

Biološka varijabilnost virusa žutog mozaika cukinija u Srbiji

Ana Vučurović¹, Aleksandra Bulajić¹, Ivana Đekić¹, Danijela Ristić¹, Janoš Berenji²
i Branka Krstić¹

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

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

Primljen: 19. oktobra 2009.

Prihvaćen: 3. novembra 2009.

REZIME

Poslednjih 20 godina virus žutog mozaika cukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) se javlja kao značajan patogen biljaka iz familije tikava. Kod nas ovaj virus, takođe, izaziva značajne gubitke, naročito u proizvodnji uljane tikve. Iako je biološka i molekularna varijabilnost ZYMV dosta ispitivana, još uvek nema dovoljno informacija o varijabilnosti evropskih izolata ovog virusa. Ovaj rad predstavlja prvu analizu fenotipske varijabilnosti izolata ZYMV poreklom iz Srbije, koji su tokom 2008. godine sakupljeni iz različitih lokaliteta gajenja uljane tikve sorte Olinka. Mehaničkim inokulacijama *C. pepo* hibrid Ezra F1, dobijeno je 12 izolata, od kojih su četiri odabrana za dalju biološku karakterizaciju. Na osnovu različitog kruga domaćina, tipa i jačine simptoma na test-biljkama, utvrđena je fenotipska varijabilnost ispitivanih izolata. Par prajmera ZYMV CPfwd/CPrev testiran je radi utvrđivanja pogodnosti za rutinsku detekciju izolata ZYMV poreklom iz Srbije. Na osnovu pojave traka očekivane veličine u gelu, ZYMV je detektovan i u pojedinačnim i mešanim infekcijama u biljkama sa različitih lokaliteta, što dokazuje pogodnost ovih prajmera. Kako ovi prajmeri amplifikuju hipervarijabilni deo genoma virusa, pogodni su ne samo za rutinsku molekularnu detekciju, već i za molekularnu karakterizaciju izolata ZYMV iz Srbije.

Rezultati dobijeni u ovom radu omogućiće dalja proučavanja genetičke varijabilnosti izolata ZYMV iz Srbije, kao i njihove evolutivne povezanosti sa izolatima iz drugih delova sveta.

Ključne reči: Tikve; virus žutog mozaika cukinija; biološka karakterizacija; pogodnost prajmera

UVOD

Tikve predstavljaju značajne i rasprostranjene gajene vrste u našoj zemlji, koje se koriste u ishrani ljudi, kao stočna hrana i u medicinske svrhe. Kod nas se ga-

ji pet vrsta roda *Cucurbita*: *C. pepo* (obična tikva, dulek, crni dulek), *C. maxima* (bundeva, beli dulek, pečenka, ludaja), *C. moschata* (muskatna tikva, šećerka), *C. ficifolia* (smokvolisna tikva) i *C. mixta* (zimski tikva) (Berenji, 1988). Najviše se gaji *C. pepo* koja se u na-

šoj literaturi označava kao obična tikva (Popović, 1991; Berenji, 1999). Smatra se da obična tikva vodi poreklo iz Novog sveta, a da je glavni centar njenog daljeg širenja Turska (McCreight, 1996). Odlikuje se velikom raznovrsnošću formi, varijeteta i sorti, a najznačajnije forme su: tikvica, uljana tikva, patison, cukini, špageti tikva, stočna tikva, kruknek (krivošije), strejnek i kokocela (Berenji, 1999).

Tikve se kod nas gaje u združenom ili čistom usevu ili na okućnicama. U čistom usevu gaji se Olinka, domaća sorta uljane tikve-golice, kompletno razrađenom tehnologijom proizvodnje (Berenji, 1994, 2007). Gajenje tikava, pre svega uljane tikve, postaje sve značajnije kako u Evropi tako i u našoj zemlji, kao jedne od kultura koja čini okosnicu alternativnih proizvodnji kao što je organska, zbog izuzetnih nutritivnih i farmakoloških vrednosti i zbog visoke cene nerafinisanog tikvinog ulja (Karlović i sar., 2001; Berenji, 2007).

Od biljnih bolesti koje mogu da smanje ili ugroze uspešnu proizvodnju tikava, najznačajnije su one izazvane virusima. Na listi virusa koji mogu da zaraze razne vrste tikava nalaze se 32 vrste (Provvidenti, 1996), međutim, kao prouzrokovani ekonomski važnih oboljenja tikava najčešće se navodi pet: virus žutog mozaika kukuruz (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virus mozaika krastavca (Cucumber mosaic virus, CMV), virus mozaika bundeve (Squash mosaic virus, SqMV), virus prstenaste pegavosti papaje (Papaya ringspot virus, PRSV) i virus mozaika lubenice (Watermelon mosaic virus, WMV) (Nameth i sar., 1986; Lecoq i sar., 2003; Agrios, 2005; Bananej i sar., 2008).

