

# Identifikacija sojeva virusa crtičastog mozaika krompira na duvanu

Ivana Đekić<sup>1</sup>, Aleksandra Bulajić<sup>1</sup>, Jelena Zindović<sup>2</sup>, Janoš Berenji<sup>3</sup>, Milena Pauković<sup>1</sup> i Branka Krstić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Biotehnički institut, Podgorica, Crna Gora

<sup>3</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija

## REZIME

Serološkim testiranjem uzoraka duvana prikupljenih u više lokaliteta u Vojvodini 2006. godine detektovani su *Potato Virus Y* (PVY), *Tomato Spotted Wilt Virus*, *Cucumber Mosaic Virus*, *Tobacco Mosaic Virus* i *Alfalfa Mosaic Virus*, pri čemu je PVY bio dominantan. Virusi su najznačajniji prouzrokovajući oboljenja duvana, a virus crtičastog mozaika krompira (PVY) izaziva ekonomski značajne štete širom sveta. Populaciju PVY čini više različitih grupa sojeva, podgrupa u okviru određenog soja i sojeva nastalih rekombinacijom. Od opisanih, PVY<sup>N</sup> (nekrotični soj) i PVY<sup>O</sup> (obični soj) prouzrokuju najveće gubitke u prinosu i kvalitetu duvana. Poznavanje predominantnog soja u populaciji PVY osnova je pravilne selekcije genotipova duvana otpornih na ovaj značajan virus.

Pregledom useva duvana u Srbiji tokom 2006. godine, uočeni su tipični simptomi koje izaziva PVY. Simptomi su se ispoljavali u vidu promena opšteg izgleda biljaka, kao i nekrotičnih promena na lišću, peteljka, stablu i cvetu. Početni simptomi nekroze nerava su se širili i zahvatali celu lisku, usled čega su biljke dobile crvenkastosmeđu (bakarnu) boju, a donje lišće je prevremeno izumiralo. Biljke sa ovakvim simptomima javljale su se u svim pregledanim lokalitetima, a učestalost pojave bila je veoma visoka.

Kako bi se razumeli razni epidemiološki aspekti oboljenja koje izaziva PVY i sprečila njegova pojava i širenje u usevu duvana, neophodna je pravilna i pravovremena identifikacija virusa. U cilju razjašnjavanja etiologije izvršena je biološka, serološka i molekularna identifikacija virusa i njegovog prevalentnog soja koji je očigledno u progresivnom širenju poslednjih godina na duvanu u našoj zemlji.

Iako je PVY<sup>N</sup> široko rasprostranjen na duvanu u Evropi, destruktivnost, visok intenzitet zaraze i široka rasprostranjenost ustanovljeni su u Srbiji tek poslednje dve godine. Nekrotični soj PVY detektovan je uglavnom u pojedinačnim infekcijama, mada je, u manjoj meri, dokazan i u mešanim infekcijama sa drugim virusima duvana.

**Cljučne reči:** Duvan; identifikacija; virus crtičastog mozaika krompira; nekrotični soj

## UVOD

Proizvodnju duvana ugrožavaju mnoge biljne bolesti, a najznačajnije među njima su bolesti izazvane virusima. Pored smanjenja prinosa, virusi izazivaju i promene u kvalitetu duvana, koje se ogledaju u menjanju hemijskog sastava duvanskog lišća usled promena u metabolizmu ugljenih hidrata i značajnom smanjenju intenziteta fotosinteze (Sievert, 1978; Latorre i sar., 1984; Herbers i sar., 2000; Mayunga i Kapooria, 2003).

Duvan u prirodnim uslovima zaražava veliki broj virusa, ali mnogi od njih se javljaju sporadično, ne izazivajući velike gubitke u proizvodnji. Kao ekonomski značajni i najrasprostranjeniji virusi duvana navode se: virus mozaika duvana (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato Virus Y*, PVY), virus bronzavosti paradajza (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV), virus mozaika krastavca (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV), virus mozaika lucherke (*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). Ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa duvana obavljena u Srbiji, u periodu 2002-2005. godine, ukazuju na prisustvo četiri ekonomski značajna virusa: TSWV, PVY, TMV i CMV, čija pojava i intenzitet zaraze variraju od godine do godine, ali i po lokalitetima (Đukić i sar., 2006).

