

Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna detekcija virusa žutog mozaika cukinija

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

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

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

REZIME

Intenzivno širenje virusa infektivnih za uljanu tikvu (*Cucurbita pepo*), poslednjih deset godina imalo je za posledicu značajne ekonomske gubitke u proizvodnji ove kulture koja se gaji na sve većim površinama u našoj zemlji. Kako bi se identifikovali virusi, odgovorni za epidemiju pojavu i ispoljavanje veoma destruktivnih simptoma na lišću i plodovima uljane tikve, tokom 2007. i 2008. sprovedeno je ispitivanje njihove pojave i rasprostranjenosti. Pregled i sakupljanje uzoraka uljane tikve, kao i nekih drugih vrsta tikava, kao što su bundeva, muskatna i bizonska tikva i vrg sa simptomima virusnih zaraza, obavljeno je na više različitih lokaliteta gajenja uljane tikve u Vojvodini. Sakupljeni uzorci testirani su DAS-ELISA metodom primenom poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju u svetu šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava: virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virusa žutog mozaika cukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virusa mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV), virusa mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV), virusa prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV) i virusa prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), koji se nalazi na A1 karantinskoj listi štetnih organizama u Srbiji.

Identifikacija virusa u sakupljenim uzorcima ukazala je na prisustvo tri virusa, ZYMV, WMV i CMV, koji su se javili u pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Njihova učestalost je po pojedinim godinama i lokalitetima bila različita. Tokom 2007. najčešće je dokazan WMV (94,2%), dok je 2008. godine prevalentan virus bio ZYMV (98,04%).

Velika učestalost ZYMV u obe godine ispitivanja ukazala je na potrebu za brzom i pouzdanom molekularnom detekcijom ovog virusa. U toku ovih istraživanja razvijen je i optimizovan protokol za detekciju ZYMV primenom specifičnih prajmera CPfwd/CPrev i komercijalnih kitova za ekstrakciju ukupne RNA i RT-PCR. Korišćenjem ovih prajmera, kojim se amplifikuje deo genoma ZYMV kojim je obuhvaćen i gen za proteinski omotač, umnožen je DNK fragment dužine oko 1100 bp iz lišća zaraženih biljaka. Mada serološke metode i dalje imaju veliku prednost u primeni za masovna testiranja velikog broja uzoraka, razvijeni protokol molekularne detekcije, zbog visoke osetljivosti i specifičnosti predstavlja značajno poboljšanje.

šanje brze dijagnoze oboljenja koja ovaj virus izaziva. Osim toga, ovaj protokol pruža osnovu za dalju karakterizaciju ZYMV izolata poreklom iz Srbije.

Gljučne reči: Uljana tikva; virusi tikava; rasprostranjenost; serološka detekcija; RT-PCR

UVOD

Tikve predstavljaju zbirnu grupu biljnih vrsta (Berenji, 1988, 1999a), koje se poslednjih godina sve više gaje, naročito uljana tikva, posebna forma obične tikve (*Cucurbita pepo*) (Berenji, 1999b). Površine na kojima se uljana tikva gaji u Srbiji procenjuju se na 1500-2000 ha (Berenji, 2000), ali se njeno gajenje širi zbog toga što uljana tikva predstavlja jednu od osnovnih kultura u sistemu organske proizvodnje, kao i zbog visokog sadržaja ulja u zrnu i visoke cene nerafinisanog tikvinog ulja na tržištu (Karlović i sar., 2001). Tikvino ulje je, posle maslinovog ulja, jedno od najkvalitetnijih ulja jer sadrži vitamin E (tokoferol), karotenoide, zasićene i nezasićene masne kiseline i kao takvo se preporučuje u ishrani (Wagner, 2000; Bavec, 2007). Osim u ishrani, tikvino ulje se koristi u tradicionalnoj i alternativnoj medicini, farmakologiji, kozmetičkoj industriji, naročito kada je organski proizvedeno. Tikvino ulje ima mnoga lekovita svojstva, a najčešće se koristi za smanjenje nivoa holesterola, umanjeње tegoba kod benigne hiperplazije prostate i jačanja imuniteta (Wagner, 2000; Fruhwirth i Hermetter, 2007). Ostale vrste tikava se u našoj zemlji gaje uglavnom kao međuusev ili po baštama (Berenji, 1999a).