Na osnovu stalnog praćenja prisustva i učestalosti pojave virusa tikava u različitim delovima sveta, može se zaključiti da su virusi koji se prenose vašima na neperezistentan način najvažnija prepreka u proizvodnji tikava, a da je među njima najznačajniji ZYMV (Tóbiás i sar., 1996; Fletcher i sar., 2000; Lelley i Hengmuller, 2000; Riedle-Bauer i sar., 2002). Destruktivni simptomi koje ovaj virus izaziva prvi put su uočeni 1973. godine u severnoj Italiji na kukuruz (Lisa i sar., 1981), a nekoliko godina kasnije i na dinji u Francuskoj (Lecoq i sar., 1981). Za nekoliko narednih godina pronađen je na svim kontinentima, u više od 50 zemalja sveta (Desbiez i Lecoq, 1997). Kako je njegovo prisustvo uvek povezano sa izraženim simptomima i značajnim smanjenjem prinosa, smatra se da je odgovoran za ogromne gubitke u proizvodnji svih vrsta tikava širom sveta (Lecoq i sar., 1981; Lisa i Lecoq, 1984; Desbiez i Lecoq, 1997; Gal-On, 2007).

Proučavanja virusa tikava u Srbiji započeta su 2000. godine, kada je na više lokaliteta gajenja potpuno uništena proizvodnja obične tikve. Kao prouzrokovani oboljenja obične tikve identifikovani su CMV, WMV i novi virus za našu zemlju – ZYMV (Dukić i sar., 2001, 2002; Krstić i sar., 2002). Tada počinju detaljna ispitivanja rasprostranjenosti i učestalosti oboljenja koje ovi virusi izazivaju na običnoj tikvi kod nas (Dukić i sar., 2004, 2006; Vučurović i sar., 2008, 2009).

Iako je ZYMV, prisutan u našoj zemlji, biološki okarakterisan (Krstić i sar., 2002; Duduk, 2008), nisu sprovedena proučavanja koja bi se odnosila na varijabilnost u okviru populacije ovog virusa, pre svega na fenotipsku varijabilnost. Poznavanje homogenosti, odnosno heterogenosti populacije nekog virusa koristan je parametar kako za razvijanje specifičnih i osetljivih metoda molekularne detekcije, tako i za odabir patotipova na osnovu kojih će se vršiti selekcija biljaka na otpornost prema virusima.

Cilj ovog rada bio je da se, kroz praćenje pojave i rasirenosti ZYMV u važnijim proizvodnim područjima u našoj zemlji tokom 2008. godine, sakupe i biološki okarakterišu izolati ZYMV radi utvrđivanja postojanja fenotipske varijabilnosti između njih, kao i da se ispita mogućnost korišćenja specifičnih prajmera ZYMV CPfw/CPrev za rutinsku molekularnu detekciju izolata ZYMV. Ovako koncipirani ciljevi predstavljaju početak razvijanja istraživanja sastava populacije ZYMV u Srbiji i utvrđivanja genetičke osnove fenotipske varijabilnosti različitih izolata.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje i odabir uzoraka tikava

Tokom 2008. godine, radi utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave ZYMV, ukupno je pregledano 13 useva tikava na šest lokaliteta: Gardinovci, Aleksandrovo, Titel, Kisač, Kulpin i Bački Petrovac. Skupljeni uzorci (51) uljane tikve-golice (*C. pepo*) sorte Olinka, bundeve (*C. maxima*) i vrga (*Lagenaria siceraria*) serološki su analizirani na prisustvo šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava (ZYMV, CMV, WMV, PRSV, SqMV i Tobacco ringspot virus, TRSV) primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) po protokolu koji su opisali Clark i Adams (1977) i uputstvu proizvođača komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju odgovarajućih virusa (Vučurović i sar., 2009).

Nakon detekcije primenom DAS-ELISA testa, za istraživanja, prikazana u ovom radu, odabrani su uzorci tikava zaraženi ZYMV, poreklom sa različitih lokaliteta gajenja tikava kod nas.

Za biološku karakterizaciju odabrani su uzorci tikava u kojima je dokazana pojedinačna infekcija ZYMV: pet uzoraka iz dva useva sa lokaliteta Titel, pet uzoraka iz četiri useva sa lokaliteta Kisač i dva uzorka iz istog useva sa lokaliteta Bački Petrovac.

Za proveru pogodnosti para prajmera ZYMV CPfwd/CPrev za rutinsku molekularnu detekciju izolata ZYMV poreklom iz Srbije, pored 12 uzoraka u kojima je dokazana pojedinačna infekcija ZYMV, odabrano je i 12 uzoraka tikava u kojima je dokazana mešana infekcija sa nekim od testiranih virusa. Uzorci u kojima je dokazana mešana infekcija ZYMV i WMV poticali su sa lokaliteta Aleksandrovo (dva uzorka), Kisač (jedan uzorak) i Bački Petrovac (jedan uzorak), uzorci u kojima je dokazano prisustvo ZYMV i CMV poticali su iz dva useva sa lokaliteta Bački Petrovac (tri uzorka), kao i sa lokaliteta Kulpin (jedan uzorak), a uzorci u kojima je dokazana trojna zaraza ZYMV, WMV i CMV poticali su sa lokaliteta Gardinovci (tri uzorka) i Bački Petrovac (jedan uzorak).

