

Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Crnoj Gori

Jelena Zindović¹, Nataša Dukić², Aleksandra Bulajić², Jelena Latinović¹,
Ivana Đekić², Bojan Duduk³ i Branka Krstić²

¹Biotehnički institut, Podgorica, Crna Gora

²Poljoprivredni fakultet, Beograd

³Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

REZIME

Istraživanja prisustva i rasprostranjenosti sedam ekonomski značajnijih virusa duvana: virusa mozaika duvana (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV), virusa bronzavosti paradajza (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV), virusa mozaika krastavca (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV), virusa crtičastog mozaika krompira (*Potato Virus Y*, PVY), virusa mozaika luterke (*Alfalfa Mosaic Virus*, AMV), virusa prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco Ringspot Virus*, TRSV) i virusa mozaika krompira (*Potato Virus X*, PVX) su obavljena na teritoriji Crne Gore tokom 2005. godine. Uzorci su sakupljeni u četiri različita lokaliteta gajenja duvana i testirani na prisustvo virusa pribjegom DAS-ELISA testa.

Seroškim analizama utvrđeno je prisustvo četiri ispitivana virusa: TMV, CMV, PVY i AMV, dok prisustvo TSWV, TRSV i PVX nije konstatovano u usjevima duvana u Crnoj Gori. Najveću zastupljenost imali su TMV (44.6%) i CMV (41.5%). Treći po raširenosti bio je PVY (15.4%), a četvrti AMV (3.1%). Takođe, primjenom DAS-ELISA testa i monoklonalnih antiseruma specifičnih za različite sojeve PVY, utvrđena je apsolutna dominantnost nekrotičnog soja (PVYN) u populaciji PVY.

Rezultati ispitivanja su ukazali na značaj TMV i CMV u proizvodnji duvana u Crnoj Gori, ali i na neophodnost njihove detaljne karakterizacije na biološkom i molekularnom nivou i sprovođenje odgovarajućih mjera kontrole.

Ključne reči: Duvan; virusi; pojava; raširenost; DAS-ELISA test

UVOD

Veliki broj bolesti ugrožava proizvodnju duvana. Među prouzrokovачima bolesti duvana virusi zauzimaju značajno mjesto, imajući u vidu njihovu široku rasprostranjenost u svijetu, način širenja i uticaj na prinos i kvalitet (Mayunga i Kapooria, 2003).

Duvan je prirodni domaćin oko 20 različitih vrsta virusa, od kojih se samo neki ubrajaju u ekonomski značajne: virus mozaika duvana (*Tobacco Mosaic Vi-*

rus, 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 luterke (*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). Ekonomski značaj virusa duvana ogleda se, ne samo u smanjenju prinosa duvana, već i u

pogoršanju njegovih tehnoloških svojstava (Blagojević, 1970; Mayunga i Kapooria, 2003). Naime, prisustvo virusa u biljkama duvana utiče na smanjenje sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata, skroba i polifenola i na povećanje nikotina, ukupnog i nitratnog azota i bjelančevina (Sievert, 1978; Latore i sar., 1984). Takođe, smanjuje se vrijednost Šmukovog broja, koji je osnovni pokazatelj kvaliteta duvana, a predstavlja odnos rastvorljivih ugljenih hidrata i bjelančevina (Mickovski, 1969).

Iako virusi zauzimaju značajno mjesto među bolestima duvana, ne postoje podaci o njihovoj prisutnosti i raširenosti u usjevima duvana u Crnoj Gori. Takođe, vrlo je malo podataka o njihovoj raširenosti u Srbiji. Prva istraživanja koja su se odnosila na rasprostranjenost virusa duvana na parcelama ogledne stanice Duvanskog instituta na Avali, sproveo je Tošić (1960). Rezultati su pokazali da su u ukupnim zarazama, koje su iznosile 10-15%, dominantne bile zaraze CMV (89%), dok je manji broj biljaka bio zaražen PVX, bilo u pojedinačnoj ili miješanoj infekciji sa TMV. Mickovski (1969) je u južnoj Srbiji utvrdio prisustvo TSWV. Noviji podaci odnose se na istraživanja koja su sproveli Dukić i saradnici (2006) u periodu 2002-2005. godine i koja ukazuju na prisustvo TSWV, PVY, TMV i CMV. Takođe, utvrdili su da je TSWV imao dominantno prisustvo od 2002. do 2004. godine, a PVY u 2005. godini. Jasnić i saradnici (2000) su u usjevima duvana u Vojvodini dokazali prisustvo virusa TSWV, AMV, CMV, PVY i TMV.

