

ZASTUPLJENOST I MOLEKULARNA DETEKCIJA VIRUSA MOZAIKA KRSTAVCA U USEVU DUVANA

Đekić, Ivana*, Bulajić, Aleksandra*, Jović, Jelena**, Krnjajić, S.**,
Vučurović, Ana*, Berenji, J.***, Krstić, Branka*

IZVOD

Trogodišnjim proučavanjima pojave i rasprostranjenosti virusa duvana u Srbiji utvrđeno je da se virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) javlja svake godine sa različitom učestalošću. Tokom 2007. godine na dva lokaliteta gajenja utvrđena je njegova prevalentnost kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama u odnosu na sve ostale ekonomski značajne viruse duvana. Usled promena u vidu izraženih simptoma na lišću i kržljivosti biljaka, CMV značajno utiče na smanjenje prinosa i kvaliteta lišća pa se smatra izuzetno važnim virusom duvana za našu zemlju. Stalno prisustvo CMV u usevu duvana i pripadnost grupi ekonomski štetnih virusa uslovlili su potrebu za razvijanjem brzog i pouzdanog protokola za molekularnu detekciju koji bi bio primenljiv u dijagnostičkim laboratorijama u našoj zemlji. U toku ovih istraživanja razvijen je i optimiziran brz i precizan protokol za molekularnu detekciju CMV u lišću duvana primenom specifičnih prajmera CMVAu1u/CMVAu2d i komercijalnih kitova za ekstrakciju totalne RNA i RT-PCR. Korišćenjem ovih prajmera, čije se mesto vezivanja na genomu CMV nalazi na granicama gena za proteinski omotač, umnožen je fragment dužine od 847 bp. Dobijeni rezultati ukazuju da se razvijeni postupak za molekularnu identifikaciju može uspešno koristiti za detekciju CMV izolata iz Srbije u duvanu. Serološki metodi i dalje predstavljaju metod izbora za masovna testiranja velikog broja uzoraka, ali razvijeni protokol molekularne identifikacije predstavlja, zbog svoje izuzetne osetljivosti i specifičnosti, sredstvo za potvrdu rezultata dobijenih drugim metodima, kao i metod za dokazivanje virusa u niskoj koncentraciji i način za karakterizaciju CMV izolata poreklom iz Srbije.

Ključne reči: duvan, virus mozaika krastavca, učestalost, ELISA, RT-PCR

UVOD

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) je tipičan predstavnik jednog od tri roda familije Bromoviridae, po kome je rod i dobio ime, *Cucumovirus* (Murphy et al., 1995).

* Ivana Đekić, dipl. inž., dr Aleksandra Bulajić, Ana Vučurović, dipl. inž., prof. dr Branka Krstić, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

** Jelena Jović, dipl. biolog, dr Slobodan Krnjajić, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine biljaka, Beograd-Zemun

*** Dr Janoš Berenji, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Prvi put je otkriven 1919. godine kao prouzročivač mozaika na krastavcu (Francki et al., 1979), po čemu je i dobio ime. Od tada, CMV se proširio u mnoge delove sveta i identifikovan je kao uzročnik brojnih epidemija kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama (Palukaitis et al., 1992). CMV je jedan od ekonomski najvažnijih virusa koji prouzrokuje više od stotinu oboljenja na 1000 biljnih vrsta svrstanih u oko 100 familija (van Regenmortel et al., 2000).

CMV se ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa, ali njegovo dominantno rasprostranjenje vezuje se za umereno tople regione gde su povoljni uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši (Shew, Lucas, 1991; Palukaitis et al., 1992). Jedan je od najznačajnijih virusa duvana u Aziji i Evropi, naročito Španiji, gde izaziva značajne gubitke u proizvodnji (Shew, Lucas, 1991). Virus mozaika krastavca prisutan je na duvanu i u našoj zemlji. Prva ispitivanja rasprostranjenosti virusa duvana iz 1960. godine (Tošić, 1960), na parcelama ogledne stanice Duvanskog instituta, ukazali su na dominantnu pojavu CMV. U ovim istraživanjima je utvrđeno da je virus bio prisutan na čak 89% biljaka duvana. Slični rezultati dobijeni su i u istraživanjima koja su sprovedeli Jasnić et al. (2000) i koja upućuju na značajno prisustvo ovog virusa na duvanu u našoj zemlji u periodu od 1995. do 1999. godine. U periodu od 2002. do 2005. godine zastupljenost je bila manja, tako da je CMV bio prisutan u usevu duvana, međutim ne u značajnoj meri i nije predstavljao opasnost za proizvodnju duvana kod nas (Dukić et al., 2006). Novija ispitivanja pojave i rasprostranjenosti virusa duvana u našoj zemlji ukazuju na ponovno širenje ovog virusa u usevu duvana, tako da je tokom 2007. godine, CMV bio prevalentan virus na mnogim lokalitetima gajenja duvana (Đekić et al., 2008).