Virus crtičastog mozaika krompira (*Potato Virus Y*, PVY) ubraja se u ekonomski značajne viruse više vrsta biljaka familije *Solanaceae*, među kojima je duvan, pored krompira, paradajza i paprike najvažniji. Smatra se da je PVY jedan od ekonomski najvažnijih virusa duvana (Reilly, 1983; Shew i Lucas, 1991; Mayunga i Kapooria, 2003). Opisano je nekoliko sojeva ovog virusa kao i njihovi rekombinanti, koji se međusobno razlikuju po rasprostranjenosti i jačini simptoma koje izazivaju, a samim tim i štetnosti (De Bokx i Huttinga, 1981; Schubert i sar., 2007).

Nekrotični soj PVY (PVY<sup>N</sup>) koji na duvanu izaziva izražene simptome u vidu nekroze nerava, a često i cele lisne površine, rasprostranjen je u Evropi, Rusiji, Južnoj Americi, severozapadnim delovima SAD, delovima Afrike i Japana, i ozbiljno ugrožava proizvodnju duvana, krompira, paprike i paradajza (De Bokx i Huttinga, 1981; Ohshima i sar., 2000; Crosslin i sar., 2002; Ghosh i sar., 2002). U uslovima jakih zaraza zabeleženo je smanjenje prinosa od 7% do 81%, a nije ret-

ka pojava da virusna infekcija potpuno uništi proizvodnju duvana (Sievert, 1978; De Bokx i Huttinga, 1981).

Ispitujući prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u više lokaliteta u Srbiji u periodu 2002-2005. godine, utvrđeno je širenje PVY, tako da je 2005. godine ovaj virus bio prevalentan (Đukić i sar., 2006). U toku 2006. godine u pregledanim lokalitetima gajenja duvana u Vojvodini uočena je učestala pojava simptoma karakterističnih za zaraze izazvane PVY što je ukazivalo na njegovo dalje širenje. Kako je PVY veoma varijabilan, a zbog izuzetnog značaja poznavanja strukture populacije sojeva u biljnoj virusologiji, sprovedene su detaljnije analize uzoraka duvana u kojima je dokazano prisustvo PVY.

Cilj ovog rada bio je da se, osim serološke identifikacije virusa u usevu duvana 2006. godine, molekularnom detekcijom potvrdi prisustvo PVY, a biotestom i primenom specifičnih monoklonalnih antitela odredi prevalentni soj ovog virusa u našoj zemlji.

## MATERIJAL I METODE

### Sakupljanje uzoraka duvana

Tokom avgusta 2006. godine, obavljen je pregled useva duvana u sedam lokaliteta u Vojvodini (Futog, Kuzmin, Bačinci, Kukujevci, Hrtkovci, Golubinci i Beška) i sakupljeno je ukupno 107 uzoraka lišća sa simptomima koji su ukazivali na moguće prisustvo virusnih zaraza.

### DAS-ELISA metoda primenom poliklonalnih antitela

Prikupljeni uzorci duvana sa simptomima testirani su DAS-ELISA metodom (Clark i Adams, 1977) primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju šest virusa: PVY, TMV, TSWV, AMV i CMV (Loewe Biochemica GmbH) i TRSV (Neogen Europe Ltd, Scotland, UK). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa enzimom 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 homogenizacijom biljnog materijala u razređenju 1:6. Nakon dva sata od dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski Plate Reader (Microplate

reader, DASsrl, Italy), merenjem absorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti absorpcije dva i više puta veće od vrednosti absorpcije negativne kontrole.

## RT-PCR metoda

Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije PVY i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama korišćenjem poliklonalnog antiseruma specifičnog za PVY. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata koja su, na osnovu reakcije specifičnih dijagnostičkih test biljaka, detaljnije biološki okarakterisana. Kao pozitivna kontrola poslužio je izolat nekrotičnog soja PVY poreklom sa krompira (Zindović, 2006).

Ribonukleinske kiseline su ekstrahovane iz lišća biljaka *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, na kojima su održavani odabrani izolati PVY. Ekstrakcija RNA urađena je pomoću Rneasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Spain), prema uputstvu proizvođača.

U radu su korišćeni prajmeri za detekciju PVY, koji omogućavaju umnožavanje 5' neprepisujućeg regiona virusnog genoma (5' non-translated-region) (Marie-Jeane Tordo i sar., 1995; Glais i sar., 1996). Sekvenca uzvodnog (forward) PVYc prajmera je: 5'-AAT TAA AAC AAC TCA ATA CA-3', a sekvenca nizvodnog (downstream) 3' PVYd prajmera je: 5'-TGY GAH CCA CGC ACT ATG AA-3'.

