

## BIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VIRUSA MOZAIKA KRSTAVCA POREKLOM IZ LUBENICE U SRBIJI

KATARINA MILOJEVIĆ, IVANA STANKOVIĆ, ANA VUČUROVIĆ, DANIJELA RISTIĆ, DUŠAN NIKOLIĆ,  
ALEKSANDRA BULAJIĆ, BRANKA KRSTIĆ

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd  
e-mail: branka.krstic@agrif.bg.ac.rs

### REZIME

Proučavanjem pojave i rasprostranjenosti virusa mozaika krastavca u usevu lubenice u Srbiji tokom 2012. godine, prisustvo virusa utvrđeno je u pet od šest pregledanih lokaliteta. Prisustvo virusa ustanovljeno je u 24,05% serološki testiranih uzoraka (DAS-ELISA), a najzastupljeniji je bio na lokalitetu Silbaš. Tokom ovih istraživanja virus mozaika krastavca češće je bio prisutan u mešanim infekcijama sa ZYMV i/ili WMV (12,66%), dok je prisustvo pojedinačne infekcije utvrđeno u nešto nižem procentu, 11,39%. Mehaničkim inokulacijama *N. glutinosa*, dobijeno je pet izolata, od kojih su dva odabrana za dalju biološku karakterizaciju. Na osnovu tipa i jačine simptoma na test-biljkama, utvrđena je fenotipska varijabilnost ispitivanih izolata. Molekularna detekcija obavljena je amplifikacijom fragmenta dužine 871 bp kod svih ispitivanih izolata korišćenjem para prajmera CMVCPfwd/CPREV, koji omogućavaju umnožavanje gena za protein omotača i deo 5' i 3' UTR regiona. Analizom sekvenci kompletnog gena za protein omotača i rekonstrukcijom filogenetskog stabla, utvrđena je pripadnost izolata CMV iz lubenice iz Srbije podgrupi IA, koja obuhvata većinu izolata odabranih za filogenetsku analizu.

**Ključne reči:** CMV, lubenica, DAS-ELISA, biotest, RT-PCR, filogenetske analize

### UVOD

Lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) vodi poreklo iz Namibije (severna Afrika) gde i danas postoji u divljoj formi zajedno sa drugim *Citrullus* vrstama i ubraja se među najstarije gajene biljke. Počeci gajenja lubenice datiraju još iz starog Egipta gde je jedna od vodećih povrtnarskih kultura već 4000 godina (Szamosi et al., 2009). Ukupan prinos lubenice u svetu tokom 2011. godine iznosio je 104,5 miliona t sa oko 3,5 miliona ha koliko je bilo zasejano ovom kulturom. U Srbiji, pod ovom kulturom nalazi se uku-

pno 13,8 hiljada ha, a najznačajniji regioni gajenja lubenice po površini i prinosu su Bačka, Srem i Mačva (FAO, 2011).

Brojni fitopatogeni organizmi ugrožavaju proizvodnju lubenice u mnogim proizvodnim područjima širom sveta, ali ekonomski najveće štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta izazivaju biljni virusi (Providenti, 1996; Lecoq et al., 2003). Od opisanih 35 vrsta virusa infektivnih za lubenicu, kao ekonomski najznačajniji i najrasprostranjeniji virusi lubenice navode se: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika kukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV), vi-

rus prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV) i virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Yuki et al., 2000; Papayianis et al., 2005; Köklü and Yilmaz, 2006; da Silveira et al., 2009).

Virus mozaika krastavca tipičan je predstavnik roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* i jedan je od pet ekonomski najznačajnijih virusa na povrću i ukrasnom bilju (Scholthof et al., 2011). Prvi put je opisan 1916. godine u Americi kao prouzročivač oboljenja na krastavcu i muskatnoj tikvi (Francki et al., 1979). Od tada, CMV se proširio u mnoge delove sveta i danas se ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa, ali se njegovo dominantno prisustvo vezuje za umereno tople regione gde su i najpovoljniji uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši. Virus mozaika krastavca se prenosi na neperzistentan način sa više od 80 vrsta vaši, a najefikasniji vektori ovog virusa su *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008).

Smatra se da je CMV jedan od virusa sa najširim krugom domaćina koji uključuje oko 1300 vrsta iz više od 500 rodova iz 100 botaničkih familija (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008). Jedan je od najznačajnijih virusa biljaka iz familije tikava, uključujući i lubenicu, i odgovoran je za brojne epidemije i značajne gubitke u proizvodnji u većini regiona gajenja ovih kultura. Virus mozaika krastavca prisutan je na biljkama familije tikava i u našoj zemlji. Prva istraživanja virusa mozaika krastavca na biljkama iz familije tikava sprovedena su 1966. godine kada je prvi put opisan na dinji (Stakić i Nikolić, 1966) i drugim biljkama iz familije tikava (Pejčinovski, 1978). Ispitivanja viroza tikava, vršena u Srbiji u poslednjih desetak godina ukazuju da je CMV jedan od stalno prisutnih i ekonomski štetnih virusa na velikom broju gajenih vrsta ove familije (Dukić i sar., 2001; Krstić et al., 2002; Vučurović i sar., 2008, 2011; Vučurović et al., 2012a), dok je prisustvo ovog virusa na lubenici prvi put zabeleženo 2012. godine (Milojević et al., 2012).

