

Prisustvo i karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzna u usevu lubenice u Srbiji

Ana Vučurović • Aleksandra Bulajić • Katarina Milojević • Ivana Stanković •
Danijela Ristić • Janoš Berenji • Branka Krstić

received: 4 April 2012, accepted: 28 June 2012.

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1773

Izvod: Prisustvo virusa žutog mozaika kukuruzna (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) na dva od sedam lokaliteta gajenja lubenice u Srbiji tokom 2011. godine utvrđeno je analizom uzoraka lišća simptomatičnih i asimptomatičnih biljaka lubenice primenom DAS-ELISA metode. Na lokalitetu Gornji Tavankut, ZYMV je dokazan u 23,08% testiranih biljaka u pojedinačnim infekcijama, a na lokalitetu Silbaš u 35,29% testiranih biljaka u mešanim infekcijama sa virusom mozaika krastavca i virusom mozaika lubenice. ZYMV je uspešno mehanički prenesen sa prirodno zaraženih biljaka lubenice na *Cucurbita pepo* 'Ezra F1'. Molekularna detekcija obavljena je RT-PCR metodom umnožavanjem dela gena za nuklearne inkluzije, gena za protein omotača i dela 3' neprepisujućeg regiona, čime je potvrđena identifikacija izolata. Filogenetske analize pokazale su grupisanje izolata poreklom iz lubenice sa drugim izolatima iz Srbije i Centralne Evrope u okviru A-I podgrupe. Analize aminokiselinske sekvence N-terminalnog kraja CP gena, takođe su pokazale pripadnost izolata 550-11 centralnoevropskoj grani.

Ključne reči: izolati, lubenica, virus žutog mozaika kukuruzna

Uvod

Lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) ubraja se u najstarije gajene biljne vrste (Szamosi et al. 2009) i predstavlja jednu od najznačajnijih povrtarskih kultura. Najveći svetski proizvođači lubenice su Kina i Japan, a u Evropi Grčka, Italija, Španija i Turska. Po površinama od preko 14.000 ha na kojima se lubenica gaji, Srbija se ubraja među srednje proizvođače u Evropi (FAO 2010), mada proizvodnja lubenice beleži trend stalnog porasta. Plod lubenice sadrži najviše vode, ali i značajne količine vitamina i minerala (Perkins-Weazie et al. 2001).

U mnogim delovima sveta, fitopatogeni virusi smatraju se ograničavajućim faktorom za proizvodnju lubenice (Guner & Wehner 2008). Do sada je opisano više od 32 vrste virusa infektivnih za lubenicu, ali ekonomski najznačajnije štete, koje

mogu da potpuno unište proizvodnju, u većini regiona gajenja ovih kultura prouzrokuju virusi roda *Potyvirus*. Od njih, najznačajniji su virus žutog mozaika kukuruzna (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) i virus prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV). Pored ova tri, u ekonomski štetne viruse lubenice ubrajaju se virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV, *Cucumovirus*) i virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV, *Comovirus*) (Provvidenti 1996, Xu et al. 2004, Guner & Wehner 2008, da Silveira et al. 2009).

Destruktivni simptomi koje izaziva ZYMV prvi put su uočeni 1973. godine u severnoj Italiji na kukuruznu (Lisa et al. 1981), a nekoliko godina kasnije i na dinji u Francuskoj (Lecoq et al. 1981). ZYMV je primer veoma destruktivnog „*emerging*“ biljnog virusa, jer se od njegovog otkrića za samo nekoliko godina proširio u mnoge zemlje Evrope, Azije, Afrike, Bliskog Istoka, Severne i Južne Amerike i Okeanije (Desbiez & Lecoq 1997). Brzo i naglo širenje objašnjava se efikasnim prenošenjem sa biljke na biljku vektorima-biljnim

A. Vučurović • A. Bulajić • K. Milojević • I. Stanković • D. Ristić • B. Krstić*
University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11080 Belgrade-Zemun, Serbia
e-mail: homemadecent@gmail.com

J. Berenji
Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Supported by Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Projects No. III-43001 and TR-31025

vašima na neperzistentan način (Lisa & Lecoq 1984), kao i širenjem na veliku udaljenost putem zaraženog semena (Fletcher et al. 2000). Kako je njegovo prisustvo uvek povezano sa izraženim simptomima i značajnim smanjenjem prinosa, smatra se da je odgovoran za ogromne gubitke u proizvodnji svih vrsta tikava, dinje, krastavca (Desbiez & Lecoq 1997, Gal-On 2007), kao i lubenice širom sveta (Providenti et al. 1984, Providenti 1991, Xu et al. 2004, Ling et al. 2009, Yu et al. 2011).

ZYMV je u Srbiji prvi put detektovan 2000. godine kao prouzročivač destruktivnih promena obične tikve (Dukić et al. 2001). Od tada počinju detaljna ispitivanja ovog virusa na običnoj tikvi (Krstić et al. 2002, Dukić et al. 2004) i drugim vrstama tikava kao što su uljana, muskatna i bizonska tikva, bundeva i vrg (Đekić et al. 2007, Vučurović et al. 2009a, 2009b, 2012b). Prisustvo ovog virusa na lubenici u Srbiji zabeleženo je prvi put 2011. godine (Vučurović et al. 2012a).