Zbog svega navedenog, cilj ovog rada je bio utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti sedam virusa duvana na teritoriji Crne Gore.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka duvana

Pregledom usjeva duvana tokom 2005. godine, na velikom broju biljaka uočeni su simptomi koji su upućivali na virusne zaraze. Na četiri različita lokaliteta u Crnoj Gori: Staniselići, Sukuruć, Tuzi i Vranj, sakupljeno je 65 uzoraka sa simptomima virusne zaraze. Uzorci su pripadali sortama Burley (63 uzorka) i Merilend (dva uzorka).

Serološke analize

Serološke analize sakupljenih uzoraka obavljene su primjenom direktnе imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA testa) po protokolu koji su opisali Clark

i Adams (1977), uz korišćenje poliklonalnih antitijela specifičnih za detekciju TSWV, TMV, CMV, AMV (Loewe Biochemica, Njemačka), TRSV (Adgen, Škotska), PVY i PVX (Bioreba, Švajcarska). Ekstrakcija biljnog soka iz zaraženog lišća je urađena u prisustvu pufera za ekstrakciju u odnosu 1:10. Poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatom su korišćena u razređenjima preporučenim od strane proizvođača; za TSWV, TMV, CMV i AMV u razređenju 1:200; za PVY i PVX 1:1000; za TRSV IgG u razređenju 1:500, a konjugovani IgG 1:4000.

Drugi dio seroloških analiza je obuhvatio karakterizaciju PVY izolata. Uzorci koji su bili zaraženi PVY su dalje testirani i to primjenom DAS-ELISA testa i monoklonalnih antitijela za nekrotični - PVY^N, obični - PVY^O i crtičasti - PVY^C soj (Sasa, Škotska). Monoklonalna antitijela su korišćena u razređenju 1:1000, a odgovarajući konjugat u razređenju 1:4000 za PVY^N i PVY^{O+C} i 1:2000 za PVY^C.

Reakcija je očitavana na spektrofotometru (Microplate Reader 680, Biorad), dva sata nakon inkubacije mjerenjem absorpcije na 405 nm. Pozitivnim su ocjenjivani oni uzorci čija je vrijednost absorpcije bila dva ili više puta veća od vrijednosti absorpcije negativne kontrole.

REZULTATI

Simptomi u polju

Na biljkama duvana konstatovane su različite promjene: prosvijetljenost nerava, mrežavost, hlorotično šarenjilo, blagi do jaki mozaik, naboranost, klobučavost i uvjerenost listova (Slike 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7). Takođe, zabilježe-



Slika 1. Nekroza nerava na listu duvana
Figure 1. Vein necrosis of tobacco leaves



Slika 2. Patuljavost duvana
Figure 2. Tobacco dwarfing



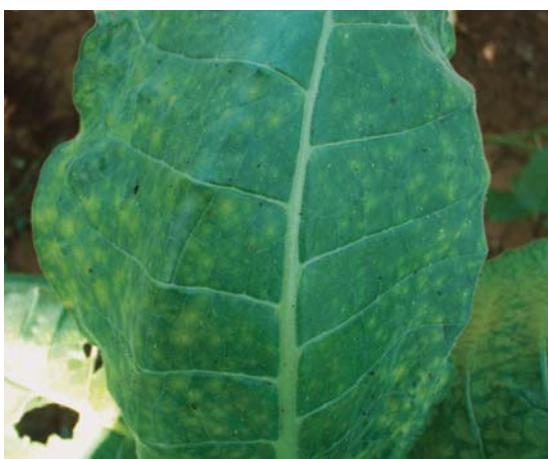
Slika 5. Nekrotične pjege na listu duvana
Figure 5. Necrotic spots on tobacco leaves



Slika 3. Izraženi mozaik i zadržavanje zelene boje oko nerava
Figure 3. Distinct mosaic with veinbanding



Slika 6. Uvijanje ivica listova duvana prema naličju
Figure 6. Tobacco leaf edge curling



