije izazvao pojavu simptoma 30 dana po inokulaciji. Izolati 449-12 i 201-11 izazvali su simptome izraženog mozaika, dok je šest izolata (650-07, 101-08 (Slika 68), 723-10, 570-11, 581-11, 1-12) izazvalo pojavu blagog mozaika od osmog do 16 dana po inokulaciji. Na biljkama *N. glauca* pored blagog mozaika uočeno je i zadržavanje zelene boje oko nerava koje je izazvao izolat 1-12.

Simptomi u vidu mozaika na biljkama *Nicotiana glauca* uočeni su šestog do devetog dana po inokulaciji kod osam ispitivanih izolata, dok izolat 670-08 nije izazvao pojavu simptoma 30 dana po inokulaciji. Izolati 723-10 i 101-08 izazvali su izražen mozaik, a izolat 1-12 je dodatno izazvao i deformisanost lisne površine. Ostali izolati izazvali su pojavu blagog mozaika na *N. glauca*.

Nakon inokulacija ispitivanim izolatima, biljke roda *Chenopodium* reagovala su pojavom lokalnih nekrotičnih pega, međutim utvrđena je razlika u reakcijama kako

između ispitivanih izolata, tako i između testiranih biljnih vrsta. Na biljkama *C. amaranticolor* (Slika 69), *C. quinoa* (Slika 70) i *C. murale* svi ispitivani izolati izazvali su pojavu lokalnih hlorotičnih, a kasnije i nekrotičnih pega koje su se ispoljile tri do četiri dana po inokulaciji. Simptomi lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pega praćeni deformacijama u vidu nitavosti lista na biljkama *C. foetidum* javljali su se nakon šestog dana po inokulaciji izolatima 449-12, 201-11, 723-10, 581-11, 101-08 (Slika 71), 670-08 i 1-12. Pored deformacija u vidu nitavosti lista, izolati 201-11 (Slika 72) i 1-12 su izazvali i kržljivost biljka koja se javila nakon 12 dana po inokulaciji. Izolati 570-11 i 650-07 nisu izazvali pojavu simptoma na *C. foetidum*.

Capsicum annuum 'Dukat' reagovala je pojavom blagog (izolati 449-12, 570-11, 581-11, 101-08 i 650-07) ili izraženog mozaika (201-11, 723-10, 670-08 i 1-12) od 10 dana po inokulaciji. Izražen mozaik praćen klobučavošću lista izazvao je izolat 670-08 (Slika 73), dok je izolat 201-11 (Slika 74) izazvao i deformacije i nekrozu lista.

Biljke *Solanum lycopersicum* 'San Pjer' reagovale su pojavom sistemskih simptoma 10 dana po inokulaciji u vidu izraženog mozaika kod svih izolata, izuzev 449-12 i 723-10 koji su izazvali blag mozaik. Osim izraženog mozaika izolat, 201-11 izazvao je i klobučavost lista paradajza, dok je izolat 670-08 pored klobučavosti izazvao i deformacije lisne površine (Slika 75).

Izolati 201-11 i 1-12 izazvali su simptome izraženog mozaika na *Solanum nigrum* koji je kod izolata 201-11 bio praćen blagom klobučavošću lišća, dok su svi ostali izolati izazvali simptome blagog mozaika (Slika 76) devet do 14 dana po inokulaciji.

Physalis floridana reagovala je pojavom blagog mozaika nakon inokulacija izolatima 449-12, 723-10 i 581-11. Izražen mozaik bio je zastupljen kod ostalih šest izolata, s tim što je izolat 201-11 izazvao i deformacije i uvijenost lista, izolat 570-11 deformacije, nitavost i klobučavost lista (Slika 77), a izolat 670-08 klobučavost lista. Pojava simptoma uočavala se 10 do 13 dana po inokulaciji.

Gomphrena globosa reagovala je pojavom lokalnih nekrotičnih pega 11 dana po inokulaciji (Slika 78) kod šest ispitivanih izolata, dok izolati 101-08, 670-08 i 1-12 nisu izazvali pojavu simptoma ni 30 dana po inokulaciji.

Biljke *Cucumis sativus* 'Delikates' i *Cucumis melo* 'Ananas' reagovale su pojavom blagog mozaika kod svih ispitivanih izolata (Slike 79 i 80). Pored toga izolati

201-11, 723-10, 581-11 (Slika 81), 101-08, 670-08, 650-07 izazvali su nekrozu i uvijenost lista koja se javljala petog do 10 dana po inokulaciji.

Pet od devet ispitivanih izolata izazvalo je pojavu blagog mozaika 14 do 18 dana po inokulaciji na biljkama *Citrullus lanatus* 'Sugar baby'. Pored toga, izolat 449-12 izazvao je i zadržavanje zelene boje oko nerava. Izolati 723-10, 101-08, 670-08 i 1-12 nisu doveli do reakcija na test biljkama.

Reakcija biljaka *Cucurbita pepo* 'Olinka' na mehaničke inokulacije ispitivanim izolatima bila je slična kod većine ispitivanih izolata i manifestovala se pojavom izraženog mozaika (Slika 82) 12 dana po inokulaciji. Pored mozaika, kod većine izolata javljale su se lokalne nekrotične ili sistemične hlorotične pege, kao i uvijenosti lista. Izolat 723-10 bio je izuzetak i doveo je do pojave blagog mozaika praćenog zadržavanjem zelene boje oko nerava.

Biljke *Cucurbita pepo* 'Olivija' reagovala su pojavom izraženog mozaika kod osam odabranih izolata, dok je izolat 670-08 izazvao blagi mozaik sedam dana po inokulaciji. Pored izraženog mozaika, izolati 201-11, 723-10, 581-11, 101-08 i 650-07 izazvali su i pojavu sistemičnih simptoma u vidu uvijenosti lista i hlorotične pegavosti 10 do 16 dana po inokulaciji. Jedino je izolat 449-12 doveo do pojave lokalnih hlorotičnih pega na kotiledonim listovima koji su se javile sedam dana po inokulaciji. Nakon inokulacija sa izolatom 1-12 pored izraženog mozaika dolazilo je i do uvijenosti lišća (Slika 83).

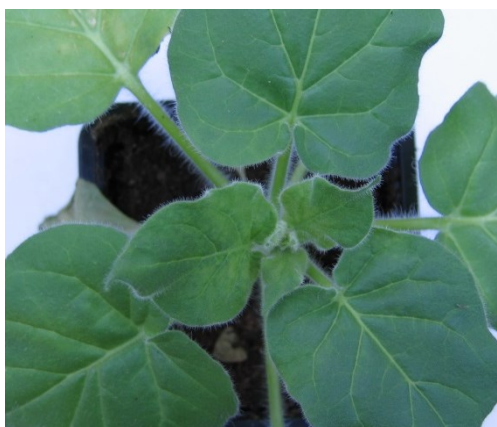
Biljke *Cucurbita pepo* 'Ezra F1' uglavnom su reagovala pojavom izraženog mozaka, dok je blagi mozaik zabeležen jedino kod izolata 581-11 sedmog dana po inokulaciji. Izolati 449-12, 650-07 i 1-12 izazvali su i uvijenost lista, a izolati 201-11 i 670-08 nektotične pege na kotiledonim listovima.

Kod biljaka *Cucurbita pepo* 'Beogradska' i *Cucurbita pepo* 'Zucchini' došlo je do pojave sistemičnih simptoma u vidu blagog mozaika (izolati 449-12 i 201-11) ili izraženog mozaika (izolati 570-11, 723-10 i 650-07 (Slika 84)) osam dana po inokulaciji. Izuzetak je bio izolat 581-11 koji je izazvao mozaik različitog intenziteta, na *C. pepo* 'Beogradska' izražen, a na *C. pepo* 'Zucchini' blagi mozaik. Izolat 101-08 izazvao je blagi mozaik na *C. pepo* 'Zucchini', dok nije uspeo da zarazi *C. pepo* 'Beogradska'. Za razliku od izolata 101-08, izolat 670-08 izazvao je blagi mozaik i uvijenost lista na *C. pepo* 'Beogradska' dok nije uspeo da zarazi *C. pepo* 'Zucchini'.

Izolat 650-07 je izazvao i uvijenost lista na *C. pepo* 'Beogradska', dok se izolat 1-12 najviše razlikovao od ostalih jer nije izazvao pojavu simptoma ni posle 30 dana po inokulaciji test biljaka.

Na test biljkama *Datura metel*, *Datura stramonium*, *Petunia x hybrida*, *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac', *Pisum sativum* 'Mali provansalac', nije došlo do pojave simptoma do 30 dana po inokulaciji ni sa jednim od ispitivanih izolata.

Svi rezultati dobijeni primenom biotesta potvrđeni su primenom serološke metode detekcije, DAS-ELISA testa. U svim korišćenim test biljkama, koje su na inokulacije ispitivanim izolatom CMV reagovale pojavom simptoma, potvrđeno je prisustvo CMV, odnosno, kod biljka bez simptoma nije utvrđeno prisustvo CMV.



Slika 54. Izolat 650-07: Blagi mozaik na lišću *Nicotiana glutinosa*



Slika 55. Izolat 723-10: Blagi mozaik i uvijenost lišća *Nicotiana glutinosa*



Slika 56. Izolat 201-11: Izraženi mozaik i deformacije na listu *Nicotiana glutinosa*



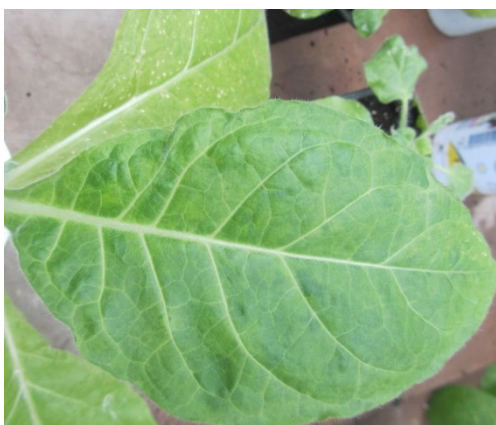
Slika 57. Izolat 449-12: Izraženi mozaik na lišću *Nicotiana glutinosa*



Slika 58. Izolat 1-12: Izraženi mozaik i klobučavost na listu *Nicotiana glutinosa*



Slika 59. Izolat 1-12: Izraženi mozaik, klobučavost i nitavost na lišću *Nicotiana glutinosa*



Slika 60. Izolat 201-11: Blagi mozaik i klobučavost na listu *Nicotiana tabacum* 'Banat'



Slika 61. Izolat 570-11: Izraženi mozaik, i klobučavost na lišću *Nicotiana tabacum* 'Prilep'



Slika 62. Izolat 449-12: Izraženi mozaik i deformacije na lišću *Nicotiana tabacum* 'Samsun'



Slika 63. Izolat 670-08: Blagi mozaik na lišću *Nicotiana tabacum* 'Samsun'



Slika 64. Izolat 201-11: Izraženi mozaik, klobučavost i uvijenost lišća *Nicotiana debneyi*



Slika 65. Izolat 581-11: Izraženi mozaik i deformacije na lišću *Nicotiana rustica*



Slika 66. Izolat 1-12: Izraženi mozaik i klobučavost na lišću *Nicotiana benthamiana*



Slika 67. Izolat 201-11: Izraženi mozaik, deformacije i uvijenost lišća *Nicotiana clevelandii*



Slika 68. Izolat 101-08: Blagi mozaik na lišću *Nicotiana alata*



Slika 69. Izolat 581-11: Lokalne nekrotične pege na listu *Chenopodium amaranticolor*



Slika 70. Izolat 650-07: Lokalne nekrotične pege na listu *Chenopodium quinoa*



Slika 71. Izolat 101-08: Lokalne nekrotične pege na listu *Chenopodium foetidum*



Slika 72. Izolat 201-11: Nitavost na lišću *Chenopodium foetidum*



Slika 73. Izolat 670-08: Izraženi mozaik, deformacije i klobučavost na lišću *Capsicum annuum* 'Dukat'



Slika 74. Izolat 201-11: Nekroza na listu *Capsicum annuum* 'Dukat'



Slika 75. Izolat 670-08: Izraženi mozaik i klobučavost na lišću *Solanum lycopersicum* 'San Pjer'



Slika 76. Izolat 449-12: Blagi mozaik na lišću *Solanum nigrum*



Slika 77. Izolat 570-11: Izraženi mozaik, deformacije, klobučavost i nitavost na lišću *Physalis floridana*



Slika 78. Izolat 723-10: Lokalne nekrotične pege na listu *Gomphrena globosa*



Slika 79. Izolat 449-12: Blagi mozaik na listu *Cucumis sativus* 'Delikates'



Slika 80. Izolat 670-08: Blagi mozaik i uvijenost lista *Cucumis melo* 'Ananas'



Slika 81. Izolat 581-11: Blagi mozaik i uvijenost lišća *Cucumis sativus* 'Delikates'



Slika 82. Izolat 570-11: Izraženi mozaik na listu *Cucurbita pepo* 'Olinka'



Slika 83. Izolat 1-12: Izraženi mozaik i uvijenost lista *Cucurbita pepo* 'Olivija'



Slika 84. Izolat 650-07: Izraženi mozaik i uvijenost lišća *Cucurbita pepo* 'Beogradska'

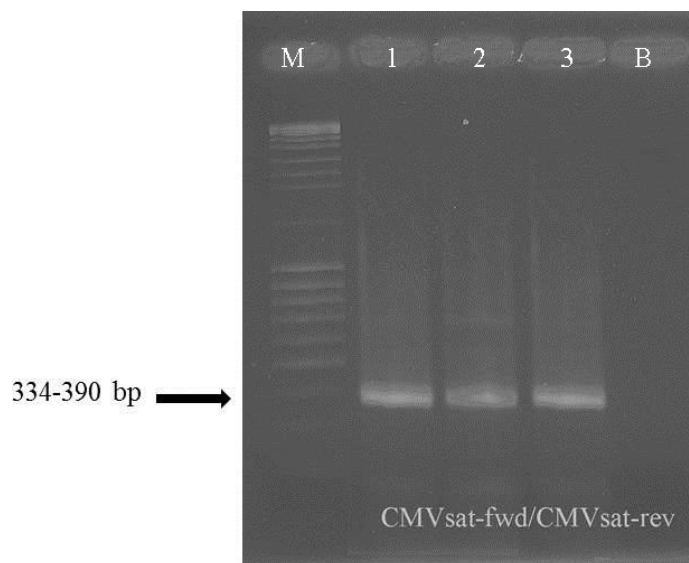
5.10. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK

Prisustvo satRNK proveravano je u uzorcima koji su prethodno odabrani za molekularnu analizu CMV: 415-07, 115-08, 151-08, 171-08, 270-09, 230-10, 201-11, 500-10, 242-09, 514-11, 570-11, 283-12, 449-12, 473-12, 610-11, 286-12, 163-08, 674-11, 717-11, 720-11, 280-12, 477-07, 598-07, 542-08, 471-09, 723-10, 581-11, 581p-11, 746-07, 101-08, 670-08, 207-09, 647-10, 533-2-11, AR1-12, 650-07, 702-07, 202-08, 267-13, 1-12, 52-13, 540-10, 79-13 i 58-12.

5.10.1. Detekcija satRNK

Provera prisustva satRNK u ispitivanim izolatima CMV obavljeno je primenom „One-step“ RT-PCR metode uz korišćenje prajmera CMVsat-fwd/CMVsat-rev koji omogućavaju amplifikaciju fragmenta veličine od 334 do 390 bp, a koji obuhvata celu satRNK. Od ukupno 44 testiranih izolata CMV iz Srbije prisustvo satRNK detektovano

je kod izolata 101-08 i AR1-12 iz paradajza i 1-12 iz *Peperomia tuisana* poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka sa korišćenim markerom (M) (Slika 85). Do amplifikacije nije došlo u ostalim testiranim uzorcima kao i u negativnoj kontoli (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 85. Vizuelizacija amplikona satRNK gena u 1% agaroznom gelu dobijenih korišćenjem prajmera CMVsat-fwd/CMVsat-rev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 1-12 iz *Peperomia tuisana*; 2-izolat 101-08 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat AR1-12 iz *Solanum lycopersicum*; B- negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom.

5.10.2. Identifikacija satRNK

Sekvenciranjem fragmenta amplifikovanih korišćenjem odgovarajućih prajmera dobijene su sekvence satRNK izolata 101-08, AR1-12 i 1-12 koje će u daljem tekstu biti označene kao 101-08-satRNA, AR1-12-satRNA i 1-12-satRNA. Sekvence satRNK su potom deponovane u GenBank bazu podataka gde su dobili pristupne brojeve. Sekvencama 101-08-satRNA i AR1-12-satRNA iz paradajza dodeljeni su pristupni brojevi KT270486, odnosno KM358138, a sekvenci 1-12-satRNA iz *Peperomia tuisana* pristupni broj KT270485. Dobijene sekvence upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka primenom MEGA softvera verzija 5.0.

Međusobna nukleotidna (nt) sličnost tri satRNK poreklom iz Srbije, čije su sekvence trimovane na dužinu od 326 nt koja odgovara dužini najkraće sekvence (1-12-

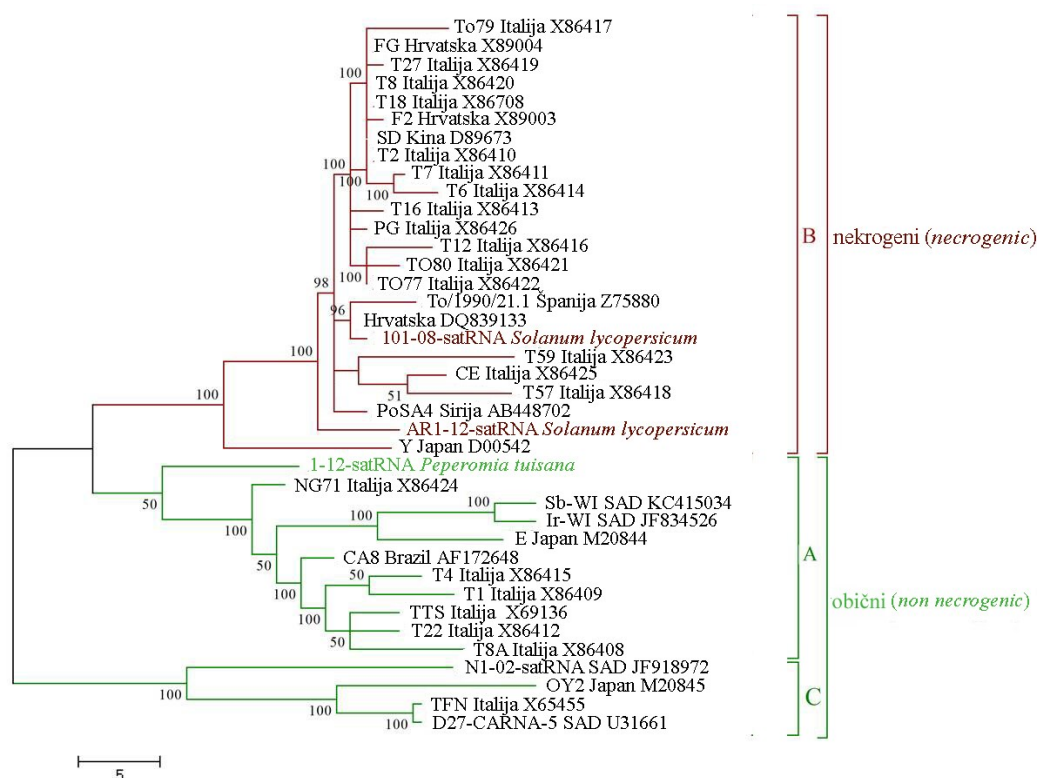
satRNA), iznosila je od 88,9 do 97,0% (10 do 30 nt razlike). Izolat AR1-12-satRNA razlikuje se u 10 nukleotida (97,0% nt sličnost) od izolata 101-08-satRNA, odnosno u 27 nukleotida (89,9% nt sličnost) od izolata 1-12-satRNA. Izolati 101-08-satRNA i 1-12-satRNA međusobno se razlikuju u 30 nukleotida (88,9%).

BLAST analiza pokazala je 86 do 98% nt sličnosti ispitivanih izolata sa sekvencama CMV-satRNK iz drugih delova sveta. Stepem najviše nt sličnosti svakog ispitivanog izolata određen je poređenjem sekvence odabranog izolata sa sekvencama koje su u BLAST analizi pokazale najveći stepen sličnosti korišćenjem MEGA softvera verzija 5.0. Izolati AR1-12-satRNA i 101-08-satRNA najveću nt sličnost pokazali su sa izolatom iz Italije (X86410 odnosno X86419) od 97,1% odnosno 97,9%, dok je izolat 1-12-satRNA najveću nt sličnost od 94,3% pokazao sa izolatom iz Španije (Z75870). Prisustvo satRNA nije zavisilo od grupisanja izolata CMV u odgovarajuću podgrupu na osnovu CP gena. Tako je satRNA detektovana u izolatu AR1-12-satRNA iz podgrupe IA, koji je samo analiziran na osnovu CP gena i u rekombinantnim izolatima 101-08-satRNA i 1-12-satRNA.

5.10.3. Filogenetska analiza satRNK

Sekvence satRNK tri izolata CMV poreklom iz Srbije i 36 sekvenci satRNK odabranih izolata iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka (Tabela 5) odabrane su za filogenetsku analizu. Odabrane sekvence CMV-satRNK su zatim skraćene na dužinu najkraće sekvence od 326 nt po izolatu 1-12-satRNA, nakon čega je rekonstruisano filogenetsko stablo Maximum parsimony metodom implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0. Konsenzus stablo prikazano na slici 86, dobijeno od 64 generisanih stabala, pokazalo je izdvajanje izolata satRNK u tri grupe (A, B i C). Ovakva podela podržana je visokim „*bootstrap*“ vrednostima od 100% za B i C grupu, dok je za grupu A iznosila 50%. Izolati 101-08-satRNA i AR1-12-satRNA iz paradajza poreklom iz Srbije grupisali se u okviru grupe B u kojoj se nalaze svi izolati koji pripadaju nekrogenom (*necrogenic*) soju satRNK i poseduju „konsenzus“ sekvencu GA-GCUAAGGCUUA---UGCUAUGCUGAU koja je odgovorana za pojavu nekroze kod biljaka paradajza. Izolat 1-12-satRNA iz *P. tuisana* poreklom iz Srbije grupisao se u okviru grupe A. U okviru grupa A i C nalaze izolati koji nemaju „konsenzus“ sekvencu koja je odgovorana za pojavu nekroze i pripadaju grupi običnih („ne

nekrogenih“, *non necrogenic*) ili blagih (*benign*) sojeva. Pojava intenzivnijih simptoma hloroze na duvanu i paradajzu povezana je sa „*chlorosis-inducing domains*“ odnosno „konsenzus“ sekvencom CCUUUCGAGGU. Ova „konsenzus“ sekvenca nije detektovana ni kod jednog izolata satRNK iz Srbije. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci satRNK u stablu bio je $0,098\pm 0,012$, dok su unutargrupni diverziteti iznosili $0,032\pm 0,004$ za grupu B, $0,0062\pm 0,011$ za grupu A i $0,071\pm 0,023$ za podgrupu C. Međugrupna variranja između ovih grupa iznosila su od $0,120\pm 0,019$ do $0,205\pm 0,030$.



Slika 86. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci 39 izolata CMV-satRNK dužine 326 nt korišćenjem MEGA 5.0 Maximum parsimony metode sa „*bootstrap*“ analizom u 1000 ponavljanja gde su „*bootstrap*“ vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati iz Srbije koji pripadaju nekrogenoj (*necrogenic*) podgrupi su obojeni bordom, a izolati koji pripadaju običnoj (*non necrogenic*) podgrupi zelenom bojom.

6. DISKUSIJA

Biljni virusi predstavljaju jedan od ograničavajućih faktora u proizvodnji mnogih gajenih biljaka širom sveta jer dovode do velikih ekonomskih gubitaka (**Van den Bosch et al., 2006**). Proučavanja koja se odnose na genetički diverzitet i moguće izvore varijacije u okviru populacije virusa imaju značaj za bolje razumevanje evolutivnih mehanizama koji utiču na varijabilnost. Glavni izvori varijabilnosti biljnih virusa su mutacije, rekombinacije i pseudorekombinacije, odnosno reasortment. Pomenuti procesi mogu da dovedu do velikih fenotipskih promena u populaciji biljnih virusa (**García-Arenal et al., 2001; Bonnet et al., 2005**). Ove promene mogu da budu naročito značajne prilikom selekcije na otpornost, jer mogu značajno ili potpuno da smanje efikasnost korišćenja, do tada, otpornih sorti/hibrida (**García-Arenal and McDonald, 2003**).