S obzirom na rastući značaj gajenja lubenice, raširenost i učestalost pojave ZYMV na vrstama familije Cucurbitaceae, kao i na raširenost prirodnih vektora u Srbiji, ovaj virus može da postane ograničavajući faktor proizvodnje lubenica u našoj zemlji. Zbog toga je osnovni cilj ovog rada bio da se ispita prisustvo i učestalost pojave ZYMV na lubenici na više lokaliteta gajenja, da se filogenetskim analizama odredi mesto odabranog izolata iz lubenice poreklom iz Srbije u populaciji ovog virusa u svetu, kao i da se utvrdi njegova genetička sličnost sa drugim izolatima ovog virusa poreklom iz Evrope.

Materijal i metod rada

Sakupljanje uzoraka lubenice

Ispitivanje prisustva i rasprostranjenosti ZYMV u usevu lubenice tokom 2011. obuhvatilo je pregled osam useva na sedam različitih lokaliteta gajenja u Srbiji: Družetić, Mačkovac, Surčin, Silbaš, Gornji Tavankut, Togočevce i Porodin. Tokom pregleda je sakupljeno 156 uzoraka lubenice sa različitim tipovima simptoma koji su ukazivali na virusnu zarazu, kao i određeni broj uzoraka sa slučajno odabranih biljaka koje nisu ispoljavale simptome virusnih zaraza.

Serološke analize

Detekcija virusa u usevu lubenice obavljena je primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) po protokolu koju su opisali Clark & Adams (1977) uz korišćenje komercijalnih dijagnostičkih kitova. U cilju utvrđivanja pojedinačnih i mešanih infekcija, testiranje

sakupljenih uzoraka obavljeno je korišćenjem poliklonalnih antiseruma specifičnih za pet najznačajnijih virusa lubenice, ZYMV, WMV, CMV, PRSV i SqMV (Bioreba AG, Switzerland). Poliklonalna antitela i antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:6. Nakon 1-2 časa po dodavanju supstrata p-nitrofenilfosfata (1 mg/ml), intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DAS srl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcije na 405 nm koje su dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Mehaničko prenošenje izolata ZYMV

U cilju dokazivanja infektivne prirode oboljenja od svakog uzoraka prirodno zaraženih biljka lubenice, u kojem je prethodno serološki dokazana infekcija ZYMV, pripreman je inokulum kojim je mehanički inokulisano pet biljaka *Cucurbita pepo* hibrid Ezra F1. Inokulum za mehaničke inokulacije pripremljen je homogenizacijom lišća sa simptomima u razređenju 1:5, uz korišćenje 0,01 M fosfatnog pufera pH 7,0 i karborundum praha finoće 400 meša kao abraziva. Test biljke inokulirane su u fenofazi 2-3 prava lista i održavane u uslovima staklenika. Pojava i tip simptoma praćeni su u periodu do mesec dana nakon inokulacije.

Molekularna karakterizacija

Reverzna transkripcija (RT) i lančana reakcija polimeraze (PCR) primenjene su u cilju molekularne detekcije izolata ZYMV i potvrde rezultata dobijenih serološkim analizama i biotestom. U ova ispitivanja uključeni su svi izolati u kojima je prethodno DAS-ELISA testom identifikovan ZYMV, kao i izolati dobijeni mehaničkim inokulacijama *C. pepo* hibrid Ezra F1. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ZYMV, 147-08, poreklom iz *Cucurbita pepo* 'Olinka' (Accession number HM072432). Molekularna detekcija obavljena je primenom OneStep RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) korišćenjem para prajmera ZY-2/ZY-3 kojim se amplifikuje fragment DNA finalne dužine 1186 bp koji obuhvata deo gena za nuklearne inkluzije (NIb), gen za protein omotača (CP) i deo 3' neprepisujućeg regiona (3' UTR) (Thomson et al. 1995).

Izolacija ukupnih RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka lubenice i veštački inokuliranih *C. pepo* hibrid Ezra F1 obavljena je primenom RNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. U oba slučaja, za izolaciju ukupnih RNA korišćeno je

100 mg zamrznutog biljnog materijala prethodno čuvanog na -80°C. Ukupna izolovana RNA korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera ZY-2/ZY-3. Reakciona smeša RT-

PCR reakcije, zapremine 25 µl sadržala je: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 µl dNTP miksa (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smeši

Tabela 1. Sekvence CP gena izolata ZYMV dostupnih u GenBank korišćene za filogenetske analize
Table 1. ZYMV isolates with coat protein sequences from GenBank used in the phylogenetic analysis