Na tikvama, štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta, mogu da izazovu različiti fitopatogeni organizmi, ali su ekonomski najznačajniji virusi (Provvidenti i Schroeder, 1970; Lecoq i sar. 2003; Sevik i Arli-Sokmen, 2003). Do sada je opisan veliki broj vrsta biljnih virusa koji su infektivni za različite vrste u okviru familije Cucurbitaceae. Zitter i sar. (1996) navode da gajenu tikvu može da zarazi više od 30 virusa. Iako većina opisanih virusa tikava izaziva značajne gubitke u proizvodnji, smatra se da ekonomski značajna oboljenja izaziva pet virusa: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV), virus prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) i virus žutog mozaika kukuruznog (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (Lecoq i sar., 2003; Agrios, 2005).

U Srbiji, virusi tikava nisu bili proučavani sve do 2000. godine, kada je problem virusnih oboljenja obične tikve skrenuo na sebe pažnju uništenom proizvod-

njom na više lokaliteta gajenja. Kao prouzrokovani oboljenja obične tikve identifikovani su CMV, WMV i novi virus za našu zemlju, ZYMV (Dukić i sar., 2001). Od tada počinju detaljna ispitivanja rasprostranjenosti i učestalosti oboljenja koja ovi virusi izazivaju na običnoj tikvi kod nas (Dukić i sar., 2001, 2002, 2004, 2006; Krstić i sar., 2002).

Simptomi virusnih zaraza mogu varirati u zavisnosti od biljke domaćina, vremena ostvarene infekcije i vrste virusa (Provvidenti i Schroeder, 1970). Najčešći simptomi virusnih zaraza na listu tikava su mozaik, hlorotično šarenilo, deformacije, klobučavost i nitavost, a na plodu deformacije, često sa karakterističnim bradavičastim izraštajima na površini i nekroza tek formiranih plodova (Lecoq i sar., 1983; Zitter i sar. 1996; Đekić i sar., 2007; Vučurović i sar., 2008). Procenat zaraženih biljaka u polju može varirati u zavisnosti od lokaliteta i gajene vrste od 10 do 100% (Tobias i Tulipan, 2002). U slučaju pojave virusnih zaraza obične tikve prouzrokovanih WMV, utvrđeno je smanjenje prinosa od 50 do 100% (Mansour i Al-Musa, 1982). Pri mešanim infekcijama sa dva ili više virusa na zaraženim biljkama dolazi do sinergističkog dejstva, intenzitet bolesti se povećava usled čega su i štete u usevu mnogo veće (Desbiez i Lecoq, 1997). Tako su mešane infekcije virusima ZYMV i CMV izazvale pojavu jakih simptoma bolesti na zaraženim biljkama dinje i kukuruznog (Wang i sar., 2002). Virusne zaraze tikava, osim direktnog smanjenja prinosa, smanjuju i tržišnu vrednost plodova i do 94% (Blua i Perring, 1989; loc. cit. Desbiez i Lecoq, 1997).

S obzirom da virusi svake godine smanjuju prinos i kvalitet tikava u našoj zemlji, a pojedinih godina se javljaju u epidemijским razmerama, osnovni cilj ovih istraživanja bio je praćenje prisustva i rasprostranjenosti pojedinih virusa na različitim vrstama tikava, a posebno na uljanoj tikvi. Pored toga, radi poboljšanja dijagnostičkih metoda za dokazivanje ZYMV kao jednog od najdestruktivnijih virusa tikava, cilj je bio i razvijanje protokola za osetljivu, brzu i pouzdanu molekularnu detekciju ovog virusa u prirodno zaraženim biljkama tikava.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka tikava

Ispitivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa tikava obavljeno je tokom 2007. i 2008. godine. Pregledom je obuhvaćeno 19 useva na 11 lokaliteta gajenja tikava u Vojvodini (Tabele 1 i 2). Tokom pregleda, sakupljeni su uzorci tikava sa različitim tipovima simptoma koji su ukazivali na virusnu zarazu.

U toku 2007. godine sakupljeno je 69 uzoraka tikava sa simptomima virusnih zaraza. Pregled je obuhvatio osim uljane tikve (*Cucurbita pepo*) i druge vrste, kao što su bundeva (*C. maxima*), muskatna tikva (*C. moschata*), bizonska tikva (*C. feotidissima*) i vrg (*Lagenaria siceraria*) na pet lokaliteta gajenja u Vojvodini: Bački Petrovac, Futog, Banatsko Karadorđevo, Aradac i Krajišnik.