Biolška karakterizacija izolata ZYMV

Radi dobijanja izolata ZYMV, biljke *C. pepo* hibrid Ezra F1 mehanički su inokulisane inokulumom pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka tikava u kojima je prethodno dokazana pojedinačna infekcija ZYMV. Na ovaj način je dobijeno 12 izolata koji su se razlikovali na osnovu tipa ispoljenih simptoma na lišću *C. pepo* hibrid Ezra F1. Za dalju detaljnu biološku karakterizaciju, mehaničkim inokulacijama niza test-biljaka, odabrana su ukupno četiri izolata, dva koji su izazivali samo mozaik i dva koji su pored mozaika izazvali i druge tipove simptoma.

U ispitivanje kruga domaćina i tipa ispoljenih simptoma uključene su sledeće test-biljke: *C. pepo* cv. Beogradska tikvica, hibrid Ezra F1 i tikvica cukini (nepoznata sorta), *C. moschata* cv. Lola, *Cucumis sativus* cv. Regal, Delicates, Dugi zeleni i Sunčani potok, *C. melo* cv. Ananas, *Citrus vulgaris* cv. Creamson sweet, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *C. foetidum*, *Datura stramonium*, *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* cv. Banat i Samsun, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii* i *N. debneyi*.

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

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

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije ZYMV, potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama i u cilju ispitivanja mogućnosti korišćenja specifičnih prajmera ZYMV CPfwd/CPrev (Pfosser i Baumann, 2002) za rutinsku molekularnu detekciju različitih izolata ZYMV poreklom iz naše zemlje.

Da bi se utvrdila pogodnost odabranih prajmera, bilo je potrebno testirati veći broj uzoraka sa različitih lokaliteta u kojima je prethodno serološkim analizama utvrđena zaraza ZYMV u pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Za ova ispitivanja odabrana su ukupno 24 uzorka tikava.

Izolacija ukupnih RNA iz 100 mg lišća prirodno zaraženih biljaka tikava obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Ukupna izolovana RNA korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera ZYMV CPfwd/CPrev.

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

15 min na 95°C; denaturacija 25 s na 94°C, elongacija 25 s na 55°C i ekstenzija 70 s na 72°C (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Uzorci su elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 µg/ml i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine od oko 1100 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplicona korišćen je marker, MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

REZULTATI

Preliminarna karakterizacija i izdvajanje izolata ZYMV

Izolati ZYMV izdvojeni su tako što su biljke *C. pepo* hibrid Ezra F1 mehanički inokulisane inokulumom

pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka tikava u kojima je prethodno dokazana pojedinačna infekcija ZYMV. Na ovaj način dobijeno je 12 izolata ZYMV iz različitih useva istog ili sa različitih lokaliteta. Simptomi na inokulisanim biljkama *C. pepo* hibrid Ezra F1 pojavili su se 10 dana po inokulaciji, ali je odabir izolata za dalja ispitivanja izvršen 15 dana po inokulaciji, kada su se na osnovu simptoma na novostvorenom lišću izolati mogli razlikovati. Na osnovu tipa ispoljenih simptoma na lišću, za dalju detaljnu biološku karakterizaciju, odabrani su izolati 128-08 (lokalitet Titel) i 140-08 (Bački Petrovac), koji su izazvali samo pojavu mozaika, izolat 146-08 (Kisač) koji je prouzrokovao simptome mozaika, hloroze nerava i zadržavanje zelene boje oko nerava, i izolat 147-08 (Kisač) koji je pored mozaika i zadržavanja zelene boje oko nerava izazivao i hlorotično prošaravanje i izraženo suženje liski inokulisanih biljaka.

Prema ispoljenim simptomima, koje su izazvali na uljanoj tikvi sorte Olinka (Slike 1-4) u polju, izolati



Slika 1. Izolat 128-08: izražena hloroza, žutilo oko nerava i naboranost liske



Slika 3. Izolat 146-08: prošaravanje lišća i zadržavanje zelene boje oko nerava



Slika 2. Izolat 140-08: izražena hloroza i zadržavanje zelene boje oko nerava



Slika 4. Izolat 147-08: izražena hloroza, zadržavanje zelene boje i naboranost oko nerava

odabrani za biološku karakterizaciju nisu se drastično razlikovali. Sva četiri izolata prouzrokovali su pojavu hlorotičnog prošaravanja bez izraženih deformacija liške ili izražene kržljivosti biljaka. Ipak, izolati 128-08, 140-08 i 147-08 izazvali su izraženu hlorozu, koja nije bila uočljiva na lišću biljke iz koje je dobijen izolat 146-08. Osim toga, izolat 128-08 je izazvao žutilo, a ostali zadržavanje zelene boje oko nerava, a naboranost liške oko ili između nerava izazvali su samo izolati 128-08 i 147-08.

Reakcije test-biljaka na ispitivane izolate ZYMV

Detaljna biološka karakterizacija četiri odabrana izolata ZYMV obavljena je na osnovu ispoljavanja i tipa

simptoma na većem broju vrsta biljaka koje pripadaju krugu domaćina ZYMV ili biljnih vrsta koje nisu u literaturi opisane kao domaćini ovog virusa. Reakcije test-biljaka, koje su uključivale prirodne domaćine (tri sorte obične tikve, četiri sorte krastavca i po jedna sorta muskatne tikve, lubenice i dinje) i eksperimentalne domaćine iz rodova *Chenopodium*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Datura*, *Gomphrena* i *Physalis*, prikazane su u tabeli 1.