Prvi podaci o genetičkoj varijabilnosti biljnih virusa datiraju još od 1926. godine (**McKinney, 1935, loc. cit. García-Arenal et al., 2001**), dok su prva proučavanja razmene genetičkog materijala usledila znatno kasnije (**Donis-Keller et al., 1981**). Tokom poslednjih 25 godina poraslo je interesovanje za proučavanje strukture populacije biljnih virusa, odnosno mehanizama koji dovode do promena u prirodnim populacijama i širenju ovih patogena, o čemu svedoče mnoge publikacije širom sveta (**García-Arenal et al., 2001; Moreno et al., 2004; Seo et al., 2009b; Kaye et al., 2011**). Iako je prošlo više decenija od prvih proučavanja, za sada su rezultati proučavanja populacije virusa više deskriptivnog karaktera (**Roossinck, 2003**) i zasnivaju se na filogenetskim, odnosno taksonomskim analizama. Međutim, za pojedine viruse poput *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (**Tsompana et al., 2005; Kaye et al., 2011**), *Watermelon mosaic virus* (WMV) (**Moreno et al., 2004**), *Potato virus Y* (PVY) (**Ogawa et al., 2008**), *Soybean mosaic virus* SMV (**Seo et al., 2009b**), *Rice stripe virus* (RSV) (**Wei et al., 2009**) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) (**Fraile et al., 1997; Lin et al., 2003, 2004; Moury et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Liu et al., 2009; Nouri et al., 2014**), struktura populacije je mnogo bolje okarakterisana na osnovu nukleinskih sekvenci i danas raspoloživih statističkih metoda za analizu sekvenci.

CMV se pokazao kao idealan model za proučavanje evolucije RNK virusa zbog brzih evolutivnih promena koje su prisutne u prirodnoj populaciji i koje negativno utiču na poljoprivredu (**Roossinck, 2003**), ali i zbog prisustva satelitne RNK (satRNK) koja

je čest pratilac ovog virusa (**García-Arenal et al., 2001**) i koja najčešće dovodi do još većih šteta. Podaci dobijeni proučavanjem populacije CMV poreklom iz različitih regiona sveta ukazali su na varijabilnost genetičke strukture populacije ovog virusa (**Gallitelli, 2000; García-Arenal et al., 2001; Lin et al., 2003**). Velika varijabilnost genetičke strukture populacije ovog virusa kao posledicu može imati nastanak novih fenotipova koji mogu da ugroze efikasnost, pre svega, otpornih sorti kao najefikasnije mere kontrole, zbog čega je bitno pratiti promene u populaciji virusa nastale kroz procese mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija. Podizanje nivoa rezistentnosti biljaka domaćina predstavlja najznačajniji korak ka efikasnoj kontroli biljnih virusa, a selekcija na otpornost se zasniva na poznavanju prevalentnih i agresivnih haplotipova u populaciji određenog virusa u nekom regionu.

6.1. Simptomi CMV na prirodno zaraženim biljkama

Na biljkama paradajza, u kojima je dokazano prisustvo CMV primenom DAS-ELISA testa i koje su odabrane za dalje analize, zabeleženi su simptomi kako na listu i stablu, tako i peteljci ploda i plodovima. Na mladom lišću zabeleženi su uglavnom simptomi u vidu hloroze i blagog mozaika, a usled ranih infekcija pojedine biljke su zbog skraćanja internodija dobijale žbunolik izgled često praćen zaostajanjem u porastu. Simptomi mozaika bili su često praćeni deformacijom liske u manjem ili većem stepenu i pojavom klobučavosti. Kod pojedinih biljaka zabeležena je i nitavost (vrbolikost), jedan od karakterističnih simptoma CMV, koja nastaje redukcijom međunervalnog tkiva lista. Na peteljkama ploda uočena je nekroza u vidu tamnosmeđih traka, dok je kod plodova zabeleženo neravnomerno sazrevanje i pojava prošaravanja. Na zaraženim plodovima koji su najčešće bili deformisani uočavale su se pege ili koncentrični prstenovi crvene boje. Takođe, nekrotična prošaravanja i deformisanost zabeleženi su i na zelenim plodovima. Plodovi kod kojih su bili primećeni ovakvi tipovi simptoma gubili su svaku tržišnu vrednost, što je u saglasnosti sa navodima **Zitter and Murphy (2009)** i **Nikolić i sar. (2012)**. Prema **Zitter and Murphy (2009)** tip i intezitet simptoma zavise od sorte paradajza, virulentnosti soja virusa, uslova sredine, kao i od toga da li se biljke gaje na otvorenom ili u zaštićenom prostoru. Pošto su biljke sa simptomima sakupljane u različitim fazama razvoja, pretpostavka je da je variranje simptoma zavisilo i od fenofaze biljke u momentu infekcije (**Zitter and Murphy,**

2009). Osim toga, na intezitet simptoma može uticati i satRNK čije prisustvo u velikom broju slučajeva ima katastrofalne posledice po proizvodnju, pre svega na proizvodnju paradajza, ali i paprike i tikava (Škorić et al., 1996; García-Arenal and Palukaitis, 1999; García-Arenal et al., 2000; Luis-Arteaga et al., 1998; Jordá et al., 1992). Prisustvo satRNK kod pojedinih izolata CMV poreklom iz paradajza progresivno je pojačalo simptome prouzrokovane ovim virusom i u Srbiji.

Virus mozaika krastavca jedan je od najznačajnijih virusa paprike u Srbiji (Milošević, 2013). Simptomi oboljenja koje ovaj virus prouzrokuje bili su veoma izraženi na svim nadzemnim organima biljke. Stepenn njihove izraženosti zavisi od osetljivosti sorti paprike, virulentnosti soja virusa, starosti biljke i uslova sredine (Mijatović i sar., 2007; Petrović i sar., 2010a; Milošević, 2013; Milošević i sar., 2013). Pored različitih tipova mozaika, od blagog do izraženog, na biljkama paprike u kojima je potvrđen CMV i koje su odabrane za dalje analize, zabeleženi su i simptomi kao što su deformacije, blaga klobučavost, nitavost i nekrotično prošaranje lista. Do nekroze lista uglavnom je dolazilo u kasnijim fazama razvoja mozaičnih šara i pega, a osim simptoma na listovima primećena je i nekroza lisnih peteljki i stabla paprike. Prema Petrović i sar. (2010a, 2010b) u početnim fazama razvoja bolesti, na listovima se prvo javlja slab do izražen mozaik, dok se u kasnijim fazama javljaju hlorotične pege nepravilnog oblika. Kod pojedinih zaraženih biljaka zabeleženo je skraćivanje internodija što je rezultiralo pojavom žbunolikog izgleda, a usled zaostajanja zaraženih biljaka u porastu dolazilo je i do pojave kržljivosti. Cvetovi zaraženih biljaka, obično ostaju neoplođeni, a ako se plod i formira on je deformisan i sa nekrozom površinskog tkiva. Često dolazi i do neravnomernog sazrevanja tako da su plodovi bez tržišne vrednosti.

Simptomi koje CMV prouzrokuje na biljkama duvana su raznovrsni i zavise kako od sorte duvana, tako i od soja virusa. Takođe, na ispoljavanje simptoma utiču i uslovi spoljašnje sredine (Gooding, 1991). Na biljkama duvana, koje su odabrane za dalje analize zabeleženi su simptomi u vidu slabog do izraženog mozaika, deformacija lisne površine, klobučavosti praćene sužavanjem liske, kao i zaostajanje u porastu. Ovakve simptome zabeležili su i drugi autori (Gooding, 1991; Mayunga and Kapooria, 2003; Đekić i sar., 2008b).

Na biljkama iz familije Cucurbitaceae konstatovane su raznovrsne morfološke i hromatske promena na listovima i plodovima. Na biljkama odabranim u okviru ove

disertacije zabeleženi su simptomi blagog do veoma izraženog mozaika, hloroze lisnih nerava praćene nekrozom listova, klobučavost lista, zadržavanje zelene boje oko nerava, naboranost lista, blaga do izražena deformisanost lisne površine koja je kod pojedinih biljaka dovela do gubitka prepoznatljivog oblika liske, dok je sužavanje lisnih nerava dovelo do redukcije lisne površine. Kod pojedinih biljaka uočeni su i deformisani plodovi sa simptomima bradavičastih izraštaja. Svi navedeni simptomi u saglasnosti su sa opisima simptoma drugih autora (**Zitter et al., 1996; Desbiez and Lecoq, 1997; Dukić et al., 2001; Krstić et al., 2002; Wang et al., 2002; Tóbiás and Tulipán, 2002; Vučurović i sar., 2008; Vučurović i sar., 2011**). U ranijim fazama razvoja biljke zaraza se ispoljavala uvijanjem lišća, mozaikom i smanjivanjem lisne površine. Na jako zaraženim biljkama cvetovi su bili deformisani i ponekad zelene boje. Poznato je da simptomi na biljkama familije tikava variraju u zavisnosti od biljne vrste, genotipa, vremena ostvarene infekcije, kao i uslova spoljne sredine (**Providenti and Schroeder, 1970; Zitter, 1996; Desbiez and Lecoq, 1997; Dukić et al., 2001; Krstić et al., 2002; Wang et al., 2002; Tóbiás and Tulipán, 2002; Vučurović i sar., 2008**). Vrlo jaki simptomi ispoljavaju se na letnjim i zimskim tikvama, nekim bundevama i različitim sortama dinja, dok su simptomi mnogo blaži na krastavcu i lubenici. Na vrežama zaraženih biljaka često je prisutno mozaično prošaravanje, dok su plodovi usled očiglednih ranih infekcija veoma deformisani, sa različitim bradavičastim izraštajima ili ulegnućima na površini. Usled veoma ranih infekcija, dolazilo je do nekroze tek zametnutih plodova ili do potpunog izostanka zametanja plodova. U jako zaraženim plodovima formirao se mali broj sitnog, deformisanog semena slabe klijavosti, kao što su zabeležili i drugi autori (**Zitter, 1996; Vučurović i sar., 2008; Vučurović i sar., 2011**). Plodovi zaraženi u kasnijim fazama razvoja ispoljavali su različite vidove mozaičnog prošaravanja. U toku ovih istraživanja prvi put je izvršena karakterizacija CMV u Srbiji na lubenici (**Milojević et al., 2012; Milojević i sar., 2013**).

Zaražene biljke u usevu pasulja ispoljavale su samo simptome u vidu blagog mozaika i hloroze lista. Pored ovih simptoma, **Davis et al. (1981)** navode da CMV na pasulju prouzrokuje i zaostajanje u porastu, dok **Larsen et al. (2002)** od simptoma navode još i zadržavanje zelene boje oko nerava. Najizraženiji simptomi javljaju se usled ranih infekcija, kada su biljke zaražene u fenofazi cvetanja, i tada dolazi do

najvećih gubitaka. Kod rano zaraženih biljaka može izostati i formiranje mahuna, a ukoliko dođe do formiranja, mahune su uglavnom deformisane, prošarane i sitnije (**Zitter and Murphy, 2009**).

Na biljkama *Peperomia tuisana* zabeleženi su simptomi nekrotičnog prošaravanja u vidu šara različitog oblika i površine, kao i u vidu koncentričnih krugova, dok se na stablu i lisnim drškama uočavala nekroza, što je u saglasnosti sa rezultatima **Flasinski et al. (1995)** i **Daughtrey et al. (1997)**. U toku ovih istraživanja CMV je prvi put dokazan na *Peperomia tuisana* u Srbiji (**Milojević et al., 2013**).

Na lišću zaraženih biljaka lale javljale su se hlorotične crtičaste pege, svetlotamna prugavost i deformacije listova. Zaražene biljke zaostajale su u porastu, a zabeleženo je i smanjenje veličine cvetova koji su često bili neravnomerno obojeni. Ovakvi tipovi simptoma na biljkama lale zabeleženi su i od strane drugih autora (**Kaper and Waterworth, 1981; Samuitienė and Navalinskienė, 2008**). Prisustvo CMV na lali prvi put je dokazano u Srbiji u okviru ove disertacije (**Milojević et al., 2014**).

Iako na korovskim biljkama uglavnom ne dolazi do ispoljavanja simptoma (**Zitter and Murphy, 2009**), na listovima biljaka krasolike (*Stenactis annua*) zabeleženi su simptomi u vidu izraženog mozaika, nekrotičnih pega, kao i deformacija lisne površine u vidu blage klobučavosti. Na osnovu pregleda literature, kod nas i u svet, prisustvo CMV prvi put je utvrđeno na ovoj biljnoj vrsti čime se proširuje krug domaćina ovog virusa.

Na biljkama ukrasnog bagrema (*Wisteria sinensis*) zabeleženi su simptomi deformacije listova u vidu izražene nitavosti. Detekcija ovog virusa na listovima bagrema sa izraženim simptomima predstavlja prvi nalaz na *W. sinensis*, kao novom domaćinu ne samo kod nas, nego i u svetu. Ovim nalazom proširuje se krug domaćina koji prema najnovijim podacima obuhvata više od 1300 vrsta iz preko 500 rodova i više od 100 biljnih familija (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**).

6.2. Amplifikacija izolata CMV

Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) primenjena u cilju amplifikacije različitih genskih regiona odabranih izolata CMV predstavlja osnovu za proučavanje strukture populacije ovog virusa u našoj zemlji. Zbog velike varijabilnosti izolata uključenih u istraživanja pojedini genski regioni nisu mogli

da budu amplifikovani prajmerima opisanim u literaturi. Zbog toga je u toku izrade ove doktorske disertacije dizajnirano sedam različitih parova prajmera za različite regione genoma ovog virusa i razvijen protokol za svaki od njih. Osim dizajniranih prajmera za amplifikaciju pojedinih izolata ili regiona korišćeno je i dva para specifičnih prajmera koji su prethodno opisani u literaturi (**Finetti Sialer et al., 1999; Yu et al., 2005**).

Amplifikacija kompletnog ili parcijalnog CP gena odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije izvršena je primenom jednog od dva para specifičnih prajmera, CMVCPfwd/CMVCPrev (**Milojević et al., 2012**) ili CMVF/R (**Yu et al., 2005**) koji su uspešno amplifikovali očekivani fragment od 871 bp, odnosno 500 bp. Iako prajmerima dizajniranim u toku izrade ove disertacije (**Milojević et al., 2012**) nije uspešno amplifikovan samo jedan od 36 izolata CMV, dizajnirani prajmeri mogu se smatrati veoma uspešnim za amplifikaciju CP gena koji se najčešće koristi i za rutinsku detekciju ovog virusa u dijagnostičkim laboratorijama (**Stanković et al., 2011; Vučurović, 2012**). Za amplifikaciju MP gena kod svih ispitivanih izolata CMV korišćen je jedan od dva primenjena para dizajniranih prajmera, MPfwd/MPrev ili CMVMP3/CMV3a-rev. Produkti očekivane veličine od 834 bp, karakterističan za prajmere MPfwd/MPrev, ustanovljeni su kod 15 od 19 odabranih izolata. Ovaj par prajmera nije uspeo da amplifikuje fragmente kod četiri izolata, pa je za njihovu amplifikaciju korišćen konzervativniji deo sekvence MP gena koji se nalazi unutar ovog regiona, čime se dobija produkt veličine od 728 bp. Iako je amplifikacija parcijalnog MP gena većeg broja izolata izvršena prajmerima MPfwd/MPrev, oba dizajnirana para prajmera se mogu preporučiti za uspešnu amplifikaciju ovog regiona genoma CMV. Amplifikacija 2a gena CMV obavljena je primenom para specifičnih prajmera za ovaj genski region, RV11/RW8 (**Finetti Sialer et al., 1999**), koji su uspešno amplifikovali očekivani fragment od oko 650 bp. Kao i prethodan par prajmera, dizajnirani prajmeri 2bfwd/2brev, omogućili su amplifikaciju ciljne sekvence od 804 bp kod svih ispitivanih izolata. Ovi prajmeri pokazali su se veoma uspešnim za amplifikaciju 2a i 2b gena CMV. Molekularna amplifikacija 1a gena CMV obavljena je kombinacijom jednog nizvodnog prajmera sa tri uzvodna: RNA1a-fwd/RNA1a-rev, RNA1a-fwd/RNA1a-r i RNA1a-fwd/CMV1a-reverse, koji umnožavaju početni deo ovog gena. Prisustvo amplifikovane ciljne sekvence od 1198 bp 1a gena, uz korišćenje specifičnih dizajniranih prajmera RNA1a-fwd/RNA1a-rev nije detektovano kod 2 od 15 odabranih

izolata. Kako prethodno dizajnirani prajmeri nisu uspešno amplifikovali sve odabrane izolate dizajnirani su novi uzvodni prajmeri na osnovu drugih konzervativnih delova u okviru 1a gena. Tako je, amplifikacija ciljne sekvence kod ova dva izolata izvršena uz pomoć uzvodnog prajmera CMV1a-reverse, odnosno RNA1a-r koji u kombinaciji sa nizvodnim prajmerom daju fragment očekivane veličine od 981, odnosno 1500 bp. I pored činjenice da je za amplifikaciju različitih regiona CMV u većini slučajeva korišćeno više od jednog para dizajniranih prajmera ili prajmera preuzetih iz literature, ni jedan od korišćenih prajmera nije uspeo da amplifikuje produkt MP, 2a, 2b i 1a gena izolata poreklom iz *Cucurbita maxima* (242-09), zbog čega je ovaj izolat isključen iz daljih analiza identifikacije i karakterizacije CMV na osnovu pomenutih regiona. Za amplifikaciju ovog izolata, radi njegove dalje analize, potrebno je dizajnirati nove specifične prajmere.

6.3. Molekularna identifikacija izolata CMV

Rezultati molekularne identifikacije BLAST analizom, potvrdili su pripadnost svih ispitivanih izolata CMV iz Srbije na osnovu pokazanih sličnosti sa izolatima CMV iz drugih delova sveta. Sličnost sekvenci ispitivanih izolata poreklom iz Srbije sa izolatima CMV iz drugih delova sveta varirala je u zavisnosti od upoređivanog regiona. Tako je, za CP gen iznosila od 79 do 99%, za MP i 2b gen od 78 do 99%, za 2a gen od 90 do 99% i 1a gen od 81 do 99%. Stepem nukleotidne sličnosti, manji od 88%, ispitivanih izolata sa izolatima CMV iz GenBank baze podataka je prvi pokazatelj varijabilnosti u okviru prirodne populacije ovog virusa (**Palukaitis and García-Arenal, 2003; Yu et al., 2005**). Tako je, stepen nukleotidne sličnosti određenih genskih regiona ispitivanih izolata CMV ukazao na varijabilnost u okviru prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji.

Na osnovu seroloških osobina, hibridizacije nukleinskih kiselina, analize sekvenci i RFLP analize (**Palukaitis et al., 1992; Rizos et al., 1992; Chaumpluk et al., 1996; Owen and Palukaitis, 1988; Roossinck, 2002; Palukaitis and García-Arenal, 2003**) ustanovljena je podela izolata CMV u dve podgrupe, označene kao I i II. Prema literaturnim podacima sličnost između izolata koji pripadaju I i II podgrupi iznosi od 69-77%, dok je u okviru podgrupa veća od 90% (**Palukaitis et al., 1992**). Na osnovu homologije sekvenci nukleinskih kiselina izolata podgrupe I, **Palukaitis and Zaitlin**

(1997) su predložili izdvajanje podgrupe IB u koju bi bili svrstani izolati poreklom iz Azije i podgrupe IA gde bi bili svrstani svi ostali izolati. Prema literaturnim podacima sličnost između izolata koji pripadaju IA i IB podgrupi CMV iznosi od 92-95% (Roossinck et al., 1999; Roossinck, 2002). Na osnovu nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci CP gena 44 odabrana izolata CMV poreklom iz Srbije utvrđena je varijabilnost populacije CMV u našoj zemlji. Nukleotidna sličnost od 76,3-100% dovela je do podele izolata iz Srbije u dve grupe. Najveći broj srpskih izolata grupisao se u prvu grupu sa sličnošću od preko 94,2%, dok se u drugu grupu svrstalo osam izolata (242-09, 581-11, 581p-11, 101-08, 1-12, 52-13, 540-10 i 79-13) čija je sličnost bila iznad 96,6%. Nukleotidna sličnost između izolata različitih grupa kretala se od 76,3-80,6%. Za razliku od ovih istraživanja koja su ukazala na heterogenost populacije CMV, ranija istraživanja populacije ovog virusa iz Srbije poreklom iz paprike, duvana i biljaka iz porodice Cucurbitaceae pokazala su malu varijabilnost prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji, pri čemu su se svi ispitivani izolati grupisali u okviru monofiletičke podgrupe IA (Dukić i sar., 2002; Đekić, 2009; Vučurović i sar., 2011; Vučurović, 2012; Milošević, 2013).

Varijabilnost populacije CMV u Srbiji utvrđena je i na osnovu nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci MP gena 19 odabranih izolata ovog virusa. Nukleotidna sličnost odabranih izolata kretala se od 76,6-100%. Heterogenost populacije CMV iz Srbije dovela je do podele izolata u dve grupe i na osnovu MP gena. Najveći broj srpskih izolata grupisao se u prvu grupu sa sličnošću od preko 98,3%, dok se u drugu grupu svrstalo četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 79-13) čija je sličnost bila iznad 97,6%. Nukleotidna sličnost između izolata različitih grupa kretala se od 76,6-78%. Literaturni podaci pokazuju da se sličnost između izolata koji pripadaju podgrupama I i II kreće od 77-79%, dok je u okviru podgrupa veća od 92% (Roossinck, 2001; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Podela podgrupe I, na IA i IB podgrupu, zasnovana na analizama CP gena prihvaćena je i kod ostalih genskih regiona CMV (Roossinck, 2002; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Međusobna sličnost između izdvojenih grupa izolata poreklom iz Srbije ukazuje na prisustvo izolata iz različitih podgrupa ovog virusa. Poređenjem izolata grupisanih u prvu i drugu grupu na osnovu nukleotidne i aminokiselinske sličnosti CP i MP gena uvidelo se da se izolat 540-10 grupisao sa izolatima koji se po CP genu grupišu u drugu grupu, dok se po MP genu

grupisao sa izolatima koji su činili prvu grupu. Ovi rezultati ukazali su na moguće prisustvo rekombinantnih ili pseudorekombinantnih izolata u populaciji CMV u Srbiji.

Za razliku od rezultata dobijenih na osnovu stepena sličnosti CP i MP gena analiza nukleotidne i aminokiselinke sličnosti sekvenci 2a gena 19 odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije ukazala je na homologiju prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji. **Palukaitis and García-Arenal (2003)** navode da je stepen sličnosti sekvenci izolata koji pripadaju različitim podgrupama najniži u okviru RNK 2 segmenta CMV i da se nukleotidna sličnost između izolata koji pripadaju podgrupama I i II kreće od 69-71% na osnovu 2a gena. Isti autori ističu da je nukleotidna sličnost u okviru pomenutih podgrupa veća od 89%. Iako diverzitet nukleotidnih sekvenci 2a gena ukazuje na veću varijabilnost ovog regiona u odnosu na MP i CP gen (**Kim et al., 2014**), mala varijabilnost od 96,7-100% prirodne populacije CMV u Srbiji na osnovu 2a gena može se objasniti činjenicom da se svaka od tri RNK posebno evolutivno razvijala (**Roossinck, 2002**). **Bonnet et al. (2005)** su utvrdili da 17% populacije CMV čine rekombinantni, dok 5% populacije CMV čine pseudorekombinantni izolati ovog virusa što ukazuje da su rekombinacije i pseudorekombinacije prisutne u populaciji CMV. Rezultati ovih istraživanja koji se odnose na grupisanje izolata u odgovarajuće podgrupe CMV, kao i rezultati **Finetti Sialer et al. (1999)**, **Lin et al. (2004)** i **Nouri et al. (2014)** dobijeni proučavanjem istog regiona 2a gena u saglasnosti su sa grupisanjem izolata na osnovu analiza kompletnog 2a gena (**Roossinck, 2002; Liu et al., 2009; Kim et al., 2014**).