Obzirom da CMV pripada grupi ekonomski važnih virusa duvana u Srbiji i da je uočeno njegovo ponovno progresivno širenje, cilj ovog rada bio je da se ispita njegova zastupljenost na važnijim lokalitetima gajenja duvana u Srbiji. Pored toga, u cilju dobijanja što pouzdanijih, bržih i osetljivijih rezultata detekcije, cilj sprovedenih ispitivanja bio je da se osim serološke identifikacije CMV u usevu duvana, razvije protokol za njegovu molekularnu detekciju u prirodno zaraženim biljkama duvana.

MATERIJAL I METODI RADA

Sakupljanje uzoraka duvana

U toku 2005. godine pregledani su usevi duvana i sakupljeni uzorci sa simptomima virusnih infekcija na pet lokaliteta gajenja duvana i to: Bački Petrovac, Futog, Begeč, Beška i Mladenovac. Ukupno je sakupljeno 73 uzorka duvana sa različitim tipovima simptoma.

U 2006. godini pregledano je sedam lokaliteta: Futog, Kuzmin, Bačinci, Kukujevci, Hrtkovci, Golubinci i Beška. Tokom pregleda sakupljeno je 107 uzoraka sa simptomima virusnih zaraza.

Tokom 2007. godine, obavljen je pregled useva duvana na 10 lokaliteta gajenja u Srbiji i sakupljeno 132 uzorka lišća. Na tri lokaliteta, Bački Petrovac, Futog i Mladenovac usev duvana je bio sa visokim intenzitetom zaraze, pa je sakupljen određen broj uzoraka sa izraženim virusnim simptomima. Na ostalim 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.

Direktni imunoenzimski metod na ploči (DAS–ELISA) primenom poliklonalnih antitela

Prikupljeni uzorci duvana sa simptomima testirani su DAS–ELISA metodom (Clark, Adams, 1977) primenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju šest virusa: virusa crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virusa mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (Loewe Biochemica GmbH) 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 su pripremani homogenizacijom 1 g lišća sa 5 ml ekstrakcionog pufera. Nakon dva časa od dodavanja supstrata p–nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASsrl, Italy), merenjem absorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti absorpcije dva i više puta veće od vrednosti absorpcije negativne kontrole.

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT–PCR)

RT–PCR metod primenjen je u cilju molekularne detekcije CMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata sa različitih lokaliteta, izolat 650–07 (Bački Petrovac) i 702–07 (Futog) čija je identifikacija obavljena DAS–ELISA testom. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ovog virusa iz paradajza (746–07) (Krstić et al., 2007), koji je održavan u biljkama *Nicotiana tabacum* cv. Samsun u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija ukupnih RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka duvana, kao i iz test biljaka duvana na kojima je održavan izolat CMV poreklom iz paradajza, obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit–a (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Za izolaciju ukupnih RNA iz lišća duvana izolata 650–07 i 702–07 korišćeno je 100 mg zamrznutog biljnog materijala prethodno čuvanog na –80°C, a ukupne RNA izolata CMV koji je predstavljao pozitivnu kontrolu izolovane su iz svežeg lista. Ukupna izolovana RNA korišćena je kao matrica za reverznu transkripciju (RT) i lančanu reakciju polimeraze (PCR) 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 segment DNK finalne dužine 847 bp koji obuhvata kodirajući gen za proteinski omotač virusa (Krstić et al., 2002).

