

# PRISUSTVO I RASPROSTRANJENOST VIRUSA PAPRIKE U SRBIJI

**Dragana Milošević<sup>1</sup>, Ivana Stanković<sup>2</sup>, Maja Ignjatov<sup>1</sup>,  
Zorica Nikolić<sup>1</sup>, Branka Krstić<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd

E-mail: dragana.milosevic@nsseme.com

Rad primljen: 23.12.2017.

Prihvaćen za štampu: 29.12.2017.

## Izvod

Dvogodišnjim poučavanjima (2009-2010) prisustva i rasprostranjenosti virusa u usevu paprike u Srbiji utvrđeno je da se virusi javljaju svake godine u proizvodnji paprike na otvorenom polju. Serološkim analizama sakupljenih uzoraka paprike primenom DAS-ELISA testa dokazano je prisustvo četiri virusa: *Potato virus Y* (PVY), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) i *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), i to kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama. Tokom 2009. godine najčešće detektovan virus bio je PVY (51,21%), dok je 2010. godine prevalentan virus bio CMV (50%). Pregledom useva paprike u različitim lokalitetima gajenja zabeležena je pojava niza simptoma na lišću, stablu, cvetovima i plodovima, koji su upućivali na virusnu zarazu, ali nije bilo moguće utvrditi njihovu povezanost sa detektovanim virusom. Molekularna detekcija CMV kod tri odabrana izolata obavljena je RT-PCR metodom korišćenjem specifičnih prajmera CMV Au1u/Au2d, koji omogućavaju umnožavanje gena za protein omotača i dela 5' i 3' neprepisujućeg regiona subgenomne RNA 4. Amplifikovani fragmenti su sekvencirani i prijavljeni u GenBank, gde su im dodeljeni pristupni brojevi, KC288146 (PL-25-09), KC288147 (PL-43-09) i KC288148 (PL-52-09). Proračunom genetičke sličnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti, koji se kretao od 99,2-99,5%. Ispitivane sekvence CMV izolata iz Srbije dele najveću nukleotidnu i aminokiselinsku sličnost sa izolatima iz Amerike, Australije, Španije i Srbije.

**Ključne reči:** paprika, virusi, DAS-ELISA test, RT-PCR, sekvenciranje

## UVOD

Po svom poreklu, paprika (*Capsicum annuum* L.) je tropska biljka poreklom iz Centralne i Južne Amerike, odakle su je Španci doneli u Evropu početkom XVI veka, a u naše krajeve dospela je iz Turske (Greenleaf, 1986). Paprika u našoj zemlji ima veliki privredni značaj i spada u grupu najznačajnijih povrtarskih useva. Površine pod paprikom variraju iz godine u godinu, ali sa tendencijom stalnog povećanja. U svetu, paprika se gaji na oko 1.600.000 ha sa prosečnim prinosom od 14 t/ha, dok se u Srbiji proizvodi na oko 17.000 ha, sa prosečnim prinosom od 13,4 t/ha (RZS,

2016). Sa ekonomskog stanovišta, proizvodnja, prerada i međunarodna razmena, prvenstveno suve i sveže, ali i industrijske začinske paprike, čini ovu kulturu jednim od najznačajnijih useva povrća.

Brojne biljne bolesti mogu da smanje ili ugroze uspešnu proizvodnju paprike, ometajući normalan razvoj biljke što dovodi do smanjenog prinosa i pogoršanja kvaliteta plodova. U rano zaraženih biljaka, gubici u prinosu su posebno izraženi i mogu se kretati od 60% do 100% (Šutić, 1995, Krstić i Bulajić, 2008). Zbog značajnih šteta koje često prouzrokuju, viroze paprike su predmet proučavanja mnogih autora u svetu (Choi et al., 2005, Ozaslan et al., 2006). Od opisanih 68 vrsta virusa infektivnih za papriku (Pernezny et al., 2003), kao najznačajniji i najrasprostranjeniji virusi paprike u mediteranskom basenu navode se: virusi koji se prenose vašima na neperzistentan način, uključujući viruse roda *Potyvirus* (virus crtičastog mozaika krompira, *Potato virus Y*, PVY), *Cucumovirus* (virus mozaika krastavca, *Cucumber mosaic virus*, CMV) i *Alfavirus* (virus mozaika lucerke, *Alfalfa mosaic virus*, AMV), zatim virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) koji se prenosi tripsima, kao i virusi roda *Tobamovirus* koji se prenose mehanički i semenom paprike (virusa blagog šarenila paprike-*Pepper mild mottle virus*, PMMoV, virus mozaika duvana-*Tobacco mosaic virus*, TMV, virus mozaika paradajza-*Tomato mosaic virus*, ToMV i virus svetlozelenog mozaika duvana-*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) (Moury and Verdin, 2012).