„One-step” RT-PCR izveden je korišćenjem komercijalnog kita cMaster RT<sub>plus</sub> PCR System (Eppendorf, Germany), gde se u jednoj tubi odvijaju i reverzna transkripcija (RT) i PCR reakcija. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Biomtra, UK) pri sledećim uslovima: reverzna transkripcija na 42°C u trajanju od 60 minuta (jedan ciklus), početna denaturacija nukleinskih kiselina na 94°C u trajanju od dva minuta (jedan ciklus), zatim u 35 ciklusa denaturacija nukleinskih kiselina na 94°C, jedan minut, hibridizacija prajmera na 57°C, jedan minut i elongacija na 72°C, jedan minut i na kraju završna elongacija na 72°C, četiri minuta (jedan ciklus).

Amplifikovani fragmenti su vizuelizovani elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1.2% agaroznom gelu bojenjem etidijum-bromidom i posmatranjem pod UV svetlom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava fragmenata očekivane veličine od 975 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplikona korišćen je marker, DNA Leader 1kb (Sigma-USA).

## Biotest

U cilju biološke karakterizacije odabranih izolata, obavljena je, u uslovima staklenika, mehanička inokulacija grupe dijagnostičkih biljaka: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, cv. Banat, cv. Prilep, *N. rustica*, *Chenopodium quinoa* i *C. amaranticolor*.

Kao početni biljni materijal korišćeni su uzorci duvana u kojima je, DAS-ELISA testom primenom poliklonalnih antiseruma i RT-PCR detekcijom, utvrđeno prisustvo PVY.

Indikator biljke su mehanički inokulisane u fazi 3-4 stalna lista. Inokulum je pripremljen homogenizacijom u prisustvu 0.01 M fosfatnog pufera pH 7.0. Pojava simptoma očitavana je i praćena do tri nedelje po inokulaciji.

## DAS-ELISA primenom monoklonalnih antitela

Dalja identifikacija i karakterizacija PVY do nivoa sojeva obavljena je tako što su uzorci, u kojima je ranijim serološkim analizama dokazano prisustvo PVY, testirani DAS-ELISA metodom primenom monoklonalnih antitela specifičnih za detekciju nekrotičnog (PVY<sup>N</sup>), običnog (PVY<sup>O</sup>) i crtičastog soja (PVY<sup>C</sup>) (Scottish Agricultural Science Agency, Scotland). Koktel monoklonalnih antitela specifičan za sve sojeve PVY (IgG-PVY) korišćen je u razređenju 1:1000, a monoklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom za PVY<sup>N</sup> i PVY<sup>O+C</sup> u razređenju 1:4000, a za PVY<sup>C</sup> u razređenju 1:2000. U testiranja su uključene i pozitivne kontrole (Scottish Agricultural Science Agency, Scotland) u vidu liofiliziranog biljnog materijala za PVY<sup>N</sup> i PVY<sup>O</sup> i svežeg, zaraženog lišća *Nicotiana clevelandii* za PVY<sup>C</sup>. Homogenizacija biljnog materijala vršena je u odgovarajućem puferu, u razređenju 1:6. Reakcija je očitavana spektrofotometrijski, dva sata nakon inkubacije merenjem absorpcije na 405 nm. Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti absorpcije dva i više puta veće od vrednosti absorpcije negativne kontrole.

## REZULTATI

### Simptomi u polju

Pregledom različitih lokaliteta gajenja duvana u Vojvodini zabeležena je pojava niza simptoma, kako u



**Slika 1.** Nekroza nerava na lišću duvana  
**Figure 1.** Tobacco leaf vein necrosis



**Slika 2.** Smedecrvenkasta (bakarna) obojenost lista duvana  
**Figure 2.** Tobacco leaf reddish-brown (copper) color

vidu promene opšteg izgleda biljaka, tako i u hromatskim i morfološkim promenama lišća duvana. Najčešće uočeni simptom na lišću duvana bio je prosvetljavanje nerava, praćen nekrozom koja se širila i zahvatala celu površinu liski (Slika 1). Sa razvojem bolesti dolazi do spajanja nekrotičnih površina i ceo list poprima smeđecrvenkastu boju (Slika 2). Zaraženo, naročito donje lišće propada pre vremena, tako da se samo na vrhu stabla zadržavaju buketići sitnih listića. Na zaraženim biljkama javlja se i nekroza stabla, lisnih drški, čašičnih i kruničnih listića (Slika 3). Takođe, primećena je i pojava zaostajanja biljaka u porastu i izražene kržljivosti.