Detekcija CMV izvršena je primenom OneStep RT–PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša za RT–PCR (25 µl) sadržavala 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. Da bi se eliminisala mogućnost unakrsne kontaminacije tokom pripreme uzoraka, korišćena je negativna kontrola koju su predstavljali svi reagensi potrebni za umnožavanje

DNA, ali je umesto 1 µl uzorka dodat 1 µl molekularne vode. Osim ove negativne kontrole, u analizu je uključen i uzorak pripremljen iz zdravog lišća duvana. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 50°C 30 min; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 95°C 15 min; denaturacija 94°C 30 s, elongacija 58°C 30 s, ekstenzija 72°C 30 s (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Uzorci su elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidi-jum-bromida finalne koncentracije 0,5 µg/ml i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine 847 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplicona korišćen je marker, MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

REZULTATI

Simptomi u polju

Na svim pregledanim lokalitetima tokom 2005. i 2006. godine intenzitet zaraze virusima je bio preko 50%. Najčešće uočeni simptomi na lišću duvana bili su: blagi mozaik, upadljivo šarenilo tipa mozaika, mrežasti mozaik, hrastoliko prošaravanje, žutilo nerava, zadržavanje zelene boje oko nerava, nekroza nerava, žutilo, crvenkastosmeđa (bakarna) obojenost, nekrotične i hlorotične pege i šare, nekroza ili hloroza delova ili celih listova, kao i naboranost, kovrdžavost, uvijanje i sužavanje liski. Tokom 2005. godine na lokalitetima Begeč i Mladenovac i 2006. godine na lokalitetu Bačinci najčešći simptomi bili su pojava mozaika i deformacije listova u vidu klobučavosti.

U toku 2007. godine pregledom 10 lokaliteta gajenja duvana u Srbiji zabeležena je izražena pojava virusnih simptoma na samo tri lokaliteta. Na lokalitetu Bački Petrovac i Futog procenjen je intenzitet zaraze od 80%, a glavni simptomi su bili izražena kržljivost mozaičnih biljaka, mozaik sa naboranim i klobučavim lišćem i suženost liske. Na lokalitetu Mladenovac, gde je intenzitet zaraze bio 90%, zabeležen je drugi tip simptoma u vidu hrastolikog mozaika ili šara nalik na list paprati, nekrotičnih pega i šara na nervima ili između njih, koncentričnih hlorotičnih ili nekrotičnih pega, sivobeličastih nekroza okruženih smeđim nekrotičnim crticama ili pucanja lisnog tkiva usled neravnomernog porasta lista.

Serološka detekcija i zastupljenost virusa mozaika krastavca u usevu duvana

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa mozaika krastavca, na pet lokaliteta, tokom 2005. godine, virus je detektovan na tri lokaliteta (tab. 1), a bio je prisutan u pojedinačnim (2,74%) ili mešanim infekcijama sa TSWV, PVY ili TMV. Od 73 testirana uzorka simptomatičnih biljaka duvana, CMV je detektovan u devet (12,33%). Najveća zastupljenost CMV bila je na lokalitetu Mladenovac, gde je virus detektovan u čak 54,14% sakupljenih uzoraka kao i na lokalitetu Begeč (42,86%) u uzorcima sa simptomima mozaika i izražene klobučavosti liske (sl. 1).

Tab. 1 Prisustvo i procentualna zastupljenost CMV u pojedinačnim ili mešanim infekcijama u usevu duvana 2005. godine

Tab. 1 CMV presence and percentage of frequency in single and mixed infections during year 2005

Lokalitet (Broj uzoraka) <i>Locality (Number of samples)</i>	Pojedinačna zaraza <i>Single infection</i>	Mešana zaraza – <i>Mixed infection</i>			Ukupna zaraza <i>Total infection</i>
		TSWV+CMV	PVY+CMV	TMV+CMV	
B. Petrovac (29)	0/29* 0%	0/29 0%	0/29 0%	0/29 0%	0/29 0%
Futog (14)	0/14 0%	0/14 0%	1/14 7,14%	1/14 7,14%	2/14 14,28%
Begeč (7)	1/7 14,29%	0/7 0%	2/7 28,57%	0/7 0%	3/7 42,86%
Beška (16)	0/16 0%	0/16 0%	0/16 0%	0/16 0%	0/16 0%
Mladenovac (7)	1/7 14,29%	3/7 42,85%	0/7 0%	0/7 0%	4/7 54,14%
Ukupno (73) <i>Total</i>	2/73 2,74%	3/73 4,11%	3/73 4,11%	1/73 1,37%	9/73 12,33%

Legenda: *broj pozitivnih/ukupan broj testiranih uzoraka

Legend: *number of positive/total number of tested samples



Sl. 1 Mozaik i klobučavost lista duvana
Fig. 1 Mosaic and blistering of tobacco leaf

Na osnovu seroloških analiza uzoraka duvana prikupljenih tokom 2006. godine, prisustvo CMV je detektovano na četiri od sedam pregledanih lokaliteta (tab. 2), uglavnom u pojedinačnim infekcijama. U 3,74% uzoraka detektovana je mešana infekcija sa PVY. Od 107 sakupljenih i serološki testiranih uzoraka, prisustvo CMV je dokazano u 17 uzoraka (15,89%).

