

Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji

Nataša Dukić¹, Aleksandra Bulajić¹, Janoš Berenji², Ivana Đekić¹,
Bojan Duduk³ i Branka Krstić¹

¹Poljoprivredni fakultet, Beograd

²Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

³Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

REZIME

Prinos i kvalitet duvana mogu da budu ugroženi usled zaraze velikim brojem fitopatogenih virusa. Duvan je prirodni domaćin preko 20 virusa od kojih su najznačajniji i ekonomski najštetniji virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), virus graviranosti duvana (*Tobacco etch virus*, TEV) i virus šarenila nerava duvana (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV).

Prisustvo i rasprostranjenost virusnih zaraza duvana su ispitivani tokom četiri godine, od 2002. do 2005. Pregled i sakupljanje uzoraka sa simptomima obavljeno je u više različitih lokaliteta gajenja duvana u Vojvodini i centralnoj Srbiji. Sakupljeni uzorci su testirani DAS-ELISA metodom na prisustvo PVY, TSWV, TMV, CMV, AMV i TRSV.

Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju na prisustvo četiri ekonomski značajna virusa duvana u našoj zemlji i to: TSWV, PVY, TMV i CMV, čija je učestalost po pojedinim godinama i lokalitetima bila različita. Tokom 2002, 2003. i 2004. godine najčešće detektovan virus bio je TSWV (86,84%; 70%, odnosno 49,56%), dok je 2005. godine prevalentan virus bio PVY (56,16%). Svi virusi čije je prisustvo utvrđeno u ispitivanim uzorcima nalazili su se u pojedničnim ili mešanim infekcijama. Bez obzira na izraženu varijabilnost u ispoljenim simptomima virusnih zaraza na duvanu, ustanovljena je zavisnost tipa ispoljenih simptoma od virusa prouzrokovala.

Sprovedena ispitivanja pokazala su da su TSWV i PVY najznačajniji virusi duvana u našoj zemlji, tako da buduća ispitivanja viroza duvana treba da budu usmerena ka detaljnijoj karakterizaciji ovih ekonomski štetnih virusa.

Ključne reči: Duvan; virusi; serološko dokazivanje; rasprostranjenost

UVOD

Mnoge biljne bolesti, među kojima su najznačajnije one izazvane virusima, mogu značajno smanjiti prinos i kvalitet duvana. Štete prouzrokovane fitopatogenim virusima zabeležene su u svim regionima gajenja duvana u svetu (Mayunga i Kapooria, 2003).

Duvan je prirodni domaćin preko 20 virusa i eksperimentalni domaćin više od 100 biljnih virusa. Najznačajniji i najrasprostranjeniji virusi duvana su: virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), virus graviranosti duvana (*Tobacco etch virus*, TEV) i virus šarenila nerava duvana (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV) (Shew i Lucas, 1991).

Ranija ispitivanja viroza duvana u našoj zemlji utvrdila su prisustvo CMV, TMV i PVX (Tošić, 1960). Nešto kasnije u regionu južne Srbije ustanovljeno je prisustvo i TSWV (Mickovski, 1969). Ispitivanja sprovedena u Vojvodini pokazala su prisustvo TSWV, AMV, CMV, PVY i TMV (Jasnić i sar., 2000).

Najznačajniji efekti virusnih zaraza na duvanu su smanjenje porasta, izražena kržljivost, deformacije i smanjenje lisne površine, što direktno dovodi do smanjenja prinosa duvana. Virusne zaraze duvana, osim direktnog smanjenja prinosa, menjaju hemijski sastav i smanjuju kvalitet duvanskog lišća (Mayunga i Kapooria, 2003; Krstić i sar., 2006b). U slučaju zaraza prouzrokovanih PVY, smanjenje prinosa može iznositi od 13,4 do 57,9%, a nije retka pojava da virusne infekcije potpuno unište proizvodnju duvana (Latorre i sar., 1982). Po rezultatima Sievert-a (1978), PVY može da izazove smanjenje prinosa od 7 do 81%. U poređenju sa zdravim biljkama, u virusno zaraženim biljkama utvrđena je promena hemijskog sastava koja se ogleda u povećanju ukupne količine nikotina, totalnog azota, nitrata i povećanju pH, kao i smanjenju rastvorljivog azota, totalnih alkaloida, fenola i kiselina rastvorljivih u vodi (Sievert, 1978; Latorre i sar., 1984).

Zbog velikog uticaja virusnih zaraza na prinos i kvalitet duvana, praćenje prisustva i rasprostranjenosti pojedinih virusa je značajno za utvrđivanje i sprovođenje adekvatnih mera kontrole u proizvodnji duvana u našoj zemlji, kao i za dobijanje informacija neophodnih za selekciju genotipova sa povišenim nivoom otpornosti na prevalentne viruse.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka duvana

Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana su ispitivani tokom četiri godine, od 2002. do 2005. Pregledani su različiti lokaliteti gajenja duvana u Vojvodini i centralnoj Srbiji i sakupljeni uzorci duvana sa simptomima koji su ukazivali na virusne zaraze. Registrovan je tip i vrsta simptoma za dalju analizu povezanosti ispoljenih simptoma sa vrstom virusa koji je dokazan primenom seroloških metoda.

