

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ivan B. Vučurović

**DIVERZITET VRSTA I MOLEKULARNA  
KARAKTERIZACIJA PREVALENTNIH  
VIRUSA INFEKTIVNIH ZA VRSTE RODA**

***Allium* U SRBIJI**

doktorska disertacija

**Beograd, 2019**

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Ivan B. Vučurović

**SPECIES DIVERSITY AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF PREVALENT  
VIRUSES INFECTING *Allium* SPECIES IN  
SERBIA**

Doctoral Dissertation

**Belgrade, 2019**

Komisija za ocjenu i odbranu:

Mentor:

dr Ivana Stanković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Branka Krstić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Danijela Ristić, naučni saradnik  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Dragana Milošević, naučni saradnik  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Đorđe Moravčević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Posebnu zahvalnost na velikodušnoj pomoći, velikoj posvećenosti i podršci dugujem svom mentoru dr Ivani Stanković, vanrednom profesoru, koja mi je strpljivo i sa razumijevanjem prenijela znanje iz biljne virusologije i bila oslonac tokom izrade doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Branki Krstić, redovnom profesoru, na iskrenoj pomoći, korisnim savjetima u organizaciji eksperimenata, konstruktivnim komentarima tokom istraživanja i svestranom znanju koje mi je prenijela tokom studija i izrade disertacije.*

*Mentoru sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu dr Danijeli Ristić, naučnom saradniku, dugujem veliku zahvalnost na velikom angažovanju, pomoći, korisnim savjetima i razumijevanju tokom rada na disertaciji.*

*Zahvaljujem se članovima komisije dr Dragani Milošević, naučnom saradniku i dr Đorđu Moravčeviću, vanrednom profesoru, na korisnim sugestijama i predusretljivosti tokom izrade disertacije.*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem, mojoj sestri, dr Ani Vučurović, naučnom saradniku, na ogromnom razumijevanju, konstantnom usmjeravanju, strpljenju za sva moja pitanja i pomoći bez koje ova disertacije ne bi mogla da se ostvari.*

*Veliko hvala mojim kolegama sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, kao i kolegama iz Laboratorije za biljnu virusologiju i mikologiju Poljoprivrednog fakulteta na razumijevanju, podršci i pomoći.*

*Na kraju, beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima, na bezrezervnoj podršci, savjetima i velikom razumijevanju koje su mi pružili tokom svih godina školovanja.*

# DIVERZITET VRSTA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PREVALENTNIH VIRUSA INFEKTIVNIH ZA VRSTE RODA

## *Allium* U SRBIJI

**Rezime.** Sedmogodišnja istraživanja od 2010. do 2016. godine virusa infektivnih za vrste roda *Allium* ukazala su na značajno prisustvo virusa u Srbiji. Serološka testiranja sakupljenih uzoraka različitih vrsta lukova uključujući crni i bijeli luk, praziluk, ali i manje zastupljene vrste kao što su ljutika, aljma, biser luk, vlasac i sremuš ukazala su na prisustvo pet virusa: virus žute patuljivosti crnog luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virus žute prugavosti praziluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), obični latentni virus bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV), virus žute pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV) i virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV). Dodatnim testiranjem primjenom RT-PCR metode na bijelom luku potvrđeno je i prisustvo virusa roda *Allexivirus*: virus bijelog luka-A, -B, -C, -D, -E i -X (*Garlic virus*-A, -B, -C, -D, -E i -X; GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X), kao i prisustvo latentnog virusa ljutike (*Shallot latent virus*, SLV) na bijelom luku i aljmi čije je prisustvo prvi put dokazano u našoj zemlji. Detektovani virusi su se javljali i u pojedinačnim (36,1%) i u miješanim infekcijama (19,2%), a u najvećem broju testiranih uzoraka lukova utvrđeno je prisustvo OYDV (27%). U visokom procentu dokazano je i prisustvo GarCLV (26,2%), dok je treći po zastupljenosti bio LYSV, detektovan u 16,6% ispitivanih uzorka. Najrasprostranjeniji je bio GarCLV dokazan na 45% pregledanih lokaliteta. Drugi po rasprostranjenosti bio je OYDV (38%), a treći LYSV (24%).

Posmatrano po vrstama, virusne zaraze najviše ugrožavaju proizvodnju bijelog luka. Serološke i/ili molekularne analize ukazale su da je 91,5% ispitivanih uzoraka bijelog luka bilo zaraženo bar jednim od virusa uključenih u ova istraživanja (OYDV, LYSV, GarCLV i TSWV), a najčešće sa virusima roda *Allexivirus* (85,9% ispitivanih uzoraka). Međutim, u usjevima bijelog luka u znatnom procentu dokazano je i prisustvo OYDV (58%), koji je bio i najrasprostranjeniji, kao i GarCLV (45%). Od ukupno pet virusa (OYDV, LYSV, GarCLV, TSWV i IYSV) dokazanih na crnom luku najzastupljeniji bio je GarCLV (20,5%) koji je bio i najrasprostranjeniji, dok je drugi po zastupljenosti bio OYDV (17,1%). Od dva detektovana virusa (LYSV i GarCLV) na

praziluku najzastupljeniji i najrasprostranjeniji bio je LYSV dokazan u 32,4% testiranih uzoraka. Na ljutiki su dokazana tri virusa (OYDV, LYSV i GarCLV), na vlasцу dva (LYSV i GarCLV), na aljmi pet (OYDV, LYSV, IYSV, TSWV i SLV), na biser luku tri (OYDV, LYSV i GarCLV) i na sremušu jedan virus (OYDV).