U najvećem procentu CMV je bio prisutan na lokalitetu Bačinci (41,67%) u biljkama sa simptomima mozaične kržljivosti biljaka (sl. 2).

Tab. 2 Procentualna zastupljenost CMV u pojedinačnim ili mešanim infekcijama u usevu duvana 2006. godine
 Tab. 2 CMV presence and percentage of frequency in single and mixed infections during year 2006

Lokalitet (Broj uzoraka) <i>Locality (Number of samples)</i>	Pojedinačna zaraza <i>Single infection</i>	Mešana zaraza <i>Mixed infection</i> PVY+CMV	Ukupna zaraza <i>Total infection</i>
Futog (24)	4/24* 16,67%	2/24 8,33%	6/24 25%
Kuzmin (9)	3/9 33,33%	0/9 0%	3/9 33,33%
Bačinci (12)	3/12 25%	2/12 16,67%	5/12 41,67%
Kukujevci (12)	3/12 25%	0/12 0%	3/12 25%
Hrtkovci (12)	0/12 0%	0/12 0%	0/12 0%
Golubinci (10)	0/10 0%	0/10 0%	0/10 0%
Beška (28)	0/28 0%	0/28 0%	0/28 0%
Ukupno (107) <i>Total</i>	13/107 12,15%	4/107 3,74%	17/107 15,89%

Legenda: *broj pozitivnih/ukupan broj testiranih uzoraka
 Legend: *number of positive/total number of tested samples



Sl. 2 Izražena kržljivost duvana i mozaik na lišću
 Fig. 2 Severe stunting of tobacco plant and mosaic on leaves

Tab. 3 Procentualna zastupljenost CMV u pojedinačnim ili mešanim infekcijama u usevu duvana 2007. godine
 Tab. 3 CMV presence and percentage of frequency in single and mixed infections during year 2007

Lokalitet (Broj uzoraka) <i>Locality (Number of samples)</i>	Pojedinačna zaraza <i>Single infection</i>	Mešana zaraza – <i>Mixed infection</i>								Ukupna zaraza <i>Total infection</i>
		PVY+CMV	CMV+TMV	CMV+AMV	CMV+TSWV	PVY+ CMV+ AMV	PVY+ CMV+ TMV	CMV+AMV+ TMV	TSWV+AMV + CMV + TMV	
B. Petrovac (42)	14/42* 33,37%	2/42 4,76%	4/42 9,52%	2/42 4,76%	2/42 4,76%	6/42 14,29%	0/42 0%	0/42 0%	2/42 4,76%	34/42 80,95%
Futog (16)	0/16 0%	0/16 0%	8/16 50,00%	0/16 0%	0/16 0%	0/16 0%	4/16 25,00%	2/16 12,50%	0/16 0%	14/16 87,50%
Golubinci (8)	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%
Bingula (6)	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%
Hrtkovci (9)	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%	0/9 0%
S. Mitrovica (7)	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%	0/7 0%
Bogatić (5)	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%	0/5 0%
Morović (6)	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%	0/6 0%
Zrenjanin (3)	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%
Mladenovac (30)	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%	0/30 0%
Ukupno (132) Total	14/132 10,61%	2/132 1,52%	12/132 9,09%	2/132 1,52%	2/132 1,52%	6/132 4,55%	4/132 3,03%	2/132 1,52%	2/132 1,52%	48/132 36,36%

Legenda: *broj pozitivnih/ukupan broj testiranih uzoraka

Legend: *number of positive/total number of tested samples

Tokom 2007. godine, od 10 pregledanih lokaliteta, CMV je detektovan samo na dva (tab. 3). U pojedinačnim infekcijama detektovan je na lokalitetu Bački Petrovac (33,37%), gde se javio i u mešanim infekcijama sa dva, tri ili čak četiri virusa (tab. 3). Procenat zaraze je bio visok na oba lokaliteta gde je utvrđeno prisustvo CMV. Na lokalitetu Bački Petrovac ustanovljeno je prisustvo CMV u 80,95% testiranih uzoraka, a na lokalitetu Futog u 87,50%. Virus je detektovan u biljkama duvana koje su ispoljavale blagi do izraženi mozaik, naboranost i klobučavost lišća, kao i u mozaičnim biljkama sa suženim liskama (sl. 3). Na lokalitetu Mladenovac, gde su biljke ispoljavale drugi tip simptoma, CMV nije dokazan. Ovaj virus nije