Sva četiri izolata ZYMV prouzrokovala su tipične simptome na različitim sortama *C. pepo*, mada su uočene razlike u tipu i jačini ispoljenih simptoma, na osnovu kojih se može zaključiti da je agresivnost izolata 147-08 prema običnoj tikvi veća u odnosu na ostala tri izolata. Muskatna tikva sorte Lola nije mogla da bude zaražena mehaničkim inokulacijama izolatom 128-08, dok

Tabela 1. Reakcija test biljaka na inokulacije različitim izolatima ZYMV

Test-biljka	Izolati			
	128-08	140-08	146-08	147-08
<i>Cucurbita pepo</i> hibrid Ezra F1	M*	M	M, HN, ZBN	M, HP, ZBN, SL
<i>Cucurbita pepo</i> tikvica cukini	HN	M	HN, M	M, DL, PS
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Beogradska tikvica	PN, ZBN, M	M, ZBN	HN, ZBN	ŽM, PN
<i>Cucurbita moschata</i> cv. Lola	/	M	M	M
<i>Cucumis sativus</i> cv. Regal	/	/	M	M
<i>Cucumis sativus</i> cv. Delicates	/	/	BM	/
<i>Cucumis sativus</i> cv. Dugi zeleni	/	PN, M	PN, M	PN, M
<i>Cucumis sativus</i> cv. Sunčani potok	/	M	M	PN, M
<i>Citrulus vulgaris</i> cv. Creamson sweet	/	M	M, DL	BM
<i>Cucumis melo</i> cv. Ananas	/	/	/	/
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	/	/	/	/
<i>Chenopodium quinoa</i>	LHP	LHP	LHP	LHP
<i>Chenopodium murale</i>	LHP	/	/	LHP
<i>Chenopodium foetidum</i>	/	/	/	LHP
<i>Gomphrena globosa</i>	LHP	LHP	LHP	LHP
<i>Datura stramonium</i>	/	/	/	/
<i>Petunia hybrida</i>	/	/	/	/
<i>Physalis floridana</i>	/	/	/	/
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Banat	/	/	/	/
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	/	/	/	/
<i>Nicotiana glutinosa</i>	/	/	/	/
<i>Nicotiana rustica</i>	/	/	/	/
<i>Nicotiana clevelandii</i>	/	/	/	/
<i>Nicotiana debneyii</i>	/	/	/	/

*LHP – lokalne hlorotične pege; M – mozaik; PN – prosvetljavanje nerava; BM – blagi mozaik; HN – hloroza nerava; DL – deformisanje listova; PS – povećavanje sinusa; HP – hlorotično prošaravanje; ZBN – zadržavanje zelene boje oko nerava; ŽM – žuti mozaik; SL – sužavanje listova; / – bez simptoma

su ostala tri izolata izazvala isti tip simptoma. Takođe, mehaničke inokulacije izolatom 128-08 sve četiri sorte krastavca nisu bile uspešne, dok su sve sorte ispoljile simptome samo posle inokulacija izolatom 140-08. Izolati 140-08 i 147-08 su na nekim sortama krastavca izazvali pojavu simptoma, a neke sorte nisu mogle da budu zaražene. Sorta dinje Ananas nije mogla da bude mehanički zaražena nijednim od ispitivanih izolata, iako je dinja prirodni domaćin ovog virusa. Što se tiče eksperimentalnih domaćina, sva četiri izolata nisu izazvala pojavu simptoma ni na jednoj *Nicotiana* vrsti, a razlikovala su se na dve od četiri vrste roda *Chenopodium*. Izolat 147-08 je bio infektivan i za *C. murale* i *C. foetidum*, a izolat 128-08 samo za *C. murale*.