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) je član roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* (Rodríguez-Alvarado et al., 1995). Oboljenje koje ovaj virus izaziva je geografski široko rasprostranjeno i otkriveno je u Evropi, Australiji, Severnoj Americi (Zitikaitė and Samuitienė, 2009). Smatra se da je prisutan svuda gde se gaje osetljivi domaćini, mada je pojava oboljenja, koje ovaj virus prouzrokuje, najizraženija u umerenom klimatskom regionu (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008), gde su povoljni uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši (Shew and Lucas, 1991; Palukaitis et al., 1992). CMV se prenosi na neperzistentan način sa više od 80 vrsta vaši, a najefikasniji vektori su mu vrste *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008). Virus mozaika krastavca ima veoma širok krug domaćina koji uključuje preko 1300 vrsta iz više od 500 rodova i 100 botaničkih familija, među kojima su neki značajni povrtarski i ratarski usevi, ukrasne biljke i biljke spontane flore.

S obzirom na to da virusi svake godine smanjuju prinose i kvalitet paprike u Srbiji, a pojedinih godina se javljaju u epidemijama, praćenje prisustva, učestalosti i rasprostranjenosti pojedinih virusa, značajno je za izbor i sprovođenje adekvatnih mera kontrole u proizvodnji paprike. Osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se ispita prisustvo i zastupljenost virusa paprike, kao i detaljna karakterizacija CMV određivanjem genetičke sličnosti naših izolata sa izolatima iz ostalih delova sveta.

## MATERIJAL I METOD RADA

Sakupljanje uzoraka paprike. Utvrđivanje rasprostranjenosti i učestalosti pojave virusa u usevu paprike u periodu 2009-2010. godine obuhvatilo je pregled većeg broja lokaliteta gajenja paprike u različitim područjima u Srbiji. Ukupno je sakupljeno i analizirano 365 uzoraka biljaka paprike gajene na otvorenom polju, od toga, u 2009. godini je pregledano 16 lokaliteta i tom prilikom sakupljeno 207 uzoraka, dok je 2010. godine, pregledano 15 lokaliteta i sakupljeno 168 uzoraka paprike sa simptomima koji su ukazivali na virusnu zarazu. Uzorci su do analize čuvani na temperaturi od -80°C.

Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA). Za detekciju virusa u usevu paprike korišćena je direktna imunoenzimska metoda na ploči po protokolu koji su opisali Clark and Adams (1977) korišćenjem antiseruma specifičnih za detekciju devet virusa paprike: AMV, PVY, CMV, TSWV, virusa šarenila paprike (*Pepper mottle virus*, PepMoV), virusa šarenila nerava paprike (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV), PMMoV, TMV i virusa mozaika krompira (*Potato virus X*, PVX) (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka). Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u razređenju 1:20. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), nakon 1-2 sata vršeno je merenje apsorpcije svetlosti talasne dužine 405 nm, a pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti ekstinkcije dva i više puta veće od vrednosti ekstinkcije negativne kontrole.