Pregledi useva tokom 2008. godine i sakupljanje uzoraka uljane tikve, bundeve i vrga sa simptomima virusnih infekcija sprovedeni su na šest lokaliteta gajenja tikava: Gardinovci, Aleksandrovo, Titel, Kisač, Kulpin i Bački Petrovac, pri čemu je sakupljen 51 uzorak.

Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA)

Uzorci tikava sa simptomima virusnih zaraza, sakupljeni u toku dve godine ispitivanja, testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) po protokolu koji su opisali Clark i Adams (1977). Serološko testiranje uzoraka 2007. godine obavljeno je primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju CMV, WMV, ZYMV (Loewe Biochemica GmbH, Germany) i virusa prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) (Neogen Europe Ltd, Scotland, UK). 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 sakupljeni u toku 2008. godine testirani su na prisustvo šest najznačajnijih virusa i to: CMV, WMV, ZYMV, PRSV, TRSV i SqMV primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu

1:6. Nakon 1-2 časa po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), intenzitet bojene reakcije je očitavan spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcija na 405 nm dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

Reverzna transkripcija (RT) i lančana reakcija polimeraze (PCR) primenjene su u cilju molekularne detekcije ZYMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata sa različitim lokaliteta, izolat 128-08 (Titel) i 147-08 (Bački Petrovac) čija je prethodna identifikacija obavljena DAS-ELISA testom.

Izolacija ukupnih RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka tikava obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Za izolaciju ukupnih RNA iz lišća tikava izolata 128-08 i 147-08 korišćeno je 100 mg zamrznutog biljnog materijala prethodno čuvanog na -80°C. Ukupno izolovana RNA korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera ZYMV CPfwd/CPrev kojim se amplifikuje fragment DNA finalne dužine oko 1100 bp i koji obuhvata gen za proteinski oмотаč virusa (Pfoser i Baumann, 2002).

Detekcija ZYMV izvršena je primenom OneStep RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša za RT-PCR (25 µl) sadržala je: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 µl dNTP Miks (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smeši 400 µM), 1 µl RT-PCR enzimskog miksa, 1,5 µl svakog prajmera (0,6 µM finalne koncentracije), 14 µl RNase-free vode i 1 µl izolovane ukupne RNA. Kao negativna kontrola korišćena je DNase free voda, kao i ukupna RNA ekstrahovana iz zdravog lišća tikava. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 25 s na 94°C, elongacije 25 s na 55°C i ekstenzije 70 s na 72°C; 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 amplikona korišćen je marker, MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

REZULTATI

Simptomi u polju

U toku 2007. godine, procenjena zaraženost pregledanih useva kretala se od 30 do 50%, dok je procenjeni nivo učestalosti zaraze virusima 2008. godine bio znatno viši, preko 80%, a u pojedinim usevima sve biljke su ispoljile virusne simptome. Tokom pregleda u obe godine ispitivanja zabeležena je pojava niza simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu. Tokom 2007. godine uočeni su simptomi u vidu blagog mozaika i hlorotičnog šarenila, izraženog mozaika i naboranosti (Slika 1),



Slika 1. Mešana infekcija ZYMV, WMV i CMV: izraženi mozaik i naboranost lišća



Slika 2. ZYMV: bradavičavost ploda

kao i različite deformacije liske. Razvijeni plodovi zaraženih biljaka bili su deformisani, često sa karakterističnim bradavičastim izraštajima na površini (Slika 2). Simptomi uočeni u toku 2008. godine bili su takođe raznovrsni – od blagog mozaika, hloroze i šarenila lista do izraženog žutozelenog mozaika, izobličavanja lista, duboke nazubljenosti (Slika 3), sve do potpune redukcije lisne površine, odnosno nitavosti. Na stablu pojedinih vreža često je uočavano hlorotično prošaravanje (Slika 4). Pojedine biljke ispoljile su virusne simptome samo na određenim delovima vreža ili samo na mlađem lišću. Kao česta pojava uočeno je žutilo i sušenje starijeg lišća. Usled očigledne rane zaraze biljke su bile zakržljale, bez zametnutih plodova ili sa intenzivnim simptomima na plodu u vidu izraženih deformacija (Slika 4) ili nekroze tek formiranih plodova.