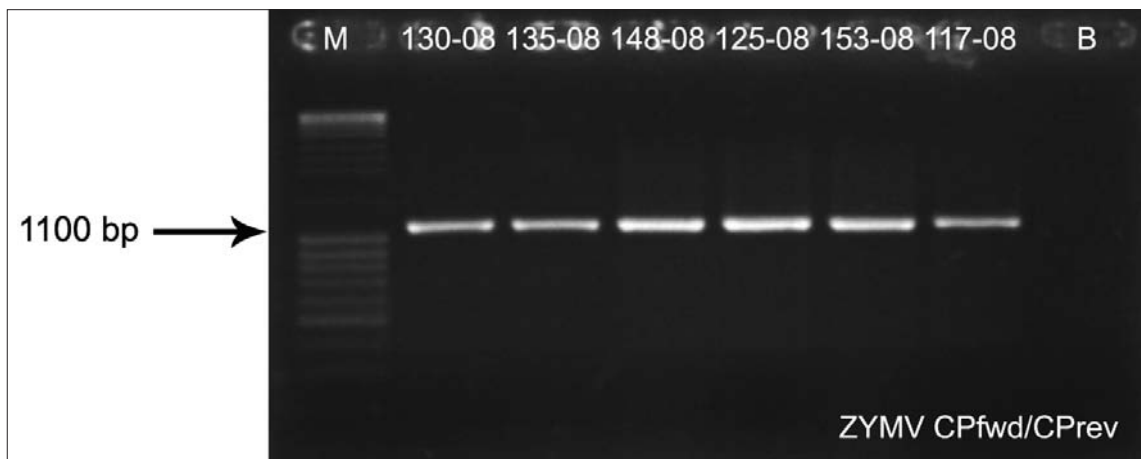
Molekularna detekcija ZYMV

Prisustvo ZYMV u 24 testirana uzorka tikava sa različitih lokaliteta potvrđeno je molekularnom detekcijom korišćenjem specifičnih prajmera ZYMV CPfwd/CPrev. ZYMV je uspešno detektovan u svim uzorcima bilo da se radi o pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Do nespecifične amplifikacije nije došlo ni u jednom slučaju mešanih infekcija. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 1100 bp (Slika 5), čiju amplifikaciju omogućavaju primenjeni prajmeri. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezara-

ženog lišća tikava i negativnoj kontroli (PCR smeša sa molekularnom vodom).

DISKUSIJA

Najveće štete u usevu tikava širom sveta nanose ZYMV, WMV i CMV, ali je epidemijaska pojava mozaika na tikvama najčešće povezana sa ZYMV. Samo nekoliko godina nakon otkrića, ZYMV je pronađen u mnogim zemljama Evrope, Azije, Bliskog istoka, Severne i Južne Amerike i Okeanije i zbog toga se izdvaja kao primer „emerging“ biljnog virusa (Desbies i Lecoq, 1997). Danas je ZYMV prisutan u skoro svim zemljama gde se gaje biljke familije Cucurbitaceae i predstavlja jednog od najdestruktivnijih virusa ove grupe gajenih kultura (Gal-On, 2007; Bananej i sar., 2008). U Mađarskoj su do 1995. godine, kad je prvi put otkriven ZYMV, najvažniji virusi tikava bili CMV i WMV (Tóbiás i sar., 1996). Međutim, za kratko vreme, ZYMV se raširio u sve delove zemlje izazivajući zastrašujuće epidemije u usevu različitih vrsta tikava, pa i uljane tikve (Tóbiás i Tulipán, 2002). U Austriji, gde se uljana tikva-golica tradicionalno gaji već više od 100 godina, epidemijaska pojava virusnog oboljenja izazvanog ZYMV prvi put se javila 1997. godine kada je nanela takve štete da je prepolovila ukupan prinos uljane tikve (Lelley i Hengmuller, 2000; Riedle-Bauer i sar., 2002). Narednih godina, ekonomski gubici su bili manji i pored toga što su biljke



Slika 5. Detekcija ZYMV u zaraženom lišću sakupljenih uzoraka uljane tikve sa različitih lokaliteta pomoću one-step RT-PCR sa ZYMV CPfwd/CPrev parom prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-4 pojedinačne infekcija ZYMV izolatima: 130-08 (lokalitet Titel), 135-08 (lokalitet Kisač), 148-08 (lokalitet Bački Petrovac); 5 mešana infekcija ZYMV i WMV – izolat 125-08 (lokalitet Aleksandrovo); 6 mešana infekcija ZYMV i CMV – izolat 153-08 (lokalitet Bački Petrovac); 7 mešana infekcija ZYMV, WMV i CMV – izolat 117-08 (lokalitet Gardinovci), 8 negativna kontrola – PCR mix sa molekularnom vodom

u skoro 100% useva širom zemlje ispoljavale virozne simptome (Riedle-Bauer i sar., 2002).

Dosadašnja ispitivanja u našoj zemlji pokazuju da su u usevu tikava prisutna tri virusa, ZYMV, WMV i CMV, i da se njihova učestalost po godinama i lokalitetima menja. Tako su 2007. godine, Vučurović i sar. (2009) utvrdili dominantno prisustvo WMV kako u pojedinačnoj tako i u mešanim infekcijama ZYMV i CMV, dok je ZYMV detektovan u više od polovine testiranih uzoraka. Situacija se promenila 2008. godine, kada se ZYMV javio u epidemijskim razmerama i bio prisutan gotovo u svim testiranim uzorcima. Iako se pojava i učestalost virusnih zaraza u usevu tikava u našoj zemlji prati već skoro jednu deceniju (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004, 2006; Vučurović i sar., 2008, 2009), ovako visok intenzitet zaraze ZYMV zabeležen je samo 2000. godine (Dukić i sar., 2001). Pojava ZYMV svake godine u usevu tikava i pojava u epidemijskim razmerama u godinama koje su povoljne za ostvarivanje ranih infekcija, ukazuju na veliki i konstantan značaj ovog virusa tikava u Srbiji.