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR). Metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije CMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama. Za ova ispitivanja odabrana su tri uzorka paprike PL-25-09 (Velika Plana), PL-43-09 (Smederevo) i PL-52-09 (Kikinda) u kojima je prisustvo CMV prethodno dokazano DAS-ELISA testom. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ovog virusa poreklom iz tikava iz Srbije (GenBank Accession Number HM065509). Izolacija ukupne RNK iz lišća prirodno zaraženih biljaka paprike, obavljena je iz 100 mg zamrznutog lišća paprike čuvanog na -80°C primenom RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Detekcija CMV izvršena je primenom OneStep RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača, korišćenjem prajmera CMV Au1u (5'-CAT GGA TGC TTC TCC RCG AG-3') i CMV Au2d (5'-CGT AAG CTG GAT GGA CAA CC-3'), koji umnožavaju fragment dužine 847 bp koji obuhvata gen za proteinski omotač virusa (Krstić et al., 2002). RT-PCR reakcije obavljane su u 20 µl zapremine PCR smeše, koja je sadržavala: 4 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,8 µl dNTP mešavine (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smeši 400 µM), 0,8 µl Qiagen OneStep RT-PCR smeše enzima, po 1,2 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,6 µM, 11,2 µl RNase-free vode i 0,8 µl izolovanih ukupnih

RNA. Kao negativna kontrola korišćena je RNase free voda. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Eppendorf, Germany) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; denaturacija 30 s na 94°C, elongacija 30 s na 58°C i ekstenzija 30 s na 72°C (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min. Uzorci su elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida (0,5 µl/ml) i pomatrani na UV transiluminatoru. Pojava traka očekivane veličine od 847 bp u poređenju sa markerom, smatrana je pozitivnom reakcijom.

Nakon uslužnog prečišćavanja i sekvenciranja u oba smera, prajmerima koji su korišćeni i u RT-PCR reakciji, dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0. (Thompson et al., 1994), međusobno upoređene korišćenjem MEGA verzije 5.0 (Tamura et al., 2011) i dobijene konsenzus sekvence podnete u GenBank banku podataka, posle čega im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number). Dobijene sekvence najpre su identifikovane korišćenjem BLAST analize (Basic Local Alignment Search Tool), a zatim je obavljeno i višestruko poređenje i proračun genetičke sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka korišćenjem MEGA 5.0.

## REZULTATI I DISKUSIJA

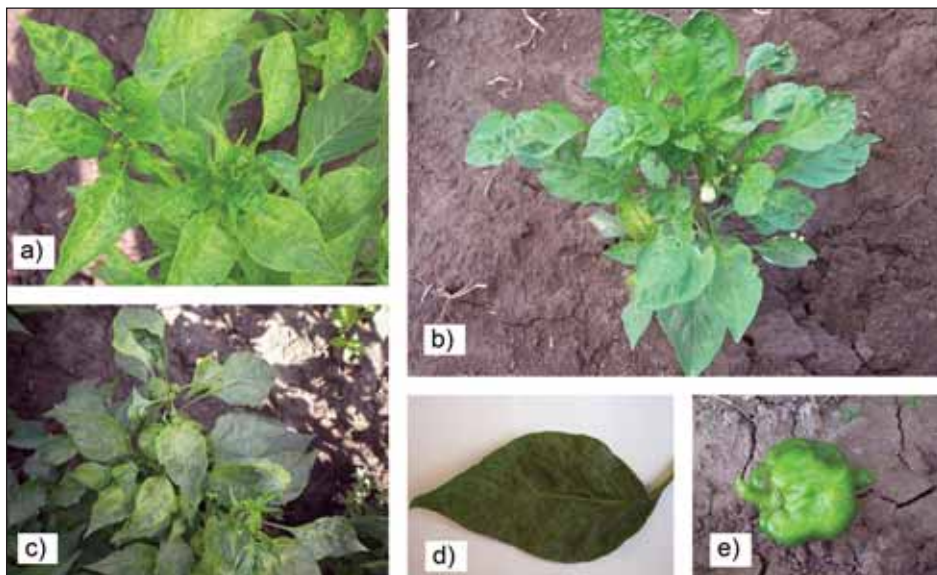
**Simptomi u polju.** Pregledom useva paprike u različitim lokalitetima gajenja u polju, utvrđena je pojava različitih simptoma koji su ukazivali na virusnu infekciju. Biljke su često zaostajale u porastu i poprimale žbunast izgled. Na lišću obolelih biljaka zabeleženi su različiti tipovi mozaika, od blagog do izraženog. Lišće je bilo sitnije, slabo naborano, sa hlorotičnim promenama koje su često bile praćene pojavom izumiranja tkiva u vidu nekroze nerava lista i nekrotičnih pega na stablu. Na plodovima su se takođe mogle uočiti promene u vidu kržljivosti, deformisanosti, nekroze površinskog tkiva, a često su bile prisutne i linearne beličaste ili žučkaste pruge (Tablo I). Simptomi koje virusi prouzrokuju na paprici su mnogobrojni, raznovrsni i često dijagnostički nesigurni.