Budući da je CMV u našoj zemlji stalno prisutan na vrstama iz familije Cucurbitaceae u veoma visokom procentu (Vučurović i sar., 2011; Vučurović et al., 2012a) i s obzirom na rastući značaj gajenja lubenice u Srbiji i prethodnu detekciju CMV na lubenici (Milojević et al., 2012), osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se ispita njegova zastupljenost u usevu lubenice u Srbiji, kao i da se filogenetskim analizama odredi pripadnost odabranih izolata iz lubenice poreklom iz Srbije genetičkim grupama ovog virusa.

## MATERIJAL I METODE

### Sakupljanje uzoraka lubenice

Tokom 2012. godine, radi utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave CMV u usevu lubenice, pregledano je šest različitih lokaliteta gajenja u Srbiji: Medveđa, Mačkovac, Silbaš, Gornji Tavankut, Togočevce i Surčin. Ukupno je sakupljeno 79 uzoraka od čega 57 uzoraka sa različitim tipovima simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu, a 22 uzorka su sakupljena sa slučajno odabranih biljaka koje nisu ispoljile simptome virusne zaraze.

### Serološke analize

Sakupljeni simptomatični i asimptomatični uzorci lubenice tokom 2012. godine, testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) korišćenjem komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland) specifičnih za detekciju pet ekonomski najznačajnijih virusa lubenice: CMV, WMV, ZYMV, SqMV i PRSV, kako bi se utvrdile pojedinačne infekcije CMV ili mešane infekcije sa drugim virusima u koje je ovaj virus uključen. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu za sve testirane viruse. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:6. Nakon 1-2 časa od dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcija na 405 nm dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole (komercijalno dostupna negativna kontrola).

### Biološka karakterizacija izolata virusa mozaika krastavca

U cilju potvrde infektivne prirode oboljenja i dobijanja izolata odabran je po jedan uzorak lubenice sa svakog od pet lokaliteta u kojima je serološki dokazano prisustvo CMV. Inokulumom pripremljenim homogenizacijom lišća prirodno zaraženih biljaka lubenice u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera (pH 7) mehanički je inokulisano po pet biljaka *Nicotiana glutinosa* za svaki od odabranih uzoraka. Na ovaj način je dobijeno pet izolata koji se nisu razli-

kovali na osnovu tipa ispoljenih simptoma na lišću *N. glutinosa*. Za dalju detaljnu biološku karakterizaciju, mehaničkim inokulacijama niza test-biljaka, odabrana su dva izolata: izolat 449-12 iz lokaliteta Silbaš i 473-12 iz Gornjeg Tavankuta. U ispitivanje kruga domaćina i tipa ispoljenih simptoma uključene su sledeće test biljke: *Cucurbita pepo* 'Olinka', *Cucumis sativus* 'Delicates', *C. melo* 'Ananas', *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet', *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. tabacum* 'Samsun', *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. debneyii*, *S. lycopersicum* 'San Pjer', *Datura stramonium*, *Petunia x hybrida* i *Gomphrena globosa*.

Ispitivani izolati CMV inokulisani su na pet biljaka svake vrste eksperimentalnog domaćina u fenofazi 2-3 prava lista. Pojava i tip simptoma praćeni su u periodu do mesec dana nakon inokulacije. Moguće latentne infekcije test biljaka bez simptoma proveravane su DAS-ELISA metodom.

### Molekularna karakterizacija

U cilju molekularne detekcije i identifikacije CMV kao i potvrde rezultata dobijenih biološkim i serološkim analizama, primenjena je metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (reverse transcription-polimerase chain reaction, RT-PCR).

Ekstrakcija ukupnih RNK iz 100 mg lišća pet odabranih prirodno zaraženih biljaka lubenice obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema preporuci proizvođača. Ukupna izolovana RNK korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera CMV-CPfwd/CPrev (Milojević et al., 2012) koji omogućavaju umnožavanje fragmenta genomne RNA3 dužine 871 bp koji obuhvata kompletan gen za protein omotača („coat protein“, CP gen) i deo 5' i 3' UTR regiona. Reakciona smeša za RT-PCR sadržala je 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera koji sadrži 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP Miks (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP), 1 µl RT-PCR enzimskog miksa, 1,5 µl svakog prajmera (finalne koncentracije 0,6 µM), 1 µl izolovane ukupne RNK i RNase free vodu do ukupne zapremine od 25 µl. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat, 151-08 poreklom iz *C. pepo* 'Olinka' iz Srbije (GenBank Acc. No. HM065509), a kao negativna kontrola lišće nezaražene biljke lubenice. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; denaturacija 30 s na 94°C, elongacija 30 s na 58°C i ekstenzija 30 s na 72°C (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C u