Iako je fenotipska varijabilnost ZYMV intenzivno proučavana u svetu (Lecoq i Pitrat, 1984; Desbiez i sar., 1996; Bananej i sar., 2008), još uvek nema dovoljno informacija za region Evrope (Glasa i sar., 2007). Biološka varijabilnost između izolata ZYMV zabeležena je i ranije između izolata različitog geografskog porekla ili između izolata koji su dug vremenski period održavani u uslovima staklenika (Desbiez i sar., 1996). Takođe, proučavajući varijabilnost izolata poreklom iz Slovačke i Češke (Glasa i sar., 2007) i Irana (Bananej i sar., 2008) uočene su razlike između ispitivanih izolata, koje su se uglavnom odnosile na jačinu ispoljenih simptoma testiranih prirodnih ili eksperimentalnih domaćina.

Razlike u ispoljavanju simptoma na test-biljkama inokuliranim različitim izolatima ukazuju na fenotipsku varijabilnost populacije ZYMV (Bananej i sar., 2008), a različiti odgovori pojedinih vrsta obične tikve ili drugih biljaka porodice Cucurbitaceae na inokulacije određenim izolatima ZYMV, sa druge strane, ukazuju na postojanje različitog nivoa otpornosti u biljkama osetljivim na ZYMV (Pfosser i Baumann, 2002; Glasa i sar., 2007).

Biološko testiranje sprovedeno u ovom radu je, na osnovu ispoljavanja i tipa simptoma ispitivanog kruga domaćina, otkrilo razlike između četiri izolata ZYMV poreklom iz Srbije. Interesantno je da su se izolati razlikovali ne samo po jačini ispoljenih simptoma već i po ispitivanom krugu domaćina. Razlike u intenzitetu simptoma i razlike u krugu domaćina, koje su izazvali

ispitivani izolati, ukazuju da varijabilnost u okviru populacije ZYMV može da ima velike praktične posledice u proizvodnji i ispoljavanju određenog nivoa otpornost gajenih genotipova tikava.

Obe ove činjenice treba uzeti u obzir i dati im ključno mesto u programima selekcije tikava na otpornost. Utvrđivanje fenotipske raznovrsnosti u okviru populacije jednog virusa određenog geografskog područja, osnova je za utvrđivanje genetičkog diverziteta virusnih izolata jedne populacije. Na osnovu identifikacije dominantnih patotipova virusa stvaraju se preduslovi za uspešni skrining osnova rezistentosti koje je potrebno identifikovati u germplazmi tikava, jer je gajenje otpornih genotipova najefikasniji i najuspešniji način kontrole svih bolesti koje izazivaju biljni virusi koji se neperzistentno prenose vašima.

Biološka varijabilnost, na osnovu simptoma u polju, utvrđena je između izolata iz jugoistočne Francuske, koji su ispoljavali izraženije simptome u odnosu na izolate iz jugozapadne Francuske (Lisa i Lecoq, 1984). Ova istraživanja su pokazala i razliku između ove dve grupe izolata i tipičnog soja ZYMV prisutnog u Italiji. Sličnu varijabilnost na osnovu simptoma u polju između izolata ZYMV iz različitih delova SAD utvrdili su i Provvidenti i sar. (1984). Na osnovu simptoma u polju, koje su izolati 128-08, 140-08, 146-08 i 147-08 izazvali na uljanoj tikvi sorte Olinka, nije uočena drastična razlika između izolata. Svi izolati su izazvali pojavu hlorotičnog prošaravanja sa nezatnom varijacijom simptoma. S obzirom da ispoljavanje tipa simptoma zavisi od vremena infekcije, a da je između ispitivanih izolata uočena fenotipska varijabilnost, buduća biološka karakterizacija izolata ZYMV u našoj zemlji treba da uključi i mehaničke inokulacije u kontrolisanim uslovima uljane tikve i to u različitim fazama razvoja biljke.

Intraspecijska varijabilnost, posebno u okviru gena za proteinski omotač, povlači za sobom problem pouzdanosti dijagnostičke tehnike, jer se mnoge od tih tehnika zasnivaju na antigenim karakteristikama proteinskog omotača (CP) ili gena koji ga kodira (CP gen) (Desbiez i sar., 1996, 1997). Prema tome, pravilan odabir prajmera za amplifikaciju fragmenata genoma izolata iz nekog geografskog područja koji se prvi put molekularno detektuju jedan je od ključnih momenata uspešnog molekularnog dokazivanja. Zbog toga su Vučurović i sar. (2009) odabrali prajmere ZYMV CP_{fwd}/CP_{rev} (Pfosser i Baumann, 2002), kojim se amplifikuje značajan deo genoma virusa i to ceo gen koji kodira proteinski omotač virusa, 3' kraj NIB (gen za nuklearne inkluzije) i deo 3'UTR (netranslirajući region). Ovi

prajmeri dizajnirani su tako da imaju 4-8 različitih nukleotida na prajmerskim mestima u odnosu na druge *Potyvirus-e*, a da nemaju neslaganja u prajmerskim mestima sa većinom poznatih sekvenci ZYMV deponovanih u NCBI GenBank bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