Različiti virusi mogu prouzrokovati slične simptome, kao i isti virus različite tipove simptoma u zavisnosti od osetljivosti sorte, fenofaze razvoja u kojoj je došlo do infekcije i uslova spoljašnje sredine (Ozaslan et al., 2006), tako da se precizna i pravilna detekcija virusa ne može obaviti samo na osnovu simptomatologije.

Simptomi uočeni tokom ovih istraživanja u saglasnosti su sa ranije opisanim simptomima viroza paprike u našoj zemlji (Krstić i Bulajić, 2008; Mijatović i sar., 2007, Tomić i sar., 2007).

**Serološka detekcija virusa.** U usevima paprike gajene na otvorenom polju, tokom 2009. godine, na većini ispitivanih lokaliteta intenzitet zaraze kretao se od 5% do 15%, ali u nekim lokalitetima zabeležena je visoka incidenca simptoma čak i do 70%. Najrasprostranjeniji virus 2009. godine bio je PVY koji je bio prisutan u 14 od 16 ispitivanih lokaliteta. Pored toga, PVY je bio najzastupljeniji virus, njegovo prisustvo bilo je značajno kako u pojedinačnoj (25,6%) tako i u mešanoj (25,6%) zarazi. Drugi

virus zabeležen u nešto nižem procentu bio je CMV (15,5% u pojedinačnoj i 21,7% u mešanoj zarazi), zastupljen u 13 ispitivanih lokaliteta. Prisustvo AMV zabeleženo je u 10 lokaliteta i to u 21,7% testiranih uzoraka, dok je prisustvo PMMoV detektovano u samo 1,45% testiranih uzoraka i to samo u mešanoj infekciji sa dva ili tri virusa. Pojedinačne infekcije bile su zastupljenije i zabeležene u 56,5%, dok su mešane infekcije dokazane u 26,6% tetiranih uzoraka (Tabela 1). Najčešća mešana infekcija bila je sa dva najzastupljenija virusa, PVY i CMV (18,8%), dok je kod četiri uzorka (1,9%) dokazano prisustvo mešane infekcije tri virusa (Tabela 2). Prisustvo TMV, TSWV, PepMV, PVMV i PVX nije utvrđeno ni u jednom testiranom uzorku.



**Tablo I.** a) PVY: hlorotično prosvetljavanje nerava b) CMV: klobučavost listova c) AMV: hlorotične beličaste površine na listovima d) PMMoV: blagi mozaik e) CMV: deformacija ploda.

Tokom 2010. godine, pregledano je 158 lokaliteta i tom prilikom procenjen je intenzitet zaraze koji se kretao se od 5 do 10%. Najzastupljeniji virus bio je CMV. U pojedinačnoj zarazi bio je zastupljen u 35,4% testiranih biljaka, a u mešanoj u 17,7% tetiranih uzoraka. Njegovo prisustvo dokazano je u 12 od 15 pregledanih lokaliteta. Drugi virus po zastupljenost zabeležen u nešto nižem procentu, bio je PVY. U pojedinačnoj zarazi bio je prisutan u 25,3%, dok je u mešanoj zarazi dokazan u 17,7% testiranih uzoraka, ali je bio prisutan u svim ispitivanim lokalitetima. Prisustvo AMV je dokazano u 10 lokaliteta i to u 17,7% testiranih uzoraka. Tokom ove godine prisustvo PMMoV je zabeleženo i u pojedinačnoj zarazi (0,6%), kao i u mešanoj infekciji dva virusa. Pojedinačne infekcije bile su zastupljenije i zabeležene su u 74,7%, dok su mešane infekcije dokazane u 19,6% tetiranih uzoraka (Tabela 1). Tokom 2010. godine, bila je prisutna samo mešana infekcija dva virusa. Najčešća