Slika 3. ZYMV: mozaik, nazubljenost i smanjena površina lišća



Slika 4. Mešana infekcija ZYMV i CMV: izražena kvrgavost i veoma deformisan mladi plod i šarenilo stabla

Serološka detekcija

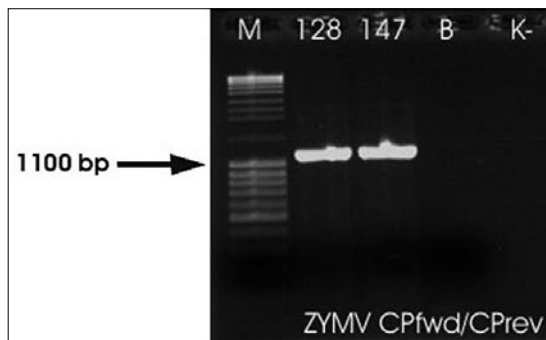
Ispitivanjima sprovedenim tokom 2007. i 2008. godine, na različitim lokalitetima gajenja uljane tikve na teritoriji Vojvodine, ustanovljeno je prisustvo tri virusa: WMV, ZYMV i CMV. Ovi virusi su detekтовani i u uzorcima drugih vrsta tikava, bundeve, muskatne i bizonske tikve i vrga.

Pregledom tikava tokom 2007. godine na više lokaliteta gajenja tikava u Vojvodini i analizom ukupno 69 uzoraka, ustanovljeno je prisustvo ZYMV, WMV i CMV (Tabela 1). Najveći broj uzoraka bio je zaražen WMV-om (94,2%). Drugi po zastupljenosti bio je CMV (55,07%), a treći ZYMV (52,17%). Osim pojedinačnih zaraza, u kojima je najčešće detektovan WMV (24,64%), virusi su dokazani i u mešanim infekcijama sa dva, odnosno tri virusa. U većem broju uzoraka dokazana je mešana infekcija sva tri virusa (28,98%). Prisustvo TRSV nije ustanovljeno ni u jednom uzorku.

Najzastupljeniji virus 2008. godine, koji je detektovan u 98,04% uzoraka bio je ZYMV, drugi po zastupljenosti bio je WMV (58,82%), dok je na trećem mestu bio CMV koji je otkriven u 54,9% uzoraka. Pojedinačna zaraza (23,53%) ustanovljena je samo ZYMV-om. Najčešće detektovana dvostruka zaraza je bila ZYMV-om i WMV-om (21,57%). Zabeležena je i istovremena zaraza tri prisutna virusa, ZYMV, WMV i CMV, u 35,29% uzoraka. Prisustvo PRSV, TRSV i SqMV nije dokazano ni u jednom ispitivanom uzorku (Tabela 2).

Molekularna detekcija virusa žutog mozaika kukuruzna

Optimizovan je RT-PCR protokol za molekularnu detekciju ZYMV u lišću tikava prilagodavanjem potrebne koncentracije prajmera. Prisustvo ZYMV u dva uzorka tikava sa lokaliteta Titel i Bački Petrovac potvrđeno je amplifikacijom gena koji kodira proteinski omotač virusa primenom specifičnih prajmera ZYMV CPfwd/CPrev. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka (izolati 128-08 i 147-08 iz tikava) 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 nezaraženog lišća tikava i negativnoj kontroli (PCR smeša sa molekularnom vodom).



Slika 5. Detekcija dva izolata ZYMV iz uljane tikve pomoću one-step RT-PCR sa ZYMV CPfwd/CPrev parom prajmera. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 2-izolat 128-08, 3-izolat 147-08 iz biljaka uljane tikve, 4-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom, 5-negativna kontrola-zdravo lišće uljane tikve

DISKUSIJA

Pojava i rasprostranjenost virusa infektivnih za tikve praćena je u usevu uljane tikve na različitim lokalitetima kako bi se izvršila inventarizacija prisutnih virusa u našoj zemlji. Takođe, testiran je i određeni broj drugih vrsta tikava koje se ne gaje masovno, ali koje ukoliko su zaražene virusima predstavljaju izvor zaraze za uljanu tikvu.

Rezultati dvogodišnjeg praćenja pojave i rasprostranjenosti virusa tikava u našoj zemlji, ustanovili su prisustvo ZYMV, WMV i CMV, čija se učestalost po godinama i lokalitetima menjala. Na svim pregledanim lokalitetima i u svim testiranim uzorcima dokazano je prisustvo bar jednog od detektovanih virusa. U obe godine ispitivanja češće su otkrivene mešane nego pojedinačne zaraze.