Stepen nukleotidne i aminokiselinke sličnosti sekvenci 2b gena 19 odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije ukazao je na varijabilnost prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji. Stepem nukleotidne sličnosti od 63,4-100% ukazao je na podelu izolata iz Srbije u dve grupe. Najveći broj srpskih izolata grupisao se u prvu grupu sa sličnošću od preko 94,4%, dok se u drugu grupu svrstalo četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 267-13) čija je sličnost bila iznad 98,3%. Nukleotidna sličnost između izolata različitih grupa kretala se od 63,4-68,7%. Veća divergentnost sekvenci u okviru RNK 2 segmenta koje pripadaju različitim podgrupama CMV prisutna i kod 2b gena saglasna je sa rezultatima **Palukaitis and García-Arenal (2003)**. Literaturni podaci pokazuju da se sličnost između izolata koji pripadaju podgrupama I i II kreće od 46-61%, dok je u okviru podgrupe I veća od 68%, odnosno u okviru podgrupe II veća od 95% (**Palukaitis**

and García-Arenal, 2003). Rezultati istraživanja **Lin et al. (2004)** i **Liu et al. (2009)** pokazuju da 2b gen poseduje najveći diverzitet u genomu CMV, što je u saglasnosti sa podacima dobijenim u ovim istraživanjima. Iako je sličnost nukleotidnih sekvenci izolata između obrazovanih grupa bila nešto veća u odnosu na vrednost definisanu od strane **Palukaitis and García-Arenal (2003)**, može se smatrati da je podela izolata u dve grupe odgovarajuća jer je sličnost u okviru obrazovanih grupa bila znatno visoka.

Na osnovu nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci 1a gena 15 odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije utvrđena je varijabilnost populacije CMV u našoj zemlji. Nukleotidna sličnost od 79,3-99,9% dovela je do podele izolata iz Srbije u tri grupe. Najveći broj srpskih izolata grupisao se u prvu, dva izolata (723-10 i 267-13) u drugu, a četiri izolata (581-11, 101-08, 1-12 i 79-13) u treću grupu. Sličnost nukleotidnih sekvenci između izolata u okviru svake od grupa bila je visoka i iznosila je preko 95,5%, dok se između izolata različitih grupa kretala od 79,5-80,5% do 90,7-92,1%. Rezultati analiza ukazali su na veći stepen sličnosti između dve od tri izdvojene grupe izolata CMV. Prema literaturnim podacima sličnost između izolata koji pripadaju I i II podgrupi na osnovu 1a gena iznosi od 76-78%, dok je u okviru podgrupe I i II veća od 88%, odnosno 98% (**Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Analize sličnosti nukleotidnih sekvenci CMV pokazale su da je sličnost između sekvenci IA i IB podgrupe oko 92% (**Roossinck, 2001**).

Prirodna populacija CMV je do sada proučavana u Španiji (**Fraile et al., 1997; García-Arenal et al., 2000; Sacristán et al., 2004; Bonnet et al., 2005**), Italiji (**Davino et al., 2012**), Kaliforniji (**Lin et al., 2003; Lin et al., 2004**), SAD (**Nouri et al., 2014**), Brazilu (**Eiras et al., 2004**), Tunisu (**Tamarzizt et al., 2013**), Kini (**Liu et al., 2009**) i Koreji (**Kim et al., 2014**). Diverzitet analiziranih populacija CMV poreklom iz Španije, Tunisa, Koreje, Brazila, Kalifornije ili SAD bio je nizak (**Fraile et al., 1997; Lin et al., 2003; Eiras et al., 2004; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Kim et al., 2014; Nouri et al., 2014**), dok je diverzitet populacije CMV u Italiji bio relativno visok i sličan diverzitetu u Indiji, Kini i Japanu (**Davino et al., 2012**). Najveće vrednosti genetičkog diverziteta između izolata ovog virusa zabeležene su u populacijama CMV poreklom iz Australije i istočne Evrope (**Davino et al., 2012**). Istraživanja prirodne populacije CMV u Srbiji na osnovu stepena sličnosti sekvenci analiziranih delova genoma ovog virusa pokazala su varijabilnost populacije na osnovu 1a, 2b, MP i CP

gena, ali ne i na osnovu 2a gena. Kod onih regiona kod kojih je utvrđena heterogenost u okviru populacije CMV došlo je do podele izolata na osnovu stepena sličnosti u određene grupe. U okviru formiranih grupa zabeležen je nizak genetički diverzitet. Veoma nizak genetički diverzitet, kakav je zabeležen u populaciji CMV u Španiji, Kaliforniji i SAD ukazuje da veoma bitnu ulogu u oblikovanju populacije CMV igra efekat osnivača („*founder effect*”) i uskog grla („*genetic bottleneck*”) (Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005). Fraile et al. (1997) i García-Arenal et al. (2001) su ustanovili postojanje metapopulacija CMV u Španiji, koju je karakterisala sopstvena lokalna dinamika u pogledu nestajanja i nasumičnih rekolonizacija iz lokalnih ili udaljenih virusnih rezervoara (izvora). Osnivač efektom se često objašnjava niska genetička raznolikost pojedinih populacija različitih biljnih virusa (Nouri, 2012). Međutim, iako je koncept metapopulacije prihvaćen kod CMV i smatra se da je homologija nukleotidnih sekvenci između izolata CMV poreklom iz istog geografskog regiona viša u odnosu na udaljena geografska područja (Chen et al., 2001; Ryu et al., 2002; Eiras et al., 2004), brojna istraživanja pokazuju da ne postoji jasna geografska povezanost između izolata ovog virusa, godine sakupljanja i biljke domaćina (Eiras et al., 2000; Lin et al., 2004, Bonnet et al., 2005). Mada, nedavno sprovedena istraživanja Tamarzizt et al. (2013) i Kim et al. (2014) pokazuju geografsku povezanost subpopulacija CMV iz paprike u Tunisu i Koreji. Nasuprot tome, homologija nukleotidnih sekvenci izolata CMV iz ljiljana u Kini bila je veoma visoka uprkos različitom geografskom poreklu izolata i različitom domaćinu (različiti varijeteti ljiljana) (Chen et al. 2001).

6.4. Filogenetske analize CMV

Analiza sekvenci i filogenetske analize su se poslednjih godina pokazale kao veoma efikasne metode za karakterizaciju populacije, ali i za detekciju rekombinanata i pseudorekombinanata kod RNK virusa (Worobey and Holmes, 1999). Pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV do nedavno je određivana na osnovu sekvenci CP gena koji predstavlja visoko konzervativan region i kodira strukturni protein (Roossinck, 2002; Jacquemond, 2012) zbog čega se smatra najinformativnijim regionom za identifikaciju i karakterizaciju ovog virusa (Moury et al., 2004). Rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci gena koji se nalaze na

različitim RNK uvidelo se da pojedini izolati na osnovu analiza različitih genskih regiona pripadaju različitim podgrupama CMV. Sve češće prisustvo rekombinacija i pseudorekombinacija u populaciji CMV (Fraile et al., 1997; García-Arenal et al., 2001; Lin et al., 2003; Eiras et al., 2004; Lin et al., 2004; Sacristàn et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Chen et al., 2007; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Tamarzizt et al., 2013; Kim et al., 2014; Nouri et al., 2014), kao i činjenica da se svaka od tri RNK posebno evolutivno razvijala (Roossinck, 2002) ukazuju da je veoma značajno prilikom proučavanja prirodne populacije CMV analizirati i ostale genske regione (Lin et al., 2004; Moury et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Bashir et al., 2006; Tamarzizt et al., 2013; Kim et al., 2014; Nouri et al., 2014).

Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci CP gena jasno pokazuje grupisanje izolata CMV u dve podgrupe, I i II, gde se u okviru podgrupe I izdvajaju podgrupe IA i IB. Ovakva podela CMV podržana je visokom homologijom između sekvenci iste podgrupe i visokim „*bootstrap*“ vrednostima, što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Roossinck, 2002; Lin et al., 2003; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Yu et al., 2005; Hareesh et al., 2006; Parrella and Sorrentino, 2009; Berniak et al., 2010; Koundal et al., 2011; Vučurović, 2012; Milošević, 2013). Rezultati filogenetske analize potvrđuju grupisanje izolata poreklom iz Srbije u dve odvojene grupe koje su prethodno ustanovljene na osnovu stepena sličnosti ispitivanih izolata. Najveći broj izolata CMV iz Srbije grupisao u okviru podgrupe IA. U ovu podgrupu svrstana je i većina poznatih izolata CMV (Bonnet et al., 2005). U okviru podgrupe IB uglavnom se nalaze izolati iz Istočne Azije, međutim usled intenzivne razmene biljnog materijala, izolati IB podgrupe su detektovani i izvan Azijskog kontinenta (Gallitelli, 2000; Lin et al., 2003; Eiras et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Sclavounos et al., 2006; Kayode et al., 2014). Tako su se u podgrupu IB, u rekonstruisanom filogenetskom stablu, svrstali i izolati iz Italije i Španije (Gallitelli, 2000; Lin et al., 2003), dok prisustvo ove podgrupe u Srbiji nije zabeleženo. Diverzitet između izolata podgrupe IB u stablu je bio značajno veći u odnosu na diverzitet ostalih podgrupa, što je u skladu sa rezultatima Lin et al. (2003). Ovi autori navode da je veći diverzitet ove podgrupe posledica toga što su izolati ove podgrupe sakupljeni u različitim periodima, iz različitih biljaka sa različitih geografskih područja. Međutim, Liu et al. (2009) navode da genetička varijabilnost izolata IB podgrupe nije povezana sa

geografskim poreklom, vremenom uzorkovanja i biljkom domaćinom. Viši stepen divergentnosti u okviru ove podgrupe može biti rezultat starije populacije izolata CMV. Po teoriji, očekuje se da starije populacije imaju veći genetski diverzitet od mlađih (Moya and García-Arenal, 1995; García-Arenal et al., 2001). Druga grupa od osam izolata poreklom iz Srbije svrstana je u II podgrupu CMV, što predstavlja prvi nalaz ove podgrupe u Srbiji. Smatra se da su izolati iz podgrupe I dominantniji u odnosu na izolate iz podgrupe II (Tian et al., 2009), kao i da dovode do većih šteta u usevima i samim tim i većih ekonomskih gubitaka. Veća zastupljenost izolata iz podgrupe I se može objasniti i činjenicom, da izolati ove podgrupe izazivaju izraženije simptome u odnosu na izolate podgrupe II, zbog čega se izolati iz podgrupe II teže uočavaju u polju (Xu et al., 1999; Tian et al., 2009). Takođe, ovi autori navode da je jedan od razloga manje učestalosti izolata iz podgrupe II i taj što su biološki nestabilniji i teži za detekciju od izolata iz podgrupe I. Izolati koji pripadaju podgrupi I se nazivaju još i „*heat-resistant*“ (otporni na visoku temperaturu), dok su izolati II podgrupe „*heat-sensitive*“ (osetljivi na visoku temperaturu), što ukazuje i podatak da su izolati II podgrupe detektovani u uzorcima pretežno sakupljenim u jesen (Fraile et al., 1997). Kao posledica svega toga može se zaključiti da trenutno manja brojnost izolata podgrupe II ne odgovara pravom stanju i da su ovi izolati mnogo brojniji, nego što se pretpostavlja (Tian et al., 2009). U prilog tome idu i skorašnja istraživanja koja ukazuju da se izolati iz podgrupe II javljaju češće, kao i da su šire rasprostranjeni nego što se ranije mislilo (Yu et al., 2005; Tian et al., 2009). Međutim, Roossinck et al. (1999) pretpostavljaju da je manja brojnost izolata podgrupe II posledica brže evolucije izolata u okviru podgrupe I, i da zbog toga izolati podgrupe I imaju širi krug domaćina i veću zastupljenost.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci parcijalnog MP gena potvrdilo je postojanje diverziteta u okviru populacije CMV u Srbiji. Rekonstruisano filogenetsko stablo pakazuje grupisanje izolata CMV u dve glavne podgrupe (I i II) i dve podgrupe u okviru podgrupe I (IA i IB), što je saglasno ispitivanjima drugih autora (Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Davino et al., 2012; Nouri et al., 2014). Najveći broj izolata CMV iz Srbije grupisao u okviru podgrupe IA. Grupa od četiri izolata poreklom iz Srbije svrstana je u II podgrupu CMV. Vrednosti genetičke udaljenosti između izolata u okviru IA, IB i II podgrupe su relativno niske i ukazuju na nizak nivo različitosti, dok više vrednosti genetičke udaljenosti između izdvojenih podgrupa

ukazuju na viši stepen divergentnosti i potvrđuju grupisanje u filogenetskom stablu (**García-Arenal et al., 2001**). Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci MP gena pokazuje da se izolat 540-10 grupisao u IA podgrupu CMV, što nije bio slučaj na osnovu sekvenci CP gena gde se grupisao zajedno sa izolatima podgrupe II. Na ovaj način potvrđeni su rezultati dobijeni na osnovu stepena sličnosti kod ispitivanog izolata. Ovakav način grupisanja ukazuje na rekombinaciju koja se dogodila u okviru RNK 3 segmenta. **Nouri et al. (2014)** su prilikom istraživanja populacije CMV u SAD detektovali dva izolata nastalih rekombinacijom IA i II podgrupe ovog virusa. Međutim, za razliku od srpskog izolata 540-10 kod ovih rekombinantnih izolata MP gen je pripadao II, a CP gen IA podgrupi CMV.

U cilju potvrde rezultata dobijenih rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci MP i CP gena, rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci RNK 3 segmenta CMV. Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci RNK 3 segmenta CMV pokazalo je jasno izdvajanje glavnih molekularnih podgrupa I i II, kao i izdvajanje podgrupa IA i IB u okviru podgrupe I. Međutim, pored ovih podgrupa došlo je i do izdvajanja rekombinantne podgrupe, označene sa R1, u kojoj se svrstao izolat 540-10 poreklom iz Srbije. Ovakva podela CMV podržana je visokom homologijom između sekvenci iste podgrupe i visokim „*bootstrap*“ vrednostima. U sličnim istraživanjima prirodne populaciji CMV u Španiji utvrđeno je da oko 17% ispitivanih izolata čine rekombinanti (**Bonnet et al., 2005**). Najveći broj rekombinanata je utvrđen na RNK 3 segmentu CMV i to između izolata poreklom iz podgrupe IA i IB (**Bonnet et al., 2005**), dok su rekombinacije između II i IA utvrđene u malom broju (**Nouri et al., 2014**). Najčešći tip rekombinacija u okviru RNK 3 segmenta utvrđen je između MP gena poreklom iz IB podgrupe i CP gena poreklom iz IA podgrupe CMV (**Bonnet et al., 2005**).

Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci 2a gena jasno pokazuje grupisanje izolata CMV u dve podgrupe, I i II. U okviru podgrupe I izdvajaju se i dve podgrupe IA i IB. Ovakva podela CMV podržana je visokom homologijom između sekvenci iste podgrupe i visokim „*bootstrap*“ vrednostima, što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (**Roossinck., 2002; Lin et al., 2004; Nouri et al., 2014**). Svi izolati CMV iz Srbije grupisali su se u okviru podgrupe IA, čime je potvrđeno da se

odabrani izolati grupišu u jednu molekularnu grupu na šta je ukazala analiza sekvenci ovog regiona.

Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci 2b gena potvrdio je postojanje diverziteta u okviru ovog regiona CMV u Srbiji. Filogenetsko stablo jasno pokazuje grupisanje izolata CMV u tri različite podgrupe (IA, IB i II), što je u potpunosti sa rezultatima drugih autora (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Nouri et al., 2014**). Genetički diverzitet u filogenetskom stablu rekonstruisanom u toku ovih istraživanja na osnovu sekvenci 2b gena bio je dva puta veći od diverziteta utvrđenog na osnovu sekvenci MP i CP gena, što je saglasno sa činjenicom da je divergentnost sekvenci u okviru RNK 2 segmenta najveća (**Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Takođe, **Kim et al. (2014)** ukazali su na veći diverzitet u okviru 2b gena u odnosu na MP i CP gen. Rezultati filogenetske analize potvrđuju grupisanje izolata poreklom iz Srbije u dve molekularne grupe koje su prethodno ustanovljene na osnovu analize sekvenci ovog regiona. Najveći broj izolata CMV iz Srbije grupisao se u okviru podgrupe IA, dok je grupa od četiri izolata svrstana u II podgrupu CMV. Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci 2b gena pokazuje da su se izolati 581-11, 101-08, 1-12 i 267-13 grupisali u II podgrupu CMV, što nije bio slučaj na osnovu analiza 2a gena gde su se svi izolati grupisali u podgrupu IA.

U cilju potvrde rezultata dobijenih rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci 2a i 2b gena, rekonstruisano je filogenetsko stablo na osnovu sekvenci RNK 2 segmenta CMV. Rekonstruisano filogenetsko stablo je pokazalo jasno izdvajanje glavnih molekularnih podgrupa I i II, kao i izdvajanje podgrupa IA i IB u okviru podgrupe I. Međutim, pored ovih podgrupa došlo je i do izdvajanja rekombinantne podgrupe, označene sa R1, u koju se svrstalo četiri izolata poreklom iz Srbije i to 581-11, 101-08, 1-12 i 267-13. Ova četiri izolata predstavljaju rekombinante haplotipa IA-II (2a-2b gen). Istraživanja populacije CMV od strane **Bonnet et al. (2005)** ukazala su na moguće rekombinacije u okviru RNK 2 segmenta, ali i da su rekombinacije češće u okviru RNK 3 segmenta u odnosu na RNK 2 segment. U populaciji CMV **Bonnet et al. (2005)** su RPA analizom utvrdili prisustvo dva rekombinovana haplotipa, IB-IA i IA-II, na osnovu analiza 5' i 3' dela 2a gena. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci RNK 2 segmenta ukazalo je na

moguće rekombinacije u okviru ovog segmenta. Kod potencijalnih rekombinantnih izolata 2a gen je pripadao IA, a 2b gen II podgrupi CMV.

Rekonstruisano filogenetsko stablo na osnovu sekvenci 1a gena jasno pokazuje grupisanje izolata CMV u dve podgrupe, I i II, gde se u okviru podgrupe I izdvajaju podgrupe IA i IB. Ovakva podela CMV podržana visokim „*bootstrap*“ vrednostima, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Nouri et al., 2014**). Vrednosti genetičke udaljenosti između izolata u okviru IA, IB i II podgrupe relativno su niske, što ukazuje na nizak nivo različitosti, dok više vrednosti genetičke udaljenosti između izdvojenih podgrupa izolata ukazuju na viši stepen divergentnosti i potvrđuju grupisanje u filogenetskom stablu. Prosečna vrednost genetičke udaljenosti u okviru IB podgrupe izolata je viša u odnosu na grupe IA i II, i nešto je niža od vrednosti između podgrupa. Ova, relativno veća vrednost diverziteta IB podgrupe u odnosu na druge dve podgrupe CMV dovela je do izdvajanja podgrupe IC u okviru postojeće IB, što je podržano i filogenetskim analiza 1a gena (**Lui et al., 2009; Kim et al., 2014**). Međutim, za sada ovakva podela podgrupe IB na IB i IC podgrupu nije prihvaćena od strane drugih autora. Rezultati filogenetske analize potvrđuju grupisanje izolata poreklom iz Srbije u tri molekularne grupe koje su prethodno ustanovljene na osnovu anlize sekvenci ovog regiona. Najveći broj izolata CMV iz Srbije grupisao u okviru podgrupe IA. Izolati 723-10 i 267-13 grupisali su se u okviru IB podgrupe, dok je grupa od četiri izolata poreklom iz Srbije svrstana je u II podgrupu CMV. U podgrupu IB, u kojoj se nalaze najčešće izolati iz Azije, svrstali su se i izolati iz Italije, Španije i Mađarske (**Gallitelli, 2000; Palukaitis and García-Arenal, 2008; Jacquemond, 2012**). Prisustvo IB podgrupe CMV predstavlja prvi nalaz ove podgrupe u Srbiji i ukazuje na potencijalno prisustvo pseudorekombinantnih izolata u populaciji CMV u našoj zemlji.

Rekonstrukcija filogenetskih stabala na osnovu sekvenci različitih segmenata (RNK 1, 2 i 3) CMV ukazala je na potencijalno prisustvo rekombinacija, dok je analiza pripadnosti ispitivanih izolata određenim molekularnim podgrupama na osnovu svih pet genskih regiona ukazala na potencijalno prisustvo pseudorekombinacija u prirodnoj populaciji ovog virusa u našoj zemlji. Identifikacija rekombinanata i pseudorekombinanata potvrđena je izdvajanjem ovih izolata iz postojećih podgrupa i grupisanjem u okviru rekombinantnih podgrupa (R1 i R2). Ovakva podela CMV

podržana visokom homologijom između sekvenci iste podgrupe i visokim „*bootstrap*“ vrednostima saglasna je sa rezultatima drugih autora (**Jacquemond et al., 2012; Tamarzizt et al., 2013**). U okviru R1 podgrupe izdvojili su se izolati kod kojih je došlo do rekombinacije ili pseudorekombinacije segmenata poreklom iz I i II podgrupe CMV. Tako su se u R1 podgrupu svrstali srpski izolati 540-10, 101-08, 581-11, 1-12 i 79-13, kineski izolat Tsh (**Chen et al., 2007**) i japanski izolat PF (**Jacquemond, 2012**). Izolat 540-10 je rekombinant između IA i II podgrupe CMV u okviru RNK 3 segmenta, dok su izolati 101-08, 581-11 i 1-12 rekombinanti u okviru RNK 2 segmenta. Izolat PF se na osnovu RNK 1 segmenta grupisao u podgrupu IB, na osnovu RNK 2 segmenta u podgrupu IA i na osnovu RNK 3 segmenta u podgrupu II (**Jacquemond, 2012**), dok se izolat Tsh na osnovu RNK 1 i 3 segmenta grupisao u podgrupu II, a na osnovu RNK 2 segmenta u IA podgrupu CMV (**Chen et al., 2007**). I izolat 79-13 poreklom iz Srbije se, kao i izolat Tsh, grupisao u podgrupu II na osnovu analiziranih sekvenci RNK 1 i 3, a u podgrupu IA na osnovu sekvenci RNK 2 segmenta, što ukazuje na postojanje pseudorekombinacije. U okviru R2 podgrupe izdvojili su se izolati kod kojih je došlo do pseudorekombinacije segmenta poreklom iz IA i IB podgrupe. Međutim, u ovu podgrupu se svrstao i srpski izolat 267-13 kod kojeg je zabeležena i rekombinacija IA i II podgrupe u okviru RNK 2 segmenta. Pored ovog izolata u R2 podgrupu svrstali su se izolati koji su ranije identifikovani kao pseudorekombinantni poreklom iz Mađarske (izolat NS), Japana (izolati 42CM i D8), Kine (izolat RZ), Koreje (izolat Mf) (**Chen et al., 2001; Liu et al., 2009; Maoka et al., 2010; Jacquemond, 2012**), kao i izolat iz Srbije (izolat 723-10). Izolati NS, 42CM, RZ i Mf se na osnovu RNK 1 segmenta grupišu u podgrupu IB, a na osnovu RNK 2 i 3 segmenta grupišu u IA podgrupu CMV (**Liu et al., 2009; Maoka et al., 2010; Jacquemond et al., 2012**) kao i izolat 723-10 iz Srbije, dok se izolat D8 na osnovu RNK 1 i 2 segmenta grupiše u podgrupu IB, a na osnovu RNK 3 segmenta u IA podgrupu CMV (**Liu et al., 2009; Jacquemond et al., 2012**). Za razliku od rekombinacija između IA i IB podgrupe koje su zabeležene u većem broju slučajeva u prirodnoj populaciji CMV u svetu (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005, Tamarzizt et al., 2013**), rekombinacije između I i II grupe zabeležene su kod dva američka izolata (**Nouri et al., 2014**) i kod jednog španskog izolata (**Bonnet et al., 2005**). Manja zastupljenost rekombinacija i pseudorekombinacija između I i II podgrupe u populaciji CMV u odnosu na rekombinante i

pseudorekombinante između IA i IB podgrupe ovog virusa može se objasniti činjenicom da su izolati koji pripadaju II podgrupi osetljiviji na visoke temperature (Fraile et al., 1997; Tamarzizt et al., 2013), dok su izolati podgrupe I šire rasprostranjeni i imaju prednost prilikom mešanih zaraza zbog brže akumulacije virusnih čestica u biljkama domaćinima (Wang et al., 2002; Chen et al., 2007). Takođe, veliki diverzitet između I i II podgrupe CMV jedan je od bitnih činilaca koji utiče na opstanak izolata nastalih rekombinacijom regiona ili pseudorekombinacijom segmenata u populaciji ovog virusa (Chen et al., 2007).

