

Prisustvo i molekularna karakterizacija virusa mozaika lucerke u usevu duvana u Srbiji

Ivana Stanković¹, Ana Vučurović¹, Aleksandra Bulajić¹, Danijela Ristić¹,
Janoš Berenji² i Branka Krstić¹

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

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

Primljen: 17. juna 2011.

Prihvaćen: 15. avgusta 2011.

REZIME

Trogodišnjim proučavanjima pojave i rasprostranjenosti virusa u usevu duvana u Srbiji utvrđeno je da se virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) javlja svake godine sa različitom učestalošću. Prisustvo AMV ustanovljeno je u najvećem broju testiranih uzoraka (58,82%) tokom 2008. godine kada je bio drugi po zastupljenosti u odnosu na sve ostale viruse čije je prisustvo utvrđeno u Srbiji. AMV je detektovan u znatno nižem procentu 2006. (2,80%) i 2007. godine (13,64%). Tokom ovih istraživanja virus mozaika lucerke češće je bio prisutan u mešanim infekcijama sa dva, tri ili čak četiri detektovana virusa. Prisustvo pojedinačne zaraze utvrđeno je samo 2006. godine u jednom usevu duvana na lokalitetu Futog. U toku ovih istraživanja razvijen je i optimiziran brz i precizan protokol za molekularnu detekciju AMV u lišću duvana primenom specifičnih prajmera CPAMV1/CPAMV2 i komercijalnih kitova za ekstrakciju ukupnih RNK i RT-PCR (reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze). Korišćenjem ovih prajmera, koji omogućavaju umnožavanje gena za protein omotača, umnožen je fragment dužine 751 bp, sekvencioniran i upoređen sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Dobijena sekvenca izolata 196-08 (GenBank Acc. No. FJ527749) pokazala je 99-93% nukleotidne identičnosti sa izolatom AMV iz drugih delova sveta. Filogenetske analize 27 izolata, na osnovu 528 bp sekvence gena za protein omotača, nisu ukazale na korelaciju sa geografskim poreklom izolata ili biljkom domaćinom, a pokazale su grupisanje izolata u četiri molekularne grupe sojeva. Izolat AMV iz duvana iz Srbije pripada grupi IV, koja obuhvata većinu izolata odabranih za filogenetsku analizu.

Ključne reči: Duvan; virus mozaika lucerke; učestalost pojave; molekularna detekcija; genetički diverzitet; filogenetska analiza

UVOD

Iako su u javnosti stalno prisutna upozorenja o štetnom uticaju nikotina na ljudsko zdravlje, sa ekonomskog aspekta duvan je i dalje jedna od najvažnijih gajenih biljaka čija proizvodnja nastavlja da se širi. U Srbiji proizvodnja duvana za industrijsku preradu i korišćenje ima veoma dugu tradiciju još iz druge polovine 19. veka, kada su i osnovane prve radionice za otkup i primarnu preradu duvana. Gotovo celokupna domaća proizvodnja duvana odvija se na individualnim posedima što ovoj grani daje specifičan ekonomsko-socijalni značaj. Gajenje duvana tradicionalno je prisutno u nedovoljno razvijenim regionima, posebno na jugu zemlje, mada je poslednjih godina sve prisutnije plantažno gajenje visokorodnih, širokolisnih i kvalitetnijih sorti duvana u ravničarskim područjima Vojvodine i Mačve. Proizvodnju duvana u Srbiji karakteriše značajna proizvodnja na usitnjenim parcelama, sa specifičnom mikroklimom, kvalitetom zemljišta, niskim nivoom tehničko-tehnološke opremljenosti i primene savremene agrotehnike (Berenji i Sikora, 2002). Površine na kojima se duvan gaji u Srbiji procenjuju se na oko 6103 ha sa ukupnim prinosom od 9847 t godišnje (FAO, 2009). Mada, zbog vrlo povoljnih zemljišnih i klimatskih uslova, postoje uslovi za uspešno gajenje više različitih tipova duvana u domaćoj proizvodnji gaje se tri tipa, a dominiraju dva: virdžinija koja u ukupnoj domaćoj proizvodnji učestvuje sa 75% i berlej 20%, dok orijentalni duvan čini samo 5%.

Na duvanu, štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta, mogu da izazovu različiti fitopatogeni organizmi, ali podaci u svetu ukazuju na činjenicu da virusi izazivaju najbrojnija i najdestruktivnija oboljenja duvana (Sievert, 1978; Latorre i sar., 1982; Latorre i sar., 1984; Gooding, 1991; Herbers i sar., 2000; Williams-Woodward, 2000). Štete izazvane fitopatogenim virusima zabeležene su u svim regionima gajenja duvana u svetu (Herbers i sar., 2000; Williams-Woodward, 2000; Mayunga i Kapooria, 2003), a najznačajniji efekti virusnih zaraza ogledaju se kroz smanjenje porasta, izraženu kržljivost, deformacije i smanjenje lisne površine, što direktno dovodi do smanjenja prinosa. Duvan je prirodni domaćin preko 20 i eksperimentalni više od 100 virusa, ali se mnogi od njih javljaju sporadično, ne izazivajući značajne gubitke u proizvodnji (Gooding, 1991). U većini proizvodnih područja, najznačajnijim virusima duvana smatraju se virusi koji se na neperzistentan način prenose vašima, kao što su virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

i virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), zatim virus koji se prenosi tripsima – virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) i nematodama, kao što je virus prstenaste pegavosti duvana (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) (Gooding, 1991; Mayunga i Kapooria, 2003; Chatzivassiliou i sar., 2004).

Podaci o prisustvu i učestalosti pojave virusa u usevima duvana širom sveta govore da je AMV stalno prisutan, a pojedinih godina u visokom procentu, što može značajno ugroziti uspešnu proizvodnju (Mayunga i Kapooria, 2003; Chatzivassiliou i sar., 2004). Virus mozaika lucerke u Srbiji detektovan je 60-ih godina prošlog veka kao prouzrokovatelj oboljenja lucerke (Babović, 1965, 1968). Noviji podaci o AMV u našoj zemlji, pre svega o prisustvu i rasprostranjenosti, ali i prvi podaci o molekularno identifikovanim i okarakterisanim izolatima, potiču iz proučavanja ovog virusa na paradajzu (Krstić i sar., 2007), paprici (Tomić i sar., 2007; Krstić i Bulajić, 2008; Petrović i sar., 2010) i lucerki (Bulajić i sar., 2010).

Virus mozaika lucerke predstavnik je roda *Alfavirus*, familije *Bromoviridae* i za sada je klasifikovan kao jedini član ovog roda biljnih virusa. Ispoljava veliku sličnost sa virusima iz rodova *Ilarvirus*, *Cucumovirus* i *Bromovirus* koji takođe imaju višedelni genom i svi za započinjanje infekcije zahtevaju prisustvo CP (*coat protein*, protein omotača) (Bol, 2010). Prvi put otkriven je 1931. godine u Americi, kao prouzrokovatelj oboljenja lucerke (Bos i Jaspars, 1971), po čemu je i dobio ime. Od tada, AMV se proširio u mnoge delove sveta i odgovoran je za brojne epidemije kako u pojedinačnoj tako i mešanoj infekciji sa drugim virusima različitih useva širom sveta (Jaspars i Bos, 1980; Hull, 2009; Bol, 2010). Ustanovljeno je da prirodnom krugu domaćina ovog virusa pripada oko 150 vrsta jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka iz 22 familije, a u eksperimentalnim uslovima virus zaražava preko 600 biljnih vrsta iz 70 familija dikotiledonih biljaka. Većina biljaka domaćina pripada familijama Fabaceae, Solanaceae i Asteraceae (Hull, 2009; Bol, 2010).