mešana infekcija bila je sa dva najzastupljenija virusa, PVY i CMV (14,6%) (Tabela 2). Prisustvo TMV, TSWV, PepMV, PVMV i PVX nije utvrđeno ni u jednom testiranom uzorku.

U usevima paprike gajene na otvorenom polju, tokom 2010. godine, zabeležen je nešto veći procenat (88%) zaraženih biljaka u odnosu na 2009. godinu (83%). Najzastupljeniji virus tokom ove dve godine bio je PVY, prisutan u 47,7% testiranih uzoraka. Slede, CMV (44,%), AMV (20%), dok je PMMoV zabeležen samo u 1,4% testiranih uzoraka. Prisustvo mešane infekcije zabeleženo je u 21,9% testiranih uzoraka, dok je najčešća mešana infekcija u obe godine ispitivanja bila sa PVY i CMV, u 17% testiranih biljaka.

Ovako značajno prisustvo PVY u obe godine ispitivanja, značajno se razlikuju u odnosu na 1999. godinu kada je PVY bio treći po zastupljenosti (Mijatović i sar., 1999) i 2007. godinu kada njegovo prisustvo nije ustanovljeno (Tomić i sar., 2007). Proučavanja vezana za zastupljenost CMV tokom različitih godina, pokazuju njegovu stalnu visoku zastupljenost u usevima paprike u našoj zemlji. Istaživanja vršena tokom 1999. (Mijatović i sar., 1999) i 2007. godine (Tomić i sar. 2007) govore o njegovoj dominantnosti u usevu paprike, što predstavlja slične rezultate dobijene u našim istraživanjima. Ovako značajna zastupljenost CMV dokazana je i u drugim područjima gajenja paprike u svetu (Gaborjanyia et al., 1998, Sepulveda et al., 2005). AMV je dokazan u manjem broju uzoraka u odnosu na CMV i PVY ali je ovaj virus stalno prisutan u usevu paprike, što potvrđuju i ranija istraživanja (Mijatović i sar. 1999, Tomić i sar. 2007). PMMoV je virus koji je ustanovljen 1996. godine u našoj zemlji (Krstić i sar., 1996), i može se reći da se nije znatnije raširio, s obzirom na to da je u našim istraživanjima nađen u veoma malom procentu. Razlog tome može biti pre svega što je virusu PMMoV jedini domaćin paprika.

**Molekularna detekcija i identifikacija.** Rezultati seroloških analiza prisustva CMV u usevu paprike u Srbiji potvrđeni su primenom molekularne RT-PCR metode i specifičnih prajmera CMV Au1u i Au2d. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, kod sva tri ispitivana uzorka ustanovljeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 847 bp. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.

Nakon sekvenciranja korišćenjem istog para prajmera Au1u/Au2d kao u RT-PCR reakciji i obrade u ClustalW programu dobijena je, sekvenca kompletnog CP gena i delimična sekvenca 5' i 3' UTR regiona subgenomne RNA 4 odabranih uzoraka. Dobijene sekvence CP gena odabranih uzoraka (KC288146 za izolat PL-25-09, KC288147 za izolat PL-43-09 i KC288148 za izolat PL-52-09), upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata CMV dostupnih u GenBank bazi podataka. Proračun genetičke sličnosti CP gena, pokazao je visok stepen nukleotidne (98,1-99,7%) i aminokiselinske (98,6-100%) homologije između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona.