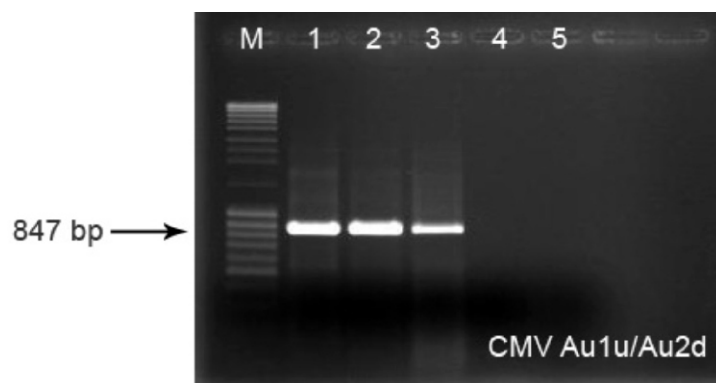
detektovan ni u biljkama duvana sakupljenim na drugim lokalitetima, a koje su ispoljavale netipične simptome u vidu smanjenog porasta i hloroze lišća.



Sl. 3 Mozaik i suženost liski
Fig. 3 Mosaic and leaf laminae narrowing

Molekularna detekcija virusa mozaika krastavca

Optimiziran je RT-PCR protokol za molekularnu detekciju CMV u lišću duvana. U odnosu na predhodno objavljene protokole (Rizos et al., 1992; Krstić et al., 2002) izvršeno je prilagođavanje potrebne koncentracije prajmera, broja ciklusa amplifikacije i temperature elongacije. Najveću osetljivost, specifičnost i prinos reakcije dao je protokol u kome je finalna koncentracija prajmera bila 0,6 μ M, broj ciklusa amplifikacije 35, a temperatura elongacija 58°C u trajanju od 30 s (sl. 4).



Sl. 4. Detekcija dva izolata CMV iz duvana pomoću one-step RT-PCR sa CMV Au1u/CMV Au2d prajmera. Kolone: M–MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1–izolat 746–07 iz paradajza, 2–izolat 650–07 iz duvana, 3–izolat 702–07 iz duvana, 4–negativna kontrola sa molekularnom vodom, 5–negativna kontrola sa zdravim lišćem duvana

Prisustvo CMV u dva uzorka duvana sa lokaliteta, Bački Petrovac i Futog potvrđeno je amplifikacijom gena koji kodira proteinski omotač virusa primenom specifičnih prajmera CMV Au1u/CMV Au2d. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka (izolati 650–07 i 702–07 iz duvana) i pozitivne kontrole (izolat 746–07 iz paradajza) sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine 847 bp (sl. 4), čiju amplifikaciju omogućavaju primenjeni prajmeri. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća duvana i negativnoj kontroli (PCR smeša sa molekularnom vodom).

DISKUSIJA

Serološka testiranja prikupljenih uzoraka duvana sa simptomima virusnih infekcija, na različitim lokalitetima gajenja u Srbiji, pokazala su da učestalost pojave CMV po godinama i lokalitetima značajno varira. Rezultati trogodišnjih istraživanja pojave i rasprostranjenosti CMV ukazali su na stalno prisustvo ovog virusa u usevu duvana u našoj zemlji. Tokom 2005. godine CMV je dokazan na tri od pet pregledanih lokaliteta, tokom 2006. na četiri od sedam, a u 2007. na dva od deset. Na lokalitetima na kojima je prisustvo CMV dokazano, broj inficiranih uzoraka bio je značajan. Zastupljenost CMV iskazana kroz procenat testiranih uzoraka u kojima je virus detektovan bila je 54,14% u 2005. godini, 41,67% u 2006., a u 2007. godini na dva lokaliteta CMV je detektovan u preko 80% testiranih biljaka. U toku pregleda i sakupljanja uzoraka na ovim lokalitetima procenjen je visok intenzitet zaraze useva na osnovu prisustva karakterističnih simptoma. Ovi podaci pokazuju da je CMV, na lokalitetima na kojima je njegovo prisustvo detektovano, bio prevalentan prouzročivač navedenih simptoma izazivajući značajne deformacije zaraženih biljaka, a time i velike ekonomske štete.