Iako AMV pripada grupi ekonomski važnih virusa duvana, o njegovom prisustvu, rasprostranjenosti i učestalosti u Srbiji nema mnogo podataka. Ciljevi ovog rada bili su da se: (i) ispita zastupljenost AMV na važnijim lokalitetima gajenja duvana u Srbiji; (ii) obezbede pouzdaniji, brži i osetljiviji rezultati detekcije kroz razvoj protokola za molekularnu detekciju AMV u prirodno zaraženim biljkama duvana; (iii) utvrdi genetička struktura populacije ovog virusa kroz određivanje stope genetičkog diverziteta u odnosu na izolate ovog virusa poreklom iz različitih

delova sveta, kao i (iv) rekonstruiše filogenetsko stablo i odredi mesto izolata iz duvana poreklom iz Srbije u populaciji AMV u svetu.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka duvana

Utvrđivanje rasprostranjenosti i učestalosti pojave AMV u usevu duvana u periodu 2006-2008. godine obuhvatilo je pregled većeg broja lokaliteta gajenja duvana u Vojvodini, centralnoj i južnoj Srbiji. U opsežnim ispitivanjima koja su obuhvatila najznačajnija proizvodna područja gajenja duvana u Srbiji, ukupno su sakupljena i analizirana 303 uzorka biljaka duvana.

Tokom 2006. godine sakupljeno je ukupno 107 uzoraka duvana tipa virdžinija sa simptomima virusnih oboljenja. Pregled useva i prikupljanje uzoraka obavljeno je na sedam lokaliteta gajenja duvana, i to: Futog, Kuzmin, Hrtkovci, Bačinci, Kukujevci, Golubinci i Beška.

Pregled prisustva virusnih zaraza na duvanu tipa berlej i virdžinija 2007. godine obavljen je na deset različitih lokaliteta u Srbiji. Na tri lokaliteta, Bački Petrovac, Futog i Mladenovac, gde je usev duvana bio sa visokim intenzitetom zaraze, sakupljen je određeni broj uzoraka sa izraženim simptomima virusnih zaraza. Na drugim pregledanim lokalitetima, Golubinci, Bingula, Hrtkovci, Sremska Mitrovica, Bogatić, Morović i Zrenjanin nije bilo simptoma koji bi upućivali na virusnu infekciju, te su prikupljene biljke koje su imale promene opšteg izgleda, smanjen porast ili hlорозу lišća. Za dalju analizu sakupljena su ukupno 132 uzorka.

U 2008. godini na prisustvo virusnih zaraza pregledani su usevi duvana na lokalitetima Lapotince i Đinđuša i sakupljena su ukupno 64 uzorka. Uzorci su obuhvatili biljke duvana tipa virdžinija sa simptomima virusnih zaraza.

Serološke analize

Za detekciju virusa u usevu duvana korišćena je direktna imunoenzimska metoda na ploči po protokolu koju su opisali Clark i Adams (1977) i prema uputstvu proizvođača komercijalnih dijagnostičkih ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kitova. U cilju utvrđivanja učestalosti pojedinačnih i mešanih infekcija u koje je AMV uključen, sakupljeni uzorci duvana testirani su korišćenjem DAS-ELISA (double antibody

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) metode primenom poliklonalnih antitela specifičnih za detekciju šest najznačajnijih virusa duvana, TSWV, PVY, CMV, TMV i AMV (Loewe Biochemica GmbH, Germany) i TRSV (Neogen Europe Ltd-Adgen Phytodiagnostic, 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 su pripremani homogenizacijom 1 g biljnog materijala sa 5 ml ekstrakcionog pufera. Nakon dva časa od davanja supstrata p-nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy), merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom smatra se su vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Molekularna detekcija i sekvencioniranje

Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (reverse transcription – polymerase chain reaction, RT-PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije AMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama. Za ova ispitivanja odabran je izolat 196-08 (Đinđuša) čija je detekcija i identifikacija obavljena DAS-ELISA testom. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ovog virusa, 403-10, poreklom iz lucerke, koji je prethodno okarakterisan i sekvencioniran (Krstić i sar., neobjavljeni podaci), koji je održavan u biljkama *N. tabacum* cv. Samsun u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija ukupne RNK iz lišća prirodno zaraženih biljaka duvana, kao i iz *N. tabacum* cv. Samsun u kojima je održavan izolat AMV poreklom iz lucerke, obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Za izolaciju ukupne RNK korišćeno je 100 mg zamrznutog lišća duvana izolata 196-08 čuvanog na -80°C, a ukupna RNK izolata 403-10 korišćenog kao pozitivna kontrola izolovana je iz svežeg biljnog materijala biljaka duvana na kojima je izolat održavan. Detekcija AMV obavljena je umnožavanjem gena za protein omotača odabranog izolata AMV primenom One-step RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) korišćenjem različitih parova prajmera: AMV-F/AMV-R (Xu i Nie, 2006), AMV-F2/AMV-R2 (Xu i Nie, 2006) i CPAMV1/CPAMV2 (Parrella i sar., 2000), prikazanih u tabeli 1.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*)

Prajmer	Sekvenca (5' → 3')	Trostruki korak (temp./vreme)			Veličina amplikona (bp)	Literatura
		Denaturacija	Elongacija	Ekstenzija		
AMV-F	CCA TCA TGA GTT CTT CAC AAA AG	95°C/30 s	58°C/30 s	72°C/30 s	351	Xu i Nie, 2006
AMV-R	TCG TCA CGT CAT CAG TGA GAC					
AMV-F2	ATC ATG AGT TCT TCA CAA AAG AA	95°C/30 s	58°C/30 s	72°C/30 s	669	Xu i Nie, 2006
AMV-R2	TCA ATG ACG ATC AAG ATC GTC					
CPAMV1	TCC ATC ATG AGT TCT TCA C	95°C/60 s	49°C/60 s	72°C/120 s	751	Parella i sar., 2000
CPAMV2	AGG ACT TCA TAC CTT GAC C					

RT-PCR reakcije obavljane su u 25 µl zapremine PCR smeše, koja je sadržala: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 µl dNTP Miks (400 µM finalne koncentracije svakog dNTP), 1 µl Qiagen OneStep RT-PCR smeše enzima (koji sadrži Omniscript reverznu transkriptazu, Sensiscript reverznu transkriptazu i HotStar *Taq* DNK polimerazu), po 1,5 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,6 µM, 14 µl RNase-free vode i 1 µl izolovane ukupne RNK. Negativnu kontrolu predstavljali su svi reagensi potrebni za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µl uzorka dodat 1 µl RNase-free vode. Reakcija je izvedena u Thermocycler-u (Biometra, UK) primenom sledećeg protokola: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; denaturacija, elongacija i ekstenzija (35 ciklusa) određeni vremenski period na određenim temperaturama preporučenim za svaki od korišćenih prajmera (Tabela 1); finalna ekstenzija 72°C u trajanju od 10 min.

Dobijeni produkti su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 µg/ml i vizualizovani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava fragmenata očekivane veličine, određene poređenjem sa MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) markerom.