Slika 4. Hlorotično šarenilo
Figure 4. Chlorotic mottling of tobacco leaves



Slika 7. Klobučavost lista duvana
Figure 7. Tobacco leaf blistering

na je pojava hlorotičnih, nekrotičnih i prstenastih pjega različitih veličina. Simptomi nekroza uočeni su u vidu nekroze nerava lista, zatim nekrotičnih pjega na stablu, cvjetnoj dršci i vršnim pupoljcima. Uočeno je izumiranje i sušenje lisnih dijelova, kao i promjene u opštem izgledu biljke u vidu patuljavosti i žbunavosti (Slika 2).

Serološke analize

Ispitivanjem 65 uzoraka lišća duvana sa četiri lokaliteta u Crnoj Gori, prisustvo virusa je utvrđeno kod 59 uzoraka (90.77%), a kod šest uzoraka (9.23%) nije utvrđeno prisustvo ispitivanih virusa.

U zaraženim uzorcima dominantan je bio virus mozaika duvana (TMV), čije prisustvo je dokazano kod 28 uzoraka (43.08%) i virus mozaika krastavca (CMV), čije prisustvo je dokazano kod 27 uzoraka (41.54%) (Tabela 1). Takođe, konstatovano je prisustvo PVY, kod 10 uzoraka (15.38%) i AMV kod dva uzorka duvana (3.08%). Nije dokazano prisustvo TSWV, TRSV i PVX ni u jednom testiranom uzorku.

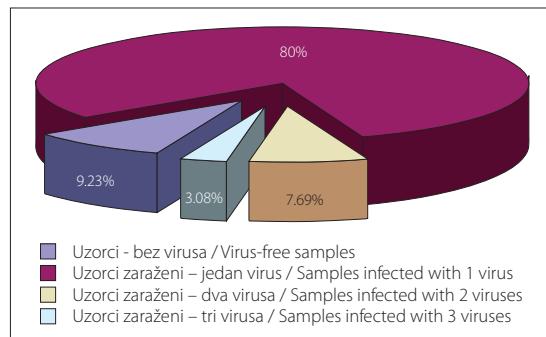
U 59 zaraženih uzoraka utvrđeno je prisustvo pojedinačne ili miješane virusne infekcije. Kod 52 zaražene biljke, odnosno kod 80% biljaka, konstatovane su pojedinačne infekcije. Mješovite infekcije (Slika 8) su dokazane kod sedam biljaka, odnosno 10.77% zaraženih biljaka i to u vidu kompleksnih zaraza sa dva (CMV i PVY; TMV i PVY) ili tri virusa (CMV, AMV i PVY; TMV, CMV i PVY). Najveću zastupljenost od mješovitih zaraza imale su zaraze CMV i PVY (četiri uzorka), dok su ostali tipovi mješovitih zaraza: TMV i PVY, CMV, AMV i PVY, TMV, CMV i PVY dokazani u pojedinačnim uzorcima. Tako je miješana zaraza sa dva virusa utvrđena kod pet uzoraka (7.69%), sa tri virusa kod dva uzorka (3.08%), dok kod šest uzoraka (9.23%) nije dokazano prisustvo nijednog ispitivanog virusa (Slika 8).

Tabela 1. Prisutnost i rasprostranjenost virusa u različitim lokalitetima gajenja duvana u Crnoj Gori tokom 2005. godine
Table 1. Presence and distribution of viruses in different tobacco growing localities in Montenegro in 2005

Lokaliteti Localities	Virusi duvana – Tobacco viruses						
	TSWV	TMV	CMV	TRSV	AMV	PVY	PVX
Staniselići	0/27(0%)*	0/27(0%)	22/27(81.48%)	0/27(0%)	1/27(3.70%)	6/27(22.22%)	0/27(0%)
Sukuruć	0/31(0%)	28/31(90.32%)	1/31(3.23%)	0/31(0%)	0/31(0%)	2/31(6.45%)	0/31(0%)
Tuzi	0/3(0%)	0/3(0%)	3/3(100%)	0/3(0%)	0/3(0%)	0/3(0%)	0/3(0%)
Vranj	0/3(0%)	0/3(0%)	1/3(0%)	0/3(0%)	1/3(33.33%)	2/3(66.67%)	0/3(0%)
Ukupno Total	0/65(0%)	28/65(43.08%)	27/65(41.54%)	0/65(0%)	2/65(3.08%)	10/65(15.38%)	0/65(0%)