Od 19 izolata detaljno ispitanih filogenetskim analizama (Tabela 12) osam imaju haplotip IA; IA-IA; IA-IA, dok kod četiri nije analiziran 1a gen te ovi izolati imaju haplotip IA-IA; IA-IA. Do rekombinacije je došlo kod četiri izolata od kojih izolat 581-11 poreklom iz *Capsicum annuum*, izolat 101-08 poreklom iz *Solanum lycopersicum* i izolat 1-12 poreklom iz *Peperomia tuisana* se mogu predstaviti kao haplotip II; IA-II; II-II, dok se izolat 540-10 poreklom iz *Wisteria sinensis* se može predstaviti kao haplotip IA; IA-IA; IA-II. Pseudorekombinacije su zabeležene kod izolata 723-10 poreklom iz *Capsicum annuum*, te se ovaj izolat može predstaviti kao haplotip IB; IA-IA; IA-IA i izolata 79-13 poreklom iz *Tulipa* sp. koji se može predstaviti kao haplotip II; IA-IA; II-II. Poslednju grupu rekombinanata predstavlja izolat 267-13 poreklom iz *Phaseolus vulgaris* kod kojeg je došlo do rekombinacije i pseudorekombinacije pri čemu ovom izolatu odgovara haplotip IB; IA-II; IA-IA. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima ukazuju na manju zastupljenost rekombinanata i pseudorekombinanata u populaciji CMV, što je bio slučaj i u populacijama u Španiji, Kaliforniji, Americi i Koreji (Fraile et al., 1997; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Kim et al., 2014; Nouri et al., 2014). Jedini izuzetak predstavlja populacija CMV u Tunisu gde su Tamarzizt et al. (2013) utvrdili da većinu analizirane populacije čine izolati kod kojih su utvrđene pseudorekombinacije.

6.5. Karakterizacija odabranih izolata primenom RFLP metode

Digestija PCR produkata odabranih izolata CMV koji se nalaze na različitim RNK pokazala se veoma korisnom metodom za razlikovanje izolata koji pripadaju različitim podgrupama CMV i utvrđivanje rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u okviru prirodne populacije ovog virusa. Poređenje restrikcionih profila, koji

daju restrikcioni enzimi *SfcI*, *BssSI* i *HaeIII*, omogućilo je grupisanje izolata u odgovarajuće podgrupe CMV na osnovu CP gena. Enzimom *SfcI* dobijeni su različiti restrikcioni profili na osnovu kojih je izvršeno razlikovanje IA od IB i II podgrupe CMV, dok su enzimi *BssSI* i *HaeIII* izvršili razlikovanje izolata I i II podgrupe ovog virusa. Slični rezultati dobijeni su u drugim istraživanjima korišćenjem restrikcioni enzima poput *AluI*, *BamHI*, *BsuRI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HhaI*, *HindIII*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaII*, *MspI*, *RsaI*, *SacI*, *Sall*, *Sau3AI* i *XhoI*. Pomenuti restrikcioni enzimi su uglavnom omogućavali razlikovanje između izolata I i II podgrupe CMV na osnovu CP gena (**Rizos et al., 1992; Fakhfakh et al., 1999; Ryu et al., 2002; Choi et al., 2004; Eiras et al., 2004; Srivastava and Raj, 2004; Bashir et al., 2006; Chen et al., 2007; Akhtar et al., 2008; Berniak et al., 2009; Parrella and Sorentino, 2009; Koolivand et al., 2012; Tamarzizt et al., 2013**). Digestija dela 2a gena restrikcijom enzimom *MluI* omogućila je razlikovanje izolata IA, IB i II podgrupe CMV na osnovu dobijenih različitih restrikcioni profila. **Finetti Sialer et al. (1999)** i **Berniak et al. (2009)** su dobili iste rezultate koristeći isti restrikcioni enzim. U okviru ovih istraživanja „*in silico*“ i „*in situ*“ RFLP metodom korišćenjem restrikcioni enzima *MluI* nije detektovan ni jedan izolat iz II podgrupe poreklom Srbije, čime su potvrđeni rezultati dobijeni filogenetskom analizom 2a gena na osnovu koje se svi izolati iz naše zemlje grupišu u IA podgrupu CMV. Digestija pomoću restrikcioni enzima *BaeI* i *PfMI*, odnosno *Sall* i *StuI*, odnosno *HindIII* i *SacII*, kako u „*in silico*“ tako i u „*in situ*“ RFLP analizi, omogućila je razlikovanje izolata različitih podgrupa na osnovu MP, odnosno 2b, odnosno 1a gena. Restrikcioni enzimi *BaeI* i *StuI* izvršili su razlikovanje izolata IA, IB i II podgrupe, restrikcioni enzim *HindIII* omogućio je razlikovanje izolata IA podgrupe od izolata IB i II podgrupe, dok su restrikcioni enzimi *PfMI*, *SacII* i *Sall* vršili razlikovanje izolata I i II podgrupe CMV. Istraživanja **Tamarzizt et al. (2013)** koja su uključila fragmente sve tri RNK pokazuju slične rezultate pri čemu je razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV izvršeno korišćenjem više restrikcioni enzima što je bio slučaj i u ovim istraživanjima. Upotrebom više od jednog restrikcioni enzima obrazovao se jedinstven restrikcioni profil koji je bio karakterističan za svaku podgrupu CMV. Zbog različitih prajmera koji su ovi autori koristili, restrikcioni enzimi su se razlikovali od enzima korišćenih u ovim istraživanjima, pri čemu enzimi korišćeni za razlikovanje izolata različitih podgrupa CMV u okviru istraživanja **Tamarzizt et al.**

(2013), na osnovu RNK 1 i RNK 2 segmenata, su mogli samo da izvrše razlikovanje između izolata IA i IB podgrupe jer korišćeni prajmeri nisu umnožavali izolate iz II podgrupe CMV. Poput prethodnih autora, **Chen et al. (2007)** su, korišćenjem odgovarajućeg restrikcionog enzima za svaku od tri RNK, odredili grupisanje izolata CMV u odgovarajuće podgrupe ovog virusa na osnovu dobijenih restrikcionih profila. Pomenuti autori su iskoristili RFLP metodu „*in situ*“ u cilju potvrde rezultata dobijenih analizom sekvence i filogenetskim analizama i tako potvrdili prisustvo pseudorekombinacija kod izolata Tsh iz *Solanum lycopersicum* poreklom iz Kine. Na osnovu ovakvog pristupa, koji pruža veoma pouzdan dokaz o prisustvu rekombinacija i pseudorekombinacija u prirodnoj populaciji CMV, potvrđene su rekombinacije kod izolata 540-10, 101-08, 581-11 i 1-12, pseudorekombinacije kod izolata 723-11 i 79-13 i rekombinacije i pseudorekombinacije kod izolata 267-13 poreklom iz Srbije. Iako za razlikovanje izolata I i II podgrupe CMV postoji veći broj opisanih metoda poput serologije, molekularne hibridizacije, RT-PCR i RT-PCR-RFLP (**Gallitelli, 1998**), većina njih se donedavno zasnivala na CP genu, koji se smatra informativnijim za filogenetske analize u odnosu na druge gene ili nekodirajuće regione ovog virusa (**Moury et al., 2004**). Međutim, činjenica da se svaka od tri RNK posebno evolutivno razvijala (**Roossinck, 2002**) kao i da rekombinantni i pseudorekombinantni izolati čine preko 11% populacije ovog virusa (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**), ukazuje da je veoma značajno razviti brze i pouzdane metode koje će omogućiti razlikovanje izolata IA, IB i II podgrupe ne samo na osnovu CP gena već i na osnovu drugih kodirajućih i nekodirajućih regiona genoma ovog virusa (**Finetti Sialer et al., 1999; Tamarzizt et al., 2013**). Razvijanje i primena RFLP metode omogućava lakše proučavanje strukture populacije ne samo ovog već i drugih virusa. Osim toga, prednost primene RFLP metode u odnosu na druge molekularne metode je i taj, što za nju nije neophodno prethodno sekvenciranje i što je njome moguće detektovati greške nastale u procesu sekvenciranja. Ova osobina iskorišćena je za proveru mešanih infekcija u prirodnoj populaciji CMV u Srbiji. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da su svi odabrani izolati imali isti restrikcioni profil u svim ponavljanjima, čime je isključeno prisustvo mešane infekcije kod rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata poreklom iz Srbije. Istu metodu za proveru mešane infekcije koristili su **Tamarzizt et al. (2013)**. Iako RT-PCR-RFLP ponekad može

navesti na pogrešno tumačenje rezultata (**Eiras et al., 2004; Tamarzizt et al., 2013**) korišćenjem više od jednog restriktionog enzima izbegavaju se greške ovog tipa, te se ova metoda može preporučiti kod analiza većeg broja uzoraka jer je jeftinija u odnosu na druge metode poput sekvenciranja.

6.6. RDP analize rekombinacije

Rekombinacije i pseudorekombinacije predstavljaju jedan od najvažnijih evolucionih mehanizama izmene genetičkog materijala, pre svega kod virusa sa višedelnim genomom, kakav je i CMV (**White et al., 1995; Bonnet et al., 2005**). Analizom celog genoma CMV, **Koundal et al. (2011)** utvrdili su da se najveći broj mesta rekombinacije nalazi u okviru 2a gena, zatim u 2b, 1a i MP genu, a najmanje u CP genu. Primenom RDP softvera i analizom sekvenci izolata CMV poreklom iz Srbije potvrđeno je da je u prirodnoj populaciji ovog virusa u našoj zemlji prisutna izmena genetičkog materija u vidu rekombinacija. Analiza sekvenci odabranih izolata CMV ukazala je da izolati 101-08, 581-11, 1-12 i 267-13 predstavljaju pripodne rekombinante između IA i II podgrupe CMV pri čemu 2a gen pripadaju IA podgrupi, a 2b gen II podgrupi. Takođe, izolat 540-10 je prirodni rekombinant između podgrupa IA i II CMV, pri čemu MP gen potiče od izolata iz IA podgrupe dok CP gen pripada II podgrupi. **Shi et al. (2002)** i **Maoka et al. (2010)** sugerišu da RNK 2 ima ključnu ulogu u evoluciji biljnih virusa koja se najčešće dovodi u vezu sa opstankom izolata nastalih rekombinacijom ili pseudorekombinacijom. Za njihov opstanak ključno je da 2b gen, koji ima ulogu supresora koji sprečava odbrambene mehanizme biljke domaćina i omogućava širenje virusa, potiče od IA podgrupe jer su izolati iz ove podgrupe virulentniji u odnosu na izolate iz II podgrupe. **Maoka et al. (2010)** smatraju da izolati kod kojih RNK 1 i 2 segmenti potiču od izolata iz IA, a RNK 3 od izolata iz II podgrupe su stabilniji od drugih izolata nastalih rekombinacijom ili pseudorekombinacijom, jer 1a i 2a protein prave bolji replikacioni kompleks ukoliko imaju homologo poreklo. Do sličnih rezultata razmene genetičkog materijala između različitih podgrupa u prirodnoj populaciji CMV došli su i autori **Sarcristán et al. (2004)**, **Chen et al. (2007)** i **Nouri (2012)**, što ukazuje da iako su ovi mehanizmi izmene genetičkog materijala ređi u okviru prirodne populacije svakako utiču na dalju evoluciju i širenje kruga domaćina ovog virusa. Izolati nastali rekombinacijom ili pseudorekombinacijom između različitih

podgrupa CMV pokazuju prednost u prilagođavanju na nove biljke domaćine (**Fraile et al., 1997; Bonnet et al., 2005**). Mogući razlog za manju zastupljenost rekombinanata ili pseudorekombinanata između I i II podgrupe je taj što izolati koji pripadaju II podgrupi su osjetljiviji na visoke temperature, te je ovaj vid izmene prisutan pretežno u regionima sa umerenom klimom (**Tamarzizt et al., 2013**), poput one zastupljene u Srbiji. Utvrđeno je da pseudorekombinacije i rekombinacije između IA i IB podgrupe CMV su prisutne u većem procentu u prirodnoj populaciji CMV u svetu (**Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005, Tamarzizt et al., 2013**). Analizama koje su sproveli **Chen et al. (2007)** utvrđeno je postojanje izolata u kojem su prisutne pseudorekombinacije i rekombinacije, pri čemu rekombinovani ili pseudorekombinovani fragmenti mogu da potiču bilo od IA, IB ili II podgrupe CMV.

6.7. Uticaj evolutivnih parametara na populaciju CMV

Z vrednosti pokazuju da na sve testirane genske regione CMV poreklom iz Srbije deluje negativna („*purifying*“) selekcija. Najveća Z vrednost od -3,314 zabeležena je kod 2a gena, dok su se vrednosti Z za 1a, 2b, MP i CP gen kretale od -13,501 do -4,267. Rezultati analiza **Lin et al. (2004)**, **Koundal et al. (2011)** i **Nouri (2012)** pokazuju da svi genski regioni CMV, odnosno prirodna populacija CMV, podležu negativnoj selekciji koja predstavlja dominantnu evolucionu silu. Takođe, istraživanja u Kaliforniji pokazuju da su geni na RNK 2 (2a i 2b) najvarijabilniji po parametrima populacione genetike, odnosno da su proteini koje oni kodiraju tolerantniji na promene u aminokiselinskom sastavu u odnosu na gene na RNK 1 (1a) i RNK 3 (MP i CP) (**Lin et al., 2004**). Imajući u vidu da na prirodnu selekciju mogu da utiču brojni faktori poput građe genoma, biljke domaćina i vektora, **Garcia-Arenal et al. (2001)** su na osnovu rezultata brojnih autora, koji su analizirali genome različitih biljnih virusa među kojima je i CMV, ukazali da negativna selekcija preovlađuje tokom evolucije. Međutim, istraživanja **Lin et al. (2003)** i **Liu et al. (2009)**, koja su obuhvatila izolate CMV poreklom iz različitih biljnih vrsta i različitog geografskog porekla, pokazala su da 1a, 2a, MP i CP geni podležu negativnoj selekciji, dok se 2b gen nalazi pod uticajem pozitivne selekcije. Ovi podaci ukazuju da 2b gen ima veću toleranciju na mutacije, da je nastao relativno nedavno, kao i da njegova evolucija još nije završena (**Lin et al., 2003; Liu et al., 2009**). Iako je utvrđeno da 1a, 2a i CP gen podležu negativnoj

selekciji, **Moury (2004)** je analizirajući sekvence izolata CMV identifikovao delove u okviru sekvenci izolata pomenutih gena koji podležu pozitivnoj selekciji. Isti autori navode da identifikovani delovi u okviru sekvenci CP gena, koji su pod uticajem pozitivne selekcije, nisu podjednako zastupljeni već da se oni razlikuju u zavisnosti od podgrupe ovog virusa pri čemu izolati iz IA i II podgrupe podležu većem selekcionom pritisku nego izolati iz podgrupe IB. Testiranjem svakog para sekvenci odabranih izolata CMV iz Srbije utvrđeno je da preovladava negativna selekcija. Jedini izuzetak primećen je kada su testirane međusobno sekvence izolata 115-08 i 471-09, na osnovu analiza sekvenci CP gena, na koje utiče slaba pozitivna selekcija. Kako ove sekvence sa ostalim analiziranim sekvencama podležu uticaju negativne selekcije potrebno izvršiti njihovo testiranje primenom drugog statističkog testa. U prilog tome idu i istraživanja **Moury (2004)** gde rezultati analiza pokazuju različit uticaj selekcije u zavisnosti od primenjenog selekcionog modela.

6.8. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV

Biološko testiranje devet odabranih izolata CMV urađeno je u cilju provere mogućnosti razlikovanja izolata različitih podgrupa CMV na osnovu reakcije test biljaka. Većina odabranih izolata (449-12, 201-11, 570-11, 723-10, 670-08 i 650-07) pripadala je molekularnoj podgrupi IA, dok su se preostala tri izolata (581-11, 101-08 i 1-12) pripadala u II pogrupi CMV. Pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV određivana je filogenetskim analizama sekvenci CP gena. Između ispitivanih izolata postojala je razlika u tipu i vremenu ispoljavanja simptoma, ali su svi izazvali tipove simptoma koji su ranije zabeleženi u literaturi (**Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002; Tóbiás and Tulipan, 2002; Davino et al., 2005; Sudhakar et al., 2006; Akhtar et al., 2008; Pratap et al., 2008; Samad et al., 2008; Chou et al., 2009; Parrella and Sorrentino, 2009; Kim et al., 2010; Geetanjali et al., 2011; Han et al., 2011; Iqbal et al., 2011; Zitikaitė et al., 2011; Ali et al., 2012; Vučurović, 2012**). Iako je biološko testiranje ukazalo na fenotipsku varijabilnost ovog virusa u našoj zemlji, ona se nije mogla povezati sa molekularnom podgrupom ispitivanog izolata.

Test biljke *N. glutinosa* različito su reagovala na inokulacije ispitivanim izolatima. Jedna grupa izolata (449-12, 201-11 i 1-12) izazvala je pojavu izraženog mozaika i deformacija lisne površine, dok su ostali izolati prouzrokovali blagi mozaik

koji je kod izolata 570-11, 670-08, 723-10 i 581-11 bio praćen deformacijama lista. Navedeni simptomi na *N. glutinosa* saopšteni su i od strane velikog broja autora (Wahyuni et al., 1992; Davino et al., 2005; Kim et al., 2010; Iqbal et al., 2011; Zitikaite et al., 2011; Han et al., 2012; Kumari et al., 2012; Pratap et al., 2012). Iako se *N. glutinosa* često navodi kao dijagnostička vrsta (Edwards and Gonsalves, 1983; Owen and Palukaitis, 1988; Chou et al., 2009) jer reaguje pojavom različitih simptoma u zavisnosti od podgrupe virusa, u toku ovih istraživanja na osnovu dobijenih simptoma nije bilo moguće izvršiti grupisanje izolata u odgovarajuću podgrupu CMV. Pojava sistemskih simptoma na test biljkama *N. tabacum* 'Banat', *N. tabacum* 'Prilep' i *N. tabacum* 'Samsun' posle inokulacije sa izolatima CMV bila je u skladu sa rezultatima drugih autora (Duduk, 2008; Iqbal et al., 2011; Vučurović i sar., 2011; Han et al., 2012; Milojević i sar., 2013). Ispitivani izolati su se međusobom razlikovali po intezitetu mozaika na test biljkama, mada je uglavnom dolazilo do pojave blagog mozaika. Izolat 1-12 jedini je izazvao pojavu izraženog mozaika na *N. tabacum* 'Banat', a izolati 201-11 i 570-11 su pored mozaika izazvali i različite deformacije lisne površine u vidu njene redukcije i/ili klobučavosti lista. Izolati 650-07, 101-08 i 581-11 izazvali su i pojavu hlorotičnog prošaravanja, dok su izolati 570-11, 581-11 i 1-12 reagovali pojavom izraženog mozaika na test biljci *N. tabacum* 'Prilep'. Pojedini izolati, na ovoj test biljci, pored mozaika prouzrokovali su i zadržavanje zelene boje oko nerava (201-11 i 570-11) ili hlorotično prošaravanje lista (723-10). Pored mozaika, u zavisnosti od izolata na *N. tabacum* 'Samsun' zabeležena je pojava sistemskih hlorotičnih pega, deformacije lisne površine, nitavost i klobučavost lista. Kod mehanički inokulisanih biljka *N. debneyii*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. alata*, *N. sylvestris* primetne su bile razlike između izolata. Izolati su se razlikovali po infektivnosti za *N. alata* i *N. sylvestris*, ili po jačini i tipu simptoma na *N. debneyii*, *N. rustica*, *N. benthamiana* i *N. clevelandii*. Ovakve reakcije test biljaka navode se i u literaturi (Wahyuni et al., 1992; Davino et al., 2005; Duduk, 2008; Kim et al., 2010; Iqbal et al., 2011; Vučurović i sar., 2011; Zitikaite et al., 2011; Han et al., 2012; Kumari et al., 2012; Pratap et al., 2012). Iako Zhang et al. (1994a) navode da izolati koji pripadaju podgrupi I izazivaju izraženije simptome na test biljkama duvana za koje je karakteristično da se ranije ispoljavaju u poređenju sa izolatima iz II podgrupe, u toku

ovih istraživanja ni jedna test biljka duvana se nije pokazala pogodnom za razlikovanje I od II podgrupe CMV.

Kod ostalih biljaka iz familije Solanaceae, kod kojih je došlo do ispoljavanja simptoma, svi odabrani izolati prouzrokovali su pojavu blagog do izraženog mozaika. Test biljka *C. annuum* 'Dukat' reagovala je i pojavom klobučavosti (izolati 670-08 i 201-11), nekroze i deformacije lisne površine (izolat 201-11) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Davino et al., 2005; Samad et al., 2008; Kim et al., 2010; Iqbal et al., 2011; Kumari et al., 2012; Pratap et al., 2012). Izolati 670-08 i 201-11 jedini su prouzrokovali klobučavost lista na *S. lycopersicum* 'San Pjer', dok je izolat 201-11 prouzrokovao klobučavost lista i na *S. nigrum*. Iako Vučurović i sar. (2011) ne navode pojavu simptoma na *S. lycopersicum* 'San Pjer', simptomi u vidu sistemičnog mozaika, deformacija i nekroze zabeleženi su od strane mnogih autora (Wahyuni et al., 1992; Samad et al., 2008; Kim et al., 2010; Zitikaite et al., 2011; Han et al., 2012; Kumari et al., 2012; Pratap et al., 2012). Pojava nitavosti na mehanički inokulisanim biljkama paradajza dugo se smatrala povezanom sa izolatima koji pripadaju podgrupi I (Sudhakar et al., 2006; Akhtar et al., 2008; Pratap et al., 2008), međutim Geetanjal et al. (2011) navode da pojavu ovog simptoma mogu da izazovu i izolati iz II podgrupe. Ni jedan od odabranih izolata, bilo da pripada I ili II podgrupi CMV, nije izazvao pojavu nitavosti u toku ovih istraživanja. Pored razlika u intezitetu mozaika na osnovu reakcije test biljke *P. floridana*, uočena je i razlika i u tipu ispoljavanja simptoma. Izolati 201-11, 670-08 i 570-11 prouzrokovali su deformaciju lisne površine u vidu klobučavosti, nitavosti i/ili uvijenosti lista. Pojavu mozaika saopštili su i autori Han et al. (2012), dok izolati Samad et al. (2008) nisu uspeli da zaraze ovu test biljku.

Nakon mehaničkih inokulacija biljaka roda *Chenopodium* i *G. globosa*, ispitivanim izolatima, zabeležena je pojava lokalnih (hlorotičnih i nekrotičnih pega) i sistemičnih (nitavost i kržljivost) simptoma. Svi odabrani izolati uniformno su izazvali pojavu lokalnih simptoma na *C. amaranticolor*, *C. quinoa* i *C. murale*, što je saglasno sa rezultatima i drugih autori (Davino et al., 2005; Duduk, 2008; Kim et al., 2010; Vučurović i sar., 2011; Han et al., 2012; Pratap et al., 2012). Kod test biljke *G. globosa* uočene su razlike između izolata gde je većina reagovala je pojavom lokalnih nekrotičnih pega, dok kod izolata 101-08, 670-08 i 1-12 nije došlo do pojave simptoma. Međutim, kako je prisustvo lokalnih nekrotičnih pega kao i izostanak simptoma

zabeležen i kod izolata iz IA i II podgrupe variranja simptoma na ovoj test biljci nije bilo povezano sa podgrupom virusa. Prisustvo lokalnih nekrotičnih pega (**Wahyuni et al., 1992; Samad et al., 2008; Vučurović i sar., 2011; Zitikaite et al., 2011**) ili potpuno odsustvo simptoma (**Wahyuni et al., 1992; Dukić et al., 2002; Samad et al., 2008**) zabeleženo je i od strane drugih autora koji takođe nisu uočili vezu između simptoma na *G. globosa* i podgrupe kojoj izolat pripada. Pored lokalnih simptoma **Wahyuni et al. (1992)** i **Samad et al. (2008)** navode da CMV na *G. globosa* može prouzrokovati i pojavu mozaika i deformaciju lisne površine. A na test biljci *C. foetidum*, pored lokalnih simptoma (**Zitikaite et al., 2011**) zabeleženi su i sistemski simptomi (**Krstić et al., 2002; Vučurović i sar., 2011**). Kod svih izolata, sem 650-07 i 570-11 koji nisu izazvali pojavu simptoma na datoj biljci, došlo je do pojave nitavosti, a kod izolata 201-11 i 1-12 uočena je kržljivost biljke.

Na mehaničkim inokuliranim biljkama iz porodice Cucurbitaceae uočavale su se razlike između izolata po infektivnosti za *C. lanatus* 'Sugar baby', *C. pepo* 'Beogradska', *C. pepo* 'Zucchini' ili po jačini i tipu simptoma na preostalim test biljkama. Izolati 101-08, 670-08, 723-10 i 1-12 nisu bili infektivni za *C. lanatus* 'Sugar baby', 101-08 i 1-12 za *C. pepo* 'Beogradska' i 670-08 i 1-12 za *C. pepo* 'Zucchini'. Simptomi u vidu lokalnih nekrotičnih pega na kotiledonima i sistemskih simptoma u vidu hlorotičnih pega, mozaika, zadržavanje zelene boje oko nerava, nekroze i uvijenosti lista koji su se pojavili na inokuliranim test biljkama odgovarali su simptomima zabeleženim za CMV i od strane drugih autora (**Provvidenti and Schroeder, 1970; Rahimian and Izadpanah, 1978; Francky et al., 1979; Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002; Tóbiás and Tulipan, 2002, Vučurović i sar., 2011; Vučurović, 2012**).