Tokom ovih istraživanja, CMV je detektovan u pojedinačnim ili mešanim infekcijama sa drugim virusima duvana. Prve godine ispitivanja utvrđen je veći procenat mešanih infekcija sa TSWV, PVY ili CMV nego pojedinačnih infekcija, druge godine se javio u mešanoj infekciji samo sa PVY i to u manjem procentu, a treće godine je udeo pojedinačnih infekcija bio veći od mešanih, iako je ustanovljena zaraza nekih biljaka čak sa još tri virusa, TSWV, AMV i TMV.

Ranija istraživanja sprovedena u našoj zemlji ukazuju na cikličnu pojavu ovog virusa u usevu duvana. Istraživanja koja su sprovedeli Jasnić i saradnici (2000) ukazali su na značajno prisustvo ovog virusa na duvanu tokom 1995. i 1999. godine. U periodu od 2002. do 2006. istraživanja su potvrdila prisustvo ovog virusa, ali je učestalost njegove pojave bila zanemarljiva, kao i uticaj na proizvodnju duvana u Srbiji (Dukić et al., 2006).

Razlike u pojavi i zastupljenosti CMV ne javljaju se samo u zavisnosti od godine istraživanja, već pre svega od lokaliteta gajenja duvana. Tako je 2005. godine CMV dokazan na lokalitetu Mladenovac, ali 2007. godine nije detektovan ni u jednom od testiranih uzoraka sakupljenih na istom lokalitetu. Suprotno, 2005. godine prisustvo CMV nije dokazano na lokalitetu Bački Petrovac, dok je 2007. godine na istom lokalitetu procenat zaraženosti testiranih uzoraka bio visok, 87,50%. Razlika u pojavi i zastupljenosti virusa duvana je već ranije dokumentovana pojava (Mayunga, Kapooria, 2003). Razlike u pojavi i rasprostranjenosti CMV potpuno su razumljive kada se zna da zavise od izvora inokuluma, vremena ostvarene zaraze, populacije vektora i tehnologije gajenja duvana.

Iako je poznato da virusi duvana izazivaju različite tipove simptoma u zavisnosti od starosti biljke, uslova spoljašnje sredine, nivoa infekcije i soja virusa, ustanovljeno je postojanje izvesne

korelacije između tipa simptoma i detektovanog virusa. Obzirom da determinacija nekog virusnog prouzrokovala ne može da se zasniva samo na simptomatologiji, utvrđena korelacija može poslužiti samo pri izvodenju preliminarnih zaključaka o CMV kao prouzrokovala. CMV je detektovan u lišću duvana sa simptomima u vidu slabog do izraženog mozaika, klobučavosti, sužavanja liske i mozaičnim kržljivim biljkama. Obzirom da se duvan gaji zbog lista, bitno je da se pored prinosa, ostvari i visok kvalitet lista za proizvodnju cigareta. Najznačajniji efekti virusnih zaraza na duvanu su smanjenje porasta, izražena kržljivost, deformacije i smanjenje lisne površine što direktno dovodi do smanjenja prinosa (Mayunga, Kapooria, 2003; Krstić et al., 2006), a što je uočeno na svim lokalitetima uključenim u ispitivanja. U više slučajeva CMV je dokazan u biljkama duvana sa izraženim simptomima i brojnim deformacijama koji i značajno smanjuju prinos i kvalitet lišća.

Iako prisustvo CMV nije utvrđeno na svim pregledanim lokalitetima gajenja duvana u Srbiji, na pojedinim je njegovo prisustvo utvrđeno u visokom procentu testiranih uzoraka. Ovako visoka procentualna zastupljenost na lokalitetima u kojima je detektovan, kao i činjenica da se javlja svake godine na duvanu, govori o neophodnosti preduzimanja mera sprečavanja pojave i daljeg širenja ovog virusa u našoj zemlji.

Kako je CMV ekonomski važan virus za mnoge useve širom sveta, u cilju pouzdane detekcije, identifikacije i karakterizacije virusa razvijen je veći broj metoda zasnovanih na različitim osobinama virusa. Postoji više seroloških metoda zasnovanih na korišćenju monoklonskih ili poliklonskih antitela kojima je omogućena pouzdana identifikacija, pa čak i razlikovanje izolata CMV na taksonomskom nivou nižem od vrste (Porta et al., 1989, Hsu et al., 2000). Međutim, molekularne metode zasnovane na PCR-u, koje su osjetljivije i preciznije od seroloških (Bousalem et al., 2000; Jacobi et al., 1998) imaju prednost pri detekciji virusa kada se nalaze u biljci u niskoj koncentraciji, što može biti slučaj i sa nekim izolatima CMV (Zu et al., 2004). PCR je mnogo pogodniji za dobijanje informacija o virusnom genomu i za filogenetske analize. Kombinovano korišćenje seroloških i molekularnih metoda preporučuje se za epidemiološka proučavanja i proučavanja varijabilnosti izolata u okviru populacije CMV. U okviru ovih istraživanja razvijen je jednostavan, brz i pouzdan RT-PCR protokol prilagođen za primenu u dijagnostičkim laboratorijama u Srbiji. Sa druge strane ovaj protokol može da omogući ekspertskim laboratorijama naše zemlje dalji rad na karakterizaciji izolata CMV iz duvana i drugih domaćina, određivanju pripadnosti postojećim podgrupama CMV (S-IA, S-IB i S-II) i filogenetskim analizama.