Tokom 2007. godine najčešće detektovani virus bio je WMV. CMV i ZYMV su dokazani u približno istom broju uzoraka. WMV i CMV su dokazani u svim pregledanim lokalitetima gajenja tikve, dok ZYMV nije bio prisutan u jednom od pregledanih useva lokaliteta Bački Petrovac. Prisustvo virusa je dokazano u pojedinačnim i mešanim infekcijama. Pojedinačne infekcije su bile prisutne u približno trećini testiranih uzoraka. U sakupljenim uzorcima nije utvrđeno prisustvo TRSV, virusa koji se nalazi na A1 karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije (Službeni Glasnik RS, 2008-09). Kako je pregled obuhvatio pet različitih vrsta iz familije Cucurbitaceae, uključujući i uljanu tikvu, a na osnovu podataka iz literature (Zitter i sar. 1996) bilo je očekivano da će simptomi virusnih zaraza biti veo-

Tabela 1. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa tikava u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2007. godine

Lokalitet	Vrsta (broj uzoraka)	Virus															
		Pojedinačna infekcija						Mešana infekcija						Ukupna infekcija			
		ZYMV	WMV	CMV	TRSV	ZYMV+WMV	ZYMV+CMV	WMV+CMV	ZYMV+WMV	ZYMV+CMV	WMV+CMV	ZYMV+WMV	ZYMV+CMV	WMV	CMV	TRSV	
		0/18*	9/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	18/18	9/18	0/18	0/18
Bački Petrovac I**	<i>C. pepo</i> (18)	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	50%	0%	0%
	<i>L. siceraria</i> (5)	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	4/5	0/5	0/5
Bački Petrovac II	<i>C. maxima</i> (11)	0/11	1/11	0/11	0/11	6/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	10/11	11/11	4/11	0/11	0/11
		0%	9,09%	0%	0%	54,55%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	90,91%	100%	36,36%	0%	0%
	<i>C. pepo</i> (12)	0/12	3/12	0/12	0/12	3/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	5/12	8/12	12/12	6/12	0/12	0/12
		0%	25%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	0%	41,67%	66,67%	100%	50%	0%	0%
	<i>C. moschata</i> (5)	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5
		0%	0%	0%	0%	60%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	100%	100%	40%	0%	0%
	<i>L. siceraria</i> (1)	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
		0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
	<i>C. foetidissima</i> (2)	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2
		0%	50%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	0%	0%
Futog	<i>C. maxima</i> (2)	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
		0%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	100%	100%	50%	0%	0%
	<i>L. siceraria</i> (1)	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
		0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
Banatsko Karadordovo	<i>C. pepo</i> (1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
Aradac	<i>C. pepo</i> (2)	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2
		50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	100%	50%	50%	0%	0%
Krajišnik	<i>C. pepo</i> (9)	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	2/9	1/9	8/9	7/9	9/9	0/9	0/9
		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	22,22%	22,22%	11,11%	88,89%	77,78%	100%	0%	0%
Ukupno (69)		1/69	17/69	1/69	0/69	13/69	2/69	15/69	20/69	28/69	36/69	65/69	88/69	94,2%	55,07%	0/69	0/69
		1,5%	24,64%	1,45%	0%	18,84%	2,9%	21,74%	28,98%	38,69%	52,17%	94,2%	77,78%	55,07%	0%	0%	

*Broj pozitivnih/ukupan broj testiranih uzoraka

**Različiti usevi tikava na istom lokalitetu

Tabela 2. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa tikava u pojedinačnim i mešanim infekcijama 2008. godine