Ovim istraživanjima uspostavljeni su ili unaprijeđeni protokoli za molekularnu dijagnostiku dvanaest virusa infektivnih za različite vrste lukova do nivoa vrste, pojedinačnim metodama detekcije, kao i multiplex RT-PCR metodom. Obavljena je i molekularna karakterizacija tri najzastupljenija i najraširenija virusa lukova: OYDV, GarCLV i LYSV, kao i novo detektovanih virusa za našu zemlju GarV-A, -B, -C i -D iz roda *Allexivirus* i SLV iz roda *Carlavirus* analizom sekvenci i/ili rekonstrukcijom filogenetskih stabala.

Filogenetska analiza odabranih izolata OYDV na osnovu sekvenci CP gena ukazala je na raznovrsnost populacije ovog virusa kod nas i grupisanje izolata u okviru četiri podgrupe: I, VI, VII i VIII, što ukazuje na postojanje višestruke introdukcije, širenje virusa intenzivnom međunarodnom trgovinom biljnog materijala, dužu prisutnost ovog virusa u našoj zemlji, kao i na protok gena između usjeva različitih vrsta lukova. Takođe, visok diverzitet sekvenci dijela N1b i CP gena utvrđen je i za izolate LYSV koji su se na osnovu filogenetskih analiza svrstali u okviru tri grupe: B, D i E što ukazuje na višestruke introdukcije i ovog virusa u našu zemlju. Na osnovu filogenetskih analiza sekvenci dijela CP gena izolati GarCLV svrstali su se u okviru jedne grupe (grupa I), što ukazuje na zajedničko porijeklo izolata iz Srbije, osim izolata iz praziluka, čije grupisanje može da ukaže na zasebnu introdukciju ili uticaj biljke domaćina. Na osnovu filogenetskih analiza sekvenci dijela CP i NABP gena izolati GarV-A svrstali su se u okviru tri grupe: I, III i IV, izolati GarV-B u okviru dvije grupe: I i III, izolati GarV-C u okviru tri grupe: I, II i IV, dok su izolati GarV-D pokazali najmanji stepen divergentnosti i grupisali su se u okviru jedne grupe (grupe IV). Grupisanje izolata vrsta roda *Allexivirus* ukazuje na više introdukcija ovih virusa u Srbiju i na intenzivan protok gena virusa kako između udaljenih djelova svijeta, tako i unutar same države.

Dobijeni rezultati tokom izrade ove doktorske disertacije ukazuju na raznovrsnost virusa lukova u Srbiji, kako u pogledu njihove zastupljenosti i rasprostranjenosti tako i u pogledu ispoljenih razlika na molekularnom nivou. Razlike u epidemiologiji detektovanih virusa, prije svega načinima održavanja i širenja, odnosno

postojanju različitih vektora ovih virusa ukazuju na značaj kontinuiranog praćenja prisustva virusa lukova i njihovu pravilnu detekciju, a sve u cilju razvoja i implementacije odgovarajućih mjera kontrole.

**Ključne reči:** lukovi, virusi, DAS-ELISA, RT-PCR, filogenetske analize, OYDV, LYSV, GarCL, SLV, TSWV, IYSV, *Allexivirus*

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitopatologija

**UDK:** 632.38:635.25/.26(497.11)(043.3)

# **SPECIES DIVERSITY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PREVALENT VIRUSES INFECTING *Allium* SPECIES IN SERBIA**

**Abstract.** A seven-year research from 2010 to 2016 conducted in Serbia indicated the significant presence of viruses infecting different *Allium* species including onion, garlic, leek and species of minor importance: shallot, Welsh onion, great headed garlic, chive and bear's garlic. Serological analyses showed presence of five viruses: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latent virus* (GarCLV), *Iris yellow spot tospovirus* (IYSV) and *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). For the first time in Serbia, additional RT-PCR analysis showed, presence of *Allexivirus* species (*Garlic virus*-A, -B, -C, -D, -E and -X; GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E and GarV-X) on garlic, as well as *Shallot latent virus* (SLV) on garlic and welsh onion. Viruses were detected in single (36.1%) and in mixed (19.2%) infections with the highest incidence of OYDV (27%). GarCLV was also detected in high incidence (26.2%), and the third one detected was LYSV (16.6%). Analyses revealed that the most widespread virus was GarCLV detected at 45% of surveyed localities, then OYDV (38%) and LYSV (24%).

Serological and/or molecular tests showed that garlic crop was the most infected with viruses. At least one virus included in the study (OYDV, LYSV, GarCLV, and TSWV) was present in 91.5% of samples tested. The most frequently detected in garlic crop were species of *Allexivirus* genus (85.9%), but high incidence of OYDV (58%) which was the most distributed, and GarCLV (45%) was also found. Onion samples were infected with five viruses (OYDV, LYSV, GarCLV, TSWV, and IYSV) of which GarCLV was the most prevalent and widespread. LYSV was the most prevalent and distributed virus on leek detected in 32.4% samples, second detected virus was GarCLV. This study also showed presence of three viruses (OYDV, LYSV, and GarCLV) on shallot, two viruses (LYSV and GarCLV) on chive, five viruses (OYDV, LYSV, IYSV, TSWV, and SLV) on Welsh onion samples, three viruses (OYDV, LYSV, and GarCLV) great headed garlic samples, as well as one virus (OYDV) on bear's garlic samples.



During this study the protocols for molecular detection of twelve viruses infecting various *Allium* species in Serbia were developed or improved, especially simultaneous detection of different *Allium* viruses. Three most frequent and widespread viruses (OYDV, GarCLV, and LYSV), as well as newly detected viruses GarV-A, -B, -C, and -D members of genus *Allexivirus*, and SLV member of genus *Carlavirus* were molecularly characterized.