* Broj zaraženih biljaka/Broj testiranih biljaka (%)

* Number of infected plants/Number of tested plants (%)



Slika 8. Zastupljenost pojedinačnih i miješanih virusnih infekcija u uzorcima duvana iz Crne Gore

Figure 8. Ratio of single and multiple virus infections in tobacco samples in Montenegro

Rezultati analiza su pokazali da je u lokalitetu Staniselići konstatovano prisustvo tri virusa (CMV, PVY i AMV), a da je najzastupljeniji bio CMV (81.48%). Prisustvo tri virusa duvana (TMV, CMV i PVY) dokazano je i u lokalitetu Sukuruć, s tim da je najrašireniji virus bio TMV (90.32%). U lokalitetu Tuzi zaraza CMV bila je 100% i nije utvrđeno prisustvo drugih virusa duvana, dok je analizom uzorka sakupljenih na lokalitetu Vranj dokazano prisustvo dva virusa (AMV i PVY), i dominantna zastupljenost PVY (66.67%).

Dalja serološka testiranja odnosila su se na utvrđivanje sojeva PVY kod uzoraka koji su bili zaraženi ovim virusom. U svih 10 uzoraka zaraženih PVY utvrđeno je prisustvo nekrotičnog soja virusa.

DISKUSIJA

Sprovedenim istraživanjima prisustva i raširenosti virusa duvana u Crnoj Gori na četiri lokaliteta, Staniselići, Sukuruć, Tuzi i Vranj, dokazano je prisustvo četiri virusa: TMV, CMV, PVY i AMV, sa najvećom zastu-

pljenošću TMV (44.6%) i CMV (41.5%). Treći po raširenosti bio je PVY (15.4%), a četvrti AMV (3.1%). U lokalitetima Staniselići i Tuzi najveći broj biljaka bio je zaražen CMV (81.48% i 100%), u lokalitetu Sukuruć TMV (90.32%), a u lokalitetu Vranj PVY (66.67%). Analize uzoraka duvana u Crnoj Gori su pokazale da nijedan uzorak nije bio zaražen TSWV, TRSV i PVX. Prisustvo i rasprostranjenost viroza duvana u nekom regionu ili lokalitetu zavisi od mnogih faktora i mijenja se od godine do godine, što potvrđuju rezultati Jasnića i saradnika (2000) i Dukić i saradnika (2006).

U poređenju sa rezultatima Jasnića i saradnika (2000) i Dukić i saradnika (2006), prisutnost i zastupljenost virusa duvana u Crnoj Gori i Vojvodini značajno se razlikuju. Naime, najrasprostranjeniji virus u 1995. i 1999. godini u Vojvodini bio je TSWV, dok njegovo prisustvo nije dokazano 2005. godine u duvaništima u Crnoj Gori. Slične rezultate o rasprostranjenosti TSWV u južnoj Srbiji navodi i Mickovski (1969). Zaraze TMV su ostvarene u veoma malom procentu u Vojvodini; 1995. godine kod 11% ispitanih uzoraka, a 1999. godine kod samo 0,91% ispitanih uzoraka, što je ukazalo na opadanje značaja ovog virusa u Vojvodini (Jasnić i sar., 2000). Nasuprot tome, rezultati analiza u Crnoj Gori ukazali su na značaj ovog virusa i na njegovu dominantnu raširenost u usjevima duvana, zajedno sa CMV. Jasnić i saradnici (2000) su utvrdili rasprostranjenost CMV, koja je 1995. godine iznosila 33.9%, a 1999. godine 14.3%. Prisustvo PVY i AMV je u značajnom procentu konstatovano kako u Crnoj Gori, tako i u Vojvodini (Jasnić i sar., 2000), dok su novija ispitivanja virusa duvana u Srbiji pokazala dominantno prisustvo PVY, dok nije potvrđeno prisustvo AMV (Dukić i sar., 2006). PVX nije konstatovan u usjevima duvana u Crnoj Gori, dok je njegovo prisustvo bilo značajno (u 1995. godini) u Vojvodini (Jasnić i sar., 1996).