### Serološka detekcija virusa

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa duvana, u sedam lokaliteta, tokom 2006. godine, utvrđe-



**Slika 3.** Nekroza cvetnih delova  
**Figure 3.** Necrosis of flower parts

no je prisustvo pet virusa – PVY, TSWV, CMV, TMV i AMV (Tabela 1). Od detektovanih virusa najzastupljeniji je bio PVY, utvrđen kod 57.94% ispitivanih uzoraka, a na drugom mestu je bio TSWV (21.50%). CMV je bio treći po zastupljenosti i utvrđen je kod 15.89% ispitivanih uzoraka. Zatim slede TMV i AMV koji su utvrđeni u 4.67, odnosno 2.80% uzoraka. U najvećem broju testiranih uzoraka utvrđena je pojedinačna zaraza PVY (52.34%), dok je u manjem broju uzoraka utvrđeno prisustvo mešane infekcije PVY sa CMV, TMV ili AMV. PVY je detektovan u svim pregledanim lokalitetima u visokom procentu, osim u lokalitetu Beška, gde je prevelantni virus bio TSWV (82.14%). U ispitivanim uzorcima duvana nije utvrđeno prisustvo TRSV.

Na osnovu seroloških analiza uzoraka duvana sa simptomima koji su ukazivali na virusne zaraze, u šest od sedam pregledanih lokaliteta utvrđeno je dominantno prisustvo PVY.

### Molekularna detekcija PVY

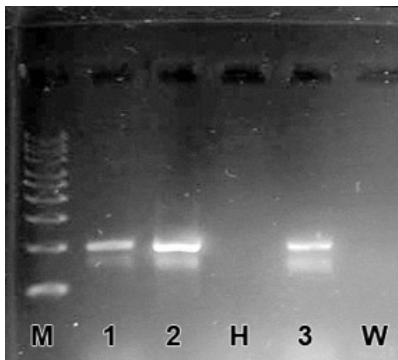
Prisustvo PVY u ispitivanim uzorcima duvana potvrđeno je molekularnom detekcijom primenom univerzalnih prajmera za PVY. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 975 bp (Slika 4), čiju amplifikaciju omogućavaju primenjeni prajmeri. Do pojave traka u gelu, amplifikacije, nije došlo kod uzoraka zdravih biljaka duvana, korišćenih kao negativna kontrola (H).

**Tabela 1.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa duvana u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2006. godine  
**Table 1.** Presence and percentage of frequency of tobacco viruses in single and mixed infections in 2006

	Pojedinačna zaraza – Single infection						Mešana zaraza – Mixed infection			Bez testiranih virusa No tested viruses	Ukupna zaraza – Total infection					
	PVY	TSWV	CMV	TMV	AMV	TRSV	PVY+CMV	PVY+AMV	PVY+TMV		PVY	TSWV	CMV	TMV	AMV	TRSV
16/24*	0/24	4/24	0/24	0/24	2/24	0/24	2/24	0/24	0/24	0/24	0/24	6/24	0/24	2/24	0/24	
66.67%	0%	16.67%	0%	8.33%	0%	0%	8.33%	0%	0%	0%	0%	25%	0%	8.33%	0%	
5/9	0/9	3/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	0/9	3/9	0/9	0/9	0/9	
55.56%	0%	33.33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	11.11%	0%	0%	33.33%	0%	0%	0%	
7/12	0/12	3/12	0/12	0/12	0/12	0/12	2/12	0/12	0/12	0/12	0/12	5/12	0/12	0/12	0/12	
58.33%	0/12	25%	0%	0%	0%	0%	16.67%	0%	0%	0%	0%	41.67%	0%	0%	0%	
8/12	0/12	3/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12	3/12	0/12	0/12	0/12	
66.67%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	8.33%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	
8/12	0/12	0/12	2/12	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12	0/12	3/12	1/12	0/12	
66.67%	0%	0%	16.67%	0%	0%	0%	0%	8.33%	0%	0%	0%	0%	25%	8.33%	0%	
10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
2/28	23/28	0/28	2/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	1/28	0/28	0/28	2/28	23/28	0/28	0/28	
7.14%	82.14%	0%	7.14	0%	0%	0%	0%	0%	3.57%	0%	0%	7.14%	82.14%	0%	0%	
56/107	23/107	13/107	4/107	2/107	0/107	0/107	4/107	1/107	3/107	1/107	1/107	17/107	5/107	3/107	0/107	
52.34%	21.50%	12.15%	3.74%	1.87%	0%	0%	3.74%	0.93%	2.80%	0.93%	0.93%	15.89%	4.67%	2.80%	0%	