Virus	Izolat ^a	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
Virus	Isolate name ^a	Country	Host plant	GenBank accession number
ZYMV	125-07, 441-07	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	JN315856-7
ZYMV	128-08, 147-08	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	HM072431-2
ZYMV	151-08	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	JN315860
ZYMV	128-09	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	JN315862
ZYMV	164-07	Srbija	<i>Lagenaria siceraria</i>	JN315858
ZYMV	244-07	Srbija	<i>Cucurbita moschata</i>	JN315859
ZYMV	162-08	Srbija	<i>Cucurbita maxima</i>	JN315861
ZYMV	226-09	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	JF308188
ZYMV	239-09	Srbija	<i>Cucurbita maxima</i>	JF308189
ZYMV	243-09	Srbija	<i>Cucurbita moschata</i>	JN315863
ZYMV	Austria 2, 5, 6, 10, 11, 12	Austrija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420012-17
ZYMV	Slovenia 1	Slovenija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420018
ZYMV	Berlin 1	Nemačka	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420019
ZYMV	Italy 1	Italija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420020
ZYMV	Kuchyna	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124239
ZYMV	10	Mađarska	<i>Cucumis sativus</i>	AJ251527
ZYMV	H266-2, 272-5, 272-8	Mađarska	<i>Cucurbita pepo</i> 'Styriaca'	AJ459954-56
ZYMV	Zuy	Poljska	<i>Cucurbita pepo</i> 'Giomontiina'	EU561044
ZYMV	Zug	Poljska	<i>Cucurbita pepo</i> 'Giomontiina'	EU561045
ZYMV	B*	Izrael	<i>Cucurbita pepo</i> 'Diamant'	AY188994
ZYMV	C-16	Španija	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ645729
ZYMV	M	Japan	/	AB004641
ZYMV	Florida	SAD	<i>Cucurbita moschata</i>	D13914
ZYMV	California	SAD	<i>Cucurbita moschata</i>	L31350
ZYMV	Knx-11	Australija	<i>Cucurbita maxima</i>	JF792373
ZYMV	Knx-14	Australija	<i>Cucurbita</i> sp.	JF797208
ZYMV	SG	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	AJ316228
ZYMV	WM	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	AJ515911
ZYMV	China 99/246	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	AY611024
ZYMV	CH99/116	Kina	<i>Cucurbita moschata</i>	AY611021
ZYMV	CH99/193	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	AY611023
ZYMV	HN-01	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	AY611026
ZYMV	Shanxi	Kina	<i>Cucurbita moschata</i>	AY074808
ZYMV	KR-PE	Koreja	<i>Cucurbita moschata</i>	AY278999
ZYMV	cu	Koreja	<i>Cucumis sativus</i>	AF062518
ZYMV	TW-NT1	Tajvan	<i>Cucumis sativus</i>	AF127933
ZYMV	TW-TN3	Tajvan	<i>Luffa cylindrica</i>	NC_003224
ZYMV	TW-PT5	Tajvan	<i>Momordica charantia</i>	AF127934
ZYMV	Singapore	Singapur	<i>Cucumis sativus</i>	AF014811
ZYMV	Reunion Island	Reunion (Francuska)	<i>Momordica charantia</i>	L29569
ZYMV ^b	H	Češka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124244
ZYMV	K	Češka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124245
BCMV ^c	MS1	Australija	<i>Macropodium atropurpureum</i>	EU761198
WMV	/	Tonga	<i>Vanilla fragrans</i>	L22907
SMV	/	Kina	/	U25673

^aPodaci preuzeti iz GenBank / All data are from GenBank

^bIzolati ZYMV sa parcijalnim sekvencama korišćeni samo za poređenje aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP / ZYMV isolates with partial sequences used only for aminoacid sequence alignment for N terminal part of the CP

^cSekvence Bean common mosaic virus, Watermelon mosaic virus i Soybean mosaic virus korišćene kao "outgrupe" / Bean common mosaic virus, Watermelon mosaic virus and Soybean mosaic virus sequences were used as outgroups

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. 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 (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 25 s na 94°C, elongacije 25 s na 55°C i ekstenzije 70 s na 72°C; finalna ekstenzija 72°C 10 min. Elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu, dobijeni produkti obojeni su rastvorom etidijum-bromida i posmatrani pod UV svetlom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava fragmenata očekivane veličine, određene poređenjem sa MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) markerom.

Za dalje filogenetske analize odabran je izolat 550-11 koji je na osnovu analize sekvence i stepena sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta prethodno identifikovan kao ZYMV (Vučurović et al. 2012a). Filogenetske analize obavljene su rekonstruisanjem filogenetskog stabla na osnovu 50 nukleotidnih sekvenci kompletnog CP („coat protein“, protein omotača) gena dužine 837 nukleotida, korišćenjem Neighbor-Joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja, kao i poređenjem aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP gena izolata 550-11 iz lubenice sa 31 drugom sekvencom ZYMV iz Evrope. Sve analize obavljene su korišćenjem softverskog paketa MEGA verzija 5.0. (Tamura et al. 2011). Kao „outgrupe“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćene su sekvence

Bean common mosaic virus (BCMV), *Soybean mosaic virus* (SMV) i WMV. Prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Tamura 3-parametra sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru programa MEGA 5.0. Sekvence korišćene za filogenetske analize prikazane su u tabeli 1.

Rezultati i diskusija

Simptomi u polju i učestalost pojave ZYMV u usevu lubenice

Pregledom useva lubenice tokom 2011. u dva od sedam pregledanih lokaliteta gajenja u Srbiji zabeležena je pojava raznovrsnih simptoma - od blagog do izraženog mozaika, hloroze i šarenila lista, ponekad praćenih blagim deformacijama (Sl. 1). Virus, među njima i ZYMV na lubenici, izazivaju različite tipove simptoma koji uglavnom nisu dovoljno dijagnostički specifični (Provvidenti 1996, Desbiez & Lecoq 1997, Kucharek & Purcifull 1997). Ipak, simptomi zabeleženi na lubenici u Srbiji odgovaraju opisanim simptomima u drugim proizvodnim područjima ove kulture u svetu. Iako su i simptomi na plodu u vidu prošaravanja i deformacija registrovani u svetu (Desbiez & Lecoq 1997, Yu et al. 2011), tokom pregleda i sakupljanja uzoraka pojava simptoma na plodovima lubenice nije uočena. U dva uzorka lišća bez simptoma detektovano je prisustvo ZYMV. Ustanovljene latentne zaraze ovim virusom, ukazuju da je njegova zastupljenost i učestalost u usevu lubenice možda i daleko značajnija, što bi trebalo ispitati testiranjem većeg broja biljaka bez simptoma.