trajanju od 10 min. Uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine od oko 871 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplicona korišćen je marker, MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Za dalju molekularnu karakterizaciju odbran je izolat 473-12 poreklom iz Gornjeg Tavankuta dobijen tokom ovih istraživanja, kao i izolat 449-12 iz Silbaša koji je na osnovu analize sekvence i stepena sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta prethodno identifikovan kao CMV (Milojević et al., 2012). Nakon prečišćavanja dobijenog RT-PCR produkta korišćenjem QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen) izolat 473-12 je poslat na uslužno sekvencioniranje (Macrogen, South Korea). Sekvencioniranje je obavljeno u oba smera, prajmerima koji su korišćeni i za amplifikaciju u RT-PCR reakciji. Dobijena sekvenca je obrađena pomoću Clustal W programa (Thompson et al., 1994) integrisanog unutar MEGA5 softvera (Tamura et al., 2011) čime je dobijena konsenzus sekvenca koja je zatim, sa relevantnim podacima vezanim za ispitivan izolat, deponovana u GenBank bazu podataka. Analiza dobijene sekvence prvo je obavljena upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize poređenjem sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Za proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranog izolata sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA5.

Filogenetske analize obavljene su rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog CP gena dva izolata iz lubenice poreklom iz Srbije i 36 sekvenci preuzetih iz GenBank (Tabela 1), korišćenjem Maximum parsimony metoda i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgrupa“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Tomato aspermy virus* (Tabela 1). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne susstitucije za izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura 2-parameter sa Gamma distribucijom (K2+G) u okviru softvera MEGA5.

**Tabela 1.** Sekvence CP gena izolata CMV dostupnih u GenBank korišćene za filogenetsku analizu.  
**Table 1.** CP gene sequences of CMV isolates from GenBank used in the phylogenetic analysis.

Virus Virus	Izolat <sup>a</sup> Isolate <sup>a</sup>	Zemlja Country	Biljka domaćin Host plant	Pristupni broj GenBank Accession Number
CMV	473-12 <sup>b</sup>	Srbija	<i>Citrullus lanatus</i>	KC878465
CMV	449-12 <sup>b</sup>	Srbija	<i>Citrullus lanatus</i>	JX280942
CMV	S	Južna Afrika	/ <sup>c</sup>	AF063610
CMV	LS	SAD	/	AF127976
CMV	trk7	Mađarska	<i>Trifolium repens</i>	L15336
CMV	Q	Australija	/	M21464
CMV	Tfn	Italija	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y16926
CMV	RB	Kina	<i>Phaseolus angularis</i>	AJ006990
CMV	P1	Kina	/	AJ006988
CMV	RZ	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EF159146
CMV	CTL	Kina	<i>Brassica chinensis</i>	EF213025
CMV	Cb7	Kina	<i>Solanum lycopersicum</i>	EF216867
CMV	PHz	Kina	<i>Pinellia ternata</i>	EU723569
CMV	BX	Kina	<i>Pinellia ternata</i>	DQ399550
CMV	FC	SAD	/	D10544
CMV	C94M3	SAD	<i>Cucumis melo</i>	AF523344
CMV	NS	Mađarska	<i>Raphanus sativus</i>	AJ511990
CMV	LiRS	Holandija	<i>Lilium</i> sp.	AJ131617
CMV	P6	Velika Britanija	/	D10545
CMV	/	Kolumbija	<i>Musa</i> sp.	U32859
CMV	I17F	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	X16386
CMV	R	Francuska	<i>Ranunculus</i> sp.	Y18138
CMV	NT9	Tajvan	<i>Solanum lycopersicum</i>	D28780
CMV	Cas	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	DQ018286
CMV	113	SAD	/	AF523340
CMV	Simp2	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	FJ621495
CMV	MAD99/4	Španija	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>melopepo</i>	AJ829770
CMV	MAD96/1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ829768
CMV	C	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	D00462
CMV	Fny	SAD	/	D10538
CMV	M	Velika Britanija	/	D10539
CMV	Leg	Japan	/	D16405
CMV	E5	Japan	/	D42080
CMV	/	Japan	/	D43800
CMV	Mf	Južna Koreja	/	AJ276481
CMV	Kor	Južna Koreja	/	L36251
CMV	Ly2	Južna Koreja	<i>Lilium longiflorum</i>	AJ296154
CMV	PR36	SAD	/	M98500
TAV <sup>d</sup>	V	Australija	/	NC003836

<sup>a</sup> - Podaci preuzeti iz GenBank; <sup>b</sup> - Izolati poreklom iz lubenice iz Srbije; <sup>c</sup> - Nepoznata biljka domaćin;

<sup>d</sup> - Sekvenca *Tomato aspermy virus* korišćena kao „outgrupa“.