\*Broj pozitivnih / ukupan broj testiranih uzoraka; - = Nije ispitivano

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



**Slika 4.** Vizuelizacija amplikona (očekivane veličine 975 bp) u 1.2% agaroznom gelu. M: 1 kb DNA marker sa veličinama fragmenata u bp od gornjeg ka donjem: 10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000; 1500; 1000 i 250; 1: zaraženi uzorak duvana; 2: zaraženi uzorak duvana; H: zdrav duvanegativna kontrola; 3: PVY<sup>N</sup> sa krompira; W: voda – negativna kontrola

**Figure 4.** Visualization of the amplicons (expected size 975 bp) in 1.2% agarose gel. M: 1 kb DNA Leader marker, with fragment size in bp from the top to the bottom: 10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000; 1500; 1000 and 250; 1: tobacco infected sample; 2: tobacco infected sample; H: healthy tobacco-negative control; 3: PVY<sup>N</sup> from potato, W: water negative control

### Reakcije indikator biljaka

Mehaničkim izolacijama na *N. tabacum* cv. Samsun dobijen je veći broj izolata PVY sa uzoraka duvana prikupljenih tokom pregleda 2006. godine. Od dobijenih, izdvojena su dva izolata iz različitih lokaliteta koji su biološki okarakterisani na osnovu reakcija grupe dijagnostičkih biljaka. Mehanički inokulisane biljke *C. quinoa* ispoljile su simptome u vidu lokalnih hlorotičnih, a *C. amaranticolor* u vidu lokalnih nekrotičnih pega. Na svim *Nicotiana* vrstama i sortama, ispitivani izolati izazvali su osim lokalnih nekrotičnih pega, deformacija, kovrdžavosti i hlorotičnog šarenila lišća, izraženu nekrozu nerava koja se širila i zahvatala celu lisku.

### Identifikacija sojeva PVY DAS-ELISA metodom primenom monoklonalnih antitela

Serološkim analizama prisustva i rasprostranjenosti šest ekonomski najznačajnijih virusa duvana u 2006. godini, ustanovljeno je dominantno prisustvo PVY. Dalja istraživanja obuhvatila su karakterizaciju sojeva PVY, primenom DAS-ELISA metode uz korišćenje mono-

klonalnih antitela specifičnih za nekrotični (PVY<sup>N</sup>), obični (PVY<sup>O</sup>) i crtičasti soj (PVY<sup>C</sup>). Testirana su ukupno 62 uzorka u kojima je prethodno ustanovljeno prisustvo PVY.

U svim ispitivanim uzorcima, DAS-ELISA testom i specifičnim monoklonalnim antitelima, dokazan je nekrotični soj PVY. Prisustvo običnog i crtičastog soja PVY u ispitivanim uzorcima nije dokazano.

### DISKUSIJA

Pregledom useva duvana zabeležena je intenzivna pojava nekroze nerava i lisne površine oko nerava, što biljci daje karakterističnu smeđecrvenkastu (bakarnu) obojenost. Pored ovih simptoma, bila je česta i nekroza peteljki, stabla i cvetnih delova. Ova izražena nekroza koja je rezultirala u karakterističnoj bakarnoj obojenosti celih biljaka upućivala je na moguće prisustvo nekrotičnog soja PVY u Srbiji (Đukić i sar., 2006; Bulajić i sar., 2006). Simptomi opisani u literaturi kao karakteristični za PVY<sup>N</sup> (Lockhart i Fisher, 1976; Latorre, 1983; Marte i sar., 1987; Mayunga i Kapooria, 2003; Brunt i sar., 1996; De Bokx i Huttinga, 1981; Büchen-Osmond, 2006) uočeni su tokom pregleda duvana u Vojvodini, avgusta 2006. godine. Simptomi koje soj PVY<sup>O</sup> proizvodi na različitim sortama duvana u vidu mozaika ili izraženog sistemičnog šarenila (Crosslin i sar., 2005), nisu uočeni na duvanu u pregledanim lokalitetima. Takođe, izraženi, destruktivni simptomi koji su se javljali na velikom broju biljaka, upućivali su na ranu zarazu useva duvana, koja ima izražen negativan efekat na prinos i kvalitet duvana, dok je takav efekat manje izražen ukoliko do zaraze dođe u drugoj polovini vegetacije ili uopšte nije značajan ukoliko su infekcije kasne (Sievert, 1978; Shew i Lucas, 1991; Ghosh i sar., 2002). Na biljkama duvana, u kojima je laboratorijskim analizama dokazana mešana infekcija PVY i nekog drugog virusa (TMV, CMV i AMV), osim izražene nekroze nerava i prevremenog propadanja lišća, bila je uočljiva i izražena kržljivost biljaka, kao što je i opisano u literaturi (Marte i sar., 1987; Mayunga i Kapooria, 2003). Simptomi koji su upućivali na zarazu izazvanu PVY uočeni su na velikom broju biljaka u šest od sedam ispitivanih lokaliteta. U lokalitetu Beška, na velikom broju biljaka, uočen je drugi, različit tip simptoma u vidu hrastolikog mozaika, prstenastih nekrotičnih pega i šara, kao i beličastih nekroza. Ovakvi simptomi su ukazivali na prisustvo TSWV, što je i serološki potvrđeno DAS-ELISA testom. Na veoma malom broju biljaka, u svim