Umnoženi fragment izolata 196-08 dobijen korišćenjem prajmera CPAMV1/CPAMV2, nakon prečišćavanja pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) direktno je poslat na uslužno sekvencioniranje u BMR Genomics (Padova, Italija). Sekvencioniranje je obavljeno na ABI Prism 3700 au-

tomatskom kapilarnom sekvencionatoru u oba smera prajmerima koji su korišćeni u RT-PCR reakciji. Dobijene sekvence odabranog izolata AMV obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., određena je konsenzus sekvenca i podneta u National Center of Biotechnology Information (NCBI) banku podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem dobijene sekvence sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson i sar., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijene sekvence. Za proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti na osnovu sekvence dela genoma odabranog izolata sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, nakon trimovanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence, kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 4.0. (Tamura i sar., 2007). Analiza sekvenci obuhvatila je međusobno poređenje sekvence CP gena dobijene u toku ovog rada i 21 sekvence izolata podnetih u NCBI bazu podataka (Tabela 2), od kojih su dve sekvence pokazivale više od 99% nukleotidne identičnosti, 18 više od 98% i jedna najniži procenat sličnosti od 93%. Filogenetsko stablo rekonstruisano je na osnovu 27 delimičnih sekvenci CP gena (Tabela 2), dužine 528 nukleotida, korišćenjem Neighbor-Joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Kimura-2 parametra u okviru programa MEGA 4.0.

Tabela 2. Sekvence CP gena izolata virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) korišćene za analizu nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci ili filogenetske analize

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	NCBI broj	Literatura
196-08	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	FJ527749	Ova istraživanja
403-10	Srbija	<i>Medicago sativa</i>	/*	Nije objavljeno
100-08	Srbija	<i>Syringa vulgaris</i>	EU925642	Nije objavljeno
VRU	Velika Britanija	<i>Lupinus polyphyllus</i>	AF015716	Thole i sar., 1998
15/64	Velika Britanija	<i>Lupinus polyphyllus</i>	AF015717	Thole i sar., 1998
S	Velika Britanija	<i>Medicago sativa</i>	X00819	Ravelonandro i sar., 1984
425 Medison	SAD	<i>Trifolium repens</i>	K02703	Barker i sar., 1983
425 Leiden	SAD	<i>Trifolium repens</i>	L00162	Koper-Zwarthoff i sar., 1977
YSMV	SAD	<i>Medicago sativa</i>	M59241	Neeleman i sar., 1991
Joe Davis	SAD	<i>Glycine max</i>	HQ185569	Fajolu i sar., 2010
NY-A 2002	SAD	<i>Medicago sativa</i>	AY340070	Shah i sar., 2006
/	SAD	<i>Phlox paniculata</i>	DQ124429	Holcomb i sar., 2006
126-A	Italija	<i>Licopersicon esculentum</i>	AJ130704	Parrella i sar., 2000
195-AN	Italija	<i>Portulaca oleracea</i>	AJ130705	Parrella i sar., 2000
F-430	Italija	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AJ130706	Parrella i sar., 2000
Danza	Italija	<i>Licopersicon esculentum</i>	Y09110	Finetti Sialer i sar., 1997
Lst	Italija	<i>Lavandula stoechas</i>	FN667967	Parrella i sar., 2010
Lye-80	Francuska	<i>Licopersicon esculentum</i>	AJ130703	Parrella i sar., 2000
Caa-1	Francuska	<i>Capsicum annum</i>	AJ130707	Parrella i sar., 2000
Dac-16	Francuska	<i>Daucus carota</i>	AJ130708	Parrella i sar., 2000
Lyh-1	Francuska	<i>Solanum sp.</i>	AJ130709	Parrella i sar., 2000
Ca375	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314749	Xu i Nie, 2006
Ca175	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314750	Xu i Nie, 2006
Ca399	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314751	Xu i Nie, 2006
Ca400	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314752	Xu i Nie, 2006
Ca401	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314753	Xu i Nie, 2006
Ca508	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314754	Xu i Nie, 2006
Ca518	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314755	Xu i Nie, 2006
Ca616	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314756	Xu i Nie, 2006
N20	Australija	/	AF332998	Jayasen i Randles, 2004
NZ1 Lincoln	Novi Zeland	<i>Pisum sativum</i>	AF215663	Timmerman-Vaughan i sar., 2001
NZ34	Novi Zeland	<i>Pisum sativum</i>	AF215664	Timmerman-Vaughan i sar., 2001
KR1	Korea	<i>Solanum tuberosum</i>	AF294432	Nije objavljeno
KR2	Korea	<i>Solanum tuberosum</i>	AF294433	Nije objavljeno
No.14	Japan	<i>Solanum tuberosum</i>	AB451173	Nije objavljeno
NZ	Kina	/	HQ316637	Nije objavljeno
L	/	/	K03542	Langereis i sar., 1986
048	/	/	V00048	Koper-Zwarthoff i sar., 1980
AMV-P	Brazil	<i>Carica papaya</i>	FJ858264	Moreira i sar., 2010
AMV-A	Brazil	<i>Medicago sativa</i>	FJ858265	Moreira i sar., 2010

/* – podatak nije dostupan

NCBI – National Center of Biotechnology Information

REZULTATI

Simptomi u polju

Biljke u kojima je serološkim analizama dokazano prisustvo AMV u pojedinačnim zarazama ispoljavale su simptome u vidu hlorotičnih ili nekrotičnih pega i hlorotičnog prstenastog prošaravanja (Slika 1). Pored toga, javljala se hloroza i hlorotično šarenilo (Slika 2), žuti mozaik, zlatno žute šare i ređe deformacije listova.

U slučaju mešane infekcije sa drugim virusima prisutnim u usevu duvana kod nas, biljke su ispoljavale intenzivnije simptome. Mešana zaraza sa TSWV i TMV ili sa TSWV, TMV i CMV ustanovljena je u biljkama sa simptomima hrastolikog mozaika, hlorotičnih pega i šara, nekrotičnih šara, mozaika i klobučavosti. Mešana zaraza sa TSWV uglavnom je dokazana u uzorcima sa simptomima hlorotičnih i nekrotičnih pega i šara, beličastih nekroza, kao i izraženog hlorotičnog šarenila i mozaika. Prisustvo mešane zaraze sa PVY i CMV pored mozaika i hloroze, uslovalo je pojavu nekroze nerava, nekrotičnih pega i nekrotičnih zona koje zahvataju veću površinu lista.



Slika 1. AMV: hlorotične prstenaste šare

Serološka detekcija i učestalost pojave virusa mozaika lucerke u usevu duvana

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti AMV, na sedam lokaliteta, tokom 2006. godine, virus je detektovan na dva lokaliteta (Tabela 3). Na lokalitetu Futog bio je prisutan u pojedinačnim (8,33%), a na lokalitetu Hrtkovci u mešanim infekcijama sa PVY (8,33%). Od 107 sakupljenih i testiranih uzoraka duvana, AMV je detektovan u 3 (2,80%).

Serološkim analizama uzoraka duvana sakupljenih tokom 2007. godine, prisustvo AMV ponovo je ustanovljeno u samo dva od deset pregledanih lokaliteta (Tabela 3). Od 132 sakupljena i serološki testirana uzorka, prisustvo virusa dokazano je u 18 uzoraka (13,64%) i to isključivo u mešanim infekcijama sa dva, tri ili čak četiri testirana virusa (Tabela 3). Na lokalitetu Bački Petrovac zastupljenost AMV bila je 33,33%, dok je na drugom lokalitetu, Futog, prisustvo virusa ustanovljeno u nešto nižem procentu, 12,5%.

Ispitivanjima sprovedenim tokom 2008. godine, prisustvo AMV isključivo u mešanim infekcijama dokazano je na oba pregledana lokaliteta u čak 40 testiranih uzoraka (58,82%). Samo na lokalitetu Lapotince AMV je detektovan u 63,64% testiranih uzoraka (Tabela 3). U najvećem procentu AMV je bio prisutan u mešanoj zarazi sa TSWV i TMV (23,53%).