<sup>e</sup> - All data are from GenBank; <sup>f</sup> - Isolates originating from watermelon from Serbia; <sup>g</sup> - Host plant is not known; <sup>h</sup>

<sup>i</sup> - *Tomato aspermy virus* sequence used as „outgroup“.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Simptomi u polju i učestalost pojave CMV u usevu lubenice

U svim pregledanim lokalitetima gajenja lubenice tokom 2012. godine zabeležena je pojava izraženih simptoma što je očigledno bila posledica ranih virusnih infekcija. Najučestaliji simptomi na listovima bili su različiti vidovi mozaika, od blagog do izraženog, 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. Ovakvi tipovi simptoma na biljama lubenice zabeleženi su i od strane Desbiez and Lecoq (1997) i Papayiannis et al. (2005). Tokom pregleda i sakupljanja uzoraka, pojava simptoma na plodovima lubenice nije uočena iako su simptomi u vidu prošaravanja i deformacija zabeleženi u drugim područjima gajenja u svetu (Provvidenti, 1996; Lecoq and Desbiez, 2012). Tip i pojava simptoma nisu mogli da budu povezani sa detektovanim virusom, jer kao što je u literaturi opisano virusi infektivni za biljke iz familije tikava, pa i lubenicu, izazivaju različite simptome koji nemaju dijagnostički značaj (Provvidenti, 1996; Desbiez and Lecoq, 1997).

Iako u uzorcima bez simptoma nije detektovano prisustvo ni jednog testiranog virusa, zbog ranije detekcije ZYMV u asimptomatičnim uzorcima lubenice (Vučurović i sar., 2012) potrebno je povremeno testirati i ovakve uzorke.

### Serološka detekcija

Ispitivanjima sprovedenim tokom 2012. godine, prisustvo CMV dokazano je u pet od šest pregledanih lokaliteta (Tabela 2). Od 79 sakupljenih i testiranih uzoraka lubenice, prisustvo CMV detektovano je u 19 (24,05%), i to kako u pojedinačnim (11,39%) tako i u mešanim infekcijama sa druga dva detektovana virusa, ZYMV i WMV. Od mešanih infekcija, najzastupljenija je bila trostruka infekcija dokazana u 6,33% testiranih uzoraka, dok su dvostruke infekcije CMV sa ZYMV ili WMV dokazane u nešto manjem procentu testiranih uzoraka, 3,80%, odnosno 2,53%. U najvećem procentu CMV je bio prisutan na lokalitetu Silbaš gde je detektovan u 38,46% testiranih uzoraka. U poslednje dve godine pojačan monitoring useva lubenice ukazao je na prisustvo CMV, ZYMV i WMV u pojedinačnim i/ili mešanim infekcijama (Vučurović i sar., 2012; Vučurović et

al., 2012b; Milojević et al., 2012) kao prouzrokovao velikih ekonomskih gubitaka kod ovog useva. Dosadašnja istraživanja prisustva i rasprostranjenosti CMV kao patogena biljaka familije Cucurbitaceae u Srbiji ukazuju da se zastupljenost ovog virusa po godinama značajno menjala, ali i da je njegova zastupljenost najčešće bila visoka, preko 50% (Krstić et al., 2002; Vučurović i sar., 2008, 2009). Iako je tokom 2012. godine CMV bio prisutan u nižem procentu, detektovan je u većini pregledanih lokaliteta gajenja lubenice u pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Kako je CMV često prisutan u visokom procentu u usevima tikava (Krstić et al., 2002; Dukić i sar., 2004; Vučurović i sar., 2008, 2009), kao i usled lakog i brzog širenja virusa na neperzistentan način vašima i širokog kruga domaćina (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008), neophodno je stalno praćenje stanja i prisustva ovog virusa u našoj zemlji.

### Biološka karakterizacija izolata CMV iz lubenice

Detaljna biološka karakterizacija odabranih izolata CMV (449-12 i 473-12) obavljena je na osnovu ispoljavanja i tipa simptoma nakon mehaničkih inokulacija 14 različitih vrsta biljaka iz četiri botaničke familije Cucurbitaceae, Solanaceae, Amarantaceae i Chenopodiaceae (Tabela 3).