Iako su u literaturi opisane kao pogodne test biljke i koriste se za potvrdu prisustva CMV ni jedan odabran izolat nije izazvao pojavu simptoma na *D. stramonium*, *D. metel*, *P. x hybrida*, *P. vulgaris* 'Poboljšani gradištanac' i *P. sativum* 'Mali provansalac'. Izostanak pojave simptoma na ovim test biljkama saopštili su i autori **Vučurović i sar. (2011)**. Izolati iz drugih delova sveta na ovoj grupi test biljaka izazvali su različite simptome. Tako, na biljkama iz roda *Datura* CMV može da izazove pojavu lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pega i prstenova ili sistemskih simptoma u vidu mozaika i deformacije lisne površine (**Wahyuni et al., 1992, Samad et al., 2008; Kim**

et al., 2010; Iqbal et al., 2011; Zitikaite et al., 2011; Han et al., 2012). Han et al. (2012) i Pratap et al. (2012) na test biljci *P. x hybrida* su zabeležili simptome hloroze, prosvetljavanja nerava i mozaika, dok su Kim et al. (2010) i Zitikaite et al. (2011) na *P. vulgaris* i *P. sativum* zabeležili simptome u vidu lokalnih nekrotičnih pega i mozaika. Prisustvo simptoma na *P. sativum*, a odsustvo na *P. vulgaris* zabeležili su Davino et al. (2005).

Iako je u našoj zemlji ranije ispitivan krug domaćina ovog virusa (Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002, Vučurović i sar., 2011), značajan doprinos istraživanja sprovedenih u ovom radu je taj što je obuhvaćen veći broj izolata koji pripadaju različitim podgrupama CMV. Biološka karakterizacija, kao fenotipski marker, ukazala je na priličnu varijabilnost populacije CMV u Srbiji. Bez obzira na detaljnu molekularnu karakterizaciju obavljenu u okviru ove disertacije, nije bilo moguće povezati biološke osobine sa genotipskim razlikama između podgrupa ispitivanih izolata. Međutim, kasnija istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pokazala su da su izolati koji su odabrani kao predstavnici II podgrupe CMV u stvari rekombinanti haplotipa II; IA-II; II-II. Kako se genom CMV sastoji od pet gena koji kodiraju proteine koji su multi-funkcionalni, rekombinacija u okviru genoma sigurno je jedan od razloga zbog kojeg se ni jedna korišćena test biljka nije pokazala pogodnom za razlikovanje podgrupa ovog virusa. Iako istraživanja u okviru ove disertacije nisu omogućila da se na osnovu različitih simptoma na određenoj test biljci izvrši razlikovanje podgrupa ovog virusa, ukazala su da bi u budućnosti trebalo prvo utvrditi pripadnost izolata odgovarajućoj podgrupi CMV na osnovu svih pet gena ovog virusa u cilju pronalaženja odgovarajućih test biljka koje bi ukazala na moguću biološku varijabilnost.

6.9. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija satRNK

Detekcija i identifikacija satRNK izvršena je parom specifičnih prajmera CMVsat-fwd/CMVsat-rev (Škorić et al., 1996) koji amplifikuju fragment od 334 do 390 nt. Prisustvo amplicona očekivane veličine zabeleženo je kod tri izolata poreklom iz Srbije: 101-08-satRNA i AR1-12-satRNA iz paradajza i 1-12-satRNA iz *P. tuisana*. Rezultati molekularne identifikacije BLAST analizom, potvrdili su pripadnost svih ispitivanih izolata CMV-satRNK na osnovu pokazane sličnosti od 86 do 98% sa izolatima CMV-satRNK iz drugih delova sveta. Iako je prisustvo satRNK karakteristika

nekim izolata ovog virusa (Choi et al., 2011; Feng et al., 2012), njena detekcija u okviru ovih istraživanja predstavlja prvi nalaz u Srbiji. Na osnovu analize CP gena ustanovljeno je da izolati CMV iz Srbije u kojima je detektovana satRNK pripadaju IA (AR1-12) i II (101-08 i 1-12) podgrupi ovog virusa, dok na osnovu analize svih pet regiona gemona CMV utvrđeno da su izolati 101-08 i 1-12 ujedno i izolati kod kojih je došlo do rekombinacije u okviru RNK 2 segmenta. Prisustvo satRNK kod izolata koji pripadaju različitim podgrupama CMV, na osnovu CP gena, utvrđeno je i u Argentini (Atencio et al., 1997). Takođe, uočeno je da se izolati CMV kod kojih nije detektovana satRNK lakše održavaju u prirodi od onih kod kojih je utvrđeno njeno prisustvo. Međutim, postoje razlike u održivosti izolata CMV u kojima je detektovana satRNK u prirodi, pri čemu je utvrđeno da su satRNK koje pripadaju nekrogenom soju stabilnije u populaciji u odnosu na one iz običnog soja (García-Arenal et al., 2000).

Prisustvo satRNK detektovano je u preko 100 izolata CMV u različitim geografskim područjima i na različitim biljnim vrstama (Kouadio et al., 2013). Za razliku od CMV kojeg karakteriše sopstvena lokalna dinamika u pogledu nastajanja i nasumična rekolonizacija iz lokalnih ili udaljenih rezervoara, populacija CMV-satRNK je svuda ista, nediferencirana (Aranda et al., 1993; Grieco et al., 1997). Genetska struktura i dinamika populacije CMV i njegove satRNK nisu povezane, pri čemu se satRNK širi epidemijski kao hiperparazit u populaciji CMV (Alonso-Prados et al., 1998). Ovakav odnos između virusa i njegove satRNK nije uobičajan na šta ukazuje povezanost *Panicum mosaic virus* (PMV) i njegove satRNK (Cabrera et al., 2000). Osnovna razlika između ovih satRNK je u načinu prenošenja gde se CMV-satRNK prenosi neperzistentno vašima, dok se PMV-satRNK prenosi mehanički. Iako postoje različiti načini grupisanja CMV-satRNK preovladava podela na osnovu tipa simptoma, odnosno u zavisnosti od toga da li satRNK progresivno pojačava ili smanjuje simptome prouzrokovane CMV (García-Arenal et al., 1999). Tako je na osnovu simptoma koje satRNK prouzrokuje na biljkama paradajza izvršena podela na nekrogeni i obični soj (Grieco et al., 1997; Betancourt et al., 2011). Međutim, uticaj satRNK na replikaciju, patogenost kao i na ekspresiju simptoma u velikoj meri zavisi od biljke domaćina i soja CMV (Crescenzi et al., 1993; Jordà et al., 1992; Grieco et al., 1997; García-Arenal et al., 1999; García-Arenal et al., 2000; Palukaitis et al., 2003; Simon et al., 2004; Choi et al., 2011). U prilog tome idu i istaživanja Betancourt et al. (2011) koja su

pokazala da se simptomi na biljkama dinje nisu razlikovali u zavisnosti od toga da li se radilo o nekrogenom ili običnom soju satRNK. Iako satRNK ne kodira ni jedan funkcionalni ORF, opšte je prihvaćeno da njeno prisustvo u najvećem broju slučajeva ima katastrofalne posledice po proizvodnju, pre svega na proizvodnju paradajza, paprike i tikava (Škorić et al., 1996; García-Arenal and Palukaitis, 1999; García-Arenal et al., 2000; Luis-Arteaga et al., 1998; Jordá et al., 1992).

Podela satRNK na nekrogeni i obični soj podržana je i filogenetskim analizama. Oblik filogenetskog stabla rekonstruisanog u ovim istraživanjima podseća na filogenetska stabla rekonstruisana od strane Grieco et al. (1997). U stablu je došlo do izdvajanja izolata satRNK u tri grupe (A, B i C), pri čemu su se satRNK iz Srbije grupisale u dve različite grupe (A i B), što ukazuje na prisustvo različitih sojeva satRNK u našoj zemlji. Ovakva podela satRNK podržana je visokim „bootstrap“ vrednostima od 100% za B i C grupu, dok je za grupu A iznosila 50%. Kouadio et al. (2013) navode da pored velikog broja okarakterisanih satRNK do sada nije ustanovljen graničan stepen sličnosti između sojeva istih i različitih grupa kao i da se sve satRNK grupišu u najmanje tri grupe, dok su Xi et al. (2006) na osnovu višestrukog poređenja nukleotidnih sekvenci sve satRNK podelili u dve grupe, koje su nazvali 1 i 2.

U grupu B svrstao se nekrogeni (*necrogenic*) soj satRNK koji ima „nekrotičnu konsenzus“ sekvencu koja je odgovorna za izazivanje nekroze kod biljaka paradajza, dok se u grupama A i C nalazi obični („ne nekrogeni“, *non necrogenic*) ili blagi (*benign*) soj satRNK kod kojih nije utvrđeno njeno prisustvo. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima saglasni su sa rezultatima koje su dobili Grieco et al. (1997), pri čemu je „nekrotična konsenzus“ sekvencu GA-GCUAAGGCUUA---UGCUAUGCUGAU (Dević et al., 1990) detektovana kod dve satRNK (101-08-satRNA i AR1-12-satRNA) iz Srbije koje su se grupisale sa satRNK nekrogenog soja. Utvrđena vrednost ukupnog nukleotidnog diverziteta sekvenci satRNK u stablu bila je nešto veća od vrednosti utvrđene u Španiji, a nešto niža od diverziteta koji je ustanovljen na svetskom nivou (García Arenal et al., 2001). Veća varijabilnost satRNK u okviru običnog soja opravdava podelu ove grupe na dve manje na osnovu sličnosti između njih, što je saglasno sa rezultatima Grieco et al. (1997).

Osim „nekrotične konsenzus“ sekvence utvrđeno je da u satRNK postoji deo u okviru sekvence koja dovodi do pojave hloroze („*chlorosis-inducing domains*“) (Choi

et al., 2011). Međutim, prisustvo ove specifične sekvence CCUUUCGAGGU (**Kurath and Palukaitis, 1989**) utvrđeno je kod malog broja satRNK, odnosno kod biljaka duvana i paradajza kod kojih su primećeni intenzivniji simptomi hloroze (**Seat and Palukaitis, 1992; Zhang et al., 1994b; Choi et al., 2011**). Ovaj deo u okviru sekvence koji dovodi do pojave hloroze nije utvrđen u detektovanim satRNK poreklom iz Srbije.

7. ZAKLJUČAK

Tokom četvorogodišnjih istraživanja (2010-2013) obavljani su pregledi različitih povrtarskih, industrijskih, ukrasnih i korovskih biljaka na prisustvo virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV). Pregledano je 130 lokaliteta u Srbiji pri čemu je sakupljeno 1378 uzoraka 97 različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti. Prisustvo CMV, primenom DAS-ELISA testa, dokazano je u 409 uzoraka (29,68%) poreklom iz 32 različite biljne vrste, njihovih varijeteta ili sorti sakupljenih na 74 pregledana lokaliteta. Tokom ovih istraživanja prisustvo CMV u Srbiji prvi put je dokazano na biljkama *Tulipa* sp. i *Peperomia tuisana*, dok detekcije ovog virusa na biljkama *Wisteria sinensis* i *Stenactis annua* ujedno predstavlja prvi nalaz CMV u prirodnoj infekciji ne samo kod nas, nego i u svetu.

Sakupljene biljke u kojima je dokazan CMV ispoljile su različite tipove simptoma, u zavisnosti od vrste domaćina i vremena infekcije. Najučestaliji simptomi bili su u vidu svetlo i tamno zelenog mozaika, hloroze, redukcije lisne površine, nitavosti, uvijenosti lista, malformacija, kao i lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pega.

U cilju proučavanja strukture populacije CMV odabrana su 44 uzorka poreklom iz 18 različitih biljnih vrsta, njihovih varijeteta ili sorti sakupljenih na 30 lokaliteta, od kojih je 36 sakupljeno tokom ovih istraživanja ili u periodu od 2007. do 2009. godine (Kolekcija biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju, Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet), dok su preostalih osam izolata prethodno bili identifikovani kao izolati CMV na osnovu analize sekvence CP gena i stepena nukleotidne sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta. Molekularna karakterizacija na osnovu analize sekvence CP gena obuhvatila je 44 izolata, dok su molekularna proučavanja na osnovu analize sekvenci 2a, 2b i MP gena obuhvatila 19 izolata, a 1a gena 15 izolata CMV.

Za proučavanje genetičke strukture populacije CMV prvo je dizajnirano sedam različitih parova prajmera za različite regione genoma ovog virusa i razvijen protokol za svaki od njih, a zatim je primenom RT-PCR metode, korišćenjem devet različitih parova prajmera, izvršena amplifikacija parcijalnih ili kompletnih genskih regiona odabranih izolata CMV.

Molekularna identifikacija svih pet genskih regiona CMV obavljena je sekvenciranjem, a sve dobijene sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka. Stepenn nukleotidne i aminokiselinske sličnosti određenih genskih regiona ispitivanih izolata CMV ukazao je na varijabilnost prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji. Stepenn sličnosti sekvenci odabranih izolata CMV iz Srbije doveo je do podele izolata u dve grupe na osnovu sekvenci parcijalnih CP i MP i celog 2b gena, odnosno tri grupe na osnovu sekvenci parcijalnog 1a gena, dok su rezultati dobijeni na osnovu stepena sličnosti sekvenci parcijalnog 2a gena ukazali na homogenost populacije ovog virusa u našoj zemlji.

Filogenetske analize na osnovu parcijalnih sekvenci izolata 1a, 2a, MP i CP gena, kao i na osnovu sekvenci izolata celog 2b gena CMV, pokazale su da se populacija ovog virusa deli u tri podgrupe (IA, IB i II). Izolati poreklom iz Srbije na osnovu sekvenci izolata parcijalnih MP i CP gena i celog 2b gena svrstani su u podgrupu IA i II, na osnovu sekvenci izolata parcijalnog 1a gena grupisani su u okviru podgrupa IA, IB i II, dok se na osnovu sekvenci parcijalnog 2a gena nalaze u okviru IA podgrupe.

Filogenetska stabla na osnovu sekvenci RNK 3 i RNK 2 segmenta CMV pokazala su jasno izdvajanje ranije opisanih molekularnih podgrupa I i II, kao i izdvajanje podgrupa IA i IB u okviru podgrupe I. Međutim, pored ovih podgrupa došlo je i do izdvajanja rekombinantnih podgrupa. U rekombinantnoj podgrupi na osnovu analize RNK 3 segmenta nalazi se izolat 540-10 (poreklom iz *W. sinensis*), dok su se na osnovu analize RNK 2 segmenta u rekombinantnu podgrupu svrstali izolati 581-11 (*Capsicum annuum*), 101-08 (*Solanum lycopersicum*), 1-12 (*P. tuisana*) i 267-13 (*Phaseolus vulgaris*).

Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci različitih segmenata (RNK 1, 2 i 3) CMV ukazalo je na prisustvo pseudorekombinanata i rekombinanata u prirodnoj populaciji ovog virusa u našoj zemlji izdvajanjem pomenutih izolata iz postojećih podgrupa (IA, IB i II) i grupisanjem u okviru dve rekombinantne podgrupe. Od 19 izolata detaljno ispitanih filogenetskim analizama osam imaju haplotip: IA; IA-IA; IA-IA, dok kod četiri nije analiziran 1a gen te ovi izolati imaju haplotip: IA-IA; IA-IA. Rekombinacije su utvrđene kod četiri izolata, od kojih tri izolata (581-11, 101-08 i 1-12) imaju haplotip: II; IA-II; II-II, dok izolat 540-10 ima haplotip: IA; IA-IA; IA-II.

Pseudorekombinacije su utvrđene kod izolata 723-10 (*C. annuum*) kome odgovara haplotip: IB; IA-IA; IA-IA i izolata 79-13 (*Tulipa* sp.) koji ima haplotip: II; IA-IA; II-II. Poslednju grupu rekombinanata predstavlja izolat 267-13 kod kojeg je došlo i do rekombinacije i do pseudorekombinacije i koji ima haplotip: IB; IA-II; IA-IA.

U cilju potvrde rezultata dobijenih filogenetskim analizama, koje su ukazale na postojanje rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u okviru prirodne populacije CMV u Srbiji, primenjena je RFLP analiza. Primenom RFLP analize „*in silico*“ izabrano je deset restrikcionih enzima čijom se digestijom dobija različiti broj fragmenata ili fragmenti različite veličine kod izolata koji pripadaju različitim podgrupama ovog virusa na osnovu različitih genskih regiona CMV. Zatim je primenom, RFLP analize „*in situ*“, korišćenjem odgovarajućih odabranih restrikcionih enzima za svaki genski region, potvrđeno grupisanje izolata CMV u okviru odgovarajućih podgrupa ovog virusa i prisustvo rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata u okviru prirodne populacije CMV u našoj zemlji. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da su svi odabrani izolati imali isti restrikcioni profil u svim ponavljanjima, čime je isključeno prisustvo mešane infekcije kod rekombinantnih i pseudorekombinantnih izolata poreklom iz Srbije.

Primenom RDP softvera i analizom sekvenci izolata CMV poreklom iz Srbije potvrđena je izmena genetičkog materija u vidu rekombinacija. Analiza sekvenci na osnovu segmenta RNK 2 odabranih izolata CMV potvrdila je da izolati 101-08, 581-11, 1-12 i 267-13 predstavljaju prirodne rekombinante između IA (2a gen) i II (2b gena) podgrupe, a analiza segmenta RNK 3 potvrdila je da izolat 540-10 predstavlja prirodni rekombinant između podgrupa IA (MP gen) i II (CP gen) CMV.

Rezultati primene „*codon-based*“ Z-test selekcije pokazuju da na sve testirane genske regione odabranih izolata CMV poreklom iz Srbije deluje negativna („*purifying*“) selekcija. Takođe, testiranjem svakog para sekvenci odabranih izolata CMV iz Srbije utvrđeno je da preovladava negativna selekcija. Jedini izuzetak ustanovljen kada su međusobno testirane sekvence CP gena izolata 115-08 (*Cucurbita pepo* ‘Olinka’) i 471-09 (*C. annuum*), za koje je utvrđeno da podležu slaboj pozitivnoj selekciji.

Biološka karakterizacija ukazala je na priličnu fenotipsku varijabilnost populacije CMV u Srbiji. Bez obzira na detaljnu karakterizaciju obavljenu u okviru ove disertacije, nije bilo moguće povezati fenotipske osobine sa genotipskim razlikama između podgrupa ispitivanih izolata. Tokom ovih istraživanja ni jedna korišćena test biljka se nije pokazala pogodnom za razlikovanje izolata podgrupa ovog virusa, jer genom CMV kodira pet multi-funkcionalnih proteina koji u različitom stepenu mogu uticati na ispoljavanje simptoma i virulentnost, kao i zbog genetičkih promena u vidu rekombinacija i pseudorekombinacija koje su prisutne u populaciji ovog virusa.

Prisustvo satRNK u Srbiji prvi put je utvrđeno kod dva izolata, 101-08 i AR1-12, poreklom iz *S. lycopersicum* i izolata 1-12 poreklom iz *P. tuisana*. Filogenetska analiza pokazala je da se satRNK, koje su detektovane u biljkama paradajza, grupišu sa izolatima nekrogenog („*necrogenic*“) soja, dok se satRNK koja je detektovana u biljkama *P. tuisana* grupišu sa izolatima običnog („*non necrogenic*“) soja satRNK.

Rezultati ove disertacije predstavljaju prva saznanja o genetičkoj strukturi prirodne populacije CMV u Srbiji. Genetička struktura proučavane populacije CMV nije u korelaciji sa biljkom domaćinom, geografskim poreklom ili godinom izolacije, što ukazuje na metapopulaciju sa osobinom lokalnog izumiranja i ponovnog uspostavljanja populacije upravo od strane izolata koji migriraju iz lokalnih populacija. Najveći broj izolata CMV uključenih u istraživanja, prema svim ispitivanim genskim regionima, pripada podgrupi IA. U ovim istraživanjima nije bilo izolata koji po svim ispitivanim genskim regionima pripadaju IB ili II podgrupi. U prirodnoj populaciji CMV u Srbiji utvrđeno je postojanje genetičkih izmena rekombinacijama i pseudorekombinacijama genomnih segmenata. Međutim, njihova učestalost je niska, što ukazuje da, iako su u prirodi heterologe genetičke kombinacije genoma moguće, manje su adaptivne i nisu favorizovane. Na sve testirane genske regione CMV deluje negativna („*purifying*“) selekcija što ograničava velike promene diverziteta i vodi ka genetičkoj uniformnosti populacije bez obzira na postojanje visokog potencijala varijabilnosti. Istraživanja ove doktorske disertacije predstavljaju osnov za dalja proučavanja genetičkog diverziteta populacije CMV u Srbiji i utvrđivanje drugih evolutivnih procesa koji ga izazivaju i kontrolišu.

8. LITERATURA

- Aaziz, R., Tepfer, M. (1999): Recombination between genomic RNAs of two cucumoviruses under conditions of minimal selection pressure. *Virology* 263: 282-89.
- Abubakar, A., van den Berg, P.M., Fokkema, J.T. (2003): Towards non-linear inversion for characterization of time-lapse phenomena through numerical mode ling. *Geophysical Prospecting* 51: 285-293.
- Adams, I.P., Glover, R.H., Monger, W.A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., Boonham, N. (2009): Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10: 537-545.
- Afreen, B., Khan, A.A., Naqvi, Q.A., Kumar, S. Pratap, D., Snehi, S.K., Raj, S.K. (2009): Molecular identification of a *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolate from carrot (*Daucus carota*) based on RNA3 genome sequence analyses. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116: 193-199.
- Agrios, G.N. (2005): *Plant Pathology*. Academic Press, Inc, San Diego/Toronto.
- Akhtar, K.P., Ryu, K.H., Saleem, M.Y., Asghar, M., Jamil, F.F., Haq, M.A. (2008): Occurrence of *Cucumber mosaic virus* subgroup IA in tomato in Pakistan. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115: 2-3.
- Aleksić, Ž., Aleksić, D., Šutić, D. (1980): Bolesti povrća i njihovo suzbijanje. Nolit, Beograd.
- Ali, A., Kobayashi, M. (2010): Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. *Journal of Virological Methods* 163: 234-237.
- Ali, A., Mohammad, O., Khattab, A. (2012): Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Disease* 96: 243-248.
- Alonso-Prados, J.L., Fraile, A., García-Arenal, F. (1997): Impact of cucumber mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 infection on melon production in central Spain. *Journal of Plant Pathology* 79: 131-134.
- Anonymous (1998): Detection and biodiversity of cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of Plant Pathology* 80: 133-149.
- Aranda, M.A., Fraile, A., García-Arenal, F. (1993). Genetic variability and evolution of the satellite RNA of cucumber mosaic virus during natural epidemics. *Journal of Virology* 67: 5896-5901.
- Atencio, F.A., Gracia, O., Zandomeni, R., Grau, O. (1997): Detection of both subgroups I and II of cucumber mosaic cucumovirus and their satellite RNAs on pepper in Argentina. *Plant Disease* 81: 695.
- Azzam, O., Arboleda, M., Umadhay, K.M.L., de los Reyes, J.B., Cruz, F., Mackenzie, A., McNally, K.L. (2000): Genetic composition and complexity of virus populations at tungro-endemic and outbreak rice site. *Archives of Virology* 145: 2643-2657.
- Babović, M. (1969): Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 102: 335-410.
- Babović, M. (1974): Pojava viroza hibridne deteline u Jugoslaviji. *Mikrobiologija* 11: 159-164.

- Bashir N.S., Kalhor M.R., Zarghani S.N. (2006): Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-288.
- Bateson, M.F., Lines, R.E., Revill, P., Chaleprom, W., Ha, C.V., Gibbs, A.J., Dale J.L. (2002): On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. *Journal of General Virology* 83: 2575-2585.
- Bellardi, M.G., Bertaccini, A. (1997): Seed transmission of cucumber mosaic virus in *Alstroemeria*. *Phytopathologia Mediterranea* 36: 159-162.
- Berniak, H., Kamińska, M., Malinowski, T. (2010): *Cucumber mosaic virus* groups IA and II are represented among isolates from naturally infected lilies. *European Journal of Plant Pathology* 127: 305-309.
- Berniak, H., Malinowski, T., Kamińska, M. (2009): Comparison of elisa and rt-pcr assays for detection and identification of cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17: 5-20.
- Bešta-Gajević, R., Jerković-Mujkić, A., Pilić, S., Stanković, I., Vučurović, A., Bulajić, A., Krstić, B. (2013): *Lamium maculatum* is a Natural Host for *Cucumber mosaic virus*. *Plant Disease* 97: 150.
- Betancourt, M., Fraile, A., García-Arenal, F. (2011): *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs that induce similar symptoms in melon plants show large differences in fitness. *Journal of General Virology* 92: 1930-1938.
- Blackman, M.L., Boevink, P., Santa Cruz, S., Palukaitis, P., Oparka, K.J. (1998): The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* 10: 525-537.
- Boccard, F., Baulcombe, D. (1993): Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* 193: 563-578.
- Boni, M.F., Posada, D., Feldman, M.W. (2007): An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176: 1035-1047.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, S., Malpica, J.M., García-Arenal, F. (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology* 332: 359-368.
- Bousalem, M., Douzery, E.J.P., Fargette, D. (2000): High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology* 81: 243-255.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D.C. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal* 17: 6739-6746.
- Bruenn, J.A. (1991): Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 19: 217-226.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J. (1996): *Cucumber mosaic virus*. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th August 1996. (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>).
- Bruyere, A., Wantroba, M., Flansinsky, S., Dzianott, A., Bujarski, J.J. (2000): Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology* 7: 4214-4219.