Rezultati molekularne detekcije, potvrdili su prisustvo CMV u testiranim uzorcima listova duvana. Prajmerima CMV Au1/CMV Au2d, dizajniranim za amplifikaciju visoko konzervativnog regiona genoma CMV, uspešno je iz duvana umnožen segment očekivane dužine od 847 bp. Razvijeni protokol za molekularnu detekciju CMV primenom RT-PCR i para CMV-specifičnih prajmera potvrdio je njihovu pogodnost za detekciju populacije ovog virusa koja se javlja u važnim proizvodnim područjima duvana u Srbiji. Uvođenje i primena ovog protokola u laboratorije i ustanove koje su ovlašćene za detekciju CMV omogućilo bi bržu i osjetljiviju dijagnostiku koja bi se mogla koristiti za potvrdu rutinskih seroloških metoda ili kao osjetljivija metoda za dokazivanje CMV u slučaju niske koncentracije u biljci.

U toku ovih ispitivanja primenjena je molekularna detekcija CMV u jednom koraku („One Step“ RT-PCR). Reverzna transkripcija (RT) i lančana reakcija polimeraze (PCR) izvode se jedna za drugom u istoj reakcionoj tubici, što je pogodno za dijagnostičke laboratorije i rutinsko testiranje. Obzirom da je nivo detekcije CMV ovom molekularnom tehnikom moguć u malim

količinama (1 mg lišća) zaraženog lišća duvana (Rizos et al., 1992) ova metoda se može koristiti za detekciju CMV u zbirnom uzorku napravljenom od tkiva sa različitih delova biljke. Ovo je veoma korisno za biljke krupnog habitusa kakav ima duvan. Korišćenje RT-PCR i CMV-specifičnih prajmera u jednom koraku (jednoj tubi) omogućava jednostavnu, brzu i preciznu detekciju, te se kao takva može koristiti u dijagnostičkim laboratorijama, kao jednostavna alternativa serološkim analizama.

ZAKLJUČAK

Obavljena ispitivanja zastupljenosti CMV u usevu duvana na više lokaliteta u Srbiji ukazala su da se ovaj virus redovno javlja izazivajući pojavu simptoma kao i značajnu redukciju prinosa. Pojava i učestalost ovog virusa, u pojedinačnim ili mešanim infekcijama, veoma su različiti u zavisnosti od regiona gajenja, ali i godine. Dobijeni rezultati ukazuju da je zastupljenost CMV u nekim usevima duvana u našoj zemlji veoma različita i da se kreće od toga da nije detektovan do toga da je prisutan u epifitotičnim razmerama zaražavajući skoro sve biljke u polju. Upravo zbog toga, uloženi su napor da se razvije metod molekularne detekcije i kao alternativa serološkim metodama, i kao metoda koja omogućava veću osetljivost i pouzdanost u poređenju sa ELISA testom. U toku istraživanja razvijen je brz i jednostavan protokol za molekularnu detekciju CMV u lišću duvana primenom specifičnih prajmera CMVAu1u/CMVAu2d i komercijalnih kitova za ekstrakciju totalne RNA i PCR. Zbog jednostavne primene odgovarajućih dijagnostičkih kitova preporučuje se za rutinsku upotrebu u laboratorijama koje se bave dijagnostikom ovog virusa u našoj zemlji. Kako se na ovaj način zbog povećane osetljivosti mogu detektovati rane zaraze i niska koncentracija virusa moguće je blagovremeno primeniti odgovarajuće mere kontrole u cilju dobijanja zdravog useva duvana.