*Cucurbita pepo* 'Olinka', *Cucumis melo* 'Ananas', *C. sativus* 'Delikates', *Nicotiana debneyii* i *S. lycopersicum* 'San Pjer' reagovala su pojavom mozaika, simptoma tipičnog za zaraze izazvane ovim virusom. Na biljkama *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet', osim mozaika koga su izazvala oba izolata, izolat 449-12 izazvao je i pojavu simptoma u vidu zadržavanja zelene boje oko nerava. Oba ispitivana izolata bila su infektivna za eksperimentalne domaćine iz roda *Chenopodium*, kao i biljke *Gomphrena globosa*. Oba izolata prouzrokovala su tipične simptome CMV u vidu mozaika i deformacija na *N. tabacum* 'Samsun', dok je *N. glutinosa* reagovala pojavom mozaika, klobučavosti i nitavosti. Ispitivani izolati razlikovali su se po tipu i jačini ispoljenih simptoma na biljkama *N. rustica*. Izolat 473-12 osim mozaika i klobučavosti, izazvao je i pojavu nitavosti na ovoj test biljci, na osnovu čega se može zaključiti da je agresivnost ovog izolata bila veća. Biljke *Petunia x hybrida* i *Datura stramonium* nisu ispoljile simptome nakon mehaničkih inokulacija odabranim izolatima, mada se u literaturi navodi da su kako *P. x hybrida* (Fletcher, 2012; Gautam et al., 2012) tako i *D. stramonium* (Iqbal et al., 2011) domaćini ovog virusa. Simptomi koji su zabeleženi

**Tabela 2.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa mozaika krastavca u pojedinačnim i mešanim infekcijama useva lubenice tokom 2012. godine.

**Table 2.** Presence and incidence of *Cucumber mosaic virus* in single and mixed infections in watermelon crops during 2012.

Lokalitet Locality	Br. polja No of fields	Br. testiranih uzoraka No of tested samples	Pojedinačna infekcija Single infection		Mešana infekcija Mixed infection		Ukupno Total
			CMV	CMV+ ZYMV	CMV+ WMV	ZYMV+ CMV+ WMV	
Medveda	2	9	0 <sup>a</sup>	1 (11,11)	2 (22,22)	0	3 (33,34)
Mačkovac	3	16	2 (12,50) <sup>b</sup>	1 (6,25)	0	0	3 (18,75)
Silbaš	1	13	5 (38,46)	0	0	0	5 (38,46)
Gornji Tavankut	2	17	1 (5,88)	0	0	3 (17,65)	4 (23,53)
Togočevce	2	15	1 (6,67)	1 (6,67)	0	2 (13,33)	4 (26,67)
Surčin	1	9	0	0	0	0	0
<b>Ukupno Total</b>	11	79	9 (11,39)	3 (3,80)	2 (2,53)	5 (6,33)	19 (24,05)

Broj zaraženih uzoraka; <sup>a</sup>% zaraženih uzoraka izračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.  
Number of infected samples; <sup>a</sup>% infected samples calculated over the total number of tested samples.

**Tabela 3.** Reakcije test biljaka na mehaničke inokulacije 449-12 i 473-12 izolatima *Cucumber mosaic virus* (CMV).

**Table 3.** Reactions of test plants on mechanical inoculation with 449-12 and 473-12 isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Test biljke Test plants	449-12	473-12
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	M*	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Delikates'	M	M
<i>Cucumis melo</i> 'Ananas'	M	M
<i>Citrullus lanatus</i> 'Creamson sweet'	M, ZBN	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LNP	LNP
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNP	LNP
<i>Solanum lycopersicum</i> 'San Pjer'	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Samsun'	M, LD	M, LD
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, K, N	M, K, N
<i>Nicotiana debneyii</i>	M	M
<i>Nicotiana rustica</i>	M, K	M, K, N
<i>Datura stramonium</i>	/	/
<i>Petunia hybrida</i>	/	/
<i>Gomphrena globosa</i>	LNP	LNP

\* - M - mozaik, ZBN - zadržavanje zelene boje oko nerava, LNP - lokalne nekrotične pege, LD - deformacije, K - klobučavost, N - nitavost, / - bez simptoma.

\* - M - mosaic, ZBN - dark green vein banding, LNP - local necrotic spots, LD - leaf deformation, K - puckering, N - shoestring, / - no reaction.

na inokulisanim test biljkama u saglasnosti su sa simptomima zabeleženim za CMV i od strane drugih autora (Krstić et al., 2002; Tóbiás and Tulipan, 2002; Vučurović i sar., 2011).