Slika 2. AMV: hlorotično šarenilo

Tabela 3. Prisustvo i učestalost pojave virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) u pojedinačnim i mešanim infekcijama duvana u periodu 2006-2008. godine

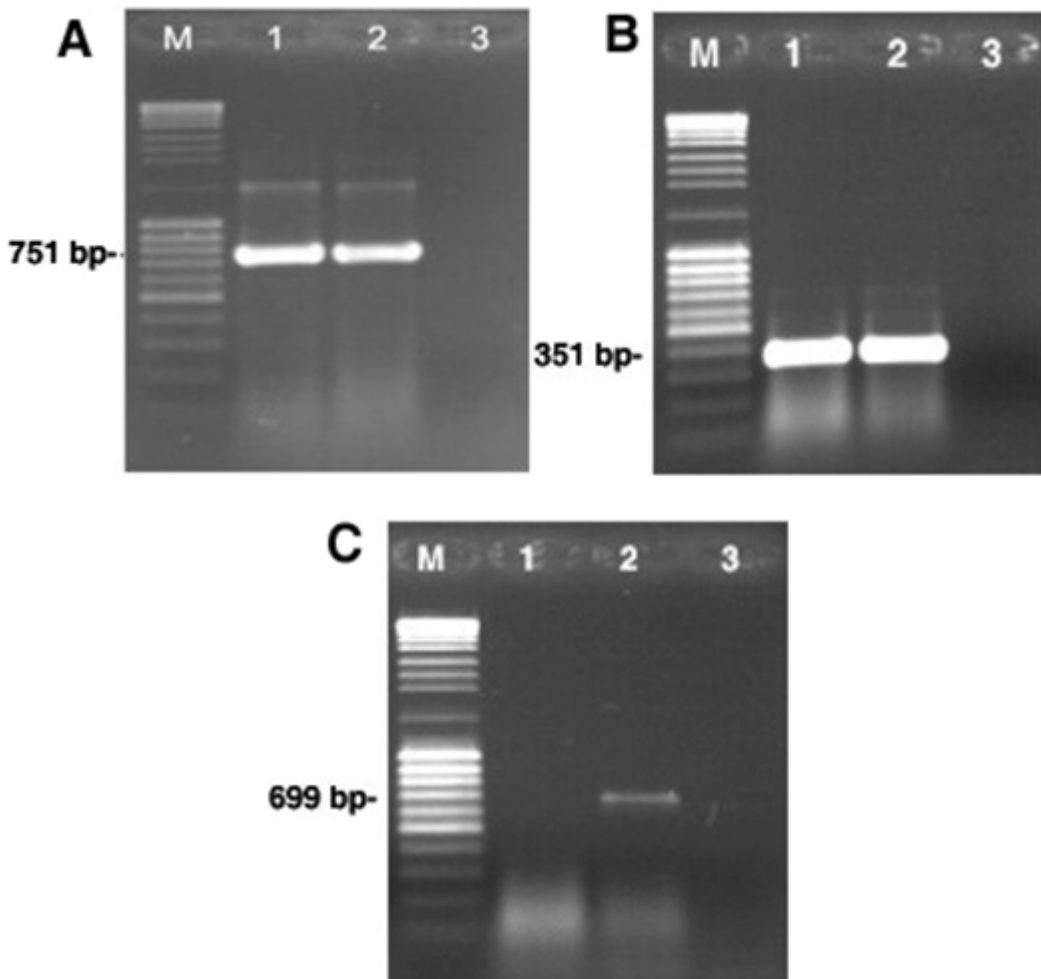
Godina	Tip duvana	Lokalitet	Br. uzoraka	Mešane infekcije (%)										
				Pojedi- načna infekcija (%)	AMV	AMV + PVY	AMV + CMV	AMV+TSWV	AMV+PVY+ CMV	AMV+CMV+ TMV	AMV+TSWV+ CMV	AMV+TSWV+ TMV	AMV+TSWV+ CMV+TMV	AMV+TSWV+ PVY+CMV
2006.	virdžinija	Futog	24	8.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Kuzmin	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bačinci	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Kukujevci	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hrtkovci	12	0	8.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Golubinci	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Beška	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno		107	1.87	0.93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2007.	berlejš	Bački Petrovac	42	0	9.52	4.76	0	14.29	0	0	0	4.76	0	0
		Zrenjanin	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mladenovac	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	virdžinija	Futog	16	0	0	0	0	0	12.5	0	0	0	0	0
		Golubinci	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bingula	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hrtkovci	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Sremska Mitrovica	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bogatić	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Morović	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno		132	0	3.03	1.52	0	4.55	1.52	0	0	1.52	0	0	
2008.	virdžinija	Đinđuša	24	0	0	0	12.5	0	0	0	0	12.5	25	
		Lapotince	44	0	0	0	9.09	0	0	9.09	36.36	0	9.09	
Ukupno		68	0	0	0	10.29	0	0	5.88	23.53	0	4.41	14.71	
UKUPNO		307	0.65	1.63	0.65	2.28	1.95	0.65	1.30	5.21	0.65	0.98	3.26	

Molekularna detekcija i identifikacija virusa mozaika lucerke

Molekularna RT-PCR metoda uz korišćenje tri različita para prajmera koji omogućavaju umnožavanje CP gena, primenjena je u cilju potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama, kao i u cilju ispitivanja pogodnosti korišćenja postojećih prajmera za detekciju izolata AMV iz duvana poreklom iz Srbije. Primenjeni prajmeri međusobno su se razlikovali u specifičnosti i sposobnosti amplifikacije ispitivanog izolata (Slika 3). Prajmeri CPAMV1/CPAMV2 i AMV-F/AMV-R uspešno su detektovali odabrani izolat. Primenom ovih prajmera došlo je do uspešne amplifikacije regiona genoma koji obuhvata deo gena za protein omotača što je potvrđeno prisustvom pojedinačnog fragmenta odgovarajuće veličine

od 751 bp, odnosno 351 bp, kako kod ispitivanog uzorka tako i kod pozitivne kontrole. Primenom para prajmera AMV-F2/AMV-R2, prisustvo fragmenta očekivane veličine 669 bp utvrđeno je kod pozitivne kontrole, ali ne i kod ispitivanog izolata iz duvana. U svim reakcijama do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog korišćenjem para prajmera CPAMV1/CPAMV2 i obrade u FinchTV programu, dobijena je delimična sekvenca CP gena i 3' UTR subgenomske RNK4 koja je prijavljena u NCBI bazu podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj, GenBank Acc. No. FJ527749. Molekularna identifikacija odabranog izolata AMV iz duvana obavljena je BLAST analizom koja je pokazala 99 do 93% identičnosti sa sekvencama svih drugih izolata AMV deponovanih u NCBI bazi podataka.