U toku 2002. godine u lokalitetima Martinoš i Pirovci sakupljeno je ukupno 38 uzoraka duvana sa simptomima virusnih zaraza. Pregled prisustva virusnih zaraza na duvanu tokom 2003. godine obavljen je u lokalitetu Bački Petrovac, gde je za analizu sakupljeno 20 uzoraka.

Tokom 2004. godine pregledani su usevi duvana u sledećim lokalitetima: Hrtkovci, Ruma, Žarkovac, Golubinci, Ljukovo, Beška, Futog, Očovo, Ada, Senta, Bogaroš, Bački Petrovac, Laćisled i Čoka. Sakupljeno je ukupno 115 uzoraka duvana sa simptomima virusnih oboljenja.

Tokom avgusta 2005. godine pregledani su usevi duvana i sakupljeni uzorci sa simptomima virusnih infekcija na različitim lokalitetima gajenja duvana i to: Bački Petrovac, Futog, Begeč, Beška i okolina Mladenovca. Za dalju analizu ukupno su sakupljena 73 uzorka duvana.

Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA)

Uzorci duvana sa simptomima virusnih zaraza, sakupljeni tokom obilaska terena, testirani su DAS-ELISA metodom (Clark i Adams, 1977) primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju PVY, TSWV, TMV, CMV, AMV (Loewe Biochemica GmbH, Germany) i TRSV (Neogen Europe Ltd, Scotland, UK). Tokom 2002. godine obavljena su testiranja na prisustvo četiri virusa (TSWV, PVY, TMV i CMV), 2003. i 2004. na prisustvo tri virusa (TSWV, PVY i TMV), a 2005. na prisustvo šest virusa (TSWV, PVY, TMV, CMV, AMV i TRSV). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu, osim za TRSV kada su antitela korišćena u razređenju 1:500, a konjugovana antitela 1:4000. Uzorci su pripremani homogenizaci-

jom biljnog materijala u odgovarajućem puferu, u razređenju 1:6. Po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), reakcija je očitavana nakon 1-2 sata merenjem apsorpcije na 405nm. Kao pozitivne reakcije ocenjivane su vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativnih kontrola.

REZULTATI

Simptomi u polju

Pregledom parcela gajenog duvana u različitim lokalitetima u Vojvodini i centralnoj Srbiji zabeležena je pojava niza simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu. Simptomi su se manifestovali u vidu promena opšteg izgleda biljaka, kao i hromatskim i morfološkim promenama lišća duvana. Zabeležena je pojava izrazito zakržljalih i patuljastih biljaka, sa izraženim simptomima na lišću, kao i biljaka sa simptomima zaraze koje nisu zaostajale u porastu u odnosu na zdrave biljke duvana. Najčešće uočeni simptomi na lišću duvana su bili: upadljivo šarenilo tipa mozaika, mrežasti mozaik, hrastoliko prošaranje, žutilo nerava, zadržavanje zelene boje oko nerava, nekroza nerava, žutilo, crvenkastosmeđa (bakarna) obojenost, nekrotične i hlorotične pege i šare, nekroza ili hloroza delova ili celih listova, kao i naboranost, kovrdžavost, uvijanje i sužavanje liski. Na zaraženim biljkama primećena je i pojava nekroze stabla, cvetne drške, kao i čašičnih i kruničnih listića.

Serološka detekcija virusa

Ispitivanjima rasprostranjenosti virusa na duvanu tokom četiri godine, od 2002. do 2005, u različitim lokalitetima gajenja na teritoriji Srbije, ustanovljeno je prisustvo četiri virusa: TSWV, PVY, TMV i CMV.

Pregledom duvana tokom 2002. godine u lokalitetima Martinoš i Pirov, i analizom ukupno 38 uzoraka, utvrđeno je prisustvo TSWV, PVY i CMV (Tabela 1). Najveći broj uzoraka bio je zaražen TSWV (86,84%). Našto manji broj uzoraka bio je zaražen CMV (18,42%) i PVY (2,63%). U ispitivanim uzorcima dominantna je bila pojedinačna zaraza TSWV (81,58%), zatim pojedinačna zaraza CMV (10,53%), kao i mešana infekcija TSWV i CMV (5,26%) i PVY i CMV (2,63%). Ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo TMV.

Kod ukupno testiranih 20 uzoraka duvana sakupljenih u lokalitetu Bački Petrovac, tokom 2003. godine, najzastupljeniji detektovani virus, u pojedinačnim ili mešanim zarazama, bio je TSWV (70%), zatim TMV (50%) i PVY (30%) (Tabela 1). Kod najvećeg broja uzoraka utvrđena je mešana zaraza TSWV i TMV (40%). Kod 15% testiranih uzoraka detektovana je pojedinačna zaraza TSWV i PVY, kod 10% uzoraka mešana zaraza TSWV i PVY i kod 5% uzoraka pojedinačna zaraza TMV. Kod 10% uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa.