### Molekularna detekcija i identifikacija

Rezultati seroloških analiza prisustva CMV u usevu lubenice u Srbiji potvrđeni su molekularnom RT-PCR metodom primenom specifičnih prajmera CMVCPfwd/CPrev koji omogućavaju umnožavanje CP gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine oko 871 bp, utvrđeno je kod svih pet ispitivanih uzoraka lubenice kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u negativnoj kontroli, ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća lubenice.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog korišćenjem istog para prajmera kao u RT-PCR i obrade u Clustal W programu, dobijena je sekvenca kompletnog CP gena i deo 5' i 3' UTR regiona, koja je prijavljena u GenBank bazu podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj (GenBank Acc. No. KC878465). Dalja identifikacija obavljena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvence dobijene u ovom radu sa sekvencama CP gena izolata iz drugih delova sveta deponovanih u GenBank korišćenjem MEGA5 softvera. Najviši stepen identičnosti od 99,8% sekvenca odabranog izolata 473-12 iz lubenice iz Srbije pokazala je sa sekvencama izolata Fny iz SAD (D10538), Ny iz Australije (U22821) i izolatom 702-07 (GQ340670) iz Srbije. Sličnost nukleotidne sekvence ovih izolata od 99,8% nije rezultirala promenom ni jedne aminokiseline, tako da je aminokiselinska identičnost ovih izolata iznosila 100%. Nukleotidna identičnost između dva srpska izolata poreklom iz lubenice iznosila je 98,6% odnosno 99,5% aminokiselinske sličnosti.

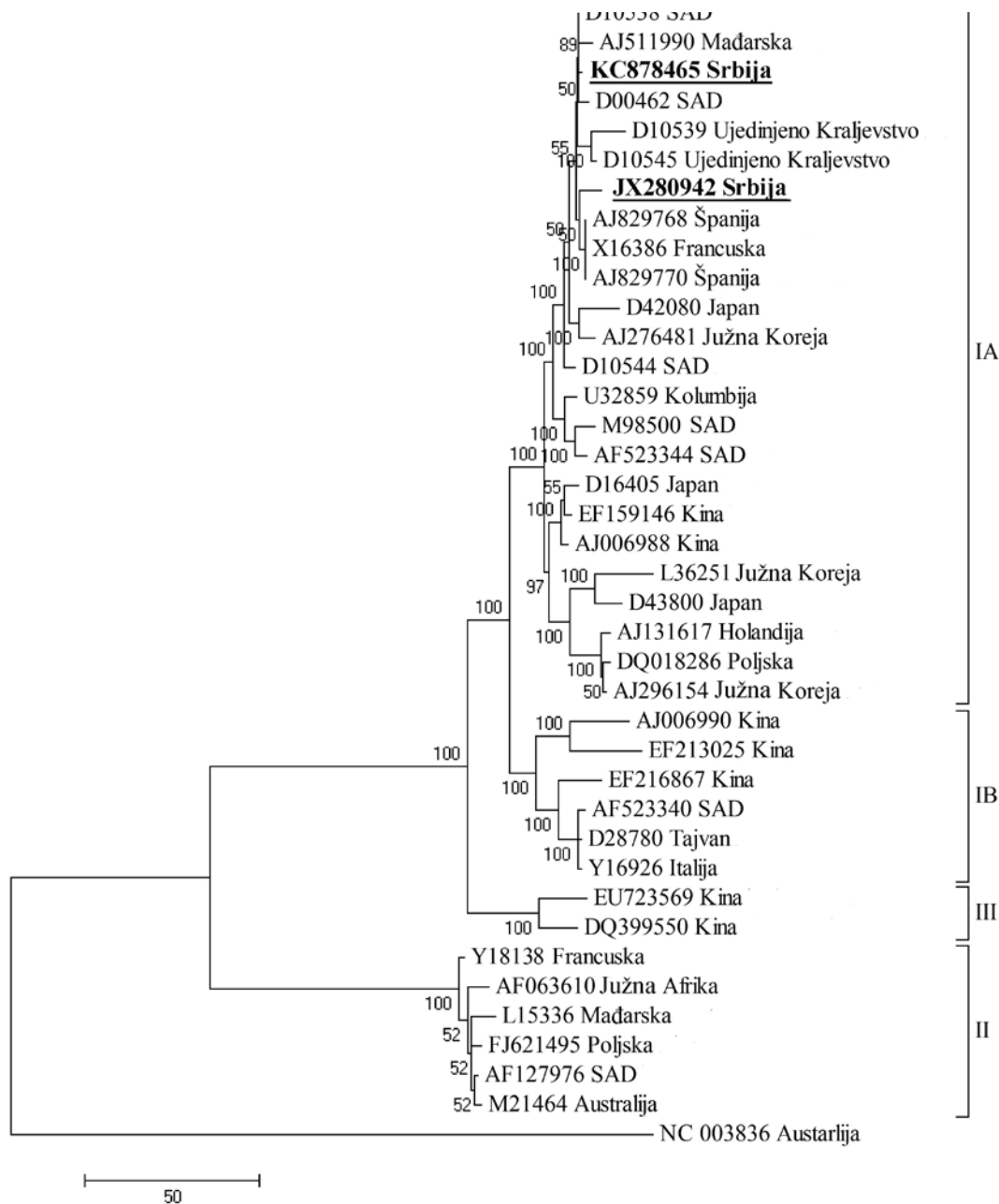
Upoređivanjem sekvenci za protein omotača srpskih izolata iz lubenice sa izolatima korišćenim za filogenetske analize, najveću nukleotidnu identičnost od 94,3% do 99,8%, odnosno 94,6% do 100% na aminokiselinskom nivou srpski izolati su pokazali sa ostalim izolatima iz IA podgrupe, dok je nukleotidna identičnost sa izolatima IB podgrupe bila niža, 92,6% do 95,4% (98,1% do 99,1% aminokiselinska identičnost). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 62,9% do 66,6% (75% do 78,5% aminokiselinske identičnosti) naši izolati ispoljili su sa izolatima grupisanim u II podgrupu, dok je nukleotidna identičnost sa III podgrupom bila od 89,8% do 90,5% (96,1% aa sličnost). Kako navode Yu et al. (2005), stepen