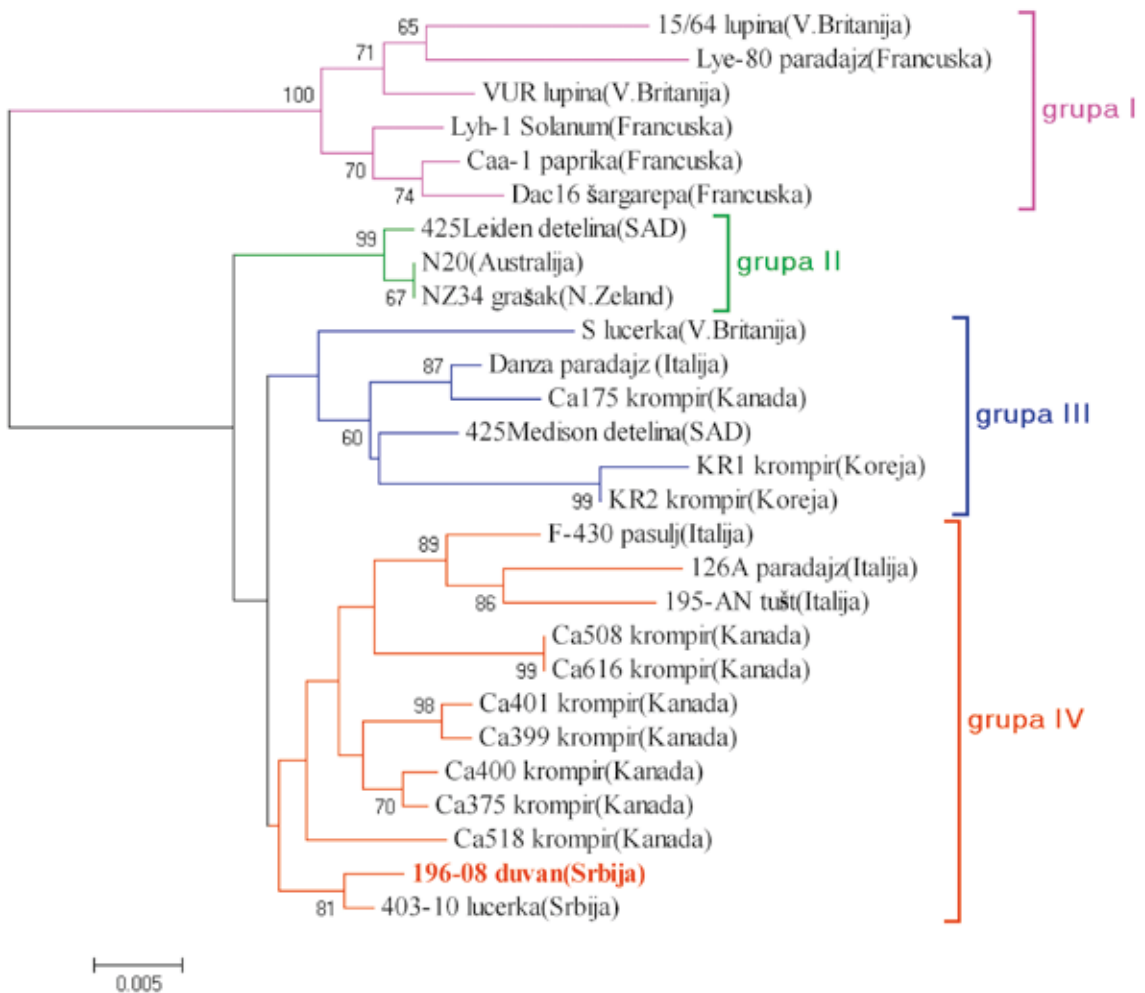
Slika 3. Detekcija odabranog izolata virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) iz duvana pomoću one-step RT-PCR korišćenjem tri različita para prajmera: AMVCP1/AMVCP2 (A), AMV-F/AMV-R (B) i AMV-F2/AMV-R2 (C). Kolone: M-MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 196-08 iz duvana, 2-izolat 403-10 iz lucerke, 3-negativna kontrola-PCR mix sa RNase-free vodom.

Tabela 4. Procenat identičnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale, istaknuto) ispitivanog izolata virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) poreklom iz Srbije (istaknuto) i sekvenci nekih izolata ovog virusa deponovanih u NCBI bazi podataka

FJ527749	/	100	99.5	97.5	98.5	99.0	98.5	99.0	96.5	97.0	97.0	99.0	99.0	98.5	92.5
AB451173	99.2	/	100	98.7	98.7	100	100	96.3	97.5	97.5	97.5	100	100	97.5	95.0
HQ316637	99.0	98.8	/	99.0	97.0	98.0	98.5	98.0	99.0	98.0	98.0	98.0	98.5	96.5	98.0
HQ185569	99.0	99.6	98.7	/	98.0	98.0	98.5	98.0	99.0	98.0	98.0	99.5	98.5	97.5	98.0
AY340070	98.2	99.2	97.8	99.2	/	96.0	94.5	97.0	97.0	96.0	96.0	97.0	98.5	98.5	97.0
AF215664	98.2	98.3	97.7	98.3	97.5	/	98.5	98.0	99.0	97.0	97.0	97.0	97.5	97.5	93.0
M59241	98.2	98.3	98.8	98.5	97.7	98.2	/	98.5	99.5	97.5	98.5	98.0	96.5	97.0	92.5
AF215663	98.3	99.2	98.0	98.7	98.2	98.7	98.5	/	99.0	97.0	98.0	98.0	96.5	96.5	93.0
FN667967	98.2	97.5	97.8	98.2	97.4	98.2	98.3	98.5	/	98.0	99.0	98.0	97.0	97.5	93.0
DQ314753	98.2	97.5	97.8	98.5	97.7	97.8	98.3	98.5	98.0	/	99.0	99.0	97.0	97.5	91.5
DQ314752	98.2	97.9	97.8	98.5	97.7	98.2	98.7	98.5	98.0	99.0	/	99.0	97.0	96.5	92.5
DQ314751	98.2	97.9	98.7	98.5	97.7	97.8	98.3	98.5	98.0	99.7	99.0	/	97.0	95.5	91.5
EU925642	98.0	98.8	97.7	97.7	97.5	97.4	97.2	98.0	97.8	97.2	98.5	97.2	/	98.5	94.0
Y09110	98.0	100	97.7	99.0	98.5	97.7	98.5	98.3	97.2	97.5	97.5	97.5	97.4	/	92.5
AF332998	98.0	98.3	97.7	98.7	98.8	98.0	97.8	98.0	97.5	97.5	97.8	97.5	96.7	98.0	91.5
L00162	98.0	98.3	97.7	98.7	98.8	98.0	97.8	98.0	97.5	97.5	97.8	97.5	96.7	98.0	91.5
K03542	98.0	98.3	97.7	98.7	98.8	98.0	97.8	98.0	97.5	97.5	97.8	97.5	96.7	98.0	91.5
V00048	98.0	98.3	97.7	98.7	98.8	98.0	97.8	98.0	97.5	97.5	97.8	97.5	96.7	98.0	91.5
FJ858265	98.0	100	97.7	99.0	98.5	97.7	97.5	98.3	97.2	97.5	97.5	97.4	100	98.0	92.5
AJ130706	98.0	98.8	97.7	98.3	97.8	98.0	98.8	98.7	98.5	98.2	97.8	98.2	97.7	97.7	92.5
FJ858264	97.8	97.5	97.5	98.2	97.7	97.8	97.7	98.2	97.7	97.7	97.7	97.5	97.8	97.2	92.5
DQ124429	93.7	95	93.4	93.5	93.4	94.0	93.4	93.9	93.9	92.9	93.0	92.9	94.4	92.9	93.2

Dalja karakterizacija obavljena je višestrukim uparivanjem sekvenci dostupnih u NCBI bazi podataka pomoću MEGA 4 softvera, a proračun genetičke sličnosti sekvenci uključio je sekvencu dobijenu u ovom radu i sekvence izolata deponovane u NCBI bazi podataka koje su pokazivale 99%, 98% odnosno 93% sličnosti sa odabranim izolatom (Tabela 4). Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske divergentnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 604 bp. Najviši stepen identičnosti od 99% sekvenca odabranog izolata iz duvana iz Srbije pokazala je sa sekvencama izolata Joe Davis iz soje iz SAD (HQ185569) i izolatom NZ iz Kine (HQ316637). Sličnost nukleotidne

sekvence ovih izolata od 99% rezultirala je u promeni jedne aminokiseline, tako da je aminokiselinska identičnost bila 99,5%. Međutim, poređenje izolata iz Srbije sa najkraćom sekvencom izolata deponovanom u NCBI bazi podataka, sekvencom izolata No.14 poreklom iz krompira iz Japana (AB451173) obavljeno je na osnovu 242 bp i pokazalo je nešto veći stepen nukleotidne identičnosti od 99,2%, što nije izazvalo promene u aminokiselinskoj sekvenci (100% aminokiselinska identičnosti). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 93,7%, odnosno 92,5% aminokiselinske sličnosti, izolat iz Srbije pokazao je sa izolatom pod pristupnim brojem DQ124429 poreklom iz *Phlox paniculata* iz SAD.