- Cabrera, O., Roossinck, M.J., Scholthof, K.B.G. (2000): Genetic diversity of *Panicum mosaic virus* satellite RNAs in St. Augustinegrass. *Phytopathology* 90: 977-980.
- Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.H., Oparka, K.J., Palukaitis, P. (1997): Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237: 237-248.
- Carrère, I., Tepfer, M., Jacquemond, M. (1999): Recombinants of cucumber mosaic virus (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Archives of Virology* 144: 365-379.
- Chaumpluk, P., Sasaki, Y., Nakajima, N., Nagano, H. (1996): Six new subgroup I members of Japanese cucumber mosaic virus as determined by nucleotide sequence analysis of RNA3's cDNAs. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62: 40-44.
- Chen, B., Francki, R.I.B. (1990): Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71: 939-944.
- Chen, Y.K., Derks, A.F., Langeveld, S., Goldbach, R., Prins, M. (2001): High sequence conservation among *Cucumber mosaic virus* isolates from lily. *Archives of Virology* 146: 1631-1636.
- Chen, Y., Chen, J., Zhang, H., Tang, X., Du, Z. (2007): Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. *Virus Genes* 35: 405-413.
- Choi, G.S., Kim, J.H., Kim, J.S., Choi, J.K. (2004): Characterization of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Water Chickweed (*Stellaria aquatica*). *Journal of Plant Pathology* 20: 131-134.
- Choi, S.K., Jeon, Y.W., Yoon, J.Y., Choi, J.K. (2011): Characterisation of a satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* that induces chlorosis in *Capsicum annuum*. *Virus Genes* 43: 111-119.
- Chou, C.N., Chen C.E, Wu, M.L., Su, H.J., Yeh, H.H. (2009): Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of *Cucumber mosaic virus* Associated with Banana Mosaic Disease. *Journal of Phytopathology* 157: 85-93.
- Cillo, F., Roberts, I.M., Palukaitis, P. (2002): *In situ* localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of *Cucumber mosaic virus* in tobacco and cucumber. *Journal of Virology* 76: 19654-19664.
- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977): Characteristics of micro plate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-482.
- Cohen, S., Nitzany, F.E. (1963): Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. *Ibid* 53: 193-196.
- Cresensi, A., Barbarossa, L., Cillo, F., Di Franco, A., Volvas, N., Gallitelli, D. (1993): Role of cucumber mosaic virus and its satellite RNA in the etiology of tomato fruit necrosis in Italy. *Archives of Virology* 131: 321-333.
- Daniels, J., Campbell, R.N. (1992): Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. *Plant Disease* 76:1245-1250.
- Daughtrey, M.L., Jones, R.K., Moyer, J.W., Daub, M.E. (1997): Tosspoviruses Strike the Greenhouse Industry: INSV Has Become a Major Pathogen on Flower Crops. *Plant Disease* 81: 1220.

- Davino S., Bellardi M.G., Di Bella M., Davino M., Bertaccini A. (2005): Characterization of a *Cucumber mosaic virus* Isolate Infecting *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 220-25.
- Davino, S., Panno, S., Rangel, E.A., Davino, M., Bellardi, M.G., Rubio, L. (2012): Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology* 157: 739-745.
- Davis, R.F., Weber, Z., Pospieszny, H., Silbernagel, M., Hampton, R.O. (1981): Seedborne cucumber mosaic virus in selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm and breeding lines in Idaho, Washington, and Oregon. *Plant Disease* 65: 492-494.
- Delević, B. (1963): Viroze paprika u SR Srbiji. *Zaštita bilja* 74: 347-437.
- Desbiez, C., Lecoq, H. (1997): Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology* 46: 809-829.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Lecoq, H. (2002): 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.
- Devic, M., Jaegle, M., Baulcombe, D. (1990): *Cucumber mosaic virus* satellite RNA (strain Y): Analysis of sequences which affects systemic necrosis on tomato. *Journal of General Virology* 71: 1443-1449.
- Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R., Symons, R.H. (1994): New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198: 593-601.
- Ding, S.W., Li, W.X., Symons, R.H. (1995): A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *The EMBO Journal* 14: 5762-5772.
- Domingo, E., Holland, J.J. (1997): RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51: 151-178.
- Donis-Keller, H., Browning, K.S., Clarck, J.M. (1981): Sequence heterogeneity in satellite tobacco necrosis virus RNA. *Virology* 110: 43-54.
- Douine, L., Quiot, J.B., Marchoux, G., Archange, P. (1979): Recensement des especes vegetales sensible au virus de la mosaïque du concombre (CMV). *Annales de Phytopathologie* 11: 439-475.
- Drake, J.W., Holland, J.J. (1999): Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13910-13913.
- Duduk, N. (2008): Identifikacija, molekularna karakterizacija i načini prenošenja virusa gajenih biljaka familije Cucurbitaceae u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I., Bulajić A. (2004a): Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 35/36: 71-79.
- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B., Krstić, B. (2006): Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 21: 205-214.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M.M., Gallitelli, D., Duduk, B. (2002): Molekularna identifikacija izolata virusa mozaika krastavca u Jugoslaviji-podgrupe IA. *Zbornik rezimea XII Simpozijuma o zaštiti bilja i Savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, Srbija*, str. 75.
- Dukić, N., Krstić, B., Finetti Sialer M.M., Gallitelli, D., Vico, I., Berenji, J. (2004b): Metoda dot-blot hibridizacije nukleinske kiseline u detekciji virusa paprike,

- paradajza i obične tikve. Zbornik rezimea V Kongresa o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, Srbija, str. 104.
- Dukić, N., Krstić, B., Katis, N.I., Papavassiliou, C., Berenji, J., Vico, I. (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V Jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 85.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Berenji, J., Duduk, B. (2006): First report of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Bottlegourd (*Lagenaria siceraria*) in Serbia. *Plant Disease* 90: 380.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavssiliou, C., Berenji, J. (2002): Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Science* 47: 149-160.
- Đekić, I. (2009): Prisustvo, rasprostranjenost i karakterizacija virusa duvana u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Đekić I., Bulajić A., Jović J., Krnjajić S., Vučurović A., Berenji J., Krstić B. (2008a): Molekularna proučavanja *Cucumber mosaic virus*-a iz duvana. Zbornik rezimea IX Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 72-73.
- Đekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J. Krstić, B. (2008b): Zastupljenost i molekularna detekcija virusa mozaika krastavca u usevu duvana. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 40: 70-82.
- Edwards, M.C., Gonsalves, D. (1983): Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide-mapping. *Phytopathology* 73:1117-1120.
- Eiras, M., Boari, A.J., Colariccio, A., Chaves, A.L.R., Briones, M.R.S., Figueira, A.R., Harakava, R. (2004): Characterization of isolates of the cucumovirus *Cucumber mosaic virus* present in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 86: 61-69.
- Eiras, M., Colaricci, A., Chaves, A.L.R., Araujo, J., Moreira, S.R. (2000): Partial characterization of cucumber mosaic virus *Commelina* sp. isolate from banana crops. *Virus Reviews and Research* 5: 192-192.
- Escriu, F., Perry, K.L., García-Arenal, F. (2000): Transmissibility of *Cucumber mosaic virus* by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. *Phytopathology* 90: 1068-1072.
- Fakhtakh, H., Gorsane, F., Marrakchi, M., Makni, M. (1999): Differentiation of Tunisian isolates of *Cucumber mosaic virus* using biological and molecular properties. *Phytopathologia Mediterranea* 38: 61-67.
- Feng, J., Lai, L., Lin, R., Jin, C., Chen, J. (2012): Differential effects of *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato. *Molecular Biology Reports* 39: 775-784.
- Finetti Sialer, M.M., Cillo, F., Barbarossa, L., Gallitelli, D. (1999): Diferentiation of Tunisian isolates of *Cucumber mosaic virus* subgroups by RT-PCR-RFLP. *Journal of Plant Pathology* 81: 145-148.
- Flasinski, S., Scott, S.W., Barnett, O.W., Sun, C. (1995): Diseases of *Peperomia*, *Impatiens* and *Hibbertia* caused by cucumber mosaic virus. *Plant Disease* 79: 843-848.
- Fraille, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M., García-Arenal, F. (1997): Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural population of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology* 71: 934-940.

- Fraile, A., Malpica, J.M., Aranda, M.A., Rodríguez-Cerezo, E., García-Arenal, F. (1996): Genetic diversity in tobacco mild green mosaic tobamovirus infecting the wild plant *Nicotiana glauca*. *Virology* 223: 148-155.
- Francki, R.I.B., Mossop, D.W., Shkula, D.D. (1979): *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, pp. 213.
- Gaborjanyi, R., Horvath, J., Kovacs, J., Kazinczi, G. (1998): Role of viruses in pepper decline in Hungary. Proceedings of the Xth Eucarpia Meeting of Capsicum and Eggplant, Avignon, France, pp. 129-132.
- Gallitelli, D. (2000): The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.
- Gallitelli, D. (1998): Present status of controlling cucumber mosaic virus. In: Khetarpal, R.K., Koganezawa, H., Hadidi, A. (Eds.), *Control of Plant Virus Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 507-523.
- Gallitelli, D., Di Franco, A., Vovlas, C., Kaper, J.M. (1988): Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) ed i potyvirus in colture ortive di Puglia e Basilicata. *Informatore Fitopatologico* 12: 57-64.
- Gallitelli, D., Martelli, G.P., Gebre-Selassie, K., Marchoux, G. (1995): Progress in the biological and molecular studies of some important viruses of solanaceae in the Mediterranean. *Acta Horticulturae* 412: 503-514.
- Gallitelli, D., Rana, G.L., Vovlas, C., Martelli, G.P. (2004): Viruses of globe artichoke: an overview. *Journal of Plant Pathology* 84: 267-281.
- García-Arenal, F., McDonald, B.A. (2003): An analysis of durability of the resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93: 941-952.
- García-Arenal, F., Palukaitis, P. (1999): Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 239: 37-63.
- García-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008): *Cucumber mosaic virus*. *Encyclopedia of Virology* 1: 614-619.
- García-Arenal, F., Escriu, F., Aranda, M.A., Alonso-Prados, J.L., Malpica, J.M., Fraile, A. (2000): Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research* 71: 1-8.
- García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J.M. (2001): Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 156-186.
- Gautam, K.K., Kumar, S., Raj, S.K. (2012): Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* strain causing severe mosaic disease on petunia in India. *Phytoparasitica* 40: 425-431.
- Geetanjali, A.S., Kumar, R., Srivastava, P.S., Mandal, B. (2011): Biological and molecular characterization of two distinct tomato strains of *Cucumber mosaic virus* based on complete RNA-3 genome and subgroup specific diagnosis. *Indian Journal of Virology* 22: 117-126.
- Gera, A., Loebenstein, G., Raccach, B. (1979): Protein coats of two strains of *Cucumber mosaic virus* affect transmission by *Aphis gossypii*. *Phytopathology* 69: 396-399.
- Gibbs, M.J., Armstrong, J.S., Gibbs, A.J. (2000): Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.

- Gielen, J., Ultzen, T., Bontems, S., Loots, W., Vanschep, A., Dehaan, P., Vangrinsven, M. (1996): Coat protein-mediated protection to *Cucumber mosaic virus* infections in cultivated tomato. *Euphytica* 88: 139-149.
- Gildow, F.E., Shah, D.A., Sackett, W.M., Butzler, T., Nault, B.A., Fleischer, S.J. (2008): Transmission efficiency of *Cucumber mosaic virus* by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology* 98: 1233-1241.
- Gooding, G.V. (1991): Disease caused by viruses. In: Shew, H.D., Lucas, G.B. (Eds.), *Compendium of tobacco diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 41-47.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. (1988): A novel super family of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters* 235: 16-24.
- Gould, A.R., Symons, R.H. (1977): Determination of the sequence homology between the four RNA species of cucumber mosaic virus by hybridization with complementary DNA. *Nucleic Acids Research* 4: 3787-3802.
- Gould, A.R., Symons, R.H. (1978): Alfalfa mosaic virus RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of Cucumber mosaic virus. *European Journal of Biochemistry* 91: 269-278.
- Grieco, F., Lanave, C., Gallitelli, D. (1997): Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 229: 166-174.
- Gumus, M., Erkan, S., Tok, S. (2004): Studies on determination of virus diseases in the seed of some cucurbitaceous species. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi* 41: 49-56.
- Habili, N., Symons, R.H. (1989): Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Research* 17: 9543-9555.
- Hajimorad, M.R., Ghabrial, S.A., Roossinck, M. (2009): *De novo* emergence of a novel satellite RNA of *Cucumber mosaic virus* following serial passages of the virus derived from RNA transcripts. *Archives of Virology* 154: 137-140.
- Hakkaart, F.A. (1986): *Virusziekten van Alstroemeria*. Jaarverslag Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek 1985: 96.
- Hall, B.G. (2008): *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual*, Third edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Ham, B.K., Lee, T.H., You, J.S., Nam, Y.W., Kim, J.K., Paek, K.H. (1999): Isolation of a putative tobacco host factor interacting with cucumber mosaic virus encoded 2b protein by yeast two-hybrid screening. *Molecules and Cells* 9: 548-555.
- Hampton, R.O., Francki, R.I.B. (1992): RNA-1 dependent seed transmissibility of cucumber mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 82:127-130.
- Han, K.S., Choi, G.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Cho, I.S., Kim, H.K., Kim, S., Yoon, J. Y., Choi, S.K. (2012): Characterization of a Novel *Cucumber mosaic virus* Isolated from *Petunia hybrida*. *The Plant Pathology Journal* 28: 299-305.
- Hareesh, P.S., Madhubala, R., Bhat, A.I. (2006): Characterization of *Cucumber mosaic virus* infecting Indian long pepper (*Piper longum* L.) and betel vine (*Piper betle* L.) in India. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 89-93.
- Hayes, R.J., Buck, K.W. (1990): Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63: 363-368.

- Higgins, C.M., Dietzgen, R.G., Mat Atkin, H., Sudarsono, S., Chren, K., Xu, Z. (1999): Biological and molecular variability of peanut stripe virus. *Current Opinion in Virology* 1: 1-26.
- Hodgman, T.C. (1988): A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333: 22-23.
- Holmes, E.C., Worobey, M., Rambaut, A. (1999): Phylogenetic evidence for recombination in Dengue virus. *Molecular Biology and Evolution* 16: 405.
- Hu, C.C., Ghabrial, S.A. (1998): Molecular evidence that strain BV-15 of peanut stunt cucumovirus is a reassortant between subgroup I and II strains. *Phytopathology* 88: 92-97.
- Hwang, M.S., Kim, S.H., Lee, J.H., Bae, J.M., Paek, K.H., Park, Y.I. (2005): Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology* 86: 3171-3177.
- Iqbal, S., Ashfaq, M., Shah, H. (2011): Biological characterization of Pakistani isolates of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV). *Pakistan Journal of Botany* 43: 3041-3047.
- Jacquemond, M. (2012): Cucumber Mosaic Virus. *Advances in Virus Research* 84: 439-504.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K., Mumović, J. (2000): Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 34: 67-76.
- Ji, L.H., Ding, S.W. (2001): The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14: 715-724.
- Jones, R.A.C. (2000): Determining 'threshold' levels for seed-borne virus infection in seed stocks. *Virus Research* 71: 171-183.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M.A., Moriones, E., García Arenal, F. (1992): Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in Eastern Spain. *Plant Disease* 76: 363-366.
- Kaper, I.M., Waterworth, H.E. (1981): *Cucumoviruses*. In: Kurstak, E. (Eds.), *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. Elsevier, Amsterdam, North-Holland, pp. 257-332.
- Kaplan, I.B., Zhang, L., Palukaitis, P. (1998): Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology* 246: 221-231.
- Kaye, A.C., Moyer, J.W., Parks, E.J., Carbone, I., Cubeta, M.A. (2011): Population genetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101: 147-153.
- Kayode, K.T., Odu, B.O., Ako-Nai K.A., Alabi, O.J. (2014): Occurrence of *Cucumber mosaic virus* Subgroups IA and IB Isolates in Tomatoes in Nigeria. *Plant Disease* 98: 1750.
- Kim, M.K., Kwak, H.R., Jeong, S.G., Ko, S.J., Lee, S.H., Kim, J.S., Kim, K.H., Choi, J.K., Choi, H.S., Cha B.J. (2010): Characteristics of cucumber mosaic virus infecting Zucchini in Korea. *Plant Pathology Journal* 26: 139-148.
- Kim, M.K., Seo, J.K., Kwak, H.R., Kim, J.S., Kim, K.H., Cha, B.J., Choi, H.S. (2014): Molecular genetic analysis of *Cucumber mosaic virus* populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology* 104: 993-1000.

- Kim, S.H., Kalinina, N.O., Andreev, I., Ryabov, E.V., Fitzgerald, A.G., Taliany, M. E., Palukaitis, P. (2004): The C-terminal 33 amino acids of the *Cucumber mosaic virus* 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *Journal of General Virology* 85: 221-230.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (2012): *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Komuro, Y. (1973): *Vegetable Viruses*. Sebundo, Tokyo, Japan.
- Koolivand, D., Bashir, N.S., Mozafari, J. (2012): Serological and molecular detection of newly isolated *Cucumber mosaic virus* variants from Iran. *International Journal of Agriculture: Research and Review* 2: 933-941.
- Kouadio, K.T., Clerck, C.D., Agneroh, T.A., Parisi, O., Lepoivre, P., Jijakli, H. (2013): Role of satellite RNAs in cucumber mosaic virus-host plant interactions. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 17: 644-650.
- Koundal, V., Haq, Q. M.R., Praveen, S. (2011): Characterization, genetic diversity, and evolutionary link of *Cucumber mosaic virus* strain New Delhi from India. *Biochemical Genetics* 49: 25-38.
- Krause-Sakate, R., Gall, O.L., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M., Candresse, T. (2002): Molecular and Biological characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92: 563-572.
- Krstić, B., Bulajić A. (2011): *Bolesti uljane tikve*. U: Berenji, J. (Eds.), *Uljana tikva Cucurbita pepo L.* Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, str. 115-198.
- Krstić, B., Tošić, M. (1994): *Biljni virusi-neke osobine i dijagnoza*. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Krstić, B., Vico, I. (2004): Kontrola virusa mozaika krastavca u okvirima održive poljoprivrede. *Biljni lekar* 5: 359-363.
- Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N.I., Papavassiliou, C. (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo L.*) in Serbia. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad*, 103: 57-65.
- Krstić, B., Bulajić, A., Đekić, I. (2007): Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. *Zbornik rezimea IV simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, Bosna i Hercegovina*, str. 13.
- Krstić, B., Vico, I., Dovas, C., Eythimiou, C., Katis, N.I., Berenji, J. (2002): Molekulatna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. *Zbornik rezimea XII Simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, Srbija*, str. 74.
- Kumari, R., Bhardwaj, R., Singh, L., Zaidi, A.A., Hallan, V. (2012): Biological and Molecular Characterization of *Cucumber mosaic virus* Subgroup II Isolate Causing Severe Mosaic in Cucumber. *Indian Journal of Virology* 24: 27-34.
- Kurath, G., Palukaitis, P. (1989): Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: recombinants constructed *in vitro* reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 91-96.
- Lakshman, D.K., Gonsalves, D. (1985): Genetic analyses of two large-lesion isolates of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 75: 758-762.

- Larsen, R.C., Miklas, P.N., Eastwell, K.C., Grau, C.R., Mondjana, A. (2002): A virus disease complex devastating late season snap bean production in the Midwest. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 45: 36-37.
- Lastra, R. (1968): Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. Plant Disease Reporter 52: 171-174.
- Latham, L.J., McKirdy, S.J., Jones, R.A.C. (1999): CMV in alternative pulse and annual pasture legumes: susceptibility and seed transmission. In: Proceedings of the VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aguadulce (Almeria), Spain, pp: 141-142.
- Lewsey, M.G., Murphy, A.M., Maclean, D., Dalchau, N., Westwood, J.H., Macaulay, K., Bennett, M.H., Moulin, M., Hanke, D.E., Powell, G., Smith, A.G., Carr, J. P. (2010): Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. Molecular Plant-Microbe Interaction 23: 835-845.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M., Ding, S.W. (1999): Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. The EMBO Journal 18: 2683-2691.
- Li, Q., Ryu, K.H., Palukaitis, P. (2001): *Cucumber mosaic virus*-plant interactions: Identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long-distance movement. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 378-385.
- Lin, H.X., Rubio, L., Smythe, A.B., Falk, B.W. (2004): Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. Journal of Virology 78: 6666-6675.
- Lin, H.X., Rubio, L., Smythe, A.B., Jimenez, M., Falk, B. W. (2003): Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. Journal of General Virology 84: 249-258.
- Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C., Perry, K.L. (2002): A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for efficient aphid vector transmission. Journal of Virology 76: 9756-9762.
- Liu, Y.Y., Yu, S.L., Lan, Y.F., Zhang, C.L., Hou, S.S., Li, X.D., Chen, X.Z., Zhu, X.P. (2009): Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China. Acta Virologica 53: 89-97.
- Loebenstein, G., Lawson, R.H., Brunt, A.A. (1995): Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ding, S.W. (2000): Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. The EMBO Journal 19: 1672-1680.
- Luis-Arteaga, M., Alvarez, J.M., Alonso-Prados, J.L., Bernal, J.J., García-Arenal, F., Lavina, A., Batlle, A., Moriones, E. (1998): Occurrence, distribution and relative incidence of mosaic viruses infecting field grown melon in Spain. Plant Disease 82: 979-982.
- Malpica, J.M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C.I., Drake, J.W., García-Arenal, F. (2002): The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. Genetics 162: 1505-1511.
- Maoka, T., Hayano, Y.S., Iwasaki, M., Yoshida, K., Masuta, C. (2010): Mixed infection in tomato to ensure frequent generation of a natural reassortant between two subgroups of *Cucumber mosaic virus*. Virus Genes 40: 148-150.

- Marrou, J., Quiot, J.B., Marchoux, G., Duteil, M. (1975): Caractérisation par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaïque du concombre et de deux autres cucumovirus: tentative de classification. Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent 40: 107-121.
- Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C. (2005a): A modified BOOTSCAN algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. AIDS Research and Human Retroviruses 21: 98-102.
- Martin, D.P., Williamson, C., Posada, D. (2005b): RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. Bioinformatics 21: 260-262.
- Martinez-Torres, D.F., Chandre, M.S., Williamson, F., Darriet, J.B., Berge, A.L., Devonshire, P., Guillet, N., Pasteur, N., Pauron, D. (1998): Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology 7: 179-184.
- Mascia, T., Cillo, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M.M., De Stradis, A., Palukaitis, P., Gallitelli, D. (2010): Characterization of the Interactions Between Cucumber mosaic virus and Potato virus Y in Mixed Infections in Tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions 23: 1514-1524.
- Mayers, C.N., Palukaitis, P., Carr, J.P. (2000): Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. Journal of General Virology 81: 219-226.
- Maynard Smith, J. (1992): Analyzing the mosaic structure of genes. Journal of Molecular Evolution 34: 126-129.
- Mayunga, D.S., Kapooria, R.G. (2003): Incidence and identification of virus diseases of tobacco in three provinces of Zambia. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 33: 355-359.
- McNeil, J.E., French, R., Hein, G.L., Baezinger, P.S., Eskridge, K.M. (1996): Characterization of genetic variability among natural populations of wheat streak mosaic virus. Phytopathology 86: 1222-1227.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2007): Zaštita povrća. AgroMivas, Smederevska Palanka.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Ristić, D., Bulajić, A., Krstić, B. (2014): First report of *Cucumber mosaic virus* in *Tulipa* sp. in Serbia. Plant Disease 98: 1449.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milošević, D., Bulajić, A., Krstić, B. (2013): First report of *Cucumber mosaic virus* Infecting *Peperomia tuisana* in Serbia. Plant Disease 97: 1004.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A., Krstić, B. (2013): Biološka i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom iz lubenice u Srbiji. Zaštita bilja 64: 14-25.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A., Krstić, B. (2012): First report of *Cucumber mosaic virus* infecting watermelon in Serbia. Plant Disease 96: 1706.
- Milošević, D. (2013): Diverzitet i karakterizacija virusa paprike u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Stanković, I., Bulajić, A., Krstić, B. (2013): *Cucumber mosaic virus*-značajan patogen paprike u Srbiji. Zbornik rezimea XII Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 55-57.