nukleotidne identičnosti izolata u okviru podgrupe I je od 88,8% do 99,2%, dok divergentnost između I i II podgrupe iznosi oko 25% (Roossinck et al., 1999). Prema tome, na osnovu najvišeg stepena homologije sekvence CP gena sa izolatima IA podgrupe, potvrđeno je da odabrani izolati iz lubenice pripadaju IA podgrupi virusa mozaika krastavca.

### Filogenetske analize

Filogenetsko stablo (Slika 1) rekonstruisano Maximum parsimony metodom na osnovu sekvenci 38 izolata CMV pokazuje jasno izdvajanje tri podgrupe (I, II i III), gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci iste grupe i visokim bootstrap vrednostima koja je za svaku podgrupu iznosila 100%, što je u potpunosti saglasnosti sa rezultatima Liu et al. (2009) i Jacquemond (2012). Genetički diverzitet između tri glavne podgrupe iznosio je od  $0,099 \pm 0,012$  do  $0,356 \pm 0,035$ . Unutrašnji diverziteti podgrupa kretali su se od  $0,013 \pm 0,008$  za podgrupu II, do  $0,039 \pm 0,08$  za podgrupu III i  $0,042 \pm 0,005$  za podgrupu I. Najveći broj izolata svrstan je u podgrupu I koja se dalje deli na dve podgrupe IA i IB, sa unutrašnjim diverzitetima od  $0,030 \pm 0,004$ , odnosno  $0,044 \pm 0,003$ . U podgrupi IA nalaze se izolati iz raznih delova sveta, Evrope (Mađarska, Srbija, Ujedinjeno Kraljevstvo, Španija, Holandija, Poljska i Francuska), Azije (Japan, Južna Koreja, Kina) i Amerike (SAD i Kolumbija). Ovoj podgrupi sojeva pripadaju i odabrani izolati iz lubenice iz Srbije. U podgrupi IB nalaze se izolati iz Azije (Kina i Tajvan) kao i po jedan izolat iz Italije i SAD, dok su u okviru podgrupe II svrstani izolati iz Evrope (Francuska, Mađarska i Poljska), Afrike (Južna Afrika), Severne Amerike (SAD) i Australije. Izdvajanje podgrupe III na osnovu CP gena sa samo dva izolata, BX i PHz, poreklom iz Kine u saglasnosti je sa prethodnim literaturnim navodima (Liu et al., 2009; Jacquemond, 2012).

Pojava CMV može biti jedan od ograničavajućih faktora gajenja lubenice u Srbiji imajući u vidu štete koje CMV, sam ili u kombinaciji sa drugim virusima, nanosi u svim regionima gajenja ove kulture u svetu. Zbog svega navedenog, neophodna su dalja istraživanja koja bi trebalo da budu usmerena na proučavanje genetičkog diverziteta u okviru prirodne populacije ovog virusa prisutne u našoj zemlji kako na lubenici tako i na drugim biljkama domaćinima, načina održavanja, dospevanja i zaražavanja biljaka lubenice, a sve to u cilju preduzimanja odgovarajućih mera kontrole.



**Slika 1.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog CP gena 38 izolata CMV korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Kimura 2-parametar modela sa Gamma distribucijom i Maximum parsimony metoda sa bootstrap analizom sa 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je „rutovano“ sa TAV. Izolati iz lubenice iz Srbije su podvučeni i naznačeni fontom Bold.

**Figure 1.** Maximum parsimony tree based on nucleotide sequences of complete coat protein gene of 38 isolates of CMV. The tree was rooted with TAV. Phylogram was generated with MEGA 5 using Kimura 2-parametar model Gamma distributed. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates and bootstrap values (>50%) are shown next to relevant branches. The Serbian CMV isolates from watermelon are underlined and bolded.



## ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta III-43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

da Silveira, D. M., Queiroz, M. A., Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Lima, N. I. S. (2009): Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 34: 123-126.

Desbiez, C., Lecoq, H. (1997): Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46: 809-829.

Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I., Bulajić, A. (2004): Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 35/36: 71-79.