Tokom 2004. godine, u lokalitetima Hrtkovci, Ruma, Žarkovac, Golubinci, Ljukovo, Beška, Futog, Očovo, Ada, Senta, Bogaroš, Bački Petrovac, Laćisled i Čoka (Tabela 2), od ukupno testiranih 115 uzoraka duvana koji su ispoljavali simptome virusnih obojenja, kod 49,56% pojedinačnih i mešanih infekcija utvrđeno je prisustvo TSWV, kod 32,17% PVY i 11,30% TMV. Najzastupljenija je bila pojedinačna zaraza TSWV (40%), zatim pojedinačna zaraza PVY (23,48%). U nešto manjem procentu detektovana je mešana zaraza TSWV i PVY (5,22%), pojedinačna zaraza TMV (4,35%), mešana zaraza TSWV i TMV (3,48%), PVY i TMV (2,61%) i mešana zaraza TSWV, PVY i TMV (0,87%). Kod 20% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo ispitivanih virusa.

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa duvana tokom 2005. godine, kojim su obuhvaćeni lokaliteti Bački Petrovac, Futog, Begeč, Beška i okolina Mladenovca, utvrđeno je prisustvo četiri virusa PVY, TSWV, TMV i CMV (Tabela 3). Najrasprostranjeniji je bio PVY, utvrđen kod 56,16% ispitivanih uzoraka a na drugom mestu je detektovano prisustvo TMV – 30,14%. TSWV je bio treći po zastupljenosti i utvrđen je kod 20,55% ispitivanih uzoraka, dok je CMV dokazan kod 12,33% ispitivanih uzoraka. U najvećem broju uzoraka detektovana je pojedinačna zaraza PVY (45,20%), TMV (17,81%) i TSWV (10,96%). U manjem broju uzoraka utvrđeno je prisustvo mešane infekcije, od čega je najzastupljenija bila mešana infekcija dva najučestalija virusa, PVY i TMV (5,48%), zatim u po 4,11% uzoraka utvrđena je mešana zaraza PVY i CMV, TSWV i TMV, i TSWV i CMV. Kod 2,74% uzoraka utvrđena je pojedinačna zaraza CMV, dok je samo u pojedinačnim uzorcima (1,37%) utvrđena mešana infekcija TMV i CMV, kao i mešana zaraza PVY, TSWV i TMV. U ispitivanim uzorcima duvana nije utvrđeno prisustvo AMV i TRSV.

Iako u sve četiri godine istraživanja serološka testiranja nisu obavljena uvek na prisustvo svih šest eko-

nomski značajnih virusa, simptomi u polju i rezultati laboratorijske analize pokazali su dominantno prisustvo TSWV tokom 2002, 2003. i 2004. godine (Tabela 4). Drugi virus po zastupljenosti tokom 2002. i 2004. godine bio je PVY, dok je 2005. godine ovaj virus bio najzastupljeniji, a TSWV treći po zastupljenosti. Prisustvo TMV nije utvrđeno tokom 2002. godine, dok je 2003. i 2005. bio drugi po zastupljenosti, a 2004. godine treći. Prisustvo CMV ispitivano je tokom dve godine, i utvrđeno je da je 2002. ovaj virus bio drugi po zastupljenosti, a 2005. godine četvrti. Poređenjem učestalosti pojave detektovanih virusa tokom ove četiri godine ispitivanja utvrđeno je dominantno prisustvo pojedinačnih infekcija, tokom 2002, 2004. i 2005. godine, dok je mešana zaraza dva virusa bila manje zastupljena. Takođe, pojava mešanih infekcija TSWV, PVY i TMV utvrđena je samo u pojedinačnim slučajevima tokom 2003, 2004. i 2005. godine.

Simptomi u polju i njihova povezanost sa detektovanim virusima

Obavljena ispitivanja prisustva virusa duvana u nekim lokalitetima u našoj zemlji ukazala su na postojanje povezanosti između serološki detektovanih virusa i tipa simptoma koje izazivaju na duvanu gajenom u polju. Virus, čije je prisustvo ustanovljeno, izazivaju niz različitih simptoma na čije ispoljavanje utiču mnogi faktori. Bez obzira na tu činjenicu, ispitivanja su ukazala na mogućnost preliminarnu dijagnostiku virusa duvana na osnovu ispoljenih simptoma u slučaju pojedinačnih infekcija. Tako je prisustvo PVY ustanovljeno u uzorcima duvana sa koncentričnim hlorotičnim pegama ili hlorozom i žutilom oko nerava na mlađem lišću. Takve pege i žute zone oko nerava se spajaju i postaju nekrotične poprimajući kasnije crvenkastosmeđu boju, što daje biljkama bakarnu obojenost (Slika 1). Ovakva nekroza se može javiti ravnomerno na listu, ali je zabeležena i pojava simptoma samo na jednoj polovini liske. Bakarna boja javlja se kako na vršnom, tako i na ostalom lišću na duvanu i takvo lišće u potpunosti propada i nema nikakvu tehnološku vrednost. Na biljkama duvana zaraženim PVY primećena je i pojava nekroze stabla (Slika 2), cvetne drške, kao i čašičnih i krunchičnih listića.