Phylogenetic analysis based on sequence of OYDV CP gene showed high population diversity of OYDV in Serbia, and revealed that Serbian OYDV isolates belong to four subgroups (I, VI, VII, and VIII), that indicate multiple introductions in Serbia, intensive virus spread through international trade, long presence in our country, and gene flow among different *Allium* crops. Also, high sequence diversity of partial N1b and CP gene of LYSV isolates was determined. LYSV isolates were phylogenetically clustered into three groups (B, D, and E). These results are indication of multiple introductions of LYSV in Serbia. Phylogenetic analysis based on CP gene of GarCLV revealed that Serbian isolates, except leek isolate, belong to group I probably sharing the same ancestor. Separate grouping of leek GarCLV isolate pointed out a new introduction of GarCLV or it may happen to the effect of different host species. Phylogenetic analysis based on CP and NABP genes of GarV-A revealed that Serbian GarV-A isolates were clustered in three groups (I, III, and IV); GarV-B isolates belong to two groups (I and III); GarV-C isolates were grouped in three groups (I, II, and IV), and GarV-D showed the lowest diversity and isolates were clustered in one group (IV). Phylogenetic analyses of *Allexivirus* isolates showed multiple introductions in Serbia, intensive gene flow throughout the different parts of the world, as well through the country.

The obtained results illustrate that *Allium* viruses are diverse group of pathogens based on the number of species, their diversity and differences in molecular characteristics. Differences in the biological and epidemiological characteristics point out the importance of the monitoring of *Allium* viruses, successful and on time detection which will lead to development of adequate virus control measurements.

**Keywords:** viruses, *Allium*, DAS-ELISA, RT-PCR, phylogenetic analyses, OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, TSWV, IYSV, *Allexivirus*

**Scientific field:** Biotechnical Science

**Scientific discipline:** Phytopathology

**UDC:** 632.38:635.25/.26(497.11)(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	4
2.1. Vrste roda <i>Allium</i> kao gajene biljke.....	4
2.1.1. Ekonomski značajne vrste roda <i>Allium</i> .....	5
2.1.2. Gajenje, značaj i upotreba lukova.....	5
2.2. Bolesti i štetočine.....	10
2.3. Virusi lukova i njihov značaj.....	10
2.4. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja lukova u Srbiji.....	12
2.5. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa lukova.....	13
2.5.1. Virus žute patuljavosti crnog luka.....	13
2.5.2. Virus žute prugavosti praziluka.....	15
2.5.3. Obični latentni virus bijelog luka.....	17
2.5.4. Latentni virus ljutike.....	19
2.5.5. Virus žute pjegavosti irisa.....	20
2.5.6. Virus bronzavosti paradajza.....	22
2.5.7. Virusi roda <i>Allexivirus</i> .....	23
2.6. Kontrola virusa lukova.....	25
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	28
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	30
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka oboljelih biljaka.....	30
4.2. Serološka ispitivanja.....	31
4.2.1. Imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) primjenom poliklonalnih antitijela.....	31
4.3. Molekularna ispitivanja.....	33
4.3.1. Ekstrakcija ukupnih RNK.....	34
4.3.2. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR).....	35
4.3.2.1. Molekularna detekcija izolata OYDV.....	35
4.3.2.2. Molekularna detekcija izolata LYSV.....	37
4.3.2.3. Molekularna detekcija izolata GarCLV.....	38
4.3.2.4. Molekularna detekcija izolata IYSV.....	38
4.3.2.5. Molekularna detekcija izolata TSWV.....	39

4.3.2.6.	Molekularna detekcija izolata SLV .....	40
4.3.2.7.	Molekularna detekcija izolata <i>Allexivirus</i> spp.....	41
4.3.2.8.	Multiplex RT-PCR .....	45
4.3.3.	Analiza RT-PCR produkata .....	47
4.4.	Molekularna identifikacija najznačajnijih vrsta virusa luka .....	47
4.5.	Filogenetske analize.....	49
4.5.1.	Filogenetske analize OYDV .....	49
4.5.2.	Filogenetske analize LYSV .....	52
4.5.3.	Filogenetske analize GarCLV .....	53
4.5.4.	Filogenetske analize vrsta roda <i>Allexivirus</i> .....	55
4.5.5.	Filogenetske analize GarV-A.....	55
4.5.6.	Filogenetske analize GarV-B .....	56
4.5.7.	Filogenetske analize GarV-C .....	57
4.5.8.	Filogenetske analize GarV-D.....	58
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>60</b>
5.1.	Simptomi u polju i učestalost oboljenja.....	60
5.2.	Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima lukova primjenom DAS-ELISA metode .....	66
5.3.	Molekularna detekcija virusa lukova .....	94
5.3.1.	Detekcija OYDV primjenom RT-PCR metode .....	95
5.3.2.	Detekcija LYSV primjenom RT-PCR metode.....	95
5.3.3.	Detekcija GarCLV primjenom RT-PCR metode.....	96
5.3.4.	Detekcija IYSV primjenom RT-PCR metode.....	97
5.3.5.	Detekcija TSWV primjenom RT-PCR metode.....	98
5.3.6.	Detekcija SLV primjenom RT-PCR metode .....	99
5.4.	Molekularno dokazivanje izolata vrsta roda <i>Allexivirus</i> .....	100
5.4.1.	Detekcija GarV-A primjenom RT-PCR metode.....	101
5.4.2.	Detekcija GarV-B primjenom RT-PCR metode.....	102
5.4.3.	Detekcija GarV-C primjenom RT-PCR metode .....	103
5.4.4.	Detekcija GarV-D primjenom RT-PCR metode.....	104
5.4.5.	Detekcija GarV-E primjenom RT-PCR metode .....	105
5.4.6.	Detekcija GarV-X primjenom RT-PCR metode.....	106