Slika 4. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu delimičnih sekvenci CP gena 27 izolata virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) korišćenjem MEGA4 softvera i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja. Dužina grana proporcionalna je broju promena baznih parova. Izolat iz duvana iz Srbije istaknut je crvenom bojom.

Filogenetska analiza

Delimične sekvence CP gena jednog izolata AMV iz duvana poreklom iz Srbije, deponovane u NCBI bazi podataka i 26 sekvenci odabranih izolata AMV međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i Neighbor-joining metodom rekonstruisano je filogenetsko stablo (Slika 4). Filogenetsko stablo pokazuje izdvajanje četiri klastera, odnosno grupisanje izolata AMV u četiri genetička soja, nezavisno od geografskog porekla i biljke domaćina. Većina izolata, sedam iz Kanade i tri iz Italije, izdvojila se u grupu IV. Ovoj grupi genetičkih sojeva pripada i odabrani izolat iz duvana iz Srbije, 196-08, koji se zajedno sa izolatom iz lucerke iz Srbije izdvojio na posebnoj grani ovog klastera. Prvu grupu sojeva čine četiri izolata iz Francuske i dva izolata iz Velike Britanije, dok se u drugoj grupi nalaze samo tri izolata i to po jedan izolat iz SAD, Australije i sa Novog Zelanda. Dva izolata iz Koreje i po jedan izolat iz SAD, Italije, Velike Britanije i Kanade formiraju treću molekularnu grupu. Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, ustanovljena je najmanja varijabilnost unutar grupe II (0,002), dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila veća i kretala se od 0,019 unutar grupe IV do 0,021 unutar grupe I i III. Intergrupna varijabilnost bila je najveća između grupa I i III (0,062), zatim grupa I i IV (0,056) i grupa I i II (0,052), a nešto manja između grupa III i IV (0,03), II i III (0,027) i II i IV (0,026).

DISKUSIJA

Veliki broj biljnih bolesti može značajno da smanji prinos i kvalitet duvana. Po ekonomskim štetama u proizvodnji duvana virusne zaraze su na prvom mestu, imajući u vidu njihovu široku rasprostranjenost u svetu, način širenja i uticaj na prinos i kvalitet (Sievert, 1978; Latorre i sar., 1982; Reilly, 1983; Latorre i sar., 1984; Herbers i sar., 2000; Williams-Woodward, 2000). Jedan od ekonomski najznačajnijih virusa duvana je i virus mozaika lucerke koji se redovno javlja u usevu duvana i može izazvati značajne gubitke u proizvodnji (Gooding, 1991; Mayunga i Kapooria, 2003; Chatzivassiliou i sar., 2004).

Serološka testiranja prikupljenih uzoraka duvana sa simptomima virusnih infekcija, na različitim lokalitetima gajenja u Srbiji, u periodu 2006-2008. godine ukazala su na stalno prisustvo ovog virusa u usevu duvana u našoj zemlji. Takođe, rezultati ovih istraživanja pokazali su da učestalost pojave AMV po godinama i lokalitetima značajno varira. U ove tri godine istraživanja,

AMV je pokazao tendenciju lokalizovane pojave u usevima duvana, pri čemu se uglavnom javljao na manjem broju lokaliteta, ali sa značajnijom učestalošću tokom 2008. godine, i uočljivim i prepoznatljivim simptomima. Tokom 2006. godine AMV je dokazan na dva od sedam pregledanih lokaliteta, tokom 2007. na dva od deset, a u 2008. godini prisustvo virusa potvrđeno je u oba pregledana lokaliteta. Zastupljenost AMV iskazana kroz procenat testiranih uzoraka u kojima je virus detektovan bila je 2,80% u 2006. godini, 13,64% u 2007. a u 2008. godini AMV je detektovan u skoro 60% testiranih biljaka. Prisustvo AMV dokazano je i u pojedinačnim i mešanim infekcijama u usevu duvana u Srbiji, ali je prisustvo pojedinačnih zaraza ustanovljeno samo 2006. godine, dok su u druge dve godine istraživanja dominantne bile mešane infekcije i to sa dva, tri ili čak četiri virusa.

Ranija malobrojna istraživanja sprovedena u našoj zemlji ukazuju na cikličnu pojavu ovog virusa u usevu duvana. Istraživanja koja su sproveli Jasnić i sar. (2000) ukazala su na značajno prisustvo ovog virusa u usevu duvana 1995. godine, dok 2005. godine prisustvo AMV nije utvrđeno (Dukić i sar., 2006).

Razlike u pojavi i zastupljenosti AMV nisu zabeležene samo u zavisnosti od godine istraživanja, već pre svega od lokaliteta gajenja duvana. Tako je 2006. godine AMV dokazan na lokalitetu Hrtkovci, ali 2007. godine nije detektovan ni u jednom od testiranih uzoraka sakupljenih na istom lokalitetu. Ova razlika u pojavi, kao i zastupljenosti nije retka pojava kod virusa duvana (Mayunga i Kapooria, 2003), i ukazuje da je važno stalno pratiti stanje i prisustvo pojedinih virusa. Njihova pojava i rasprostranjenost svakako zavise od izvora inokuluma, koncentracije samog virusa u biljci, prisustva i brojnosti vektora-vaši, kao i sposobnosti prenošenja pojedinim vrstama vaši (Zitter, 1977).

U zavisnosti od starosti biljke, uslova spoljašnje sredine (naročito temperature), zatim vremena infekcije i soja virusa, virusi duvana izazivaju različite tipove simptoma. Međutim, ipak postoji izvesna korelacija između tipa simptoma i virusa prouzrokovaca koja ima značaj u dijagnostici virusnih oboljenja duvana (Gooding, 1991). Primarni simptomi zaraze duvana virusom mozaika lucerke najčešće su u obliku hlorotičnih pega, belih ili žutih šara i prstenova, kao i pojava žutog mozaika. Na osnovu simptoma u polju, sa visokom pouzdanošću može se obaviti 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 odgovarajućih laboratorijskih tehnika (Gooding, 1991).