Na biljkama duvana u kojima je dokazana pojedinačna zaraza TMV, kao najčešći tip simptoma zabeleženo je hlorotično šarenilo tipa blagog do jakog mozai-

Tabela 1. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa duvana u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2002. i 2003. godine
Table 1. Presence and percentage of frequency of tobacco viruses in single and mixed infections in 2002 and 2003

Godina Year	Lokalitet (broj uzoraka) Locality (Number of samples)	Pojedinačna zaraza* Single infection*				Mešana zaraza – Mixed infection*						Bez testiranih virusa* No tested viruses*				Ukupna zaraza* Total infection*			
		TSWV	PVY	TMV	CMV	TSWV+PVY	TSWV+TMV	TSWV+CMV	PVY+TMV	PVY+CMV	TMV+CMV	TSWV+ PVY+TMV	TSWV+ PVY+TMV+ CMV	TSWV	PVY	TMV	CMV		
2002.	Marroš (35)	31/35	0/35	0/35	2/35	0/35	0/35	2/35	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35	33/35	0/35	0/35	4/35		
		88.58%	0%	0%	5.71%	0%	0%	5.71%	0%	0%	0%	0%	0%	94.28%	0%	0%	11.43%		
		0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	3/3	
Piroć (3)	Ukupno (38)	31/38	0/38	0/38	4/38	0/38	0/38	2/38	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	33/38	1/38	0/38	7/38		
		81.58%	0%	0%	10.53%	0%	0%	5.26%	0%	0%	0%	0%	0%	86.84%	2.63%	0%	18.42%		
		0/3	0/3	0/3	66.67%	0/3	0/3	0/3	0/3	33.33%	0/3	0/3	0/3	0/3	33.33%	0/3	100%		
2003.	B. Petrovac (20)	3/20	3/20	1/20	-	2/20	8/20	0/20	0/20	-	-	1/20	2/20	14/20	6/20	10/20	-		
		15.00%	15.00%	5.00%	-	10.00%	40.00%	0%	0%	-	-	5.00%	10.00%	70.00%	30.00%	50.00%	-		
		0/3	0/3	0/3	0%	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	

*Broj pozitivnih/ukupno broj testiranih uzoraka; - = nije ispitivano

*Number of positive/total number of tested samples; - = not tested

Tabela 2. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa duvana u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2004. godine
Table 2. Presence and percentage of frequency of tobacco viruses in single and mixed infections in 2004

Lokalitet (broj uzoraka) Locality (Number of samples)	Pojedinačna zaraza* Single infection*			Mešana zaraza – Mixed infection*				Bez testiranih virusa* No tested viruses*			Ukupna zaraza* Total infection*		
	TSWV	PYY	TMV	TSWV+PYY	TSWV+TMV	PYY+TMV	TSWV+PYY+TMV	TSWV	PYY	TMV	TSWV	PYY	TMV
Hrtkovci (10)	0/10 0%	3/10 30.00%	1/10 10.00%	0/10 0%	0/10 0%	0/10 0%	0/10 0%	6/10 60.00%	0/10 0%	0/10 0%	0/10 0%	3/10 30.00%	1/10 10.00%
Ruma (5)	0/5 0%	2/5 40.00%	1/5 20.00%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	2/5 40.00%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	2/5 40.00%	1/5 20.00%
Žarkovac (7)	1/7 14.28%	2/7 28.57%	1/7 14.28%	0/7 0%	0/7 0%	1/7 14.28%	0/7 0%	2/7 28.57%	1/7 14.28%	3/7 42.86%	1/7 14.28%	2/7 28.57%	2/7 28.57%
Golubinci (5)	0/5 0%	4/5 80.00%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	1/5 20.00%	0/5 0%	4/5 80.00%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%
Ljukovo (3)	0/3 0%	0/3 0%	1/3 33.33%	2/3 66.67%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	2/3 66.67%	2/3 66.67%	1/3 33.33%	1/3 33.33%
Beška (7)	5/7 71.44%	1/7 14.28%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	1/7 14.28%	0/7 0%	5/7 71.43%	1/7 14.28%	0/7 0%	0/7 0%
Futog (15)	0/15 0%	9/15 60.00%	0/15 0%	2/15 13.33%	0/15 0%	1/15 6.67%	0/15 0%	3/15 20.00%	0/15 0%	2/15 13.33%	12/15 80.00%	1/15 6.67%	1/15 6.67%
Očovo (4)	0/4 0%	3/4 75.00%	0/4 0%	1/4 25.00%	0/4 0%	0/4 0%	0/4 0%	0/4 0%	0/4 0%	1/4 25.00%	4/4 100%	0/4 0%	0/4 0%
Ada (4)	1/4 25.00%	1/4 25.00%	0/4 0%	0/4 0%	0/4 0%	0/4 0%	1/4 25.00%	1/4 25.00%	0/4 0%	2/4 50.00%	2/4 50.00%	1/4 25.00%	1/4 25.00%
Senta (3)	1/3 33.33%	1/3 33.33%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	1/3 33.33%	0/3 0%	1/3 33.33%	1/3 33.33%	0/3 0%	0/3 0%
Bogaroš (13)	9/13 69.23%	0/13 0%	0/13 0%	0/13 0%	1/13 7.69%	0/13 0%	0/13 0%	3/13 23.08%	0/13 0%	10/13 79.92%	0/13 0%	1/13 7.69%	1/13 7.69%
B. Petrovac (12)	7/12 58.34%	0/12 0%	1/12 8.33%	1/12 8.33%	1/12 8.33%	1/12 8.33%	0/12 0%	1/12 8.33%	1/12 8.33%	9/12 75.00%	2/12 16.67%	3/12 25.00%	3/12 25.00%
Lačislid (12)	12/12 100%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%	12/12 100%	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%
Čoka (15)	10/15 66.67%	1/15 6.67%	0/15 0%	0/15 0%	2/15 13.33%	0/15 0%	0/15 0%	2/15 13.33%	0/15 0%	12/15 80.00%	1/15 6.67%	2/15 13.33%	2/15 13.33%
Ukupno (115) Total (115)	46/115 40.00%	27/115 23.48%	5/115 4.35%	6/115 5.22%	4/115 3.48%	3/115 2.61%	1/115 0.87%	23/115 20.00%	1/115 0.87%	57/115 49.56%	37/115 32.17%	13/115 11.30%	13/115 11.30%