5.5. Učestalost virusa roda <i>Allexivirus</i> .....	107
5.6. Simultana detekcija najznačajnijih virusa lukova .....	108
5.7. Molekularna identifikacija i filogenetske analize virusa lukova prisutnih u Srbiji .....	109
5.7.1. Molekularna identifikacija i filogenetske analize OYDV .....	111
5.7.2. Molekularna identifikacija i filogenetske analize LYSV .....	115
5.7.3. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarCLV .....	117
5.7.4. Molekularna identifikacija SLV .....	119
5.7.5. Molekularna identifikacija i filogenetske analize virusa roda <i>Allexivirus</i> ....	119
5.7.6. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-A .....	119
5.7.7. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-B .....	121
5.7.8. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-C .....	123
5.7.9. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-D .....	125
<b>6. DISKUSIJA</b> .....	128
6.1. Simptomi i učestalost oboljenja u polju .....	130
6.2. Primjena DAS-ELISA testa u identifikaciji virusa lukova u Srbiji .....	133
6.3. Rasprostranjenost virusa lukova u Srbiji .....	137
6.4. Molekularna ispitivanja .....	139
6.4.1. Simultana detekcija najznačajnijih virusa lukova .....	139
6.4.2. Molekularna ispitivanja OYDV .....	139
6.4.3. Molekularna ispitivanja LYSV .....	141
6.4.4. Molekularna ispitivanja GarCLV .....	143
6.4.5. Molekularna ispitivanja IYSV .....	144
6.4.6. Molekularna ispitivanja TSWV .....	145
6.4.7. Molekularna ispitivanja SLV .....	145
6.4.8. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija vrsta roda <i>Allexivirus</i> .....	146
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	153
<b>8. LITERATURA</b> .....	157
<b>BIOGRAFIJA</b> .....	180
<b>Izjava o autorstvu</b> .....	181

## 1. UVOD

Rod *Allium* jedan je od najvećih biljnih rodova, koji uključuje više od 800 vrsta (Fritsch et al., 2010). Vrste ovog roda koriste se u vidu začina, dodataka hrani, za svježu potrošnju, za liječenje mnogih bolesti, često i kao univerzalni lijekovi. Neke vrste gaje se i kao ukrasne biljke. Bijeli i crni luk sadrže veliki broj bioaktivnih, organskih jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji ugljeni hidrati. Prisutne su i veoma značajne mineralne materije, posebno kalijum i sumpor, kao i vitamini: B1, B2, C, E i K. Skorašnja istraživanja su pokazala da ekstrakti crnog i bijelog luka mogu sprečiti kardiovaskularne i druge bolesti, pa se sve više primijenjuju u alternativnoj medicini (Schwartz et al., 2006).

Divlje vrste roda *Allium* su rasprostranjene po čitavom umjerenom i subpolarnom pojasu sjeverne hemisfere, dok je samo jedna vrsta *A. dregeanum* opisana da nastanjuje južnu hemisferu. Međutim, gaje se u svim djelovima svijeta (Fritsch and Friesen, 2002). Svi predstavnici ove familije su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, geofite, koje nepovoljan dio godine preživljavaju u vidu skraćenih podzemnih stabala pokrivenih sočnim ljustama obrazujući lukovicu (Kojić i sar., 2001).

U ekonomski najvažnije vrste spadaju: crni luk (*A. cepa* L.), posebno varijeteti koji se uzgajaju zbog glavica, zatim bijeli luk (*A. sativum* L. var. *sativum*), vlasac ili rezanac (*A. schoenoprasum* L.), ljutika, šalot ili vlašac (*A. cepa* var. *aggregatum*), praziluk (*A. ampeloprasum* L. var. *porrum*) i aljma (*A. fistulosum*) (Brewster, 2008; Moravčević i sar., 2017).

Crni luk se smatra tipskim predstavnikom roda *Allium*, a poznat je i pod nazivima: crveni luk, crvenac, glavata ljutika, kapula ili mrki luk. Zauzima drugo mjesto u svjetskoj proizvodnji povrća, sa količinom od 93 miliona tona (FAO, 2016). Gaji se u skoro svim državama svijeta, a najveći proizvođač je Kina sa učešćem od 25% u ukupnoj svjetskoj proizvodnji (FAO, 2016).

Bijeli luk je druga najkonzumiranija vrsta iz roda *Allium* sa proizvodnjom od 26 miliona tona godišnje, a Kina je ponovo najveći svjetski proizvođač koji proizvede 80% od ukupne svjetske proizvodnje (FAO, 2016).

Na biljkama iz roda *Allium* opisan je veliki broj bolesti različite etiologije, koje mogu biti izazvane gljivama, pseudogljivama, bakterijama, virusima i drugim biotskim i abiotskim prouzročivačima. Međutim, najznačajnije štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta lukova izazivaju fitopatogeni virusi. Prirodne infekcije virusima mogu da izazovu gubitke najčešće od 25 do 50%, a zabilježene su štete i do 90%. Koji god da je primarni način prenošenja virusa lukova, oni se prenose i lukovicama, tako da vegetativno razmnožavanje favorizuje njihovo širenje i akumulaciju u lukovicama. Poznato je da crni i bijeli luk i praziluk mogu da zaraze mnogi virusi, međutim, kao opšte rasprostranjeni virusi lukova navode se: virus žute patuljivosti crnog luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virus žute prugavosti praziluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), obični latentni virus bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV), latentni virus ljutike (*Shallot latent virus*, SLV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) i virus žute pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV) (Van Dijk, 1993a; Katis et al., 2012).

Osim navedenih virusa u značajne viruse bijelog luka ubrajaju se i virusi roda *Allexivirus* koji su pronađeni na bijelom luku, koji ne izazivaju vidljive simptome, a čija rasprostranjenost, učestalost i štete koje nanose nijesu do kraja rasvijetljeni. Zbog asimptomatičnih infekcija, ovi virusi su posljednji otkriveni i nema previše podataka o njihovoj štetnosti u proizvodnji bijelog luka, mada po posljednjim istraživanjima, neki od ovih virusa mogu da izazovu značajna umanjenja prinosa na bijelom luku kada se jave u pojedinačnim infekcijama, a pogotovo ako se jave u miješanim infekcijama sa virusima roda *Potyvirus* i *Carlavirus* kada dolazi do sinergističkog efekta, a samim tim i većih gubataka u prinosu (Cafrune et al., 2006; Perotto et al., 2010; Katis et al., 2012; Celli et al., 2015).