- Mnari Hattab, M., Ezzaier, K., Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Gognalon, P. (1999): Surveys of viruses affecting pepper (*Capsicum annuum* L.) in Tunisia. In: Proceedings of the VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aguadulce (Almeria), Spain, pp. 143-144.
- Mochizuki, T., Ohki S.T. (2011): *Cucumber mosaic virus*: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology* 13: 217-25.
- Moreno, I.M., Malpica, J.M., Díaz-Pendón, J.A., Moriones, E., Fraile, A., García-Arenal, F. (2004): Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology* 318: 451-460.
- Moury, B. (2004): Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1602-1611.
- Moya, A., García-Arenal, F. (1995): Population genetics of viruses: An introduction. In: Gibbs, A., Calisher, C.H., García-Arenal, F. (Eds.), *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 213-223.
- Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., Okuno, T. (2001): Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *Journal of Virology* 75: 8045-8053.
- Nei, M., Kumar, S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Ng, J.C.K., Josefsson, C., Clark, A.J., Franz, A.W.E., Perry, K.L. (2005): Virion stability and aphid vector transmissibility of *Cucumber mosaic virus* mutants. *Virology* 332: 397-405.
- Nikolić, D., Milojević, K., Stanković, I., Vucurović, A., Ristić, D., Bulajic, A., Krstić, B. (2012): *Cucumber mosaic virus* - značajan patogen paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea XIV Simpozijuma o zaštiti bilja sa IX Kongresom o korovima, Zlatibor, Srbija, str. 105.
- Nouri, S. (2012): Biogeography and genetic diversity of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) and the role of satellite rna in symptom development. Dissertation. University of Wisconsin-Madison, USA.
- Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B.W., Groves, R.L. (2014): Genetic Structure and Molecular Variability of *Cucumber mosaic virus* Isolates in the United States. *Plos One* 9: e96582.
- Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A., Ohshima K. (2008): Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research* 131: 199-212.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J.A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., Gibbs, A. (2001): The molecular evolution of *Turnip mosaic potyvirus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology* 83: 1511-1521.
- Owen, J., Palukaitis, P. (1988): Characterization of cucumber mosaic virus: I. Molecular heterogeneity mapping of RNA-3 in 8 CMV strains. *Virology* 166: 495-502.
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C.M. (1999): Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
- Palukaitis, P., García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62: 241-323.

- Palukaitis, P., Zaitlin, M. (1997): Replicase-mediate resistance to plant virus disease. *Advance in Virus Research* 48: 349-377.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I. (1992): Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- Park, K.H., Cha, B.J. (2002): Detection of TMV, ToMV and CMV from tomato seeds and plants. *Research in Plant Disease* 8: 101-106.
- Parrella, G., Sorrentino D. (2009): Identification of a *Cucumber mosaic virus* Isolate from *Passiflora edulis* in Southern Italy and Validation of Subgroup Identification by In Silico Restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal of Phytopathology* 157: 762-767.
- Pejčinovski, F. (1978): Virusot na mozaikot na krastavita koj ogleduvanite rastenija od familijata Cucurbitaceae vo SR Makedonija. *Godišen zbornik na Zemljodelskot fakultet, Skopje, Makedonija, XXVII-XXVIII*: 97-116
- Perry, K.L., Francki, R.I.B. (1992): Insect-mediated transmission of mixed and reassorted cucumovirus genomic RNAs. *Journal of General Virology* 73: 2105-2114.
- Perry, K.L., Zhang, L., Palukaitis, P. (1998): Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* 242: 204-210.
- Petrović, D., Bulajić, A., Stanković, I., Ignjatov, M., Vujaković, M., Krstić B. (2010a): Prisustvo i rasprostranjenost virusa paprika u Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo* 47: 567-576.
- Petrović, D., Bulajić, A., Stanković, I., Ignjatov, M., Vujaković, M., Krstić B. (2010b): Rasprostranjenost virusa paprika u Srbiji. *Zbornik rezimea X Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 64.*
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N. (1989): Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* 8: 3867-3874.
- Posada, D., Crandall, K. A. (2001): Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 13757-13762.
- Pratap, D., Kumar, S., Raj, S.K. (2008): First molecular identification of a *Cucumber mosaic virus* isolate causing shoestring symptoms on tomato in India. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 57-58.
- Pratap, D., Kumar, S., Snehi, S.K., Raj, S.K. (2012): Biological and Molecular Characterization of *Cucumber mosaic virus* Isolate Causing Shoestring Disease of Tomato in India which has Closer Affinity to European or East Asian Isolates of CMV. *Indian Journal of Virology* 23: 57-63.
- Provvidenti, R., Schroeder, W.T. (1970): Epiphytotic of watermelon mosaic among Cucurbitaceae in Central New York in 1969. *Plant Disease Reporter* 54: 744-748.
- Rahimian, H., Izadpanah, K. (1978): Identity and prevalence of mosaic-inducing cucurbits viruses in Shiraz, Iran. *Phytopathologische Zeitschrift* 92: 305-312.
- Rao, A.L.N., Francki, R.I.B. (1981): Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology* 114: 573-575.

- Rizos, H., Gunn, L.V., Pares, R.D., Gillings, M.R. (1992): Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.
- Rodríguez-Cerezo E., Elena, S.F., Moya, A., García-Arenal, F. (1991): High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Journal of Molecular Evolution* 32: 328-332.
- Roossinck, M.J. (2001): Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* 2: 59-63.
- Roossinck, M.J. (2002): Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology* 76: 3382-3387.
- Roossinck, M.J. (2003): Plant RNA virus evolution. *Current Opinion in Microbiology* 6: 406-409.
- Roossinck, M.J., Zhang, L., Hellwald, K.H. (1999): Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* 73: 6752-6758.
- Rozanov, M.N., Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E. (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: A hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positivestrand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73: 2129-2134.
- Ryu, K.H., Park, H.W., Choi, J.K. (2002): Characterization and sequence analysis of a lily isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Lilium tsingtauense*. *The Plant Pathology Journal* 18: 85-92.
- Sacristà, S., Fraile, A., García-Arenal, F. (2004): Population dynamics of *Cucumber mosaic virus* in melon crops and in weeds in Central Spain. *Phytopathology* 94: 992-998.
- Salánki, K., Gellért, A., Huppert, E., Náray-Szabó, G., Balázs, E. (2004). Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 85: 1039-1048.
- Salánki, K., Kiss, L., Gellert, A., Balázs, E. (2011): Identification a coat protein region of cucumber mosaic virus (CMV) essential for long-distance movement in cucumber. *Archives of Virology* 156: 2279-2283.
- Salminen, M.O., Carr, J.K., Burke, D.S., McCutchan, F.E. (1995): Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by BOOTSCANing. *AIDS Research and Human Retroviruses* 11: 1423-1425.
- Samad, A., Ajayakumar, P.V., Gupta, M.K., Shukla, A.K., Darokar, M.P., Somkuwar, B., Alam, M. (2008): Natural infection of periwinkle (*Catharanthus roseus*) with *Cucumber mosaic virus*, subgroup IB. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 30-34.
- Samuitienė, M., Navalinskienė, M. (2008): Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania. *Žemdirbystė=Agriculture* 95: 135-143.
- Sanford, J.C., Johnston, S.A. (1985): The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395-405.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D. (2011): Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.

- Sclavounos, A.P., Voloudakis, A.E., Arabatzis, Ch., Kyriakopoulou, P.E. (2006): A severe Hellenic CMV tomato isolate: Symptom variability in tobacco, characterization and discrimination of variants. *European Journal of Plant Pathology* 115: 163-172.
- Seat, D.E., Palukaitis, P. (1992): A single nucleotide change within a plant virus satellite RNA alters the host specificity of disease induction. *The Plant Journal* 2: 43-49.
- Seo, J.K., Kwon, S.J., Choi, H.S., Kim, K.Y. (2009a): Evidence for alternate states of *Cucumber mosaic virus* replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology* 383: 248-260.
- Seo, J.K., Ohshima, K., Lee, H.G., Son, M., Choi, H.S., Lee, S.H., Sohn, S.H., Kim, K.H. (2009b): Molecular variability and genetic structure of the population of Soybean mosaic virus based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393: 91-103.
- Sepulveda, P., Larrain, P., Quiroz, C., Rebufel, P., Grana, F. (2005): Identification and incidence of pepper viruses in north central Chile and its association with vectors. *Agricultura Tecnica* 65: 235-245.
- Sevik, M.A., Akcura, C. (2011): Occurrence of *Cucumber mosaic virus* Infecting Parsley (*Petroselinum crispum*) in Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39: 30-33.
- Shew, H.D., Lucas, G.B. (1991): *Compendium of Tobacco Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Shi, B.J., Miller, J., Symons, R.H., Palukaitis, P. (2003): The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 16: 261-267.
- Shi, B.J., Palukaitis, P., Symons, R.H. (2002): Differential virulence by strains of cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15: 947-955.
- Siddiqui, S.A., Valkonen, J.P.T., Rajamäki, M.L., Lehto, K. (2011): The 2b silencing suppressor of a mild strain of Cucumber mosaic virus alone is sufficient for synergistic interaction with Tobacco mosaic virus and induction of severe leaf malformation in 2b transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 685-693.
- Simon, A.E., Roossinck, M.J., Havelda Z. (2004): Plant virus satellite and defective interfering RNAs. New paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology* 42: 415-437.
- Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M., Ding, S.W., Mo, J.Q., Gibbs, A.J. (1993): RNA hybrid mismatch polymorphisms in Australian populations of turnip yellow mosaic tymovirus. *Archives of Virology* 132: 83-99.
- Soards, A.J., Murphy, A.M., Palukaitis, P., Carr, J.P. (2002): Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 647-653.
- Sochacki, D. (2013): The occurrence of the viruses in tulip crops in Poland. *Journal of Horticultural Research* 21: 5-9.
- Srivastava, A., Raj, S.K. (2004): High molecular similarity among India isolates of *Cucumber mosaic virus* suggests a common origin. *Current science* 87: 1126-1131.

- Stakić, D., Nikolić, V. (1966): Virus mozaika lubenice - novo virusno oboljenje u Jugoslaviji. *Savremena poljoprivreda* 3: 289-302.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B. (2011): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.
- Sudhakar, N., Nagendra-Prasad, D., Mohan, N., Murugesan, K. (2006): First report of *Cucumber mosaic virus* subgroup II infecting *Lycopersicon esculentum* in India. *Plant Disease* 90: 1457.
- Škorić, D., Krajačić, M., Barbarossa, L., Cillo, F., Grieco, F., Šarić, A., Gallitelli, D. (1996): Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* with satellite rna in lethal necrosis affected tomatoes in Croatia. *Journal of Phytopathology* 144: 543-549.
- Šutić, D. (1959): Die Rolle des Paprikasamens bei der Virusübertragung. *Phytopathologische Zeitschrift* 36: 84-93.
- Šutić, D., Babović, M., Tošić, M. (1975): Seed transmission of forage legume viruses. Technical Report, Projekat, PL 480.
- Takeshita, M., Suzuki, M., Takanami, Y. (2001): Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Archives of Virology* 146: 697-711.
- Tamarzizt, H.B., Montarry, J., Girardot, G., Fakhfakh, H., Tepfer, M., Jacquemond, M. (2013): *Cucumber mosaic virus* populations in Tunisian pepper crops are mainly composed of virus reassortants with resistance-breaking properties. *Plant Pathology* 62: 1415-1428.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): 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.
- Tian, Z., Jiyan, Q., Jialin, Y., Chenggui, H., Weicheng, L. (2009): Competition between *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II isolates in tobacco. *Journal of Phytopathology* 157: 457-464.
- Tóbiás, I., Tulipan, M. (2002): Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Novenyvedelem* 38: 23-27.
- Tóbiás, I., Sári, L., Kuhlmann, H. (2003): Seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* on *Cucurbita pepo* conv. *citrullinina* var. *styriaca* (oilseed pumpkin). *Cucurbit Genetics Cooperative Reports* 26: 42-43.
- Tóbiás, I., Szabó, B., Salánki, K., Sári, L., Kuhlmann, H., Palkovics, L. (2008): Seedborne transmission of Zucchini yellow mosaic virus and *Cucumber mosaic virus* in Styrian Hulless group of *Cucurbita pepo*. In: Pitrat, M. (Ed.), *Cucurbitaceae. Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*. INRA, Avignon, France, pp. 189-197.
- Tomić, Đ., Jeremić, S., Simić, A., Petković, N., Đekić, I., Bulajić, A., Krstić, B. (2007): Status viroza paprika u Srbiji. *Zbornik rezimeja XIII Simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, str. 107-108.

- Tomitaka, Y., Ohshima, K. (2006): A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in east Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Molecular Ecology* 15: 4437-4457.
- Tomlison, J.A. (1987): Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110: 661-681.
- Tošić, M. (1960): Prilog poznavanju viroza duvana u NR Srbiji. *Zaštita bilja* 61: 61-66.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., Moyer, J.W. (2005): The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53-66.
- Van den Bosch, F., Akudibillah, G., Seal, S., Jeger, M. (2006): Host resistance and the evolutionary response of plant viruses. *Journal of Applied Ecology* 43: 506-516.
- 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., Wickner, R.B. (2000): *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA.
- Varveri, C., Boutsika, K. (1999): Characterization of cucumber mosaic cucumovirus isolates in Greece. *Plant Pathology* 48: 95-100.
- Vučurović, A. (2012): Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava i epidemiologija oboljenja u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Virusi - stalni problem u usevu tikava u Srbiji. Zbornik rezimea IX Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 96-97.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Krstić, B. (2011): Karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom iz tikava u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 26: 325-336.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2010): Učestalost pojave i molekularna karakterizacija virusa mozaika lubenice poreklom iz Srbije. *Pesticidi i fitomedicina* 25: 213-230.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.
- Wahyuni, W.S., Dietzgen, R.G., Hanada, K., Francki, R.I.B. (1992): Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Pathology* 41: 282-297.
- Wang, Y., Giba, V., Yang, J., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2002): Characterisation of synergy between cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* 92: 51-58.
- Wege, C., Siegmund, D. (2007): Synergism of a DNA and an RNA virus: Enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology* 357: 10-28.
- Wei, T. Y., Yang, J.G., Liao, F.L., Gao, F.L., Lu, L.M., Zhang, X.T., Li, F., Wu, Z.J., Lin, Q.Y., Xie, L.H., Lin, H.X. (2009): Genetic diversity and population structure of rice stripe virus in China. *Journal of General Virology* 90: 1025-1034.

- White, J.L., Tousignant, M.E., Geletka, L.M., Kaper, J.M. (1995): The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature-sensitive in tomato. *Archives of Virology* 140: 53-63.
- Wolf, P. (1972): Viruskrankheiten des Dills (*Anethum graveolens* L.). *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungariae* 7: 209-211.
- Wong, S., Thio, S.S., Shintaku, M.H., Palukaitis, P. (1999): The rate of cell-to-cell movement in squash of cucumber mosaic virus is affected by sequences of the capsid protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 628-632.
- Worobey, M., Holmes, E.C. (1999): Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology* 80: 2535-2543.
- Xi, D.H., Lan, L.Q., Wang, J.H., Xu, W.L., Xiang, B.C., Lin, H.H. (2006): Variation analysis of two cucumber mosaic viruses and their associated satellite RNAs from sugar beet in China. *Virus Genes* 33: 293-298.
- Xin, H.W., Ji, L.H., Scott, S.W., Symons, R.H., Ding, S.W. (1998): Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the Bromoviridae. *Journal of Virology* 72: 6956-6959.
- Xu, P., Li, M., Lin, Q., Xie L. (1999): Comparative studies on properties of five *Cucumber mosaic virus* isolates infecting *Passiflora* in China. *Virologica Sinica* 14: 73-79.
- Yang, Y., Kim, K.S., Anderson, E.J. (1997): Seed transmission of cucumber mosaic cucumovirus isolates in spinach. *Phytopathology* 87: 924-931.
- Yoon, J.Y. (2014): First report of *Cucumber mosaic virus* in *Saintpaulia ionantha* in Korea. *Plant Disease* 98: 573.
- Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2005): Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal Virology Methods* 123: 155-161.
- Zhang, D., Tan, X., Willingmann, P., Adam, G., Heinze, C. (2011): Problems encountered with the selection of cucumber mosaic virus isolates for resistance breeding programs. *Journal of Phytopathology* 159: 621-29.
- Zhang, L., Hanada, K., Palukaitis, P. (1994a): Mapping local and systemic symptom determinants of cucumber mosaic cucumovirus in tobacco. *Journal of General Virology* 75: 3185-3191.
- Zhang, L., Kim, Ch.H., Palukaitis, P. (1994b): The chlorosis-induction domain of the satellite RNA of cucumber mosaic virus: Identifying sequences that affect accumulation and the degree of chlorosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 208-213.
- Zitikaitė, I., Staniulis, J., Urbanavičienė, L., Žižytė M. (2011): *Cucumber mosaic virus* identification in pumpkin plants. *Žemdirbystė=Agriculture* 98: 421-426.
- Zitter, T.A. (1996): Cucurbit Diseases. In: Zitter, T.A., Hopkins, D.L., Thomas, C.E. (Eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 1-2.
- Zitter, T.A., Murphy, J.F. (2009): *Cucumber mosaic*. The Plant Health Instructor.
- Zitter, T.A., Murphy, J.F. (2014): *Cucumber mosaic virus*. In: Jones, J.B., Zitter, T.A., Momol, T.M., Miller, S.A. (Eds.), *Compendium of Tomato Diseases and Pests*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 83-84.

Prilog 1. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) CP gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije (deo 1)

	449-12	473-12	610-11	286-12	201-11	163-08	674-11	717-11	720-11	280-12	415-07	115-08	151-08	171-08	270-09	500-10	230-10	570-11	514-11	283-12	477-07	598-07
449-12	/	100	100	100	100	100	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
473-12	99.8	/	100	100	100	100	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
610-11	99.8	100	/	100	100	100	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
286-12	99.8	99.6	99.6	/	100	100	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
201-11	99.8	100	100	99.6	/	100	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
163-08	99.8	100	100	99.6	100	/	100	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
674-11	99.8	100	100	99.6	100	100	/	96.8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
717-11	97.2	97	97	97	97	97	97	/	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8
720-11	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
280-12	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
415-07	99.1	99.4	99.4	98.9	99.4	99.4	99.4	96.4	99.4	99.4	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
115-08	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
151-08	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	96.6	99.6	99.6	98.9	99.8	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100
171-08	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.6	99.6	99.4	/	100	100	100	100	100	100	100	100
270-09	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	/	100	100	100	100	100	100	100
500-10	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	96.6	99.6	99.6	98.9	99.8	99.6	99.4	99.6	/	100	100	100	100	100	100
230-10	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	/	100	100	100	100	100
570-11	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	99.6	/	100	100	100	100
514-11	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	/	100	100	100
283-12	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	/	100	100
477-07	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	99.6	99.6	99.8	99.8	/	100
598-07	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	/
542-08	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
471-09	98.9	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	96.2	99.1	99.1	98.5	99.4	99.1	98.9	99.1	99.1	98.9	98.9	99.1	99.1	98.9	98.9
723-10	99.1	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	97.6	98.9	98.9	98.3	98.7	98.5	98.7	98.9	98.5	98.7	98.7	98.9	98.9	98.9	98.7
746-07	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.6
670-08	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.4	99.6	99.8	99.4	100	99.6	99.8	99.8	99.8	99.6
207-09	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
647-10	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
533-2-1	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
ARI-12	99.4	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	96.6	99.1	99.1	98.5	98.9	98.7	98.9	99.1	98.7	98.9	98.9	99.1	99.1	99.1	98.9
58-12	99.6	99.8	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	96.8	99.8	99.8	99.6	99.6	99.4	100	99.8	99.4	99.6	99.6	99.8	99.8	99.6	99.6
650-07	99.4	99.6	99.6	99.1	99.6	99.6	99.6	96.6	99.6	99.6	98.9	99.4	99.1	99.4	99.6	99.1	99.4	99.4	99.4	99.6	99.6	99.4
702-07	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
202-08	96.8	97	97	96.6	97	97	97	94.2	97	97	96.4	96.8	96.6	96.8	97	96.6	96.8	96.8	97	97	96.8	96.8
267-13	99.8	100	100	99.6	100	100	100	97	100	100	99.4	99.8	99.6	99.8	100	99.6	99.8	99.8	100	100	99.8	99.8
79-13	80.3	80.1	80.1	80.6	80.1	80.1	80.1	78.2	80.1	80.1	80.6	80.3	80.6	80.1	80.1	80.1	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	79.9
540-10	79.9	79.7	79.7	80.1	79.7	79.7	79.7	77.8	79.7	79.7	80.1	79.9	80.1	79.7	79.7	79.9	79.7	79.7	79.7	79.7	79.9	79.7
581-11	80.3	80.1	80.1	80.6	80.1	80.1	80.1	78.2	80.1	80.1	80.6	80.3	80.6	80.1	80.1	80.1	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	79.9
581p-11	80.3	80.1	80.1	80.6	80.1	80.1	80.1	78.2	80.1	80.1	80.6	80.3	80.6	80.1	80.1	80.1	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	79.9
242-09	78.6	78.4	78.4	78.6	78.4	78.4	78.4	76.5	78.4	78.4	78.8	78.4	78.6	78.4	78.4	78.2	78.6	78.4	78.4	78.4	78.6	78.4
101-08	80.1	79.9	79.9	80.3	79.9	79.9	79.9	78	79.9	79.9	80.3	80.1	80.3	79.9	79.9	79.9	80.1	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9
1-12	79.9	79.7	79.7	80.1	79.7	79.7	79.7	77.8	79.7	79.7	80.1	79.9	80.1	79.7	79.7	79.7	79.9	79.7	79.7	79.7	79.9	79.7
52-13	79.9	79.7	79.7	80.1	79.7	79.7	79.7	77.8	79.7	79.7	80.1	79.9	80.1	79.7	79.7	79.7	79.9	79.7	79.7	79.7	79.9	79.7

Prilog 1. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) CP gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije (deo 2)

	542-08	471-09	723-10	746-07	670-08	207-09	647-10	533-2-11	ARI-12	58-12	650-07	702-07	202-08	267-13	79-13	540-10	581-11	581p-11	242-09	101-08	1-12	52-13
449-12	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
473-12	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
610-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
286-12	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
201-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
163-08	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
674-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
717-11	96.8	94.9	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.2	96.8	96.2	96.8	90.4	96.8	85.3	84.6	85.3	85.3	81.4	85.3	84.6	84.6
720-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
280-12	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
415-07	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
115-08	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
151-08	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
171-08	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
270-09	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
500-10	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
230-10	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
570-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
514-11	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
283-12	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
477-07	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
598-07	100	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
542-08	/	98.1	100	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
471-09	99.1	/	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	97.4	98.1	98.7	98.1	91.7	98.1	85.9	85.3	85.9	85.9	82.1	85.9	85.3	85.3
723-10	98.9	98.1	/	100	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
746-07	99.8	98.9	98.7	/	100	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
670-08	99.8	98.9	98.7	99.6	/	100	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
207-09	100	99.1	98.9	99.8	99.8	/	100	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
647-10	100	99.1	98.9	99.8	99.8	100	/	100	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
533-2-11	100	99.1	98.9	99.8	99.8	100	100	/	99.4	100	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
ARI-12	99.1	98.3	98.5	98.9	98.9	99.1	99.1	99.1	/	99.4	98.7	99.4	92.9	99.4	88.5	87.8	88.5	88.5	84.6	88.5	87.8	87.8
58-12	99.8	98.9	98.7	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	98.9	/	99.4	100	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
650-07	99.6	99.1	98.5	99.4	99.4	99.6	99.6	99.6	98.7	99.4	/	99.4	92.9	99.4	87.2	86.5	87.2	87.2	83.3	87.2	86.5	86.5
702-07	100	99.1	98.9	99.8	99.8	100	100	100	99.1	99.8	99.6	/	93.6	100	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
202-08	97	96.2	96.4	96.8	96.8	97	97	97	96.2	96.8	96.6	97	/	93.6	83.3	82.7	83.3	83.3	79.5	83.3	82.7	82.7
267-13	100	99.1	98.9	99.8	99.8	100	100	100	99.1	99.8	99.6	100	97	/	87.8	87.2	87.8	87.8	84	87.8	87.2	87.2
79-13	80.1	79.7	80.3	80.3	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	78.2	80.1	/	99.4	100	100	96.2	100	99.4	99.4
540-10	79.7	79.3	79.9	79.9	79.9	79.7	79.7	79.7	80.1	79.7	79.3	79.7	77.8	79.7	98.7	/	99.4	99.4	96.8	99.4	100	100
581-11	80.1	79.7	80.3	80.3	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	79.7	80.1	78.2	80.1	99.1	98.7	/	100	96.2	100	99.4	99.4
581p-11	80.1	79.7	80.3	80.3	80.3	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	79.7	80.1	78.2	80.1	99.1	98.7	100	/	96.2	100	99.4	99.4
242-09	78.4	77.8	78.6	78.6	78.6	78.4	78.4	78.4	78.8	78.4	78	78.4	76.3	78.4	96.6	97.9	96.6	96.6	/	96.2	96.8	96.8
101-08	79.9	79.5	80.1	80.1	80.1	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	79.5	79.9	78	79.9	99.4	98.9	99.4	99.4	96.8	/	99.4	99.4
1-12	79.7	79.3	79.9	79.9	79.9	79.7	79.7	79.7	80.1	79.7	79.3	79.7	77.8	79.7	98.7	100	98.7	98.7	97.9	98.9	/	100
52-13	79.7	79.3	79.9	79.9	79.9	79.7	79.7	79.7	80.1	79.7	79.3	79.7	77.8	79.7	98.7	100	98.7	98.7	97.9	98.9	100	/