Slika 1. ZYMV: Hlorotično prošaravanje međunervalnog tkiva lista
Fig. 1. ZYMV: Chlorotic mottling of interveinal leaf tissue

Serološka detekcija

Serološkim analizama sakupljenih uzoraka lubenice, prisustvo ZYMV ustanovljeno je u pojedinačnim i mešanim zarazama, u dva od sedam pregledanih lokaliteta na teritoriji Vojvodine (Tab. 2), u ukupno 12 od 156 sakupljenih i serološki testiranih uzoraka (7,69%). Na lokalitetu Gornji Tavankut (okrug Severna Bačka) ZYMV je bio prisutan u pojedinačnim zarazama (23,08%), dok je na lokalitetu Silbaš (okrug Južna Bačka), prisustvo virusa ustanovljeno u mešanim infekcijama sa CMV i WMV i to u 35,29% testiranih uzoraka. ZYMV je prisutan u većini zemalja kao patogen biljaka familije Cucurbitaceae (Gal-On 2007, Bananej et al. 2008), a na lubenici je široko rasprostranjen i nanosi značajne štete smanjenjem prinosa i do 50% (Providenti et al. 1984, Providenti 1991, Xu et al. 2004, Ling et al. 2009, Yu et al. 2011). Dosadašnja ispitivanja u našoj zemlji ukazuju na stalno prisustvo ZYMV u usevu tikava, dok o prisustvu u lubenici nije bilo podataka, izuzev prvog izveštaja o detekciji u lubenici, a time i proširenju kruga domaćina ovog virusa (Vučurović et al. 2012a). Kako se ZYMV u tikvama često javlja u epidemijским razmerama (Dukić et al. 2001, Vučurović et al. 2009a, 2009b, 2012b) rezultati dobijeni u ovim istraživanjima ukazuju na mogućnost širenja i u usevima lubenice u Srbiji. Mada je prisustvo ZYMV zabeleženo na samo dva pregledana lokaliteta sa tendencijom lokalizovane pojave u usevu lubenice, nivo zaraze tih useva i procentualna zastupljenost bila je visoka. Zbog ekonomske vrednosti i rentabilnosti

proizvodnje, kao i lakog i brzog širenja virusa pomoću biljnih vaši na neperzistentan način (Zitter 1977), nameće se zaključak da je neophodno stalno pratiti stanje i prisustvo ovog virusa u usevu lubenice u našoj zemlji.

Mehaničke inokulacije i dobijanje izolata ZYMV

Iz lišća prirodno zaraženih biljaka lubenice u kojima je prethodno dokazana infekcija ZYMV, 12 izolata uspešno je preneto mehaničkim inokulacijama na biljke *C. pepo* hibrid Ezra F1. Svih pet mehanički inokulisanih test biljaka, po izolatu, reagovala su uniformno i pokazale su tipične simptome u vidu izraženog sistemnog mozaika 10 dana nakon inokulacije. Tip i vreme pojave simptoma odgovara podacima navedenim u literaturi (Dukić et al. 2002, Vučurović et al. 2009a).

Molekularna detekcija i identifikacija ZYMV

Prisustvo ZYMV u usevima lubenice u Srbiji uspešno je detektovano i RT-PCR metodom uz korišćenje specifičnih prajmera ZY-2 i ZY-3 (Thomson et al. 1995), amplifikacijom fragmenta veličine 1186 bp, koji obuhvata deo gena N1b, ceo gen za CP i deo 3' UTR. Nije uočena pojava nespecifičnih reakcija. Prisustvo virusa uspešno je dokazano kako u svih 12 prirodno zaraženih biljaka lubenice, tako i u mehanički inokulisanim biljkama *C. pepo* hibrid Ezra F1, kao i pozitivnoj kontroli. Do amplifikacije nije došlo u negativnoj kontroli, odnosno PCR smeši sa vodom.