Mada istraživanja brojnih autora u svijetu govore o značaju virusa za proizvodnju lukova (Walkey, 1990; Van Dijk, 1994; Salomon, 2002), malo je podataka o njihovoj pojavi, rasprostranjenosti i učestalosti na različitim vrstama lukova u našoj zemlji. Dosadašnja istraživanja virusa lukova u našoj zemlji bila su lokalnog karaktera i obuhvatila su analizu manjeg broja uzoraka sa ograničenog broja lokaliteta prije svega bijelog (Bagi et al., 2012) i crnog luka (Bulajić et al., 2008, 2009). Međutim, sve češća pojava simptoma i značajnih šteta u proizvodnji različitih vrsta lukova, ukazala su na potrebu za sveobuhvatnim istraživanjima prisustva i

rasprostranjenosti virusa lukova u našoj zemlji. Zbog toga, od 2010. godine počinju intenzivna istraživanja prisustva, ali i molekularne karakterizacije najznačajnijih virusa lukova u Srbiji (**Stanković et al.**, 2012; **Krstić i sar.**, 2014; **Milošević et al.**, 2015; **Vučurović i sar.**, 2015; **Vučurović et al.**, 2015, 2016, 2017) i uglavnom su dio istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

Imajući u vidu značaj virusa za proizvodnju različitih vrsta lukova, kompletna studija o prisustvu, rasprostranjenosti i učestalosti viroza lukova u našoj zemlji, kao i razvijanje i unaprijeđenje metoda detekcije, identifikacije i karakterizacije virusa koji ih prouzrokuju, a koje će se sprovesti u okviru izrade ove doktorske disertacije doprinijeće boljem razumijevanju izvora zaraze i načina širenja virusa lukova, a sve u cilju razvoja i implementacije pravovremenih i efikasnih mjera kontrole virusnih oboljenja.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Vrste roda *Allium* kao gajene biljke

Različite biljne vrste koje se označavaju zbirnim nazivom lukovi pripadaju rodu *Allium* koji karakteriše veliki diverzitet vrsta. Rod *Allium* broji više od 800 vrsta, a naziv roda potiče od grčke riječi  $\alpha\lambda\epsilon\omega$  što znači izbjegavati zbog neprijatnog mirisa (Boswell, 1883; Fritsch et al., 2010). Rod *Allium* spada u familiju Alliaceae, red Asparagales, klasa Monocotyledons (Block, 2010). Klasifikacija roda *Allium* je izvršena na osnovu botaničkih osobina, analize sumpornih sastojaka i molekularnih metoda (Fritsch et al., 2010). Većina vrsta roda formira glavice, a nekoliko vrsta se koristi svuda po svijetu za ishranu i kao takve su veoma važni usjevi (Block, 2010).

Divlje vrste roda *Allium* su rasprostranjene po čitavom umjerenom i subpolarnom pojasu sjeverne hemisfere, dok je samo jedna vrsta *A. dregeanum* opisana da nastanjuje južnu hemisferu (Fritsch and Friesen, 2002). U tropskom pojasu vrste roda *Allium* uspijevaju samo u planinskim regijama. U Evroazijskom regionu najveći diverzitet vrsta javlja se između Mediterana preko planina centralne Azije, sjevernog Irana, Avganistana, Pakistana, Tadžikistana, planina Mongolije, pa sve do južnog Sibira. Lukovi obično uspijevaju na otvorenim, sunčanim i sušnim staništima. Mnoge vrste su nađene u stepama, sušnim planinskim padinama, kamenitim padinama ili na zaravnima sa zakržljalom vegetacijom. *A. junceum* je vrsta koja je nađena da raste na visinama od 3660 do 5000 m nadmorske visine na Tibetu. Lukovi se rijetko sreću u gustoj vegetaciji jer su slabo kompetitivne biljke, mada postoje izuzeci kao što je *A. ursinum* (srijemuš, sremuš, medveđi luk) i neke vrste koje predstavljaju veoma štetne korove kao što je *A. vienale* i *A. carinatum*. Razvoj biljaka u ovako velikom rodu je različit, tako da postoje vrste koje cvjetaju u proljeće, u ljeto ili u jesen, cjelokupan razvoj biljaka može da traje od ranog proljeća do ranog ljeta ili da ima nekoliko ciklusa u toku godine. Kod biljaka koje uspijevaju u toplim sušnim predjelima javlja se ljetnja dormancija, dok kod vrsta koje uspijevaju u predjelima sa hladnijom klimom javlja se zimska dormancija (Brewster, 2008).

Vrste roda *Allium* mogu porasti 5 do 150 cm, sa glavicama od 2-3 mm do 8-10 cm u prečniku. Najveća glavica crnog luka, prema Ginisovoj knjizi rekorda, teška je 4,9 kg, dok je najveća glavica bijelog luka teška 1,19 kg (Block, 2010).

Lukovi nemaju karakterističan miris dok se ne povrijede biljke. Kada dođe do povrede, dolazi do hemijskih reakcija i oslabljanja sumpornih jedinjenja. Ova jedinjenja jakog mirisa i ukusa su klasifikovani kao sekundarni metaboliti i ona ne učestvuju u normalnom razvoju i rastu biljaka. Sekundarni metaboliti služe kao odbrana od predatora, parazita i bolesti, kao i da privlače oprašivače (**Block, 2010**).

### **2.1.1. Ekonomski značajne vrste roda *Allium***

U ekonomski najvažnije vrste spadaju: crni luk (*Allium cepa* L.), posebno varijeteti koji se uzgajaju zbog glavica, zatim bijeli luk (*A. sativum* L. var. *sativum*), luk vlasac ili rezanac (*A. schoenoprasum* L.), ljutika, šalot ili vlašac (*A. cepa* var. *aggregatum*), praziluk (*A. ampeloprasum* L. var. *porrum*) i aljma (*A. fistulosum*) (**Brewster, 2008, Moravčević i sar., 2017**).