*Broj pozitivnih/ukupan broj testiranih uzoraka: - = nije ispitivano

*Number of positive/total number of tested samples; - = not tested

Tabela 3. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa duvana u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2005. godine
Table 3. Presence and percentage of frequency of tobacco viruses in single and mixed infections in 2005

Lokalitet (broj uzoraka) Locality (Number of samples)	Pojedinačna zaraza* Single infection*			Mešana zaraza – Mixed infection*						Bez testiranih virusa-No tested viruses*					Ukupna zaraza - Total infection*					
	TSW	PVY	TMV	TSW+PVY	TSW+TMV	TSW+CMV	PVY+TMV	PVY+CMV	TMV+CMV	TSW+TMV	PVY+TMV	TSW+CMV	TMV+CMV	PVY+TMV	TSW+TMV	PVY	TMV	CMV	AMV	TRSV
B. Petrovac (29)	0/29	13/29	12/29	0/29	0/29	0/29	4/29	0/29	0/29	0/29	0/29	0/29	0/29	0/29	0/29	17/29	16/29	0/29	0/29	0/29
Futog (14)	0/14	12/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	1/14	1/14	1/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	13/14	1/14	2/14	0/14	0/14
Boguč (7)	0/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	6/7	0/7	3/7	0/7	0/7
Beška (16)	6/16	4/16	1/16	0/16	3/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	1/16	10/16	5/16	5/16	0/16	0/16	0/16
Mladenovac (7)	2/7	0/7	0/7	0/7	0/7	3/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	4/7	0/7	0/7	0/7
Ukupno (73) Total	10.96%	33/73	13/73	2/73	0/73	3/73	4/73	3/73	1/73	1/73	1/73	0/73	0/73	2/73	15/73	41/73	22/73	9/73	0/73	0/73
	10.96%	45.20%	17.81%	2.74%	0%	4.11%	5.48%	4.11%	1.37%	1.37%	0%	0%	2.74%	20.55%	56.16%	30.14%	12.33%	0%	0%	0%

*Broj pozitivnih/ukupno broj testiranih uzoraka: - = nije ispitivano / *Number of positive/total number of tested samples; - = not tested

Tabela 4. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa duvana u pojedinačnim i mešanim infekcijama po godinama ispitivanja
Table 4. Presence and percentage of frequency of tobacco viruses in single and mixed infections per year of investigation

Godina Year	Pojedinačna zaraza* Single infection*			Mešana zaraza – Mixed infection*						Detektovani virusi* Detected viruses*										
	TSW	PVY	TMV	TSW+PVY	TSW+CMV	TSW+TMV	PVY+CMV	PVY+TMV	TMV+CMV	TSW+CMV	TSW+TMV	PVY+TMV	TSW+CMV	TMV	PVY	TSW	TMV	CMV	AMV	TRSV
2002.	31/38	0/38	4/38	0/38	2/38	0/38	1/38	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	0/38	33/38	1/38	0/38	7/38	-	-
	81.58%	0%	10.53%	0%	5.26%	0%	2.63%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	86.84%	2.63%	0%	18.42%	-	-
2003.	3/20	3/20	1/20	2/20	8/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10/20	1/20	1/20	11/20	14/20	14/20	6/20	10/20	-	-	-
	15.00%	15.00%	5.00%	10.00%	40.00%	0%	0%	0%	0%	50.00%	5.00%	5.00%	55.00%	70.00%	30.00%	50.00%	-	-	-	
2004.	46/115	27/115	5/115	6/115	4/115	3/115	-	3/115	-	13/115	1/115	1/115	14/115	57/115	37/115	13/115	-	-	-	
	40.00%	23.48%	4.35%	5.22%	3.48%	-	2.61%	-	-	11.30%	0.87%	0.87%	12.17%	49.56%	32.17%	11.30%	-	-	-	
2005.	8/73	33/73	13/73	2/73	3/73	4/73	3/73	1/73	1/73	14/73	1/73	1/73	15/73	15/73	41/73	22/73	9/73	0/73	0/73	
	10.96%	45.20%	17.81%	2.74%	4.11%	5.48%	4.11%	1.37%	1.37%	19.18%	1.37%	1.37%	20.55%	20.55%	56.16%	30.14%	12.33%	0%	0%	

*Broj pozitivnih/ukupno broj testiranih uzoraka: - = nije ispitivano / *Number of positive/total number of tested samples; - = not tested

ka (Slika 3). Osim simptoma mozaika primetno je i zadržavanje tamnozeleno boje oko prosvetljenih nerava, kao i klobučavost lišća. Pored ovih simptoma, kod biljaka koje su zaražene u ranim fazama porasta i razvoja, često je zabeležena kržljivost, koja je bila naročito izražena ukoliko se radilo o mešanim infekcijama TMV i TSWV (Slika 4).