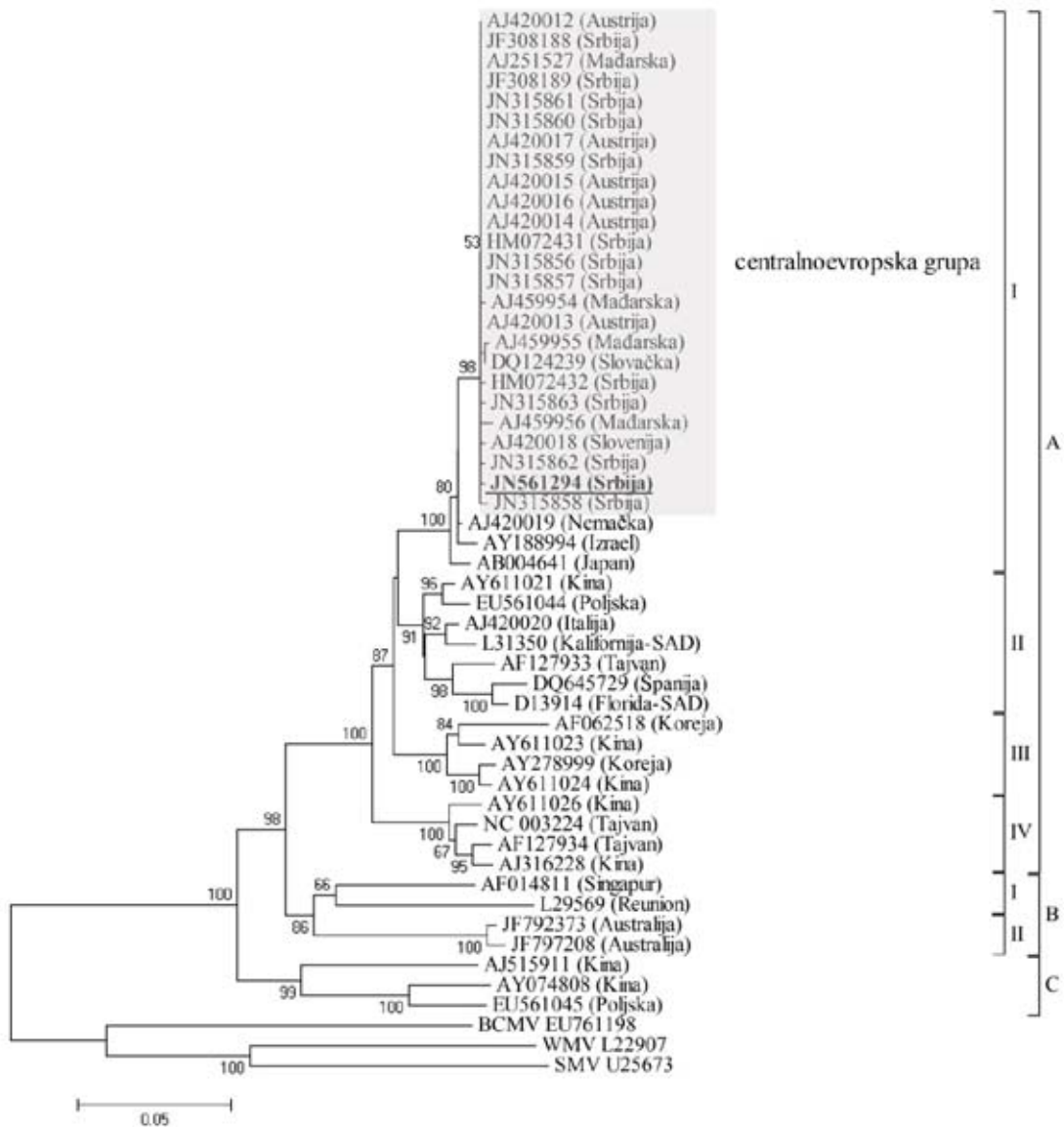
Tabela 2. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa žutog mozaika kukinija u pojedinačnim i mešanim infekcijama useva lubenice 2011.

Table 2. Presence and incidence of *Zucchini yellow mosaic virus* in single and mixed infections in watermelon crops during 2011

Lokalitet Locality	Broj polja No. of fields	Broj testiranih uzoraka No. of tested samples	Pojedinačna infekcija Single infection	Mešana infekcija Mixed infection
			ZYMV	ZYMV+ CMV+ WMV
Družetić	1	9	0 ^a	0
Mačkovac	1	26	0	0
Surčin	1	52	0	0
Silbaš	2	17	0	6 (35,29)
Gornji Tavankut	1	26	6 (23,08) ^b	0
Togočevce	1	17	0	0
Porodin	1	9	0	0
Ukupno	8	156	6 (3,85)	6 (3,85)
Total				

^a Broj zaraženih uzoraka / Number of infected samples

^b procenat zaraženih uzoraka izračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka / percentage of infected samples calculated over the total number of tested samples