U periodu od 2002. do 2004. godine ukupna vrijednost proizvodnje lukova koji se uzgajaju za ishranu bila je oko 21% vrijednosti proizvodnje paradajza, 54% vrijednosti proizvodnje krstašica i 120% vrijednosti proizvodnje ječma. Oko 46% vrijednosti proizvodnje lukova zauzima crni luk, 31% bijeli luk, 13% mladi crni luk i ljutika i 10% praziluk i ostali lukovi. Prosječna vrijednost međunarodne trgovine 2010. godine iznosila je 2167 miliona dolara, a ukupna količina prodatih lukova je 6,7 miliona tona, što je oko 9% ukupne svjetske proizvodnje povrća (**Block, 2010**).

### **2.1.2. Gajenje, značaj i upotreba lukova**

Crni luk se smatra tipskim predstavnikom roda *Allium* i zauzima drugo mjesto u svjetskoj proizvodnji povrća, sa količinom od 93 miliona tona (**FAO, 2016**). Gaji se u skoro svim državama svijeta, a najveći proizvođač je Kina sa učešćem od 25% u ukupnoj svjetskoj proizvodnji. U Srbiji je 2016. godine proizvedeno 57 hiljada tona na površini od 4772 ha (**FAO, 2016**).

Crni luk je najvjerojatnije potekao iz Persije i Beludžistana (jugozapadni Pakistan), ali takođe moguće je da crni luk potiče iz Palestine ili Indije. Crni luk se uzgaja hiljadama godina i više ne raste kao divlja biljka. Uzgaja se po čitavom svijetu u Evropi, Aziji, Sjevernoj i Južnoj Americi, Africi i Australiji (**Hedrick, 1972**). Pisani dokazi o upotrebi crnog luka se mogu naći još na hijeroglifima u egipatskim grobnicama još prije skoro 3000 godina prije nove ere. Crni luk u Egiptu je korišćen i u

raznim religijskim ritualima, postavljan je na oči, uši i uz noge na oltarima. Takođe, crni luk se koristio za balsamovanje, a pronađen je i u grudnom košu mumija. Herodot je zapisao da se crni luk, zajedno sa bijelim lukom, koristio u ishrani robova koji su pravili piramide u Gizi. Egipatski crni luk je bio blažeg ukusa i sve klase društva su ga konzumirale, osim svještenika kojima je konzumacija crnog luka bila zabranjena (**Hedrick, 1972**). Sumeri su uzgajali i koristili crni luk za spremanje hrane prije 4000 godina (**Fenwick et al., 1985**).

U Evropi, Columella je za crni luk prvi iskoristio naziv *unionem* (termin koji je možda osnova za englesku riječ „onion“ i za francusku „oignon“). U spisima Albertus Magnus (1193-1280) iz XII vijeka nije bilo crnog luka na spisku gajenih biljaka, dok su bijeli luk i praziluk bili, što ukazuje na to da su u većoj mjeri gajeni bijeli luk i praziluk, a da se crni luk smatrao egzotičnom biljkom u Srednjem vijeku. Od XVI vijeka crni luk više nije bio egzotična biljka i portugalski ljekar Amatus Lusitanus napisao je da se crni luk smatra najrasprostranjenijim povrćem, koji se se javlja kao dvije sorte: crvena i bijela (**Fenwick et al., 1985**). Na Američki kontinent crni luk je stigao možda i 1492. godine sa Kristoferom Kolombom, a Korteze je na svom maršu na Tenočtitlan 1519. godine primijetio da crni luk, praziluk i bijeli luk gaje domoroci (**Hedrick, 1972**).

Crni luk je dvogodišnja biljka, međutim, kada se gaji preko arpadžika ima trogodišnji ciklus razvika: u prvoj godini odgajaju se sitne lukovice - arpadžik, u drugoj - glavice za potrošnju i u trećoj sjeme. Korijenov sistem u crnog luka je žiličast, relativno slabo razvijen, sa malo korijenovih dlačica, razmješten pretežno u površinskom sloju zemljišta. Lukovica se sastoji od suvih i mesnatih sočnih listova i „plitice“, koja u botaničkom pogledu predstavlja pravo, jako skraćeno stablo, iz kog u drugoj, odnosno trećoj godini izrastaju cvjetonosna stabla („bikovi“). Šuplja cvjetonosna stabla, sa karakterističnim proširenjem u donjem dijelu, nose na svojim vrhovima loptastu cvast sa 200 do 1000 sitnih cvjetova. Iz jedne lukovice obično izbije više bikova, od 1 do 20. Luk je stranooplodna biljka i oprašuje se pomoću insekata. Sjeme luka je crno, uglavito i jako smežurano, apsolutne težine 3-5 g. Može da očuva klijavost do 3 godine, pri čemu sa svakom proteklom godinom klijavost brzo opada. Listovi se sastoje iz pera i lisnog rukavca. Pero je tamnozeleno, šuplje, sa slabijim ili jačim voštanim pepeljkom. Svaki novi list razvija se u pazuhu prethodnog lista i ubrzo

ga nadržaste. Na taj način lisni rukavci obrazuju lažno stablo koje u vrijeme stasavanja lukovica omekša, počne da se suši i pada na zemlju (**Popović, 1991**).