Prisustvo TSWV utvrđeno je u uzorcima duvana sa raznolikim simptomima, a najčešće u vidu hrastolikog mozaika ili šara nalik na list paprati, nekrotičnih pega i šara na nervima ili između njih, koncentričnih hlorotičnih ili nekrotičnih pega, sivobeličastih nekroza okruženih smeđim nekrotičnim crticama, pucanja lisnog tkiva usled neravnomernog porasta lista (Slika 5). Većina biljaka u kojima je dokazan TSWV bile su sa izrazitim zaostajanjem u porastu.

Prisustvo CMV utvrđeno je u uzorcima duvana sa izraženim simptomima mozaika i klobučavosti, kao i sužavanja liske (Slika 6).

Mešana zaraza PVY i TMV utvrđena je u uzorcima duvana sa vrlo raznovrsnim simptomima zaraze, propadanja biljke, nekroze nerava, nekrotičnih pega do nekrotičnih zona i naboranosti lista. Kao i kod pojedinačnih zaraza PVY i u mešanoj zarazi TMV utvrđena je nekroza stabla, cvetne drške i čašičnih listića. Uzorci u kojima je detektovano prisustvo PVY i CMV ispoljavali su simptome nekroze nerava, hloroze nerava, hloroze i izraženog mozaika. Mešana zaraza TSWV i TMV utvrđena je kod uzoraka duvana sa simptomima hrastolikog mozaika, klobučavosti, patuljivosti sa izraženim simptomima mozaika, posebno na vršnom mladom lišću, dok je mešana zaraza TSWV i CMV utvrđena kod biljaka sa simptomima nekrotičnih šara, nekroze nerava, hlorotičnih pega i šara, klobučavosti i mozaika. U uzorcima duvana sa utvrđenom mešanom zarazom TMV i CMV simptomi su se ispoljavali u vidu kržljivosti, šupljikavosti lišća i beličastih pega, a mešana zaraza PVY, TSWV i TMV uglavnom se ispoljavala simptomima nekroze nerava i kržljivosti.

DISKUSIJA

Rezultati četvorogodišnjeg praćenja pojave i rasprostranjenosti virusa duvana u našoj zemlji su pokazali prisustvo TSWV, PVY, TMV i CMV, čija je učestalost po godinama i lokalitetima različita.

Ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su dominantno prisustvo TSWV od 2002. do 2004. godine, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim 1995.



Sl. 1. PVY: Crvenosmeđa (bakarna) boja zaražene biljke duvana
Fig. 1. PVY: Red brown (copper-like) coloration of an infected tobacco plant



Sl. 2. PVY: Nekrotične crtice na stablu duvana
Fig. 2. PVY Necrotic streaks on tobacco stem



Sl. 3. TMV: Mozaik na lišću duvana
Fig. 3. TMV: Mosaic on tobacco leaves

i 1999. godine (Jasnić i sar., 2000). Međutim, ispitivanjima sprovedenim 2005. godine utvrđeno je dominantno prisustvo PVY na duvanu u našoj zemlji, ko-



Sl. 4. Mešana infekcija TMV i TSWV: Izražena krčljavost duvana
Fig. 4. Mixed infection with TMV and TSWV: Severe stunting of tobacco plant



Sl. 5. TSWV: Zakrčljavost duvana sa nekrozom i deformacijom listi
Fig. 5. TSWV: Stunting of tobacco with necrosis and malformation of leaves



Sl. 6. CMV: Izraženi mozaik na lišću duvana
Fig. 6. CMV: Severe mosaic on tobacco leaves

je je potvrđeno i u drugim područjima gajenja duvana u svetu (Lucas, 1975; Sievert, 1978; Burk i sar., 1982; Marte i sar., 1987). PVY je 2002. i 2004. godine, kao i

1999. (Jasnić i sar., 2000) bio drugi po zastupljenosti. Takođe, ova ispitivanja su utvrdila i visok procenat zaraze duvana TMV. Ova dva virusa, PVY i TMV, su u literaturi opisani kao široko rasprostranjeni, ekonomski štetni virusi duvana i kao prouzrokovajući značajnih gubitaka u proizvodnji duvana širom sveta (Lucas, 1975; Sievert, 1978; Mayunga i Kapooria, 2003). Iako je 1999. godine izgledalo da TMV gubi značaj u proizvodnji duvana, ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su da je ovaj virus prisutan i pojedinih godina veoma značajan na duvanu, kao što je to ustanovljeno 2003. i 2005. godine. Analizom dobijenih rezultata uočava se tendencija povećanja procenta zaraze duvana PVY i TMV. U ispitivanim uzorcima duvana sakupljenim 2005. godine nije utvrđeno prisustvo AMV, mada su Jasnić i saradnici (2000) ustanovili prisustvo ovog virusa na duvanu 1995. godine. Prisustvo TRSV, virusa koji se nalazi na A1 karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije, nije utvrđeno u ispitivanim uzorcima duvana.