S obzirom na utvrđenu fenotipsku varijabilnost izolata ZYMV poreklom iz Srbije, koja je pretpostavka njihovog genetičkog diverziteta, bilo je potrebno testiranjem većeg broja uzoraka, u kojima je serološkim metodama dokazano prisustvo ZYMV u pojedinačnim i mešanim infekcijama, utvrditi pogodnost prajmera ZYMV CPfwd/CPrev za rutinsku detekciju izolata ovog virusa poreklom iz naše zemlje. Sve izvedene PCR reakcije rezultirale su jednim jasnim bendom na poziciji koja je očekivana za prisustvo ZYMV, bez obzira na to da li se virus u ispitivanom uzorku nalazio u pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Ovo je naročito značajno jer je na taj način pokazano da nema nespecifičnih reakcija sa WMV koji kao pripadnik *Potyvirus* roda ispoljava značajnu srodnost i sličnost u sekvenci gena za proteinski omotač. Značaj ovakve pouzdanosti odabranih prajmera je utoliko veći, jer je pojava mešane zaraze ZYMV i WMV u Srbiji česta (Krstić i sar., 2002; Vučurović i sar., 2009).

U svim PCR reakcijama dobijen je amplikon očekivane veličine od 1100 bp, odnosno ZYMV je dokazan u svim testiranim uzorcima. Na osnovu ovih obavljenih ispitivanja utvrđeno je da se prajmeri ZYMV CPfwd/CPrev mogu uspešno koristiti za rutinsku detekciju različitih izolata ZYMV poreklom iz Srbije. Prajmeri ZYMV CPfwd/CPrev su, takođe, korisni za dobijanje amplikona izolata ZYMV u cilju određivanja njihovih nukleotidnih sekvenci, a zatim za razlikovanje izolata ZYMV iz Srbije na osnovu njihovih bioloških osobina i sekvenci najvarijabilnijeg dela genoma. S obzirom da se u okviru amplifikovanog fragmenta od 1100 bp nalazi i hipervarijabilan 5' kraj CP gena (N1b-CP) (Desbiez i sar., 2002), koji se najčešće koristi za filogenetske analize (Pfosser i Baumann, 2002; Bananej i sar., 2008), biće omogućeno proučavanje evolutivne povezanosti izolata poreklom iz Srbije sa izolatima ovog virusa iz različitih delova sveta.

Poznavanje diverziteta i varijabilnosti u okviru populacije jednog virusa vitalno je značajno za stvaranje sorti koje bi bile rezistentne na dominantne varijante virusa u određenom geografskom regionu. Karakterizacija populacije patogena određenog geografskog područja ili određenog ekosistema, kroz utvrđivanje njene heterogenosti i homogenosti, omogućava bolje razume-

vanje epidemiologije oboljenja i razvijanje mera kontrole koje će imati dugotrajnije dejstvo. Prema tome, određivanje varijabilnosti u okviru populacije jednog virusa i razumevanje mehanizama i faktora koji utiču na varijabilnost ima veliki praktični agronomski značaj, posebno pri razvijanju strategija kontrole zasnovanih na otpornosti.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta „Unapređenje sortimenta, tehnologije proizvodnje i primarne dorade ulajne tikve-golice i nevena“ (TR200089), čiju realizaciju finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Agrios, G.N.:** Plant Pathology. Academic Press, Inc, San Diego/Toronto, 2005.
- Bananej, K., Keshavaraz, T., Vahdat, A., Hosseini Salkdeh, G. and Glasa, M.:** Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. Journal of Phytopathology, 156: 654-659, 2008.
- Berenji, J.:** Hemijska, nutritivna i farmakološka vrednost uljane tikve-golica (*Cucurbita pepo* L.). Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 43: 149-159, 2007.
- Berenji, J.:** Poznavanje tikava *Cucurbita* sp. Zbornik referata 3. Poljedelski dnevni ABC Pomurka, Murska Sobota, 1988, str. 24-27.
- Berenji, J.:** Stočna tikva – zaboravljena krmna kultura. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 23: 529-537, 1995.
- Berenji, J.:** Tikve – hrana, lek i ukras. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 23: 529-537, 1999.
- Berenji, J.:** Uljana tikva. U: Tehnologija proizvodnje lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja (Adamović D., urednik). Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, i Agroseme-Panonija, Subotica, 1994, str. 15-21.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.:** Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 44-50, 1977.
- Desbiez, C., Gal-On, A., Raccab, B. and Lecoq, H.:** Characterization of epitopes on *zucchini yellow mosaic potyvirus* coat protein permits studies on the interactions between strains. Journal of General Virology, 78: 2073-2076, 1997.
- Desbiez, C. and Lecoq, H.:** *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology, 46: 809-829, 1997.

- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T. and Lecoq, H.:** Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in the island of Martinique. *Plant Disease*, 80: 203-207, 1996.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H.:** Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. *Virus Research*, 85: 5-16, 2002.
- Duduk, N.:** Identifikacija, molekularna karakterizacija i načini prenošenja virusa gajenih biljaka porodice Cucurbitaceae u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2008, str. 1-134.
- Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I. i Bulajić, A.:** Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 35/36: 71-79, 2004.
- Dukić, N., Krstić, B., Katis, N.I., Papavassiliou, C., Berenji, J. i Vico, I.:** Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V jugoslovenskog save-tovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2001, str. 85.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavassiliou, C. and Berenji, J.:** Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Science*, 47: 149-160, 2002.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N.I., Papavassiliou, C. and Berenji, J.:** First report of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Bottlegourd (*Lagenaria siceraria*) in Serbia. *Plant Disease*, 90: 380, 2006.
- Fletcher, J.D., Wallace, A.R. and Rogers, B.T.:** Potyvirus in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV2 virus infections. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 17-26, 2000.
- Gal-On, A.:** *Zucchini yellow mosaic virus*: insect transmission and pathogenicity-the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology*, 8: 139-150, 2007.
- Glasa, M., Svoboda, J. and Nováková, S.:** Analysis of the molecular and biological variability of *zucchini yellow mosaic virus* isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes*, 35: 415-421, 2007.
- Karlović, Đ., Berenji, J., Recseg, K. i Kóvári, K.:** Savremeni pristup uljanoj tikvi (*Cucurbita pepo* L.) sa posebnim osvrtom na tikvino ulje (*Oleum cucurbitae*). Zbornik radova 42. save-tovanja industrije ulja Proizvodnja i prerada uljarica, Herceg Novi, 2001, str. 177-182.
- Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N.I. and Papavassiliou, C.:** Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, 103: 57-65, 2002.
- Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C. and Girard, M.:** Potential involvement of melon fruit in long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Disease*, 87: 955-959, 2003.
- Lecoq, H., Pitrat, M. and Clement, M.:** Identification et caracterisation d'un potyvims provoquant la maladie du rabougn.ssement jaune du melon. *Agronomie*, 1: 827-34, 1981.
- Lecoq, H. and Pitrat, M.:** Strains of *zucchini yellow mosaic virus* in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Phytopathologische Zeitschrift*, 111: 165-173, 1984.
- Leley, T. and Hengmuller, S.:** Breeding for ZYMV tolerance of seed-oil pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *Styriaca*) in Austria using molecular markers. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 23: 117-119, 2000.
- Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G. and D'Aquilo, M.:** Characterization of a potyvirus that causes *Zucchini yellow mosaic*. *Phytopathology*, 71: 667-672, 1981.
- Lisa, V. and Lecoq, H.:** *Zucchini yellow mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 282. Kew, Surrey (GB), 1984.
- McCreight, J.D.:** Botany and culture. In: *Compendium of Cucurbit Diseases* (Zitter T.A., Hopkins D.L. and Thomas C.E., eds.). St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, 1996, pp. 2-6.
- Nameth, S.T., Dodds, J.A., Paulus, A.O. and Leammelen, F.F.:** Cucurbit viruses of California an ever-changing problem. *Plant Disease*, 70: 8-11, 1986.
- Pfösser, M.F. and Baumann, H.:** Phylogeny and geographical differentiation of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates (Potyviridae) based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes. *Archives of Virology*, 147: 1599-1609, 2002.
- Popović, M.:** Povrtarstvo. Nolit, Beograd, 1991, str. 1-431.
- Providenti, R.:** Diseases caused by viruses. In: *Compendium of Cucurbit Diseases* (Zitter T.A., Hopkins D.L. and Thomas C.E., eds.). St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, 1996, pp. 37-45.
- Providenti, R., Gonsalves, D. and Humaydan, H.S.:** Occurrence of *zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California. *Plant Disease*, 68: 443-446, 1984.
- Riedle-Bauer, M., Suarez, B., Reinprecht, H.J.:** Seed transmission and natural reservoirs of *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 109: 200-206, 2002.

Tóbiás, I., Basky, Zs. and Ruskó, J.: *Zucchini yellow mosaic virus*-potyvirus a new pathogen of cucurbit plants occurring in Hungary. *Növényvédelem*, 32: 77-79, 1996.

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

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

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B.: Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzja. *Pesticidi i fitomedicina*, 24(2): 85-94, 2009.

Biological Variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Serbia

SUMMARY

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) has become an important pathogen of cucurbits over the past 20 years. In our country, this virus also causes significant losses, especially in oil pumpkin production. Although ZYMV variability has been extensively studied worldwide by biological and molecular characterization, such information is still limited for the European region. Herein, we present the first analysis of phenotypic variations of ZYMV isolates sampled from oil pumpkin cv. Olinka from different locations in Serbia during 2008. Twelve isolates were obtained by mechanical inoculation on the *C. pepo* hybrid Ezra F1, and four of them were chosen for further detailed biological study. These investigated isolates exhibited different phenotypical features and thus represented different variants, concerning their host range, and type and severity of symptoms. A previously developed primer pair, ZYMV CPfwd/CPrev, was tested to determine its suitability for detection of Serbian ZYMV isolates. Amplification of Serbian ZYMV isolates of different origin, in single and mixed infection, resulted in one distinctive band. The used primer pair proved to be useful not only for routine molecular detection, but also for further molecular characterization of Serbian ZYMV isolates because it amplifies the hypervariable genomic region of ZYMV.

The result obtained in this study is a contribution to investigation of genetic diversity of Serbian ZYMV isolates and their molecular relationship with ZYMV isolates from other parts of the world.

Keywords: Pumpkin; *Zucchini yellow mosaic virus*; Biological characterization; Primer suitability