Lokalitet	Vrsta (broj uzoraka)	Virus																						
		Pojedinačna infekcija							Mešana infekcija							Ukupna infekcija								
		ZYMV	WMV	CMV	TRSV	PRSV	SgMV	ZYMV+WMV	ZYMV+CMV	WMV+CMV	ZYMV+WMV+CMV	ZYMV	WMV	CMV	TRSV	PRSV	SgMV							
Gardinovci	<i>C. pepo</i> (10)	0/10*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	0/10	7/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10					
Aleksandrovo	<i>C. pepo</i> (2)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2				
Titel I**	<i>C. pepo</i> (5)	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	<i>C. pepo</i> (3)	80%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%			
Titel II	<i>C. pepo</i> (3)	33,33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	33,33%	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		
	<i>C. pepo</i> (5)	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
Kisač I	<i>C. pepo</i> (5)	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	80%	80%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	<i>C. pepo</i> (2)	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Kisač III	<i>C. pepo</i> (4)	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	<i>C. pepo</i> (2)	25%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	50%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Kisač IV	<i>C. pepo</i> (2)	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	<i>C. pepo</i> (2)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Kulpin	<i>C. pepo</i> (2)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	<i>C. pepo</i> (3)	66,67%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	33,33%	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Bački Petrovac I	<i>C. pepo</i> (7)	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	0/7	0/7	4/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	<i>C. pepo</i> (2)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	14,29%	0%	0%	57,14%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Bački Petrovac III	<i>C. maxima</i> (4)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	3/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	<i>L. siceraria</i> (2)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	75%	75%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ukupno (69)		12/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	9/51	1/51	1/51	18/51	50/51	28/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51
		23,53%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	17,65%	1,96%	1,96%	35,29%	98,04%	54,9%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Broj pozitivnih/ukupno broj testiranih uzoraka

**Različiti uscvi tikava na istom lokalitetu

ma varijabilni. Tako je ustanovljeno da su biljke ispoljavale različite tipove mozaika, hlorotičnog šarenila, deformacija listi, smanjenja površine do nitavosti, a plodovi su često bili deformisani sa bradavičastim izraštajima na površini. Simptomi zabeleženi na prirodno zaraženim biljkama, nisu se mogli dovesti u vezu sa virusom prouzrokovateljem.

Prevalentan virus u usevu uljanih tikava 2008. godine bio je ZYMV. Ovaj virus je detektovan u svim usevima svih ispitivanih lokaliteta. Drugi po zastupljenosti bio je WMV detektovan na svim lokalitetima, ali ne i u svim pregledanim usevima. Na trećem mestu po zastupljenosti bio je CMV, prisutan na četiri lokaliteta. Kao i prve godine ispitivanja, zastupljenija je bila mešana infekcija dva ili tri virusa, dok je pojedinačna zaraza dokazana samo u oko četvrtini testiranih uzoraka. U ispitanim uzorcima nije ustanovljeno prisustvo TRSV, kao ni PRSV i SqMV. U svim pregledanim usevima uljane tikve zabeležen je veliki broj biljaka sa virusnim simptomima, koji je često prelazio 80%. Na tikvama su se 2008. godine javili, takođe, raznovrsni simptomi, ali je za razliku od prethodne godine, češće uočena kržljivost biljaka, pojava nedostatka formiranja plodova, nekroza i izražene malformacije tek formiranih plodova. Veza između tipa simptoma i virusa prouzrokovачa ni u ovoj godini istraživanja nije bila prisutna, mada su simptomi jasno ukazivali da su virusne prirode, što je i laboratorijskim testiranjem potvrđeno.

Kako su dobijeni rezultati pokazali, u samo dve godine ispitivanja došlo je do značajnih promena u pogledu učestalosti zaraze određenim virusom. Rasprostranjenost ZYMV, koji je u toku prve godine ispitivanja bio treći po zastupljenosti, u toku druge godine se promenila i ovaj virus je ostvario izuzetno veliku učestalost zaraze. Na pojedinim lokalitetima, zaražene biljke ispoljile su izražene simptome i deformacije, često praćene potpunim izostankom formiranja plodova. Zbog ispoljene tendencije i učestalosti zaraze, ovaj virus je odabran za dalju molekularnu detekciju.

Poređenjem dobijenih rezultata prisustva virusa tikava sa ranijim ispitivanjima virusnih oboljenja sprovedenih tokom 2001. godine (Krstić i sar., 2002) i 2002. godine (Dukić i sar., 2004) potvrdila su da se na tikvama u Srbiji javljaju tri virusa, ZYMV, WMV i CMV, u pojedinačnim i mešanim infekcijama. Iako ranija ispitivanja nisu dokazala prisustvo nekih važnih virusa tikava, kao što su PRSV i SqMV (Krstić i sar., 2002; Dukić i sar., 2004), na osnovu testiranja uzoraka sakupljenih 2008. godine, može se zaključiti da ovi virusi nisu za sada prisutni u našoj zemlji.