pregledanim lokalitetima, uočeni su simptomi izraženog mozaika karakterističnih za TMV i CMV.

Ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su prisustvo pet virusa, PVY, TSWV, CMV, TMV i AMV u pregledanom usevu duvana 2006. godine. Najrasprostranjeniji i najučestaliji virus bio je PVY, koji je detektovan uglavnom u pojedinačnim infekcijama, mada je i u manjoj meri dokazan u mešanim infekcijama sa drugim virusima duvana.

Rezultati seroloških analiza potvrđeni su molekularnom detekcijom PVY primenom „One-step” RT-PCR metode korišćenjem univerzalnih prajmera za detekciju PVY, pri čemu su dobijeni fragmenti očekivane veličine (oko 975 bp) (Marie-Jeane Tordo i sar., 1995; Glais i sar., 1996). Na ovaj način je potvrđena identifikacija PVY, koji je prethodno dokazan serološkim ispitivanjima.

Smatra se da su sojevi PVY<sup>N</sup> i PVY<sup>O</sup> odgovorni za najveće gubitke u prinosu duvana i krompira (Zaag van der, 1987). Iako se PVY navodi kao jedan od ekonomski najvažnijih virusa duvana (Reilly, 1983; Shew i Lucas, 1991; Mayunga i Kapoora, 2003), do pre nekoliko godina ovaj virus nije predstavljao opasnost za proizvodnju duvana u Srbiji. Ispitivanjima sprovedenim 1995. i 1999. godine (Jasnić i sar., 2000), PVY je bio prisutan u usevu duvana kod nas, ali ne u značajnoj meri. Praćenjem prisustva i rasprostranjenosti virusa duvana tokom 2002, 2003. i 2004. godine najčešće detektovan virus bio je TSWV, dok je 2005. godine, po prvi put od kada traju intenzivna proučavanja virusa duvana kao prevalentan virus dokazan PVY (Dukić i sar., 2006). Izražena pojava i raširenost PVY poslednjih godina kod nas ukazuju na progresivno širenje ovog virusa u usevu duvana u Srbiji (Bulajić i sar., 2006; Dukić i sar., 2006), što potvrđuju i ova ispitivanja.

Izolati PVY su tradicionalno klasifikovani u tri grupe sojeva: PVY<sup>O</sup> (obični soj), PVY<sup>N</sup> (nekrotični soj) i PVY<sup>C</sup> (crtičasti soj) (De Bokx i Huttinga, 1981). Međutim, kako je velika varijabilnost virusa uslovljena genetskom rekombinacijom prilično uobičajena za viruse *Potyvirus* roda (Revers i sar., 1996), i za PVY je utvrđeno postojanje većeg broja rekombinantnih sojeva: PVY<sup>NTN</sup> (Beczner i sar., 1983; Le Romancer i sar., 1994; van den Heuvel i sar., 1994), PVY<sup>Z</sup> (Jones, 1990), PVY<sup>N</sup> W (Wilga) (Chrzanowska, 1991; Glais i sar., 2005). Broj okarakterisanih sojeva PVY se stalno povećava daljim proučavanjem izolata PVY poreklom, ne samo sa krompira već i sa drugih domaćina (Rosner i sar., 2000).