Gajeni crni luk se svrstava u dvije grupe: običan crni luk i *Aggregatum* grupa. Prvoj grupi pripada većina ekonomski značajnih sorti, koje formiraju samo jednu veliku glavicu i uglavnom se razmnožavaju sjemenom, kao i sorte koje se uzgajaju za salatu (**Block, 2010**). Glavice sorti iz grupe *Aggregatum* su manje nego kod običnog luka, jer se one brzo dijele i obrazuju bočne, sporedne glavice i tako formiraju bokor sitnijih glavica. Ova grupa se dijeli na dvije podgrupe: *A. cepa* var. *solanina* i *A. cepa* var. *aggregatum*. Lukovi iz podgrupe *A. cepa* var. *aggregatum* formiraju od 3 do 20 glavica koje su šire nego što su duže i obmotane su suvom ovojnicom. Ova podgrupa lukova se tradicionalno gaji u Finskoj i u sjevernoj Rusiji. Podgrupa *A. cepa* var. *solanina* formira grupu uskih, pojedinačnih glavica, a listovi i cvjetovi su manji nego kod vrsta iz grupe običnih crnih lukova. Vrste iz grupe *Aggregatum* se obično razmnožavaju vegetativno, mada danas postoje vrste ljutike koje se razmnožavaju sjemenom i gaje u Evropi, Izraelu i Sjevernoj Americi. *Aggregatum* grupa nije tako ekonomski značajna kao grupa običnih crnih lukova, ali u Evropi, Sjevernoj Americi, Argentini, Francuskoj i nekim tropskim regionima uzgaja se na većim površinama (**Brewster, 2008**).

Bijeli luk je druga najkonzumiranija vrsta iz roda *Allium* sa proizvodnjom od 26 miliona tona godišnje (**FAO, 2016**), a Kina je ponovo najveći svjetski proizvođač koji proizvede 80% od ukupne svjetske proizvodnje. U Srbiji je proizvedeno 4,8 hiljada tona u toku 2016. godine, na površini od 1581 ha (**FAO, 2016**).

Bijeli luk se uzgaja najmanje 5000 godina i pretpostavlja se da je odomaćen na području centralne Azije u regionu planine Tjen Šan (**Etoh and Simon, 2002**). Veoma rano bijeli luk je proširen u cijelu Aziju i Evropu, a iz Mediterana su istraživači i moreplovci prenijeli bijeli luk u podsaharsku Afriku i u Ameriku (**Fenwick et al., 1985; Etoh and Simon, 2002**). Kao i crni i bijeli luk se od davnina koristi u Egiptu, što je vidljivo i na grobnicama koje potiču iz ranog dinastičkog perioda Egipta (2925-2575 prije nove ere). U drijevnom medicinskom papirusu „*The Codex Elgers*”, nastalom oko 1500. godine prije nove ere, opisana su 22 preparata koja se prave od bijelog luka i koja su bila korišćena za liječenje glavobolje, zapaljenja grla, malaksalosti i mnogih drugih bolesti (**Fenwick et al., 1985**). Grci su takođe prepoznali ljekovita svojstva bijelog luka, pa su takmičari koji su učestvovali na Olimpijskim igrama koristili bijeli luk da bi

poboljšali izdržljivost. Rimljani su davali bijeli luk radnicima i vojnicima da ojačaju i da podstaknu hrabrost. Takođe, i kod Rimljana i Grka bijeli luk se koristio za liječenje raznih bolesti (**Fenwick et al.**, 1985).

Bijeli luk se gaji kao jednogodišnja biljka i razmnožava se vegetativnim pupoljcima, čenovima ili češnjevima. Neke sorte tjeraju cvjetonosno stablo, ali umjesto sjemena obrazuju sitne vazdušne lukovice. Bijeli luk razvija slab korijenov sistem koji se u zemljištu razmješta plitko. Stabljika se obrazuje, kao i u crnog luka, od lisnih rukavaca. Lukovicu sačinjava manji ili veći broj češnjeva (u prosjeku 10-12), koji su spolja obavijeni zajedničkim ovojnim listovima. Svaki češanj ima čvrstu, kožastu ovojnu ljuspu koja zatvara mesnat pupoljak iz kojeg se pod povoljnim uslovima razvija nova biljka. Broj, veličina i oblik češnjeva znatno varira u zavisnosti od sorte i spoljnih uslova (**Popović**, 1984).

Bijeli luk je potpuno sterilan i zbog toga se uzgaja samo iz češnjeva. Bijeli luk je selekcionisan za uzgoj većih glavica, pa je to uticalo na promovisanje sterilnosti. Postoje i drugi faktori zbog kojih je došlo do sterilnosti bijelog luka kao što su, ranije skupljanje glavica u vlažnijim klimatima i skidanje cvjetonosnog stabla radi povećanja porasta glavice (**Block**, 2010). Divlji bijeli luk je pronađen u Kazahstanu i Kirgistanu i konačno je omogućeno razmnožavanje bijelog luka sjemenom, čime će se smanjiti prenošenje raznih štetočina i patogena, a prije svega virusa, te će se smanjiti potreba za eliminacijom virusa (**Shemesh et al.**, 2008).

Praziluk se u znatno manjoj mjeri gaji u svijetu, sa godišnjom proizvodnjom od oko 2 miliona tona (**FAO**, 2016). Praziluk je takođe porijeklom iz Sredozemlja kao jedna od povrtarskih kultura koju su uzgajali još i Egipćani. Praziluk se ne ističe svojom hranljivom vrijednošću i sadržajem vitamina, ali njegov značaj je bio veliki jer se koristio u toku zime i proljeća kada je bilo malo drugog svježeg povrća (**Popović**, 1991).

Praziluk je dvogodišnja biljka koja u prvoj godini obrazuje vegetativne organe, listove i lisne rukavce iz kojih se obrazuje lažno stablo, koje može da izraste do visine od 50-80 cm. Generativni organi se obrazuju u drugoj godini, obično u toku proljeća i visine su do 150 cm. Na biljci se obrazuje samo jedno cvjetonosno stablo (**Moravčević i sar.**, 2017).

Pretpostavlja se da je ljutika donešena za vrijeme krstaških ratova iz Sirije, iz grada Askalona (**Fenwick et al.**, 1985). Ljutika, šalot, kozjak ili vlašac se kod nas gaji uglavnom u kućnim vrtovima i koristi se kao mladi zeleni luk rano sa proljeća, ali mogu se koristiti i zrele lukovice. Ljutika je višegodišnja biljka, koja se najčešće razmnožava vegetativno, lukovicama. Za ljutiku je karakteristično da formira više lukovica, izduženog, zaobljenog oblika, koje su obavijene košuljicom (**Popović**, 1991).