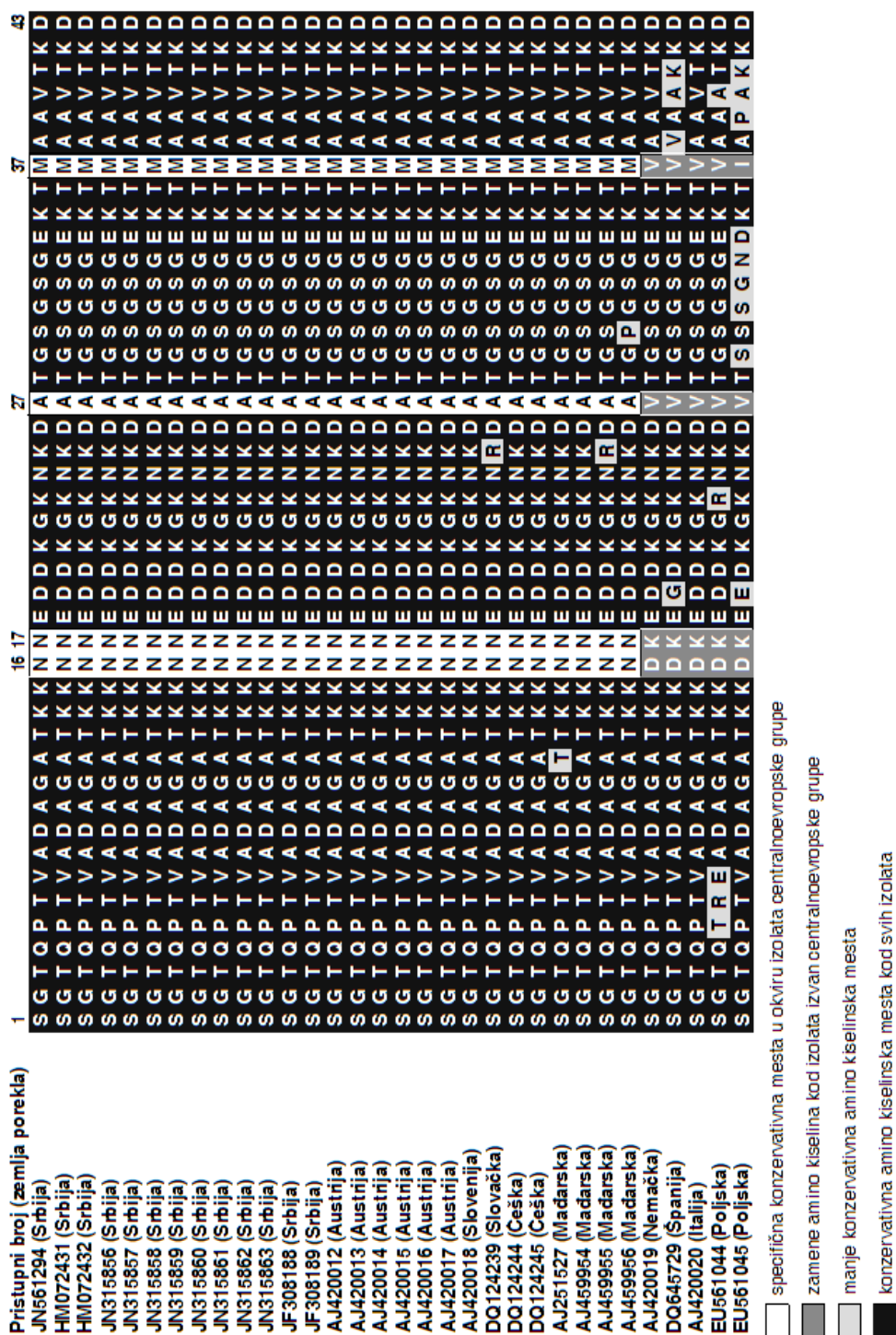
Slika 2. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci celog CP gena 50 izolata ZYMV korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Tamura 3-parametar modela sa Gamma distribucijom i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence BCMV, WMV i SMV su korišćene kao „outgroup“. Centralnoevropska grupa je osenčena. Izolat ZYMV iz lubenice iz Srbije je naznačen i podvučen

Fig. 2. Neighbor-Joining tree based on nucleotide sequences of complete coat protein gene of 50 isolates of ZYMV. The tree was rooted with BCMV, WMV and SMV. Phylogram was generated with MEGA 5 using Tamura 3-parameter model Gamma distributed. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates and bootstrap values (>50%) are shown next to relevant branches. The branch of Central European isolates is grey-shaded. The Serbian ZYMV isolate from watermelon is underlined bolded

Filogenetska analiza

Filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbor-Joining metodom na osnovu 837 bp celog CP gena 50 odabranih sekvenci, prikazano na slici 2, jasno pokazuje izdvajanje tri molekularne grupe (A-C),

odnosno grupisanje izolata ZYMV u tri genetička soja kako su naveli Coutts et al. (2011). Ovakvo grupisanje ZYMV izolata je podržano visokom homologijom sekvenci iste grupe i visokim *bootstrap* vrednostima (100, 86 i 99%).



Slika 3. Poređenje aminokiselinskih sekvenci N-terminalnog kraja proteinskog omotača izolata Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) iz Srbije i drugih delova Evrope
 Fig. 3. Amino acid sequence alignment for the N-terminal part of the coat protein of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) isolates originating from Serbia and other parts of Europe

Grupa A podeljena je u četiri podgrupe (I-IV), a grupa B u dve (I-II). Genetički diverzitet između tri glavne grupe iznosi od 0,134±0,013 do 0,45±0,004, a unutar grupa i podgrupa je 0,045±0,004 (A), 0,004±0,001 (A-I), 0,073±0,009 (A-II), 0,063±0,008 (A-III), 0,082±0,011 (A-IV),

0,131±0,013 (B), 0,137±0,019 (B-I), 0,009±0,003 (B-II) i 0,108±0,011 (C). Grupa A sadrži izolate iz Azije, Evrope i Amerike. Izolat iz lubenice, kao i 12 ZYMV izolata iz tikava iz Srbije, zajedno sa izolatima iz Centralne Evrope svrstani su u posebnu granu u okviru podgrupe A-I. Filogenetsko stablo

pokazuje da su svi izolati iz Evrope takođe svrstani u A-I osim Zug ZYMV izolata iz Poljske koji se nalazi u C grupi zajedno sa izolatima iz Kine. U grupi B nalaze se uglavnom izolati iz Istočne Azije i Australije. Izolat 550-11 poreklom iz lubenice iz Srbije sa izolatima iz centralnoevropske grupe pokazuje visoku nukleotidnu (99,9-99,5%) i aminokiselinsku (100-99,3%) sličnost na nivou CP gena, dok je nukleotidna sličnost sa ostalim izolatima A-I podgrupe nešto manja i iznosi 98,9-98,1% (95,7-97,3% aa sličnost). Tóbiás & Palkovics (2003) i Glasa et al. (2007) su takođe analizom sekvenci ZYMV izolata pokazali visok stepen sličnosti izolata iz Centralne Evrope, što ukazuje na blisku evolutivnu povezanost ovih izolata i protok gena („gene flow“) u okviru ovog regiona.