Razlike u pojavi i zastupljenosti pojedinih virusa nisu ustanovljene samo u zavisnosti od godine istraživanja već i od lokaliteta gajenja duvana. Tako je tokom 2002. godine u lokalitetu Martinoš najrasprostranjeniji detektovan virus bio TSWV. Tokom vegetacije 2004. godine najveći procenat zaraze TSWV utvrđen je u lokalitetima Beška, Bogaroš, Bački Petrovac, Laćisled i Čoka, dok je najveći procenat zaraze PVY utvrđen u lokalitetima Hrtkovci, Ruma, Žarkovac, Golubinci, Futog i Očovo. U podjednakom broju uzoraka utvrđeno je prisustvo TSWV i PVY u lokalitetima Ljukovo, Ada i Senta. Tokom 2005. godine TSWV je bio najučestaliji u lokalitetu Beška i Mladenovac, a PVY u Bačkom Petrovcu, Futogu i Begeču. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu i upoređujući ih sa rezultatima Jasnića i saradnika (2000) može se zaključiti da određeni virusi predstavljaju problem u gajenju duvana u određenim lokalitetima.

Ova razlika u pojavi, kao i zastupljenosti, nije retka kod virusa duvana (Mayunga i Kapooria, 2003), i potpuno je razumljiva kada se zna da se detektovani virusi odlikuju potpuno različitim epidemiologijom. Tako se PVY, CMV i AMV prenose vašima, TSWV tripsima, dok TMV nema vektora, ali se izuzetno lako prenosi mehanički. Njihova pojava i rasprostranjenost svakako zavise od izvora inokuluma, vremena ostvarenje zaraze, populacije vektora, kao i načina izvođenja proizvodnog procesa gajenja duvana od mesta i načina proizvodnje rasada, pa do preduzimanja svih agrotehničkih mera u proizvodnji.

Iako je poznato da virusi duvana mogu da izazivaju veoma različite tipove simptoma u zavisnosti od starosti biljke, uslova spoljašnje sredine (naročito temperature), nivoa infekcije, kao i u zavisnosti od soja virusa, ustanovljeno je postojanje izvesne korelacije između tipa simptoma i detektovanog virusa. S obzirom da determinacija nekog virusnog prouzrokača ne može da se zasniva samo na simptomatologiji, utvrđena korelacija može poslužiti samo pri izvođenju preliminarnih zaključaka o virusu prouzrokaču. Simptomi koje izaziva PVY, uočeni u toku ovih istraživanja, u saglasnosti su sa navodima iz literature (Marte i sar., 1987). Takođe, Marte i saradnici (1987) navode da se mešana infekcija ovog virusa i drugih prirodno raširenih virusa duvana (posebno CMV) odlikuje kompleksnijom slikom simptoma, zbog čega simptomi gube dijagnostički značaj. Pojava izraženih simptoma nekroze nerava koji rezultiraju u karakterističnoj bakarnoj obojenosti celih biljaka, prema navodima iz literature (Marte i sar., 1987; Shew i Lucas, 1991), upućuje na moguće prisustvo nekrotičnog soja PVY u našoj zemlji. Mnogi istraživači (Lucas, 1975; Daillo i Mulchi, 1981; Reilly, 1983) su opisali simptome na duvanu prouzrokovane infekcijom TMV koji su istovetni simptomima zapaženim u toku ovih istraživanja. Međutim, ovaj tip simptoma je veoma sličan tipu simptoma koji izaziva CMV, tako da pojava raznih tipova mozaika može da uputi na infekciju jednim od ova dva virusa (Shew i Lucas, 1991). Iako je slika simptoma koje TSWV izaziva na duvanu veoma raznolika, pojava hlorotičnih i nekrotičnih prstenastih pega na lisnim nervima ili oko njih, sa sigurnošću upućuje na infekciju ovim virusom (CAB International, 2000). Shew i Lucas (1991) navode da su simptomi na biljkama duvana u polju dovoljni da se na osnovu njih, sa visokom pouzdanošću od 99%, izvrši tačna identifikacija mnogih virusa duvana, ali samo ako je za određeni region poznato koji su virusi prisutni i ako je prethodno izvršena korelacija između tipa simptoma i određenog virusa korišćenjem laboratorijskih tehnika za dokazivanje biljnih virusa. Zbog toga ustanovljena korelacija između simptoma i virusa prouzrokača u našim klimatskim uslovima ima određeni značaj u dijagnostici virusa duvana.

Iako je rasprostranjenost i procentualna zastupljenost TSWV tokom 2005. godine bila manja, činjenica da se ovaj virus javlja svake godine na duvanu govori o neophodnosti preduzimanja mera sprečavanja pojave i daljeg širenja ovog virusa koji se nalazi na A2 karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije.

U cilju sprečavanja nepovoljnog dejstva virusnih zaraza na proizvodnju duvana, neophodno je dobro po-

znavanje biologije i epidemiologije prouzrokača. Daljim sprovođenjem adekvatnih mera mogu se kontrolisati virusne bolesti duvana, bilo da se radi o ekonomski značajnim virusima (Krstić i sar., 2006b) ili karantinskim virusima kao što je TSWV (Csinos i sar., 2001; Krstić i sar., 2005a; Krstić i sar., 2005b).

Višegodišnja ispitivanja virusnih zaraza na duvanu pokazala su da su TSWV i PVY najznačajniji virusi duvana u našoj zemlji, i da buduća ispitivanja viroza duvana treba da budu usmerena ka detaljnijoj karakterizaciji ovih ekonomski štetnih virusa.