S obzirom na veliku varijabilnost PVY i važnost poznavanja strukture populacije sojeva određenog virusa

u biljnoj virologiji, u okviru ovih istraživanja sprovedena je dalja detaljnija analiza uzoraka duvana, u kojima je dokazano prisustvo PVY. Zbog mogućnosti serološkog razlikovanja sojeva PVY korišćenjem monoklonalnih antitela specifičnih za tri osnovne grupe sojeva, pristupilo se utvrđivanju prevalentnosti sojeva PVY. Na osnovu testiranja prikupljenih uzoraka DAS-ELISA testom korišćenjem monoklonalnih antitela specifičnih za tri osnovne grupe sojeva PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> i PVY<sup>C</sup>, utvrđeno je samo prisustvo nekrotičnog soja PVY.

Odabrani izolati poreklom iz različitih lokaliteta testirani su biotestom koji je primenjen u cilju razlikovanja sojeva PVY. Ispitivani izolati su se razlikovali od PVY<sup>O</sup> i PVY<sup>C</sup>, kao i od podgrupa bioloških varijanti u okviru PVY<sup>N</sup> grupe sojeva, na osnovu reakcija mehanički inokulisanih test biljaka koje se opisuju u literaturi (De Bokx i Huttinga, 1981; Le Romancer i sar., 1994). Rezultati biotesta potvrđili su pripadnost ispitivanih izolata nekrotičnom soju PVY.

Na osnovu reakcija nekih test biljaka i serološkim testiranjem prikupljenih uzoraka korišćenjem soj specifičnih monoklonalnih antitela, utvrđeno je, u okviru populacije PVY na duvanu u Srbiji, prisustvo nekrotičnog soja PVY.

## LITERATURA

- Beczner, I., Horvath, J., Rombanayi, J. and Forster, H.:** Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.*, 27: 339-352, 1983.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J.:** *Potato Virus Y*. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>). Accession date: August 20, 1996.
- Büchen-Osmond, C.:** ICTVdB Management. 00.057.0.01.001. *Potato virus Y*. In: ICTVdB – The Universal Virus Database. Version 4., 2006. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>).
- Bulajić, A., Zindović, J., Berenji, J., Dukić, N., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B.:** Nekrotični soj virusa crtičastog mozaika krompira na duvanu u Srbiji. Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2006, str. 67-68.
- Chrzanowska, M.:** New isolates of the necrotic strain of potato virus (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Res.*, 34: 179-182, 1991.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.:** Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 44-50, 1977.