LITERATURA

- Bousalem, S., Dallot, S., Guyader, S. (2000): The use of phylogenetic data to develop molecular tools for the detection and genotyping of Yam mosaic virus. Potential application in molecular epidemiology. *J. Virol. Methods* 90, 25–36.
- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977): Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 44–50.
- Đukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B., Krstić, B. (2006): Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. *Pestic. Fitomed.* 21, 205–214.
- Đekić I., Bulajić, A., Jović J., Krnjajić S., Vučurović A., Berenji J., Krstić B. (2008): Molekularna proučavanja *Cucumber mosaic virus*-a iz duvana. IX savetovanje o zaštiti bilja. Zlatibor, 24. – 28. novembra 2008. Zbornik rezimea, 72–73.
- Francki, R.I.B., Mossop, D.W., Shukla, D.D. (1979): *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213.
- Hsu, H.T., Barzuna, L., Bliss, W., Perry, K.L. (2000): Identification and subgrouping of *cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies. *Virology* 90, 615–620.
- Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C., Castello, J.D. (1998): Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for the detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamovirus. *J. Virol. Methods* 74, 167–178.

Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K., Mumović, J. (2000): Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo 34, 67–76.

Krstić, B., Bulajić, A., Đekić, I. (2007): Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. IV Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, 11–13. decembar 2007. Zbornik rezimea, 13.

Krstić, B., Vico, I., Berenji, J., Dukić, N., Bulajić, A. (2006): Opšti principi kontrole virusnih oboljenja duvana sa posebnim osvrtom na virus mozaika duvana. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad 42, 401–412.

Krstić, B., Vico, I., Chrysostomos, D., Eythimiou, C., Katis, I. N., Berenji, J. (2002): Molekularna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. XII simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida. Zlatibor, 25–29. novembar 2002. Zbornik rezimea, 74.

Mayunga, D.S., Kapooria, R.G. (2003): Incidence and identification of virus diseases of tobacco in three provinces of Zambia. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 33, 355 – 359.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabral, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. (1995): Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Wien, Austria: Sprinder–Vergal, Arch. Virol. 10 (Suppl.), 350–354.

Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I.B. (1992): *Cucumber mosaic virus*. Adv. Virus Res. 41, 281–348.

Porta, C., Devergne, J.C., Cardin, L., Briand, J.P., Van Regemortel, M. H. V. (1989): Serotype specificity of monoclonal antibodies to *cucumber mosaic virus*. Arch. Virol. 104, 271–285.

Rizos, H., Gumn, V.G., Pares, R.D., Gillings, M.R. (1992): Differentiation of *cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. J. Gen. Virol. 73, 2099–2103.

Shew, H.D., Lucas, G.B. (1991): Compendium of Tobacco Diseases. APS Press.

Tošić, M. (1960): Prilog poznavanju viroza duvana u NR Srbiji. Zaštita bilja 61, 61–66.

Van Regemortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickne, R.B. (2000): Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, S. Diego, CA, USA, 929–930.

Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2004): Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS–ELISA and immunocapture RT–PCR. J. Gen. Virol. 123, 155–161.

FREQUENCY AND MOLECULAR DETECTION OF *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* IN TOBACCO CROPS

**Dekić, Ivana, Bulajić, Aleksandra, Jović, Jelena, Krnjajić,
S., Vučurović, Ana, Berenji, J., Krstić, Branka**

SUMMARY

Three-year investigation of the presence and distribution of tobacco viruses in Serbia showed that *Cucumber mosaic virus* (CMV) appeared every year with different frequency. During 2007, in two localities CMV was even prevalent both in single and in mixed infections, comparing to all other economically important tobacco viruses. Due to distinct leaf symptoms and stunting of plants, CMV infection causes great crop losses and leaf quality decrease and for that reason CMV appears to be very important tobacco virus in Serbia. Continuous presence of CMV in tobacco crops and its economically destructive effect implied the necessity for the development of a rapid and reliable protocol for CMV molecular detection which would be applicable in diagnostic laboratories in our country. During this investigation a rapid and simple protocol was optimized and developed for molecular detection of CMV in tobacco leaves, using primers CMVAu1u/CMVAu2d and commercially available kits for total RNA extraction as well as for RT-PCR. In RT-PCR by these primers that flank the CMV capsid protein gene, a DNA fragment of 847 bp was amplified in the samples of infected tobacco leaves. Obtained results show that established molecular detection procedure is suitable for reliable and efficient detection of tobacco CMV isolates originating from Serbia. Although serological methods are still useful for large-scale testing of great number of samples, this protocol is, due to its high sensitivity and specificity, an important improvement in conformation of the results obtained by other methods, in the detection of virus low concentrations and in further characterization of CMV isolates originating from Serbia.

Key words: tobacco, cucumber mosaic virus, frequency, ELISA, RT-PCR