**Tabela 1.** Prisustvo AMV, CMV, PVY, PMMoV u pojedinačnoj i ukupnoj zarazi u paprici u Srbiji

Godina	Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna/ukupna zaraza (%)				Bez prisustva testiranih virusa (%)
			AMV	CMV	PVY	PMMoV	
2009	Selenča	10	50/50	0/0	0/0	0/0	50
	Ravno Selo	15	33,3/53,3	0/20	20/53,3	0/0	13,3
	Đurđevo	15	0/0	26,7/53,3	26,7/53,3	0/0	20
	Bačka Palanka	15	20/33,3	0/0	53,3/66,7	0/0	13,3
	Veternik	9	0/11,1	0/77,8	22,2/100	0/0	0
	Horgoš I	10	60/60	0/0	20/20	0/0	20
	Horgoš II	5	0/20	20/100	0/80	0/0	0
	Senta	20	25/25	15/15	35/35	0/0	25
	Čonoplja	9	0/0	0/11,1	66,7/100	0/33,4	0
	Velika Plana	15	20/33,3	46,7/60	0/0	0/0	20
	Smederevo	15	0/0	46,7/86,7	13,3/53,3	0/0	0
	Kraljevo	15	0/0	0/26,7	53,3/80	0/0	20
	Trstenik	10	0/0	40/40	40/40	0/0	20
	Čačak	15	0/0	26,7/66,7	0/40	0/0	20
	Indija	15	0/26,7	0/26,7	33,3/86,7	0/0	13,3
Aleksinac	14	35,7/35,7	14,3/42,9	14,3/42,9	0/0	0	
<b>Ukupno</b>		<b>207</b>	<b>15,5/21,7</b>	<b>15,5/37,2</b>	<b>25,6/51,2</b>	<b>0/1,45</b>	<b>17</b>
2010	Đurđevo	7	14,3/14,3	0/0	57,1/57,1	14,3/14,3	14,3
	Bački Jarak	10	0/10	40/70	20/40	0/0	10
	Bukovac	10	0/0	10/40	50/80	0/0	10
	Rimski Šančevi	10	20/30	30/60	20/40	0/0	0
	Bačka Topola	15	26,7/26,7	40/60	0/20	0/0	13,3
	Ruma	15	0/0	60/60	13,3/13,3	0/0	26,7
	Vašica	7	14,3/14,3	14,3/71,4	14,3/71,4	0/0	0
	Šabac	10	20/30	0/10	40/	0/60	20
	Horgoš	15	6,7/13,3	53,3/80	13,3/40	0/0	0
	Kikinda	7	0/0	71,4/71,4	14,3/14,3	0/0	14,29
	Čonopla	15	0/0	71,4/53,3	46,7/66,7	0/6,7	0
	Smederevo	5	0/0	0/0	100/100	0/0	0
	Užice	10	30/50	0/0	0/20	0/0	50
	Aleksinac	12	8,3/16,7	58,3/66,7	16,7/16,7	0/0	8,3
Valjevo	10	20/20	30/40	20/40	0/0	10	
<b>Ukupno</b>		<b>158</b>	<b>13,3/17,7</b>	<b>35,4/53,2</b>	<b>25,3/43,0</b>	<b>0,6/1,3</b>	<b>12</b>
<b>Ukupno za obe godine</b>		<b>365</b>	<b>14,5/20</b>	<b>24,1/44,1</b>	<b>25,5/47,7</b>	<b>0,3/1,4</b>	<b>14,8</b>

Proračunom genetičke sličnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je najviši stepen nukleotidne sličnosti između izolata PL-43-09 i PL-52-09 (99,5%), izolat PL-52-09 ima stepen identičnosti 99,4% sa izolatom PL-25-09, dok je između izolata PL-43-09 i PL-25-09 stepen nukleotidne sličnosti 99,2%. Izolat PL-43-09 pokazuje najviši stepen nt sličnosti 99,5% (100% aa) sa dva izolata iz Amerike (U20668 i D10538) i po jednim izolatom iz Australije (U22821) i Španije

(AM183119). Izolat PL-25-09 najveću nt sličnost od 99,7% (100% aa) pokazao je sa dva izolata iz Amerike (U20668 i D10538) i po jednim izolatom iz Australije (U22821) i Srbije (GQ340670), dok PL-52-09 najveću nt sličnost 99,7% (100% aa) deli sa dva izolata iz Amerike (U20668 i D10538), i jednim izolatom iz Australije (U22821).