Dukić, N., Krstić, B., Katis, I., Papavassiliou, C., Berenji, J., Vico, I. (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. V jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, 85.

FAO (2011): FAO Corporate Statistical Database ŠOnlineĆ. Š1 pĆ Available at <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Cited 16 January 2013, verified 10 April 2013). FAO Corporate Statistical Database (FAOSTAT), United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.

Fletcher, J. D. (2012): New plant disease records in New Zealand: Additional hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30: 505-506.

Francki, R. I. B., Mossop, D. W., Hatta, T. (1979): Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213.

García-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008): Cucumber mosaic virus. In Mahy, B. W. J. and van Regenmortel, M. H. V. (eds.) *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier, Amsterdam 171-176.

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.

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.

Köklü, G., Yilmaz, O. (2006): Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection*, 87: 123-130.

Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N. I., Papavassiliou, C. (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 103: 57-65.

Lecoq, H., Desbiez, C. (2012): Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. *Advances in Virus Research*, 84: 67-126.

Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C., Girard, M. (2003): Potential involvement of melon fruit in long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Disease*, 87: 955-959.

- 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.
- 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.
- Papayiannis, L. C., Ioannou, N., Boubourakas, I. N., Dovas, C. I., Katis, N. I., Falk, B. W. (2005): Incidence of Viruses Infecting Cucurbits in Cyprus. *Journal of Phytopathology*, 153: 530-535.
- Pejčinovski, F. (1978): Virusot na mosaicot na krastavicata koj odgleduvanite rastenija od familijata Cucurbitaceae vo SR Macedonija. Godišen zbornik na Zemljodelskot fakultet, Skopje, XXVII-XXVIII: 97-116.
- Provvidenti, R. (1996): Diseases Caused by Viruses. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L. and Thomas, C. E. (eds.) *Compendium of Cucurbit Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA 37-40.
- Roossinck, M. J., Zhang, L., Hellwald, K. H. (1999): Rearrangements in the 59 nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73: 6752-6758.
- 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.
- Stakić, D., Nikolić, V. (1966): Virus mozaika lubenice-novo virozno oboljenje u Jugoslaviji. *Savremena poljoprivreda*, 3: 289-302.
- Szamosi, C., Solmaz, I., Sari, N., Barsony, C. (2009): Morphological characterization of Hungarian and Turkish watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai) genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 1091-1105.
- 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.
- Tóbiás, I., Tulipán, M. (2002): Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Növényvédelem*, 38: 23-27.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Virusi-stalni problem u usevu tikava u Srbiji. IX savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, 96-97.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009): Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzna. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 85-94.
- 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., Milojević, K., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2012): Prisustvo i karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzna u usevu lubenice u Srbiji. *Ratararstvo i povrtarstvo*, 42: 151-159.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012a): 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.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Nikolić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2012b): First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon in Serbia. *Plant Disease*, 96: 149.

Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2005): Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123: 155-161.

Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Kitajima, E. W., Barroso, P. A. V., Kuniyuki, H., Groppo, G. A., Pavan, M. A. (2000): Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, 84: 516-520.

**(Primljeno: 10. 04. 2013.)**

**(Prihvaćeno: 09. 05. 2013.)**

## BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS INFECTING WATERMELON IN SERBIA

KATARINA MILOJEVIĆ, IVANA STANKOVIĆ, ANA VUČUROVIĆ, DANIJELA RISTIĆ, DUŠAN NIKOLIĆ,  
ALEKSANDRA BULAJIĆ, BRANKA KRSTIĆ

*University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade*  
*e-mail: branka.krstic@agrif.bg.ac.rs*

### SUMMARY

Investigation of the presence and distribution of *Cucumber mosaic virus* in watermelon crops in Serbia during 2012 revealed that the virus was present in five out of six surveyed localities. CMV was detected in 24.05% of total serologically tested samples using DAS-ELISA method and the virus was the most prevalent in the locality of Silbaš. During this investigation, *Cucumber mosaic virus* was present more often in mixed infections with ZYMV and/or WMV (12.66%), while the single infection was detected in lower percentage, 11.39%. Five CMV isolates were obtained by mechanical inoculations of *N. glutinosa* and two of them were selected for further biological characterization. Concerning type and severity of symptoms on test plants, the investigated isolates exhibited different phenotypic features. Molecular detection was performed by amplification of a fragment of 871 bp in all tested isolates, using the primer pair CMVCPfwd/CPrev that amplify the entire coat protein gene and part of 5' and 3' UTR regions. The affiliation of Serbian CMV isolates from watermelon to subgroup IA, the group that includes most of the isolates selected for phylogenetic analysis, was determined by sequence analysis of the complete CP gene and reconstruction of phylogenetic tree.

**Key words:** CMV, watermelon, DAS-ELISA, bioassay, RT-PCR, phylogenetic analysis

**(Received: 10. 04. 2013.)**

**(Accepted: 09. 05. 2013.)**