- Crosslin, J.M., Hamm, P.B., Eastwell, K.C., Thorton, R.E., Brown, C.R., Crosini, D., Shiel, P.J. and Berger, P.H.:** First report of the necrotic strain of *Potato Virus Y* (PVY<sup>N</sup>) on potatoes in the north western United States. *Plant Dis.*, 86: 1177, 2002.
- Crosslin, J.M., Hamm, P.B., Shiel, P.J. and Hane, D.C.:** Serological and molecular detection of tobacco vein necrosis isolates of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) from potato grown in the Western United States. *Am. J. Potato Res.*, 82: 263-269, 2005.
- De Bokx, J.A. and Huttinga, H.:** *Potato Virus Y*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, N° 242 (N° 37 revised), 1981.
- 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.
- Ghosh, S.B., Nagi, L.H.S., Ganapathi, T.R., Paul Khurana, S.M. and Bapat, V.A.:** Cloning and sequencing of potato virus Y coat protein gene from an Indian isolate and development of transgenic tobacco for PVY resistance. *Curr. Sci.*, 82: 855-859, 2002.
- Glais, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Marie-Jeanne Tordo, V., Robaglia, C. and Astier-Manificier, S.:** Molecular characterization of Potato Virus Y<sup>N</sup> isolates by PCR-RFLP. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102: 655-662, 1996.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C.:** Specific detection of the PVY<sup>N-W</sup> variant of Potato virus Y. *J. Gen. Virol. Met.*, 125: 83-93, 2005.
- Herbers, K., Takabata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M. and Sonnewald, U.:** Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.*, 1: 51-59, 2000.
- 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.
- Jones, R.A.C.:** Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyvirus in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol.*, 117: 93-105, 1990.
- Latorre, B.A.:** Disease incidence gradient and the effect of seedbed infection on potato virus Y. *Plant Dis.*, 67: 302-304, 1983.
- 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 Dis.*, 68: 844-886, 1984.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. and Nedellec, M.:** Biological characterisation of various geographical isolates of PVY inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.*, 43: 138-144, 1994.
- Lockhart, B.E.L. and Fisher, H.U.:** A disease of tobacco in Morocco caused by a vein necrosis isolate of potato virus Y. *Plant Dis. Rep.*, 60: 114-116, 1976.
- Marie-Jeanne Tordo, V., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C. and Astier-Manificier, S.:** Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of Potato Virus Y genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, 76: 939-949, 1995.
- 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. *Phytopathol. Mediter.*, 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*, 33: 355-359, 2003.
- Ohshima, K., Sako, K., Hiraishi, C., Nakagawa, A., Matsuo, K., Ogawa, T., Shikata, E. and Sako, N.:** Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease Occuring in Japan: Its Association with Potato Virus Y Necrotic Strain. *Plant Dis.*, 84: 1109-1115, 2000.
- Reilly, J.J.:** Effects of sequential virus infections on flue-cured tobacco. *Tob. Sci.*, 28: 23-27, 1983.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. and Dunez, J.:** Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J. Gen. Virol.*, 77: 1953-1965, 1996.
- Rosner, A., Lachman, A., Pearlsman, M., Maslenin, L. and Antignus, Y.:** Molecular characterisation and differential diagnosis of a necrotic PVY isolate in tomato. *Ann. Appl. Biol.*, 137: 253-257, 2000.
- Schubert, J., Fomitcheva, V. and Sztangret-Wisniewska, J.:** Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-promers. *J. Virol. Met.*, 140: 66-74, 2007.
- Shew, H.D. and Lucas, G.B.:** Compendium of Tobacco Diseases. APS Press, 1991.
- Sievert, R.C.:** Effect of *Potato virus Y* on cultivars and hybrids of burley tobacco. *Phytopathology*, 68: 974-978, 1978.
- van den Heuvel, J.F.J.M., van der Vlugt, R.A.A., Verbeek, M., de Haan, P.T. and Huttinga, H.:** Characteristics of a resistance-breaking isolate of Potato virus Y causing Potato Tuber Necrosis Ringspot Disease. *Eur. J. Plant Pathol.*, 100: 347-356, 1994.
- Zaag van der, D. E.:** Yield reduction in relation to virus infection. In: *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production* (J.A. De Bokx and van der Want, J.P.H., eds.). Wageningen, The Netherlands, 1987, pp. 149-150.
- Zindović, J.:** Identifikacija i karakterizacija virusa krompira u Crnoj Gori. *Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet*, 2006.



# Identification of *Potato Virus Y* Strains in Tobacco Crops

## SUMMARY

Five viruses: *Potato Virus Y* (PVY), *Tomato Spotted Wilt Virus*, *Cucumber Mosaic Virus*, *Tobacco Mosaic Virus* and *Alfalfa Mosaic Virus*, of which PVY was predominant, were detected by serological testing of tobacco samples collected from many localities in Vojvodina in 2006. Viruses are the most important pathogens in tobacco and PVY causes considerable economic damages all over the world. A PVY population comprises several different strain groups, strain subgroups and recombinant strains. Among these, PVY<sup>N</sup> (necrotic strain) and PVY<sup>O</sup> (ordinary strain) cause the greatest yield and quality losses in tobacco. Identification of a prevalent strain in a PVY population is the basis of proper tobacco genotype selection for resistance against this significant virus.

Typical symptoms caused by PVY were observed by monitoring tobacco crops in our country in 2006. The symptoms occurred as changes in the general plant appearance, as well as necrotic areas on leaves, petioles, stems and flowers. The initial symptoms of veinal necrosis were expanded throughout the leaf, causing reddish-brown (copper) plant color and premature death of lower leaves. Plants with these symptoms occurred in all monitored localities and their frequency was high.

In order to understand various epidemiological aspects of the diseases caused by PVY and to prevent its occurrence and spreading in tobacco crops, it is necessary to properly identify this virus in time. Biological, serological and molecular identification of the virus and its prevalent strain was carried out in order to determine tobacco disease ethiology. The results obtained suggest that this prevalent strain of PVY has been spreading progressively in our country in recent years.

Although PVY<sup>N</sup> is widely spread in tobacco crops in Europe, its destructiveness, disease intensity and wide distribution in Serbia were established only in the last two years. PVY necrotic strain was detected mainly in single infections, although it was also present in mixed infections with other tobacco viruses.

**Keywords:** Tobacco; Identification; *Potato Virus Y*; Necrotic strain