Poređenje prve 43 pozicije aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP gena ZYMV izolata 550-11 iz Srbije, sa 31 izolatom ovog virusa iz Srbije i drugih delova Evrope pokazalo je da izolat 550-11 i ostali izolati ZYMV iz Srbije, kao i ostali izolati koji pripadaju centralnoevropskoj grupi, na pozicijama 16 i 17 imaju dva specifično konzervativna mesta sa dva ostatka aminokiseline asparagin (NN), umesto asparaginske kiseline i lizina (DK) koji su karakteristični za ostale izolate iz Evrope. Takođe, pozicije 27 i 37 kod izolata iz Centralne Evrope, uključujući i izolate iz Srbije specifično su promenjene, tako da izolati iz Centralne Evrope na poziciji 27 imaju ostatak alanina (A) umesto valina (V), odnosno metionin (M) umesto valina (V) ili izoleucina (I) na poziciji 37 (Sl. 3.). Ovi rezultati predstavljaju potvrdu rezultata dobijenih od strane Pfosser & Baumann (2002), Glasa et al. (2007) i Vučurović et al. (2012b) koji ukazuju na samo jednu introdukciju ZYMV u Centralnu Evropu. Posle inicijalne introdukcije, ZYMV se dalje brzo širio u područja gajenja biljaka familije Cucurbitaceae u Austriji, Mađarskoj, Sloveniji, Slovačkoj, Češkoj i Srbiji, što potvrđuju gotovo istovremene epidemije u Srbiji (Dukić et al. 2002) i Austriji, Mađarskoj i Sloveniji (Pfosser & Baumann 2002). Filogenetska analiza, uključivanjem izolata ZYMV iz lubenice kao novog domaćina ovog virusa u Srbiji, ukazuje da nije bilo novih introdukcija ZYMV u Srbiju, da su izolat iz lubenice i izolati iz drugih vrsta tikava genetički veoma bliski i imaju zajedničko poreklo.

Zaključak

Nakon prve pojave ZYMV na lubenici kao novom domaćinu u Srbiji, prisustvo virusa tokom ovih istraživanja detektovano je u dva lokaliteta, u pojedinačnim i mešanim zarazama sa CMV i WMV primenom odgovarajućih seroloških

DAS-ELISA testova, biotesta i molekularne detekcije primenom RT-PCR i para specifičnih prajmera. Nakon sekvencioniranja gena za CP izolata iz lubenice i odgovarajućih filogenetskih analiza sekvenci izolata ZYMV različitog porekla, ustanovljeno je mesto izolata ZYMV iz lubenice iz Srbije u odnosu na ostale poznate izolate populacije ovog virusa u svetu, a potvrđen je i put introdukcije ovog virusa u našu zemlju. Ustanovljeno je postojanje latentnih zaraza lubenice ovim virusom što je ukazalo na moguću veću učestalost ovog virusa u usevu lubenice, zbog čega bi trebalo obuhvatiti testiranje većeg broja uzoraka. Pored toga, zbog velikih šteta koje ZYMV nanosi u svetu, neophodna su dalja istraživanja koja bi trebalo da budu usmerena na rasvetljavanje osnovnih zakonitosti njegove epidemiologije, proučavanje sastava i varijabilnosti populacije prisutne u našoj zemlji, načina održavanja, dosegavanja i zaražavanja biljaka lubenice, a sve to u cilju preduzimanja odgovarajućih mera kontrole.

Literatura

- Bananej K, Keshavaraz T, Vahdat A, Hosseini Salkdeh G, Glasa M (2008): Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. *J. Phytopathol.* 156: 654-659
- Clark MF, Adams AN (1977): Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 44-50
- Coutts BA, Kehoe MA, Webster CG, Wylie SJ, Jones RAC (2011): Zucchini yellow mosaic virus: biological properties, detection procedure and comparison of coat protein gene sequences. *Arch. Virol.* 156: 2119-2131
- Da Silveira DM, Queiroz MA, Lima JAA, Nascimento AKQ, Lima Neto IS (2009): Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Trop. Plant Pathol.* 34: 123-126
- Desbiez C, Lecoq H (1997): Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathol.* 46: 809-829
- Dukić N, Berenji J, Krstić B, Vico I, Bulajić A (2004): Prisustvo i rasprostranjenost virusa obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 35/36: 71-79
- Dukić N, Krstić B, Katis I, Papavassiliou C, Berenji J, Vico I (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. *Zbornik rezimea V jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, 85
- Dukić N, Krstić B, Vico I, Katis N I, Papavassiliou C, Berenji J (2002): Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *J. Agric. Sci. Belgrade* 47: 149-160
- Đekić I, Bulajić A, Berenji J, Krstić B (2007): Epidemijaska pojava virusa tikava (*Cucurbita* spp.) u Srbiji. *Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, 118-119
- FAO (2010): FAO Corporate Statistical Database [Online]. [1 p] Available at <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Cited 23 February 2012, verified 15 March 2012). FAO Corporate Statistical Database (FAOSTAT), United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Rome
- Fletcher JD, Wallace AR, Rogers BT (2000): Potyvirus in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV2 virus infections. *New Zeal. J. Crop Hort.* 28: 17-26