Primjenom DAS-ELISA testa i monoklonalnih antitijela specifičnih za različite sojeve PVY, konstatovana je apsolutna dominantnost nekrotičnog soja u populaciji PVY u Crnoj Gori. Obični i crtičasti soj nisu dokazani ni u jednom uzorku duvana zaraženog PVY. Ranija ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti sojeva PVY u usjevima krompira u Crnoj Gori (Zindović, 2006), pokazala su, takođe, najveću zastupljenost nekrotičnog soja PVY u većini lokaliteta gajenja krompira.

Udio pojedinačnih u ukupnim zarazama bio je dominantan i iznosio je 88.13%. Od miješanih infekcija (11.87%) konstatovane su zaraze sa dva (CMV+PVY i TMV+PVY) ili tri (CMV+AMV+PVY i TMV+CMV+PVY) virusa.

Radi uspješne kontrole virusnih oboljenja duvana neophodno je stalno praćenje i dobro poznavanje zastupljenosti virusa u pojedinim lokalitetima gajenja. Ovo je posebno važno za virusе koji se prenose biljnim vašima, kao što su PVY i CMV, ali i TMV, koji se, bez obzira što nema vektore, veoma lako prenosi mehaničkim putem. Utvrđeno prisustvo i raširenost virusa duvana u Crnoj Gori, nameće potrebu primjene integralne zaštite duvana, koja podrazumijeva istovremenu primjenu određenih fizičkih, agrotehničkih i hemijskih mjeera, koje su u saglasnosti sa ustanovljennom inventarizacijom prisutnih virusa.

LITERATURA

- Blagojević, M.:* Neke važnije viroze duvana u SR Bosni i Hercegovini. Zaštita bilja, 110-111: 323-328, 1970.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.:* Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immuno-sorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 475-483, 1977.
- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B.:* Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. Pestic. fitomed., 21: 205-214, 2006.
- Jasnić, S., Bagi, F. i Berenji, J.:* Rasprostranjenost nekih virusa duvana u Vojvodini. Biljni lekar, 6: 507-511, 1996.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J.:* Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. Zbornik rada Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 34: 67-76, 2000.
- Latore, B.A., Flores, V. and Marholy, G.:* Effect of Potato Virus Y on Growth, Yield, and Chemical Composition of Flue-cured Tobacco in Chile. Plant Dis., 68: 884-886, 1984.
- Mayunga, D.S. and Kapooria, R.G.:* Incidence and identification of virus diseases of tobacco in three provinces of Zambia. Bull. OEPP/EPPO, 33: 355-359, 2003.
- Mickovski, J.:* Tomato spotted wilt virus na duvanu u Jugoslaviji (*Lycopersicum virus 3 - Smith*). Zaštita bilja, 105: 203-214, 1969.
- Shew, H.D. and Lucas, G.B.:* Compendium of Tobacco Diseases. The American Phytopathological Society, USA, 1991.
- Sievert, R.C.:* 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.
- Zindović, J.:* Identifikacija i karakterizacija virusa krompira u Crnoj Gori. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2006.

Presence and Distribution of Tobacco Viruses in Montenegro

SUMMARY

Seven important tobacco viruses were investigated in Montenegro in 2005: *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) and *Potato Virus X* (PVX). This investigation included sample collection from four tobacco growing regions in Montenegro and their serological testing by DAS-ELISA test. Presence of different strains of PVY was investigated as well using DAS ELISA test with specific monoclonal antibodies.

Serological results proved the presence of four tobacco viruses (TMV, CMV, PVY and AMV), while TSWV, TRSV and PVX were not found in the tested samples of tobacco crops in Montenegro. The results also showed that TMV and CMV were the most frequent (44.6% and 41.5% of tested samples, respectively) followed by PVY (15.4%) and the least frequent AMV (3.1%). Most samples were infected with one of the examined viruses. In the PVY population found in Montenegro, its necrotic strain (PVY^N) was absolutely predominant.

The results indicated the significance of TMV and CMV concerning tobacco viral infections in Montenegro, as well as a necessity of their detailed characterization at biological and molecular level.

Keywords: Tobacco; Viruses; Presence; Distribution; DAS-ELISA