Prilog 2. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) MP gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije

	473-12	286-12	201-11	674-11	415-07	270-09	500-10	230-10	570-11	723-10	581-11	101-08	670-08	58-12	650-07	1-12	540-10	79-13	267-13
473-12	/	99.5	99.5	100	100	99	99.5	100	100	100	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
286-12	99.5	/	99	99.5	99.5	99	99	99.5	99.5	99.5	86.2	86.2	99.5	99.5	99.5	86.2	99.5	86.2	99.5
201-11	99.7	99.2	/	99.5	99.5	98.5	99	99.5	99.5	99.5	86.2	86.2	99.5	99	99.5	86.2	99.5	86.2	99.5
674-11	100	99.5	99.7	/	100	99	99.5	100	100	100	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
415-07	99.5	99	99.2	99.5	/	99	99.5	100	100	100	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
270-09	99.5	99.5	99.2	99.5	99	/	98.5	99	99	99	86.2	86.2	99	99.5	99	86.2	99	86.2	99
500-10	99	98.8	98.6	99	98.5	98.8	/	99.5	99.5	99.5	85.7	85.7	99.5	99	99.5	85.7	99.5	85.7	99.5
230-10	99.3	98.8	99	99.3	99.8	98.8	98.3	/	100	100	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
570-11	99.8	99.7	99.5	99.8	99.3	99.7	99.2	99.2	/	100	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
723-10	98.8	98.6	98.5	98.8	98.6	98.6	99.2	98.5	99	/	86.2	86.2	100	99.5	100	86.2	100	86.2	100
581-11	78	77.6	78	78	77.8	77.8	78	78	77.8	77.8	/	99.5	86.2	86.2	86.2	99.5	86.2	100	86.2
101-08	76.9	76.6	76.9	76.9	76.8	76.8	76.9	76.9	76.8	76.8	98.3	/	86.2	86.2	86.2	99	86.2	99.5	86.2
670-08	99.2	98.6	98.8	99.2	98.8	98.6	98.1	98.6	99	98	77.8	76.8	/	99.5	100	86.2	100	86.2	100
58-12	99.8	99.5	99.5	99.8	99.3	99.7	98.8	99.2	99.7	98.6	78	76.9	99	/	99.5	86.2	99.5	86.2	99.5
650-07	99.7	99.2	99.3	99.7	99.2	99.2	98.6	99	99.5	98.5	77.8	76.8	98.8	99.5	/	86.2	100	86.2	100
1-12	78	77.6	78	78	77.5	78	77.6	77.6	77.8	77.5	97.6	98	77.6	78	77.8	/	86.2	99.5	86.2
540-10	100	99.5	99.7	100	99.5	99.5	99	99.3	99.8	98.8	78	76.9	99.2	99.8	99.7	78	/	86.2	100
79-13	77.6	77.3	77.6	77.6	77.3	77.5	77.6	77.5	77.5	77.5	98.3	98.6	77.5	77.6	77.5	98.8	77.6	/	86.2
267-13	100	99.5	99.7	100	99.5	99.5	99	99.3	99.8	98.8	78	76.9	99.2	99.8	99.7	78	100	77.6	/

Prilog 3. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) 2a gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije

	473-12	286-12	201-11	674-11	415-07	270-09	500-10	230-10	570-11	723-10	581-11	101-08	670-08	58-12	650-07	1-12	540-10	79-13	267-13
473-12	/	97.1	98.8	97.6	100	99.4	100	100	100	99.8	100	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
286-12	96.7	/	97.1	99.4	97.1	97.6	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	98.2	97.1	97.6	97.1	97.1	97.1	99.4
201-11	98.8	96.7	/	97.6	98.8	99.4	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	99.4	98.8	98.8	98.8	97.6
674-11	97.1	99.6	97.1	/	97.6	98.2	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	98.8	97.6	98.2	97.6	97.6	97.6	100
415-07	99.4	96.9	99	97.3	/	99.4	100	100	100	98.8	100	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
270-09	99	97.3	99	97.7	99.2	/	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	100	99.4	99.4	99.4	98.2
500-10	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	/	100	100	98.8	100	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
230-10	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	/	100	98.8	100	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
570-11	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	/	98.8	100	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
723-10	99	97.3	99	97.7	99.2	99.6	99.2	99.2	99.2	/	98.8	98.8	98.8	98.8	99.4	100	98.8	98.8	97.6
581-11	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	100	99.2	/	100	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
101-08	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	100	99.2	100	/	98.8	100	99.4	98.8	100	100	97.6
670-08	97.5	99.2	97.5	99.6	97.7	98	97.7	97.7	97.7	98	97.7	97.7	/	98.8	99.4	98.8	98.8	98.8	98.8
58-12	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	100	99.2	100	100	97.7	/	99.4	98.8	100	100	97.6
650-07	99.4	97.3	99.4	97.7	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	98	99.6	/	99.4	99.4	99.4	98.2
1-12	98.8	97.1	98.8	97.5	99	99.4	99	99	99	99.8	99	99	97.8	99	99.4	/	98.8	98.8	97.6
540-10	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	100	99.2	100	100	97.7	100	99.6	99	/	100	97.6
79-13	99.4	96.9	99	97.3	100	99.2	100	100	100	99.2	100	100	97.7	100	99.6	99	100	/	97.6
267-13	96.9	99.8	96.9	99.8	97.1	97.5	97.1	97.1	97.1	97.5	97.1	97.1	99.4	97.1	97.5	97.3	97.1	97.1	/

Prilog 4. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) 2b gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije

	473-12	286-12	201-11	674-11	415-07	270-09	500-10	230-10	570-11	723-10	581-11	101-08	670-08	58-12	650-07	1-12	540-10	79-13	267-13
473-12	/	94.7	97.9	97.9	95.8	95.8	95.8	97.9	97.9	94.7	55.2	54.2	97.9	97.9	97.9	54.2	97.9	96.9	54.2
286-12	95.7	/	96.9	96.9	99	94.7	94.7	96.9	96.9	93.8	58.9	55.2	96.9	96.9	96.9	55.2	96.9	97.9	55.2
201-11	99	96.7	/	100	97.9	97.9	97.9	100	100	96.9	55.2	54.2	100	100	100	54.2	100	99	54.2
674-11	99.3	96.4	99.7	/	97.9	97.9	97.9	100	100	96.9	55.2	54.2	100	100	100	54.2	100	99	54.2
415-07	95.7	99.3	96.7	96.4	/	95.8	95.8	97.9	97.9	94.7	55.2	54.2	97.9	97.9	97.9	54.2	97.9	99	54.2
270-09	96.4	94.4	97.4	97	94.4	/	95.8	97.9	97.9	94.7	54.2	53.1	97.9	97.9	97.9	53.1	97.9	96.9	53.1
500-10	97.4	97	98.3	98	97	96.4	/	97.9	97.9	99	58.9	55.2	97.9	97.9	97.9	55.2	97.9	96.9	55.2
230-10	98.7	97	99.7	99.3	97	97.7	98.7	/	100	96.9	55.2	54.2	100	100	100	54.2	100	99	54.2
570-11	99.3	96.4	99.7	100	96.4	97	98	99.3	/	96.9	55.2	54.2	100	100	100	54.2	100	99	54.2
723-10	96.7	96.4	97.7	97.4	96.4	95.7	99.3	98	97.4	/	58.9	55.2	96.9	96.9	96.9	55.2	96.9	97.9	55.2
581-11	64.4	68.7	64.7	64.4	68.7	68.7	64.7	64.7	64.4	65.3	/	99	55.2	55.2	55.2	98.9	55.2	55.2	98.9
101-08	63.4	64.7	64.4	63.7	64.4	64.4	64.4	64.4	63.7	64.7	99.3	/	54.2	54.2	54.2	100	54.2	54.2	100
670-08	98.7	97	99.7	99.3	97	97.7	98.7	100	99.3	98	64.7	64.4	/	100	100	54.2	100	99	54.2
58-12	98.7	97	99.7	99.3	97	97.7	98.7	100	99.3	98	64.7	64.4	100	/	100	54.2	100	99	54.2
650-07	99.3	96.4	99.7	100	96.4	97	98	99.3	100	97.4	64.4	63.7	99.3	99.3	/	54.2	100	99	54.2
1-12	63.4	64.7	64.4	63.7	64.4	64.4	64	64	63.7	64.7	98.3	99	64	64	63.7	/	54.2	54.2	100
540-10	99.3	96.4	99.7	100	96.4	97	98	99.3	100	97.4	64.4	63.7	99.3	99.3	100	63.7	/	99	54.2
79-13	95.7	98.7	96.7	96.4	98.7	94.4	97	97	96.4	96.4	64.7	64	97	97	96.4	64.4	96.4	/	54.2
267-13	63.4	64.4	63.7	63.4	64.4	64.4	63.7	63.7	63.4	64.4	99	99.7	63.7	63.7	63.4	98.7	63.4	64.4	/

Prilog 5. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) 1a gena svih ispitivanih izolata poreklom iz Srbije

	473-12	286-12	674-11	415-07	570-11	723-10	581-11	101-08	670-08	58-12	650-07	1-12	540-10	79-13	267-13
473-12	/	99.2	99.6	99.2	99.6	93.5	87.8	87.8	99.6	99.6	99.2	87.8	99.2	86.9	93.5
286-12	95.8	/	99.6	100	99.6	93.9	88.2	88.2	99.6	99.6	99.2	88.2	98.2	87.3	93.9
674-11	99.3	95.9	/	99.6	100	93.5	88.2	88.2	100	100	99.6	88.2	99.2	87.3	93.5
415-07	95.6	99.9	95.8	/	99.6	93.9	88.2	88.2	99.6	99.6	99.2	88.2	98.2	87.3	93.9
570-11	99.3	96.2	99.5	96.1	/	93.5	88.2	88.2	100	100	99.6	88.2	99.2	87.3	93.5
723-10	91.6	92.1	91.4	92	91.4	/	86.1	86.1	93.5	93.5	93.1	86.1	93.5	85.3	100
581-11	79.7	80.4	80	80.3	79.9	80.5	/	100	88.2	88.2	87.8	100	87.8	99.2	86.1
101-08	79.9	80.5	80.1	80.4	80	81	99.6	/	88.2	88.2	87.8	100	87.8	99.2	86.1
670-08	99	95.9	99.2	95.8	99.7	91.2	79.6	79.7	/	100	99.6	88.2	99.2	87.3	93.5
58-12	99.9	95.9	99.5	95.8	99.5	91.7	79.9	80	99.2	/	99.6	88.2	99.2	87.3	93.5
650-07	98.5	95.6	98.6	95.5	99.2	90.9	79.3	79.5	98.9	98.6	/	97.8	98.8	86.9	93.1
1-12	79.9	80.5	80.1	80.4	80	81.2	99.3	99.5	79.7	80	79.5	/	87.8	99.2	86.1
540-10	98.8	95.9	98.9	95.8	99.2	91.4	79.9	80	98.9	98.9	98.4	80	/	86.9	93.5
79-13	79.7	80.4	80	80.3	79.9	80.5	98.9	99	79.6	79.9	79.3	99	79.9	/	85.3
267-13	91.4	91.7	91.3	91.6	91.3	99.2	80.7	81.1	91	91.6	90.7	81.4	91.3	80.7	/

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. 473-12		-5.387	-5.470	-1.951	-1.915	-6.660	-11.778	-11.587	-2.468	1.023	-2.992	-2.087	-11.599	-11.311	-6.620
2. 286-12	1.000		-1.018	-5.552	-5.230	-6.715	-11.397	-11.205	-5.298	-5.455	-5.496	-5.185	-11.178	-10.922	-7.030
3. 674-11	1.000	1.000		-5.629	-5.331	-6.775	-11.375	-11.182	-5.399	-5.537	-5.623	-5.284	-11.157	-10.911	-7.063
4. 415-07	1.000	1.000	1.000		-2.019	-6.965	-11.786	-11.623	-2.493	-2.124	-2.967	-2.197	-11.620	-11.327	-6.916
5. 570-11	1.000	1.000	1.000	1.000		-6.948	-11.958	-11.765	-1.471	-2.093	-2.090	-1.652	-11.791	-11.498	-6.928
6. 723-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.535	-10.369	-7.152	-6.719	-7.126	-6.905	-10.241	-10.306	-2.551
7. 581-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.800	-12.086	-11.818	-12.018	-11.714	-2.289	-1.875	-10.353
8. 101-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-11.868	-11.626	-11.820	-11.495	-2.133	-1.587	-10.181
9. 670-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.616	-2.515	-2.181	-11.920	-11.617	-7.127
10. 58-12	0.154	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-3.016	-2.245	-11.639	-11.352	-6.676
11. 650-07	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.783	-11.856	-11.585	-7.075
12. 540-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-11.523	-11.233	-6.906
13. 1-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.586	-10.070
14. 79-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.147
15. 267-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

Prilog 6. Rezultati „codon-based“ testa pozitivne selekcije za svaki par ispitivanih sekvenci 1a gena 15 izolata *Cucumber mosaic virus*. Verovatnoća odbacivanja nulte hipoteze striktno neutralnosti ($d_N = d_S$) u korist alternativne ($d_N > d_S$) prikazana je ispod dijagonale. Vrednosti verovatnoće manje od 0,05 smatraju se značajnim na nivou značajnosti 5%. Sa gornje strane dijagonale prikazane su Z vrednosti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. 473-12		-3.102	-1.394	-3.046	-1.780	-1.919	-1.780	-1.780	-1.780	-1.374	-1.780	-1.780	-3.269	-1.780	-1.219	-1.780	-1.690	-1.780	-3.225
2. 286-12	1.000		-3.076	-0.678	-2.841	-2.768	-2.841	-2.841	-2.841	-2.424	-2.841	-2.841	-0.063	-2.841	-2.754	-2.841	-2.616	-2.841	1.080
3. 201-11	1.000	1.000		-2.992	-1.390	-1.910	-1.390	-1.390	-1.390	-1.353	-1.390	-1.390	-3.204	-1.390	-1.188	-1.390	-1.670	-1.390	-3.196
4. 674-11	1.000	1.000	1.000		-2.771	-2.723	-2.771	-2.771	-2.771	-2.349	-2.771	-2.771	1.464	-2.771	-2.697	-2.771	-2.550	-2.771	-1.015
5. 415-07	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.541	0.000	0.000	0.000	-0.914	0.000	0.000	-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
6. 270-09	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.541	-1.541	-1.541	-0.675	-1.541	-1.541	-2.944	-1.541	-1.484	-1.541	-1.222	-1.541	-2.891
7. 500-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	0.000	-0.914	0.000	0.000	-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
8. 230-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	-0.914	0.000	0.000	-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
9. 570-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.914	0.000	0.000	-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
10. 723-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.914	-0.914	-2.581	-0.914	-0.666	-0.914	-0.984	-0.914	-2.548
11. 581-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
12. 101-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.994	0.000	-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
13. 670-08	1.000	1.000	1.000	0.073	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.994	-2.930	-2.994	-2.775	-2.994	-0.354
14. 58-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.658	0.000	-1.352	0.000	-2.960
15. 650-07	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.658	-1.196	-0.658	-2.879
16. 540-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.352	0.000	-2.960
17. 1-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.352	-2.732
18. 79-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.960
19. 267-13	1.000	0.141	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Prilog 7. Rezultati „codon-based“ testa pozitivne selekcije za svaki par ispitivanih sekvenci 2a gena 19 izolata *Cucumber mosaic virus*. Verovatnoća odbacivanja nulte hipoteze striktno neutralnosti ($d_N = d_S$) u korist alternativne ($d_N > d_S$) prikazana je ispod dijagonale. Vrednosti verovatnoće manje od 0,05 smatraju se značajnim na nivou značajnosti 5%. Sa gornje strane dijagonale prikazane su Z vrednosti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. 473-12		-2.358	-0.377	-2.692	1.506	-2.234	-1.497	-0.982	1.506	-1.666	-3.509	-3.513	-0.982	-0.982	1.506	1.506	-3.565	-2.780	-3.513
2. 286-12	1.000		-2.421	-0.668	-2.619	-3.027	-1.211	-2.150	-2.619	-1.393	-3.255	-3.261	-2.150	-2.150	-2.619	-2.619	-3.273	-0.369	-3.261
3. 201-11	1.000	1.000		-2.779	-1.013	-2.270	-1.389	-1.010	-1.013	-1.551	-3.178	-3.178	-1.010	-1.010	-1.013	-1.013	-3.221	-2.876	-3.178
4. 674-11	1.000	1.000	1.000		-2.950	-3.343	-1.674	-2.541	-2.950	-1.821	-3.183	-3.191	-2.541	-2.541	-2.950	-2.950	-3.236	-1.180	-3.191
5. 415-07	0.067	1.000	1.000	1.000		-2.507	-1.853	-1.457	0.000	-1.966	-3.382	-3.380	-1.457	-1.457	0.000	0.000	-3.427	-3.040	-3.380
6. 270-09	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.288	-1.981	-2.507	-2.429	-3.205	-3.208	-1.981	-1.981	-2.507	-2.507	-3.255	-3.459	-3.208
7. 500-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.967	-1.853	-0.700	-3.318	-3.317	-0.967	-0.967	-1.853	-1.853	-3.360	-1.820	-3.317
8. 230-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.457	-1.185	-3.178	-3.178	0.000	0.000	-1.457	-1.457	-3.221	-2.629	-3.178
9. 570-11	0.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.966	-3.382	-3.380	-1.457	-1.457	0.000	0.000	-3.427	-3.040	-3.380
10. 723-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-3.289	-3.286	-1.185	-1.185	-1.966	-1.966	-3.334	-1.950	-3.286
11. 581-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-0.640	-3.178	-3.178	-3.382	-3.382	-1.705	-2.937	-0.640
12. 101-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-3.178	-3.178	-3.380	-3.380	-1.637	-2.949	0.000
13. 670-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	-1.457	-1.457	-3.221	-2.629	-3.178
14. 58-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.457	-1.457	-3.221	-2.629	-3.178
15. 650-07	0.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	-3.427	-3.040	-3.380
16. 540-10	0.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-3.427	-3.040	-3.380
17. 1-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.990	-1.637
18. 79-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.949
19. 267-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

Prilog 8. Rezultati „codon-based“ testa pozitivne selekcije za svaki par ispitivanih sekvenci 2b gena 19 izolata *Cucumber mosaic virus*. Verovatnoća odbacivanja nulte hipoteze striktno neutralnosti ($d_N = d_S$) u korist alternativne ($d_N > d_S$) prikazana je ispod dijagonale. Vrednosti verovatnoće manje od 0,05 smatraju se značajnim na nivou značajnosti 5%. Sa gornje strane dijagonale prikazane su Z vrednosti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. 473-12		-1.190	-0.648	0.000	-1.711	-0.334	-2.110	-2.021	-1.033	-2.680	-10.170	-10.804	-2.454	1.032	-1.518	0.000	-10.100	-10.451	0.000
2. 286-12	1.000		-1.316	-1.190	-2.082	-0.331	-1.944	-2.337	-0.664	-2.594	-10.429	-11.077	-2.664	-1.192	-1.923	-1.190	-10.363	-10.734	-1.190
3. 201-11	1.000	1.000		-0.648	-1.847	-0.683	-2.149	-2.137	-1.163	-2.711	-10.165	-10.800	-2.539	-0.325	-1.631	-0.648	-10.096	-10.447	-0.648
4. 674-11	1.000	1.000	1.000		-1.711	-0.334	-2.110	-2.021	-1.033	-2.680	-10.170	-10.804	-2.454	1.032	-1.518	0.000	-10.100	-10.451	0.000
5. 415-07	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.612	-2.683	-1.010	-1.979	-2.805	-10.119	-10.710	-2.797	-1.503	-2.276	-1.711	-10.194	-10.442	-1.711
6. 270-09	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.495	-1.914	1.430	-2.199	-10.234	-10.840	-2.283	-0.675	-1.386	-0.334	-10.028	-10.506	-0.334
7. 500-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.910	-1.872	-1.840	-10.219	-10.786	-3.214	-1.939	-2.695	-2.110	-10.435	-10.432	-2.110
8. 230-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.253	-3.035	-10.102	-10.693	-3.016	-1.838	-2.519	-2.021	-10.154	-10.403	-2.021
9. 570-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.078	1.000	1.000		-2.517	-10.246	-10.861	-2.636	-0.662	-1.823	-1.033	-10.170	-10.530	-1.033
10. 723-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.001	-10.547	-3.655	-2.538	-3.158	-2.680	-10.249	-10.213	-2.680
11. 581-11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.867	-10.209	-10.083	-10.297	-10.170	-3.680	-3.261	-10.170
12. 101-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.839	-10.718	-10.915	-10.804	-2.974	-2.534	-10.804
13. 670-08	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.257	-2.898	-2.454	-10.220	-10.494	-2.454
14. 58-12	0.152	1.000	1.000	0.152	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.235	1.032	-10.018	-10.368	1.032
15. 650-07	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-1.518	-10.197	-10.562	-1.518
16. 540-10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.100	-10.451	0.000
17. 1-12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-2.435	-10.100
18. 79-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		-10.451
19. 267-13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

Prilog 9. Rezultati „codon-based“ testa pozitivne selekcije za svaki par ispitivanih sekvenci MP gena 19 izolata *Cucumber mosaic virus*. Verovatnoća odbacivanja nulte hipoteze striktno neutralnosti ($d_N = d_S$) u korist alternativne ($d_N > d_S$) prikazana je ispod dijagonale. Vrednosti verovatnoće manje od 0,05 smatraju se značajnim na nivou značajnosti 5%. Sa gornje strane dijagonale prikazane su vrednosti Z vrednosti.

BIOGRAFIJA

Katarina N. Milojević je rođena 20.05.1987. godine u Požarevcu. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,53 (devet i 53/100). Diplomski rad pod naslovom: „Molekularna detekcija i identifikacija virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) iz duvana“ odbranila je sa ocenom 10 (deset). Dobitnik je nagrade Zadužbine Nikole Spasića za najboljeg studenta treće godine Poljoprivrednog fakulteta, a školske 2009/10. godine bila je stipendista Fonda za mlade talente (Ministarstvo omladine i sporta Republike Srbije).

Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Poljoprivrednom fakultetu, Studijski program: Poljoprivredne nauke, Modul: Fitomedicina upisala je 2010/11. godine. Od 2011-2013. godine kao stipendista Ministarstva prosvete i nauke bila je angažovana na Katedri za fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog fakulteta, na projektu „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“ (evidencioni broj projekta III 43001), a od 01.12.2013. godine angažovana je na istom projektu kao istraživač-saradnik. Od 2013. godine učesnik je međunarodnog FP7 projekta: „Advancing research in agriculture and food sciences at Faculty of Agriculture“, University of Belgrade. EU Commission project AREA (No 316004).

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije, Srpskog mikrobiološkog društva i Društva virusologa Srbije.

Do sada je objavila i saopštila ukupno 36 naučnih radova.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Katarina Milojević

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 10/50

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Biološka i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca
(*Cucumber mosaic virus*) u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Katarina Milojević
Broj indeksa 10/50
Studijski program Poljoprivredne nauke
Naslov rada Biološka i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca
(Cucumber mosaic virus) u Srbiji
Mentor prof. dr Branka Krstić, redovni profesor

Potpisani/a Katarina Milojević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Biološka i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca

(*Cucumber mosaic virus*) u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____