- Gal-On A (2007): Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity - the tails of two proteins. *Mol. Plant Pathol.* 8: 139-150
- Glasa M, Svoboda J, Nováková S (2007): Analysis of the molecular and biological variability of zucchini yellow mosaic virus isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes* 35: 415-421
- Guner N, Wehner TC (2008): Overview of Potyvirus resistance in watermelon. In: M Pitrat (eds.), *Cucurbitaceae, 2008: Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*. INRA, Avignon, France, 445-451
- Krstić B, Berenji J, Dukić N, Vico I, Katis NI, Papavassiliou C (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad* 103: 57-65
- Kucharek TA, Purcifull DE (1997): Aphid-transmitted viruses of cucurbits in Florida. Florida Cooperative Extension Service Circular No. 1184. University of Florida, Gainesville, 11
- Lecoq H, Pitrat M, Clement M (1981): Identification et caractérisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. *Agronomie* 1: 827-834
- Ling KS, Harris KR, Meyer JDF, Levi A, Guner N, Wehner TC, Bendahmane A, Havey MJ (2009): Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. *Theor. Appl. Genet.* 120: 191-200
- Lisa V, Lecoq H (1984): Zucchini yellow mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 282. Kew, Surrey, GB
- Lisa V, Boccardo G, D'Agostino G, Dellavalle G, d'Aguilo M (1981): Characterization of a potyvirus that cause zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71: 667-672
- Perkins-Veazie P, Collins JK, Pair SD, Roberts W (2001): Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 81: 983-987
- Pföster MF, Baumann H (2002): Phylogeny and geographical differentiation of zucchini yellow mosaic virus isolates (Potyviridae) based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes. *Arch. Virol.* 147: 1599-1609
- Provvidenti R, Gonsalves D, Humayden HS (1984): Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. *Plant Dis.* 68: 443-446
- Provvidenti R (1991): Inheritance of Resistance to the Florida Strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Watermelon. *HortScience* 26: 407-408
- Provvidenti R (1996): Diseases Caused by Viruses. In: TA Zitter, DL Hopkins and CE Thomas (eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 37-40
- Szamosi C, Solmaz I, Sari N, Barsony C (2009): Morphological characterization of Hungarian and Turkish watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum.et Nakai) genetic resources. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56: 1091-1105
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739
- Thomson KG, Dietzgen RG, Gibbs AJ, Tang YC, Liesack W, Teakle DS, Stackebrandt E (1995): Identification of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* by RT-PCR and analysis of sequence variability. *J. Virol. Methods* 55: 83-96
- Tóbiás I, Palkovics L (2003): Characterization of Hungarian isolates of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seed of *Cucurbita pepo* var *Stryaca*. *Pest Mang. Sci.* 59: 493-497
- Vučurović A, Bulajić A, Đekić I, Ristić D, Berenji J, Krstić B (2009a): Biološka varijabilnost virusa žutog mozaika kukinija u Srbiji. *Pestic. fitomed.* 24: 271-280
- Vučurović A, Bulajić A, Đekić I, Ristić D, Berenji J, Krstić B (2009b): Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukinija. *Pestic. fitomed.* 24: 85-94
- Vučurović A, Bulajić A, Stanković I, Ristić D, Nikolić D (2012a): First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon in Serbia. *Plant Dis.* 96: 149
- Vučurović A, Bulajić A, Stanković I, Ristić D, Berenji J, Jović J, Krstić B (2012b): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *Eur. J. Plant Pathol.* doi: 10.1007/s10658-012-9964-x
- Xu Y, Kang D, Shi Z, Shen H, Wehner T (2004): Inheritance of Resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus in Watermelon. *J. Hered.* 95: 498-502
- Yu TA, Chiang CH, Wu HWL, Yang CF, Chen JH, Chen YW, Yeh SD (2011): Generation of transgenic watermelon resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* and *Papaya ringspot virus* type W. *Plant Cell Rep.* 30: 359-371
- Zitter TA (1977): Epidemiology of aphid borne viruses. In: KF Harris and K Maramorosh (eds.), *Aphids as virus vector*. Academic Press, London, UK, 385-412

Presence and Characterization of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* in Watermelon in Serbia

Ana Vučurović · Aleksandra Bulajić · Katarina Milojević · Ivana Stanković · Danijela Ristić · Janoš Berenji · Branka Krstić

Summary: The presence of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in two out of seven watermelon production localities in Serbia during 2011 was investigated by analyzing leaves sampled from symptomatic and asymptomatic watermelon plants and utilizing DAS-ELISA test. In the locality of Gornji Tavankut, ZYMV was detected in 23.08% of tested plants in single infections, and in the locality of Silbas it was detected in 35.29% of tested plants in mixed infections with *Cucumber mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus*. ZYMV was successfully mechanically transmitted from naturally infected watermelon plants to *Cucurbita pepo* 'Ezra F1'. Molecular detection was performed by RT-PCR and amplification of part of the gene for nuclear inclusions, gene of coat protein and part of 3' non-coding region, which confirmed the identification of the ZYMV isolates. Phylogenetic analysis revealed grouping of the isolate originating from watermelon with other isolates from Serbia and Central Europe within A-I subgroup. Analysis of amino acid sequences of the N terminal end of the CP gene revealed that isolate 550-11 belongs to the Central European branch.

Key words: isolates, watermelons, *Zucchini yellow mosaic virus*