Praćenje učestalosti pojave virusa na tikvama tokom dve godine istraživanja i poređenje sa rezultatima prethodnih ispitivanja pokazalo je da prisustvo i učestalost pojedinih virusa značajno varira od godine do godine. Tako je dominantno prisustvo WMV dokazano u uzorcima sakupljenim 2007. godine kako u pojedinačnoj tako i u mešanoj infekciji sa ZYMV i sa ZYMV i CMV. Ovako dominantno prisustvo ovog virusa je značajna razlika u odnosu na 2001. godinu kada se javljao sporadično (Krstić i sar., 2002) i 2002. godinu kada je bio drugi po zastupljenosti (Dukić i sar., 2004). U uzorcima iz 2008. godine WMV je takođe bio drugi po zastupljenosti, posle ZYMV koji je bio najzastupljeniji. Zastupljenost CMV pokazuje donekle drugačiju sliku. Mada prisutan u velikom broju uzoraka i drugi po zastupljenosti 2007. godine, a treći 2008. godine, uglavnom je bio prisutan u mešanim infekcijama sa WMV i sa ZYMV i WMV. Slični rezultati dobijeni su 2002. (Dukić i sar., 2004), kao i 2003. i 2004. godine (Duduk, 2008). Na osnovu prethodnih i u ovom radu obavljenih ispitivanja, zastupljenost ZYMV je stalno visoka, donekle sa izuzetkom kao u 2007. godini, kada je ovaj virus bio treći po zastupljenosti, mada je detektovan u više od polovine testiranih uzoraka. Ovaj virus je u istraživanjima sprovedenim tokom 2001. (Krstić i sar., 2002), 2002. (Dukić i sar., 2004) i 2004. (Duduk, 2008) godine bio prvi po zastupljenosti, a 2003. godine je bio zastupljen u jednakom broju uzoraka kao i WMV (Duduk, 2008). Razlika u pojavi i rasprostranjenosti neperzistentnih virusa zavisno od godine je česta pojava kod virusa tikava (Tobias i Tulipan, 2002; Lecoq i sar., 2003) i ukazuje da je važno stalno pratiti stanje i prisustvo pojedinih virusa.

Upravo zbog potrebe uspostavljanja brze i tačne dijagnoze primenom osjetljive i specifične metode, razvijen je protokol za detekciju ZYMV primenom RT-PCR. Rezultati molekularne detekcije potvrdili su prisustvo ZYMV u testiranim uzorcima listova tikava. Prajmerima ZYMV CP_{fwd}/CP_{rev}, dizajniranim za amplifikaciju visoko konzervativnog regiona genoma ZYMV, uspešno je iz tikava umnožen segment očekivane veličine oko 1100 bp. Zbog velike varijabilnosti biljnih virusa uopšte, a i virusa koji su detektovani u ovom radu, bilo je potrebno proveriti pogodnost ranije opisanih prajmera za detekciju populacije virusa prisutne u našoj zemlji.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su u našoj zemlji u usevu uljane tikve prisutna tri virusa, ZYMV, WMV i CMV, i da se njihova učestalost po godinama i lokalitetima menja. Zbog veoma destruk-

tivnih simptoma na lišću i plodovima, koji su u pojedinim lokalitetima ugrozili proizvodnju ove kulture, neophodna su dalja proučavanja ovih virusa. Buduća ispitivanja viroza tikava treba da budu usmerena ka detaljnijoj karakterizaciji i bližem određivanju epidemiologije, proučavanju sastava i varijabilnosti populacije prisutne u našoj zemlji, načina održavanja, dospevanja i zaražavanja osetljivih biljaka tikava u cilju preduzimanja odgovarajućih mera kontrole.