LITERATURA

- Burk, L.G., Gooding Jr, G.V. and Chaplin, J.F.:** Reactions of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of Potato virus Y. *Tobacco Science*, 26: 85-88, 1982.
- CAB International:** Crop Protection Compendium, Wallingford, UK, CAB International, 2000.
- Clark, M.F., Adams, A.N.:** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 44-50, 1977.
- Csinos, A.S., Pappu, H.R., McPherson, R.M. And Stephenson, M.G.:** Management of *Tomato spotted wilt virus* in Flue-Cured Tobacco with Acibenzlar-S-Methyl and Imidacloprid. *Plant Disease*, 85: 292-296, 2001.
- Daillo, I. and Mulchi, C.L.:** Influence of time of infection by TMV and TEV on agronomic, chemical and physical properties of tobacco cv. MD609. *Tobacco Science*, 25: 1-5, 1981.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J.:** Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 34: 67-76, 2000.
- Krstić, B., Dukić, N., Vico, I., Bulajić, A. i Berenji, J.:** Principi kontrole virusa bronzavosti paradajza. *Zbornik sažetaka Naučno-stručnog savjetovanja agronoma Republike Srpske „Poljoprivreda RS kao sastavni dio evropskih integracionih procesa”*, Jahorina, 2005a, 45.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Berenji, J.:** Virus bronzavosti paradajza na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama na području Republike Srbije. *Zbornik rezimea II simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini*, Teslić, 2005b, 15-16.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B.:** Virus bronzavosti paradajza i virus nekrotične pegavosti *Impatiens*. *Zbornik predavanja Seminara pejzažne hortikulture Srbije 2006*, Banja Vrujci, 2006a, 63-75.

- Krstić, B., Vico, I., Berenji, J., Dukić, N. i Bulajić, A.:** Opšti principi kontrole virusnih oboljenja duvana sa posebnim osvrtom na virus mozaika duvana. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 42, 401-412, 2006b.
- Latorre, B.A., Andrade, O., Penaloza, E. and Escaffi, O.:** A severe outbreak of potato virus Y in Chilean tobacco. Plant Disease, 66: 893-895, 1982.
- Latorre, B.A., Flores, V. and Marholz, G.:** Effect of Potato Virus Y on Growth, Yield, and Chemical Composition on Flue-Cured Tobacco in Chile. Plant Disease, 68: 844-886, 1984.
- Lucas, G. B.:** Diseases of Tobacco. 3rd ed., Biological Consulting Associates, Raleigh, N.C., 1975, pp. 621.
- Marte, M., Beuchat, A., Della Torre, G. and Cerri C.:** Behaviour of some tobacco hybrids towards Tobacco mosaic virus and a necrotic strain of Potato virus Y. Phytopatologia Mediterranea, 26: 121-124, 1987.
- Mayunga, D.S. and Kapooria, R.G.:** Incidence and identification of virus diseases of tobacco in three provinces of Zambia. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 33: 355-359, 2003.
- Mickovski, J.:** Tomato spotted wilt virus na duvanu u Jugoslaviji (Lycopersicum virus 3-Smith). Zaštita bilja, 105: 203-214, 1969.
- Reilly, J.J.:** Effects of sequential virus infection on flue-cured tobacco. Tobacco Science, 28: 23-27, 1983.
- Shew, H.D. and Lucas, G.B.:** Compendium of Tobacco Diseases. APS Press., 1991.
- Sievert, R.S.:** Effect of Potato virus Y on Cultivars and Hybrids of Burley Tobacco. Phytopathology, 68: 974-978, 1978.
- Tošić, M.:** Prilog poznavanju viroza duvana u NR Srbiji. Zaštita bilja, 61: 61-66, 1960.

Presence and Distribution of Tobacco Viruses in Serbia

SUMMARY

Infection with a large number of plant viruses could imperil tobacco yield and quality. Tobacco is a natural host for more than 20 viruses, among which the most important and economically harmful are tobacco mosaic virus (TMV), tomato spotted wilt virus (TSWV), cucumber mosaic virus (CMV), potato virus Y (PVY), alfalfa mosaic virus (AMV), tobacco ring-spot virus (TRSV), tobacco etch virus (TEV) and tobacco vein mottling virus (TVMV).

The occurrence and distribution of tobacco viruses were investigated for 4 years (2002-2005). During this period many different tobacco growing localities in Vojvodina and central Serbia were monitored and samples showing virus symptoms were collected. The collected samples were tested by DAS ELISA using polyclonal antisera, specific for the detection of PVY, TSWV, TMV, CMV, AMV and TRSV.

The results obtained for the tobacco virus distribution during these four years of investigation proved the presence of four economically important viruses in our country, whose frequencies varied from year to year. In 2002, 2003 and 2004, the most frequent was TSWV (86.84%; 79% and 49.56%, respectively), while in 2005 PVY was prevalent (56.16%). All viruses detected in the samples tested were present in single or mixed infections. A correlation was established between the field symptoms on tobacco and the virus causal agents.

The results obtained showed that TSWV and PVY were the most important tobacco viruses in our country, so that further research of tobacco virus diseases should be directed towards their more detailed characterization.

Keywords: Tobacco; Viruses; Serological identification; Distribution