Visok stepen nukleotidne sličnosti izolata CMV dokazan je i kod izolata poreklom iz tikava iz Srbije (Vučurović et al., 2012).

**Tabela 2.** Prisustvo mešane infekcije AMV, CMV, PVY, PMMoV u paprici u Srbiji

Godina	Mešana infekcija dva virusa		Mešana infekcija tri virusa	
	Virusi	Zaraženi uzorci*	Virusi	Zaraženi uzorci
2009	PVY+AMV	8/3,9	AMV+PVY+CMV	3/1,5
	PVY+CMV	39/18,8	PVY+PMMoV+CMV	1/0,5
	AMV+CMV	2/1		
	PVY+PMMoV	2/1		
Ukupno		51/13,6		4/1,1
2010	PVY+AMV	3/1,8		
	PVY+CMV	23/13,7		
	AMV+CMV	3/1,8		
	AMV+PVY	1/0,6		
	PVY+PMMoV	1/0,6		
<b>Ukupno</b>		<b>31/8,3</b>		
<b>Ukupno za obe godine</b>		<b>82/21,9</b>		<b>4/1,1</b>

\*broj uzoraka sa mešanom infekcijom/% zaraženih uzoraka mešanom infekcijom

## ZAKLJUČAK

Obavljena ispitivanja zastupljenosti najznačajnijih virusa paprike na više lokaliteta u Srbiji, ukazala su da se virusi redovno javljaju u usevima paprike gajenim na otvorenom polju. Tokom dvogodišnjih istraživanja detektovano je prisustvo četiri virusa: PVY, CMV, AMV i PMMoV i to kako u pojedinačnim tako i u mešanim zarazama. Najzastupljeniji virusi paprike bili su PVY i CMV, dok su ostali virusi zastupljeni u manjem procentu.

Ostvareni rezultati ukazuju na značajno prisustvo virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način te je zbog toga neophodno uključiti odgovarajuće integralne mere kontrole virusnih zaraza u proizvodnji paprike, koje obuhvataju i kontrolu vektora detektovanih virusa, biljnih vaši, pored primene drugih preventivnih i sanitarnih mera.

## Zahvalnica

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta TR31030 i III 43001 koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.