Za detekciju i identifikaciju različitih izolata virusa mozaika lucerke razvijen je veći broj metoda zasnovanih na različitim osobinama virusa. Pored biotesta zasnovanog na korišćenju indikator biljaka kao što su *Phaseolus vulgaris*, *Chenopodium amaranticolor* i *C. quinoa*, za detekciju AMV koriste se i ELISA test i hibridizacija nukleinskih kiselina (Ahoonmanesh i sar., 1990). Xu i Nie (2006) navode da se pravilna identifikacija *Alfavirus*-a može obaviti i na osnovu izgleda čestica korišćenjem elektronskog mikroskopa. Međutim, molekularne metode zasnovane na RT-PCR, koje su osjetljivije i preciznije od seroloških (Robinson, 1992), imaju prednost pri detekciji virusa kada se nalaze u biljci u niskoj koncentraciji, što može biti slučaj i sa AMV. Zbog toga je, uspostavljanje brze i pouzdane molekularne metode bilo neophodno ne samo za detekciju AMV, već i za praćenje varijabilnosti u okviru populacije AMV u Srbiji. U tom smislu primenjena RT-PCR metoda uz upotrebu specifičnih prajmera CPAMV1/CPAMV2 pokazala se uspešnom za detekciju i identifikaciju izolata AMV iz Srbije.

Populacija AMV poreklom iz duvana iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, tako da nije poznata genetička struktura, kao ni variranje izolata iz Srbije u odnosu na izolate ovog virusa iz drugih delova sveta. Zbog toga su molekularna ispitivanja, osim detekcije, bila usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju. Genetička sličnost izolata 196-08 sa lokaliteta Đinduša, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence CP gena odabranog izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u NCBI bazi podataka.

BLAST analiza pokazala je visok stepen nukleotidne sličnosti sekvence ispitivanog izolata sa sekvencama gena za protein omotača drugih izolata AMV. Homologija sekvenci CP gena kretala se od 99% do 93%. Proračun genetičke sličnosti sekvenci CP gena ispitivanog izolata i izolata dostupnih u NCBI bazi podataka, pokazao je najviši stepen identičnosti ispitivanog izolata sa jednim izolatom iz Japana. Identičnost sekvenci dužine 242 bp između ova dva izolata od 99,2%, odnosno razlika u dva nukleotida, nije rezultovala promenom aminokiselinskog sastava ispitivanog dela sekvence gena za proteinski omotač. Međutim, poređenjem sekvence izolata AMV iz Srbije sa sekvencama izolata ovog virusa iz drugih delova sveta u dužini od 604 bp, pokazalo je najveću sličnost sa izolatom Joe Davis iz soje iz SAD i izolatom NZ iz Kine. Nukleotidna sličnost sekvenci ovih izolata od 99%, odnosno razlika u šest nukleotida, uslovlila je promenu samo jedne aminokiseline. Najniži stepen homologije od 93,7% nukleotidne

identičnosti (92,5% aminokiselinske sličnosti) ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencom izolata iz *Phlox paniculata* (DQ124429) iz SAD.

Upoređivanjem sekvenci za protein omotača više izolata sa različitim geografskim poreklom, Parrella i sar. (2000) ustanovili su da njihova genetička sličnost iznosi 93-99% na nivou nukleotidne sekvence, odnosno 92-100% na aminokiselinskom nivou. Visok stepen nukleotidne sličnosti (>98%) CP gena utvrdili su i Xu i Nie (2006) ispitujući osam izolata ovog virusa poreklom iz krompira iz Kanade. Takođe, u Italiji izolovan je i karakterisan novi soj AMV – Danza koji izaziva specifične simptome na paradajzu u vidu hloroze i nekroze i ispoljava 99-96% identičnosti u sekvenci gena za protein omotača sa ostalim prethodno opisanim izolatima (Finnetti Staler i sar., 1997). Prema tome, na osnovu visokog stepena homologije sekvence CP gena, potvrđeno je da odabrani izolat 196-08 iz duvana pripada virusu mozaika lucerke.

Iako je AMV široko rasprostranjen i ekonomski značajan virus mnogih useva, za sada dostupni podaci o strukturi populacije AMV u svetu ukazuju na postojanje varijabilnosti na biološkom, serološkom i molekularnom nivou, ali još ne postoje usaglašeni kriterijumi za podelu izolata na sojeve ili druge taksonomski niže jedinice od vrste. Na osnovu sekvence dobijene u ovom radu i dostupnih sekvenci drugih izolata, rekonstruisano je filogenetsko stablo, koje pokazuje četiri različite grupe, odnosno grupisanje izolata AMV u najmanje četiri genetička soja. Većina izolata uključenih u rekonstrukciju filogenetskog stabla svrstava se u grupu IV kojoj pripadaju i izolati AMV iz duvana i lucerke poreklom iz Srbije. Međutim, Parrella i sar. (2000) utvrdili su podelu izolata različitog geografskog porekla i iz različitih biljaka domaćina u dve odvojene grupe, a nukleotidna sličnost izolata između dve grupe bila je manja od 96%. Sa druge strane, istraživanja u Kanadi pokazala su da se svi izolati AMV sa krompira grupišu u jedan od najmanje četiri klastera izolata ovog virusa (Xu i Nie, 2006).

Svi ovi podaci ukazuju na neophodna dalja izučavanja genetičke strukture populacije AMV i definisanje novih kriterijuma, uključujući proučavanje drugih delova genoma ovog virusa. Određivanje varijabilnosti u okviru populacije ovog virusa u usevu duvana, ali i u drugim biljkama domaćina u Srbiji doprineće boljem poznavanju epidemiologije ovog patogena, a sve u cilju osmišljavanja i sprovođenja što efikasnijih mera kontrole, kao i prevencije mogućih introdukcija novih sojeva za našu zemlju usled veoma intenzivne međunarodne razmene biljnog materijala.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta III-43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena), koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Aboonmanesh, A., Hajmorad, M.R., Ingham, B.J. and Francki, R.I.B.:** Indirect double antibody sandwich ELISA for detecting *Alfalfa mosaic virus* in aphids after short probes on infected plants. *Journal of Virological Methods*, 30: 271-282, 1990.
- Babović, M.:** Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Agrohemija*, 12: 701-707, 1965.
- Babović, M.:** Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, 102: 335-410, 1968.
- Barker, R.F., Jarvis, N.P., Thompson, D.V., Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C.:** Complete nucleotide sequence of *Alfalfa mosaic virus* RNA3. *Nucleic Acids Research*, 11: 2881-2891, 1983.
- Berenji, J. i Sikora, V.:** Stanje i perspektive u proizvodnji, obradi i preradi duvana u Jugoslaviji. *Biljni lekar*, 30: 368-375, 2002.
- Bol, J.F.:** Alfalfa mosaic virus. In: *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology* (B.W.J. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, eds.). Elsevier and Academic Press, Oxford, UK, 2010, pp. 85-91.
- Bos, L. and Jaspars, E.M.J.:** CMI/AAB Descriptions of plant viruses. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, 46: 1-4, 1971.
- Bulajić A., Vučurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Ivanović, M. i Krstić B.:** Razvijanje metode za određivanje učestalosti zaraze virusom mozaika lucerke u usevu semenske lucerke. *Zbornik rezimea X savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, 2010, str. 77-78.
- Chatzivassiliou, E.K., Efthimiou, K., Drossos, E., Papadopoulou, A., Poimenidis, G. and Katis, N.I.:** A survey of tobacco viruses in tobacco crops and native flora in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 1011-1023, 2004.
- 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.
- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B.:** Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 21: 205-214, 2006.
- Fajolu, O.L., Wen, R.H. and Hajmorad, M.R.:** Occurrence of *Alfalfa mosaic virus* in soybean in Tennessee. *Plant Disease*, 94: 1505, 2010.
- FAO:** The FAO Statistical Database (FAOSTAT): Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
- Finetti Sialer, M., Di Franco, A., Papanice, M.A. and Gallitelli, D.:** Tomato necrotic yellows induced by a novel strain of *Alfalfa mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology*, 79: 115-120, 1997.
- Gooding, G.V.:** Disease caused by viruses. In: *Compendium of tobacco diseases* (H.D. Shew and G.B. Lucas, eds.). APS Press, 1991, pp. 41-47.
- 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. *Molecular Plant Pathology*, 1: 51-59, 2000.
- Holcomb, G.E., Valverde, R.A. and Gutierrez-Reynoso, D.L.:** *Alfalfa mosaic virus* causing a disease of *Phlox paniculata*. *HortScience*, 41: 474-476, 2006.
- Hull, R.:** *Comparative plant virology*. Second edition, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, 2009, pp. 1-376.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J.:** Rasprostranjenost virusa duvana u Vojvodini. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 34: 67-76, 2000.
- Jaspars, E.M. J. and Bos, L.:** *Alfalfa mosaic virus*. CMI/ABB Descriptions of Plant Viruses, No 229, 1980.
- Jayasena, K.W. and Randles, J.W.:** A short insert in the leader sequence of RNA 3L, a long variant of *Alfalfa mosaic virus* RNA3, introduces two unidentified reading frames. *Virus Genes*, 29: 311-316, 2004.
- Koper-Zwarthoff, E.C., Brederode, F.T., Veeneman, G., van Boom, J.H. and Bol, J.F.:** Nucleotide sequences at the 5'-termini of the *Alfalfa mosaic virus* RNAs and the intercistronic junction in RNA 3. *Nucleic Acids Research*, 8: 5635-5647, 1980.
- Koper-Zwarthoff, E.C., Lockard, R.E., Alzner-deWeerd, B., Rajbhandary, U.L. and Bol, J.F.:** Nucleotide sequence of 5' terminus of *Alfalfa mosaic virus* RNA 4 leading into coat protein cistron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74: 5504-5508, 1977.
- Krstić, B. i Bulajić, A.:** Ekonomski značajni i karantinski virusi paprike u Srbiji. *Zbornik IX savetovanja Savremena proizvodnja povrća*, Novi Sad, 2008, str. 24-28.

- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I.:** Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea IV simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, 2007, str. 13.
- Langereis, K., Mugnier, M.A., Cornelissen, B.J., Pinck, L. and Bol, J.F.:** Variable repeats and poly (A)-stretches in the leader sequence of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3. *Virology*, 154: 409-414, 1986.
- 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.
- Mayunga, D.S. and Kapooria, R.G.:** Incidence and identification of virus diseases of tobacco in three provinces of Zambia. *Bulletin OEPP/EPPPO Bulletin*, 33: 355-359, 2003.
- Moreira, A.G., Kitajima, E.W. and Rezende, J.A.M.:** Identification and partial characterization of a *Carica papaya*-infecting isolate of *Alfalfa mosaic virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 172-175, 2010.
- Neeleman, L., van der Kuyl, A.C. and Bol, J.F.:** Role of Alfalfa mosaic virus coat protein gene in symptom formation. *Virology*, 181: 687-693, 1991.
- Parrella, G., Acanfora, N. and Bellardi, M.G.:** First record and complete nucleotide sequence of *Alfalfa mosaic virus* from *Lavandula stoechas* in Italy. *Plant Disease*, 94: 924-924, 2010.
- Parrella, G., Lanave, C., Marchoux, G., Finetti-Sialer, M.M., Di Franco, A. and Gallitelli, D.:** Evidence for two distinct subgroups of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) from France and Italy and their relationships with other AMV strains. *Archives of Virology*, 145: 2659-2667, 2000.
- Petrović, D., Bulajić, A., Stanković, I., Ignjatov, M., Vujaković, M. i Krstić, B.:** Prisustvo i rasprostranjenost virusa paprike u Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 47: 567-576, 2010.
- Ravelonandro, M., Pinck, M. and Pinck, L.:** Complete nucleotide sequence of RNA 3 from *Alfalfa mosaic virus*, strain S. *Biochimie*, 66: 395-402, 1984.
- Reilly, J.J.:** Effects of sequential virus infection on flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 28: 23-27, 1983.
- Robinson, D.J.:** Detection of Tobacco rattle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 40: 57-66, 1992.
- Shah, D., Dillard, H., Mazumdar-Leighton, S., Gonsalves, D. and Nault, B.:** Incidence, spatial patterns, and associations among viruses in snap bean and alfalfa in New York. *Plant Disease*, 90: 203-210, 2006.
- Sievert, R.S.:** Effect of Potato virus Y on cultivars and hybrids of Burley tobacco. *Phytopathology*, 68: 974-978, 1978.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.:** MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599, 2007.
- Thole, V., Miglino, R. and Bol, J.F.:** Amino acids of alfalfa mosaic virus coat protein that direct formation of unusually long virus particles. *Journal of General Virology*, 79: 3139-314, 1998.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.:** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680, 1994.
- Timmerman-Vaughan, G.M., Pither-Joyce, M.D., Cooper, P.A., Russell, A.C., Goulden, D.S., Butler, R.C. and Grant, J.E.:** Partial resistance of transgenic peas to Alfalfa mosaic virus under greenhouse and field conditions. *Crop Sciences*, 41: 846-853, 2001.
- Tomić, Đ., Jeremić, S., Simić, A., Petković, N., Đekić, I., Bulajić, A. i Krstić, B.:** Status viroza paprike u Srbiji. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007, str. 114-115.
- Williams-Woodward, J.L.:** 1999 Georgia plant disease loss estimates. University of Georgia Crop Extension Service for Plant Pathology, 99-002, 2000.
- Xu, H. and Nie, J.:** Identification, characterization and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in potato. *Phytopathology*, 96: 1237-1242, 2006.
- Zitter, T.A.:** Epidemiology of aphid borne viruses. In: *Aphids as virus vector* (K. F. Harris and K. Maramorosch, eds.). Academic Press, London, UK, 1977, pp. 385-412.

Presence and Molecular Characterization of *Alfalfa mosaic virus* on Tobacco in Serbia

SUMMARY

Three-year investigation of the presence and distribution of tobacco viruses in Serbia revealed that *Alfalfa mosaic virus* (AMV) appeared every year with different frequency in tobacco crops. During 2008, the presence of AMV was detected in most of the tested samples (58.82%) and it was the second most common compared to all other viruses which presence was confirmed in Serbia. In 2006 and 2007, AMV was detected in a significantly lower percentage (2.80% and 13.64%, respectively). This study showed that *Alfalfa mosaic virus* was more commonly found in multiple infections with two, three or even four detected viruses. Single infections were detected only in 2006, in one tobacco field in the locality of Futog. During this investigation, a rapid and simple protocol was optimized and developed for molecular detection of AMV in tobacco leaves, using primers CPAMV1/CPAMV2 and commercially available kits for total RNA extraction as well as for RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction). Using RT-PCR and these primers that flank the AMV coat protein gene, a DNA fragment of 751 bp was amplified, sequenced, and compared with the sequences available in GenBank database. The sequence of isolate 196-08 (GenBank Acc. No. FJ527749) proved to be identical at the nucleotide level of 99 to 93% with those from other parts of the world. Phylogenetic analysis of 27 isolates based on 528 bp sequences of the coat protein gene did not show correlation of the isolates with their geographic origin or plant host and showed that these isolates fall into four molecular groups of strains. Serbian AMV isolate from tobacco belongs to group IV, the group that includes most of the isolates selected for phylogenetic analysis.

Keywords: Tobacco; *Alfalfa mosaic virus*; Frequency; Molecular detection; Genetic variability; Phylogenetic analysis