LITERATURA

- Agrios, G.N.:** Plant Pathology. Academic Press, Inc, San Diego/Toronto, 2005.
- Bavec, F., Grobelnik Mlakar, S., Rozman, Č. and Bavec, M.:** Oil pumpkins: Niche for organic producers. In: Trends in new crops and new uses (J. Janick and A. Whipkey, eds.). ASHS Press, Alexandria, VA., 2007, pp. 185-189.
- Berenji, J.:** Poznavanje tikava *Cucurbita sp.* Zbornik referata 3. Poljedelski dnevnik ABC Pomurka, Murska Sobota, 1988, str. 24-27.
- Berenji, J.:** Tikve – hrana, lek i ukras. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 23: 529-537, 1999a.
- Berenji, J.:** Proizvodnja i korišćenje uljane tikve (*Cucurbita pepo* L.). Zbornik radova 40. savetovanja Proizvodnja i prerada uljarica, Palić, 1999b, str. 303-308.
- Berenji, J.:** Breeding, production, and utilization of oil pumpkin in Yugoslavia. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 23: 105-109, 2000.
- 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. and Lecoq, H.:** Zucchini yellow mosaic virus. Plant Pathology, 46: 809-829, 1997.
- Duduk, N.:** Identifikacija, molekularna karakterizacija i načini prenošenja virusa gajenih biljaka familije 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 savetovanja 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.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B.:** Epidemijska pojava viroza tikava (*Cucurbita* spp.) u Srbiji. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007, str. 118-119.
- Frühwirth, G.O. and Hermetter, A.:** Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. European Journal of Lipid Science and Technology, 109: 1128-1140, 2007.
- Karlović, Đ., Berenji, J., Recseg, K. and Kővári, K.:** Savremeni pristup uljanoj tikvi (*Cucurbita pepo* L.) sa posebnim osvrtom na tikvino ulje (*Oleum cucurbitae*). Zbornik radova 42. savetovanja 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. Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad, 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., Lisa, V. and Dallavalle, G.:** Serological identity of muskmelon yellow stunt and zucchini yellow mosaic virus. Plant Disease, 67: 824-825, 1983.
- Mansour, A. and Al-Musa, A.:** Incidence, economic importance and prevention of watermelon mosaic virus-2 in squash (*Cucurbita pepo*) fields in Jordan. Phytopathologische Zeitschrift, 103: 35-40, 1982.
- Pföfser, 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.
- Providenti, R. and Schroeder, W.T.:** Epiphytotic of watermelon mosaic among Cucurbitaceae in Central New York in 1969. Plant Disease Report, 54: 744-748, 1970.
- Sevik, M.A. and Arli-Sokmen, M.:** Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. Plant Disease, 87: 341-344, 2003.
- Službeni glasnik RS:** Pravilnik o utvrđivanju lista karantinskih štetnih organizama, 14, 2008-2009.

Tobias, I. and Tulipan, M.: Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Novenyvedelem*, 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.

Wagner, F.S.: The health value of styrian pumpkin seed oil-science and fiction. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 23: 122-123, 2000.

Wang, Y., Giba, V., Yang, J., Palukaitis, P. and Gal-On, A.: Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*, 92: 51-58, 2002.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L. and Thomas, C.E.: *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, 1996.

Presence and Distribution of Oilseed Pumpkin Viruses and Molecular Detection of *Zucchini Yellow Mosaic Virus*

SUMMARY

Over the past decade, intensive spread of virus infections of oilseed pumpkin has resulted in significant economic losses in pumpkin crop production, which is currently expanding in our country. In 2007 and 2008, a survey for the presence and distribution of oilseed pumpkin viruses was carried out in order to identify viruses responsible for epidemics and incidences of very destructive symptoms on cucurbit leaves and fruits. Monitoring and collecting samples of oil pumpkin, as well as other species such as winter and butternut squash and buffalo and bottle gourd with viral infection symptoms, was conducted in several localities of Vojvodina Province. The collected plant samples were tested by DAS-ELISA using polyclonal antisera specific for the detection of six most economically harmful pumpkin viruses: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) and *Tobacco ringspot virus* (TRSV) that are included in A1 quarantine list of harmful organisms in Serbia.

Identification of viruses in the collected samples indicated the presence of three viruses, ZYMV, WMV and CMV, in individual and mixed infections. Frequency of the identified viruses varied depending on locality and year of investigations. In 2007, WMV was the most frequent virus (94.2%), while ZYMV was prevalent (98.04%) in 2008.

High frequency of ZYMV determined in both years of investigation indicated the need for its rapid and reliable molecular detection. During this investigation, a protocol for ZYMV detection was developed and optimized using specific primers CPfwd/Cprev and commercial kits for total RNA extraction, as well as for RT-PCR. In RT-PCR reaction using these primers, a DNA fragment of approximately 1100 bp, which included coat protein gene, was amplified in the samples of infected pumpkin leaves. Although serological methods are still useful for large-scale testing of a great number of samples, this protocol, due to its high sensitivity and specificity, is an important improvement in rapid diagnosis of diseases caused by this virus. In addition, the protocol provides a basis for further characterization of ZYMV isolates originating from Serbia.

Keywords: Oilseed pumpkin; Cucurbit viruses; Distribution; Serological detection; RT-PCR