## LITERATURA

- Clark M. F. and Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483
- Choi S. G., Kim H. J., Lee H. D., Kim S. J. and Ryu H. K. (2005): Occurrence and distribution of viruses infecting pepper in Korea. *J. Plant Pathol.* 21 (3): 258-261
- Gaborjanyi R., Horvath J., Kovacs J. and Kazinczi G. (1998): Role of viruses in pepper decline in Hungary. X<sup>th</sup> Eucarpia meeting on Capsicum and Eggplant, Avignon, France, 129-132.
- Garcia-Arenal F. and Palukaitis P. (2008): Cucumber mosaic virus. *Encyclopedia of Virology*, 1:614-619.
- Greenleaf W. H. (1986): Pepper Breeding in Breeding Vegetable Crops. M. J. Basset et AVI publishing Co inc. Wesport Connecticut (USA): 67-133.
- Krstić B., Krnjaja V., Mijatović M. i Tošić M. (1996): Virus blagog šarenila paprike prisutan u Srbiji. Zbornik kratkih sadržaja Prvog balkanskog simpozijuma Povrće i krompir: 164.
- Krstić B., Berenji J., Dukić N., Vico I., Katis N. I. and Papavassiliou C. (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, 103: 57-65.
- Krstić B. i Bulajić A. (2008): Ekonomski značajni i karantinski virusi paprike u Srbiji. Zbornik radova IX Savetovanja „Savremena proizvodnja povrća”, Novi Sad, 24-28.
- Mijatović M., Obradović A., Ivanović M. i Stevanović D. (1999): Rasprostranjenost i intenzitet pojave nekih virusa parazita paprika u Srbiji. *Zaštita bilja*, 50 (2): 151-159,
- Mijatović M., Obradović A. i Ivanović M. (2007): Zaštita povrća. *AgroMivas*, Smederevska Palanka, 93-99.
- Moury B. and Verdin E. (2012): Viruses of Pepper Crops in the Mediterranean Basin: A Remarkable Stasis. *Advances in Virus Research*, Volume 84: 127-162.
- Ozaslan M., Bas B., Aytakin T. and Sigirci Z. (2006): Identification of Pepper viruses by Das-Elisa Assays in Gaziantep-Turkey. *J. Plant Pathol.* 5 (1): 11-14.
- Palukaitis P., Roossinck M. J., Dietzgen R. G. and Francki R. I. B. (1992): *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.*, 41: 281-349.
- Pernezny K. L., Roberts P. D., Murphy J. F. and Goldberg N. P. (2003): Compendium of pepper diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Rodriguez-Alvarado G., Kurath G. and Dodds J. A. (1995): Heterogeneity in pepper isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Disease*, 79: 450-455.
- Sepulveda P., Larrain P., Quiroz C., Rebufel P. and Grana F. (2005): Identification and incidence of pepper viruses in north central Chile and its association with vectors. *Agric. Tecnica* 65: 235-245.
- Shew H. D. and Lucas G. B. (1991): Compendium of Tobacco Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Šutić D. (1995): Viroze biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Politop-P, Beograd.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.

- Tomić Đ., Jeremić S., Simić A., Petković N., Đekić I., Bulajić A. i Krstić B. (2007): Status viroza paprika u Srbiji. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 107-108
- Vučurović A., Bulajić A., Stanković I., Ristić D., Berenji J., Jović J. and Krstić B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of Zucchini yellow mosaic virus isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 935-947.
- Zitikaitė I. and Samuitienė M. (2009): Detection and characterization of Cucumber mosaic virus isolated from sweet peppers. *Scientific works of the lithuanian institute of horticulture and lithuanian university of agriculture. Sodininkystė ir daržininkystė*, 28(3): 281-288.

### Abstract

## PRESENCE AND DISTRIBUTION OF PEPPER VIRUSES IN SERBIA

**Dragana Milošević<sup>1</sup>, Ivana Stanković<sup>2</sup>, Maja Ignjatov<sup>1</sup>,  
Zorica Nikolić<sup>1</sup>, Branka Krstić<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

<sup>2</sup>University of Belgrade-Faculty of Agriculture, Belgrade

E-mail: dragana.milosevic@nsseme.com

A two-year investigation (2009-2010) of the presence and distribution of pepper viruses in Serbia revealed that viruses occur each year in open-field pepper production. Serological analyses of collected pepper samples using DAS-ELISA test detected the presence of four viruses: *Potato virus Y* (PVY), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), which occurred in single or mixed infections. In 2009 the most frequent was PVY (51.21%), while in 2010 CMV was prevalent (50%). Survey of pepper crops in different growing regions indicated the occurrence of a number of symptoms on leaves, stem, flowers and fruit, which resembled those of virus infection, but it was not possible to determine their association with detected virus. Molecular detection of CMV was performed by RT-PCR using specific primers CMV Au1u/Au2d that flank the AMV coat protein gene, as well as part of 5' and 3' non-coding region of subgenome RNA4. Amplified fragments were sequenced, deposited in the GenBank, and assigned by accession numbers, KC288146 (PL-25-09), KC288147 (PL-43-09) and KC288148 (PL-52-09). Sequence analysis, conducted with MEGA5 software, revealed 99,2-99,5% nt identity between the three Serbian CMV isolates from pepper. The sequences of CMV isolates from Serbia share the highest nucleotide and amino acid identity with isolates from America, Australia, Spain and Serbia.

**Key words:** pepper, viruses, DAS-ELISA test, RT-PCR, sequencing