Aljma ili zimski luk je porijeklom iz Sibira, gdje se, kao i na Dalekom istoku, gaji i cijeni u mnogo većoj mjeri nego kod nas. Aljma je višegodišnja vrsta koja se obično gaji kao jednogodišnji ili dvogodišnji usjev, koji se razmnožava sjemenom ili dijeljenjem bokora. Kod nas se gaji sporadično, kao mladi luk koji stiže rano u proljeće. Ova vrsta ne formira pravu lukovicu, nego samo malo proširenje pri osnovi stabljike (**Popović**, 1991).

Vlasac, rezanac ili drobnjak je višegodišnja biljka koja se gaji zbog mladog lišća. Razmnožava se sjemenom ili dijeljenjem bokora. Vlasac ima duge tanke listove koji mogu da dostignu visinu od 20 cm, kada se reže. Na biljkama izaste novo mlado lišće, a bokor se sve više širi. U toku ljeta se reže nekoliko puta (**Popović**, 1991).

Biser luk je varijetet praziluka koji se obično uzgaja u baštama u Srednjoj i Zapadnoj Evropi, kao i kod nas. Formira mnoštvo malih bijelih lukovica, koje mogu da se koriste za kišeljenje. Razmnožava se vegetativno i veoma je otporan na hladnoću.

Osim kao povrće lukovi se uzgajaju i u dekorativne svrhe. Odnedavno ukrasni lukovi su postali popularni, zbog svojih cvjetova koji cvjetaju u baštama u proljeće i ljeto, ali i zbog rezanih cvjetova. Cvjetovi ovih vrsta mogu biti raznih boja: plavi, ljubičasti, bijeli i žuti. Cvast je u obliku prostog štita sa 30 do 60 malih cvjetova koji obično formiraju loptasti oblik. Veoma su otporne i mogu da uspjevaju u bilo kom tipu zemljišta i nijesu zahtjevne. Od ukrasnih vrsta najznačajnije su: *A. caeruleum*, *A. longifolium*, *A. moly*, *A. bisculum*, *A. neapolitanum*, *A. triquetrum*, *A. gramineum*, *A. giganteum*, *A. cyaneum* i *A. ramosum* od ukupno oko 200 vrsta koje postoje. Holandija prednjači u svjetskoj proizvodnji sa oko 40 vrsta koje uzgajaju (**Block**, 2010).

## 2.2. Bolesti i štetočine

Bolesti mogu da izazovu ozbiljne gubitke u proizvodnji lukova, kako u direktnim gubicima prinosa, tako i u kvalitetu crnog luka. Crni luk napadaju brojne gljive, pseudogljive, bakterije, virusi i drugi prouzrokovaci biljnih bolesti, a osjetljiv je i na abiotske faktore kao što su ekstremni vremenski uslovi, zagađenje vazduha i zemljišta, nepravilna ishrana i hemijska jedinjenja (Aleksić i sar., 1990; Ivanović i Ivanović, 2001; Šutić, 2005; Mijatović i sar., 2007). Bolesti se mogu javiti tokom proizvodnje arpadžika crnog luka, u polju i tokom skladištenja, a njihova uspješna kontrola zahtjeva integralnu primjenu agrotehničkih mjera kao što su plodored, sanitacija, optimalno đubrenje, preventivna primjena fungicida i baktericida kao i pravilno rukovanje, žetva i skladištenje. Pravilna i pravovremena dijagnoza prouzrokovaca bolesti najvažniji je korak u integralnoj zaštiti svake kulture, pa i lukova. Veoma je važno da se prouzrokovac identifikuje što ranije tokom njegovog razvoja kako bi se primijenile efikasne mjere kontrole. Pažljiv i redovan monitoring - pregled usjeva neophodan je korak u uspješnoj kontroli prouzrokovaca. Po svojim specifičnostima, bolesti crnog luka mogu se podijeliti na bolesti sjemena i klijanaca, bolesti korijena i lukovica, bolesti lista i abiotske poremećaje (Bulajić et al., 2008).

## 2.3. Virusi lukova i njihov značaj

Proizvodnju svih vrsta gajenih lukova, a pogotovo bijelog luka i ljutike, ugrožavaju brojni biljni virusi. U svijetu je opisano preko deset virusa koji se javljaju u pojedinačnim ili miješanim infekcijama i izazivaju značajne gubitke u proizvodnji lukova širom svijeta (Walkey and Antill, 1989; Conci, 1997; Canavelli et al., 1998; Conci et al., 2003; Lunello et al., 2007; Perotto et al., 2010). Kao ekonomski najznačajniji i najrasprostranjeniji virusi navode se vrste rodova *Potyvirus* (virus žute patuljavosti crnog luka-*Onion yellow dwarf virus*, OYDV i virus žute prugavosti paraziluka-*Leek yellow stripe virus*, LYSV), zatim vrste roda *Carlavirus* (obični latentni virus bijelog luka-*Garlic common latent virus*, GarCLV i latentni virus ljutike-*Shallot latent virus*, SLV), kao i virusi roda *Allexivirus* (A, B, C, D, E i X virus bijelog luka-*Garlic virus* -A, -B, -C, -D, -E, -X, X virus ljutike-*Shallot virus X*, ShVX i filamentozni virus bijelog luka koji se prenosi grinjama-*Garlic mite-borne filamentous virus*, GarMbFV). Osim ovih virusa, u pojedinim regionima proizvodnje kao virusi koji mogu

izazvati štete navode se i: virus patuljivosti bijelog luka (*Garlic dwarf virus*, GDV, *Fijivirus*), virus žute prstenaste pjegavosti artičoke (*Artichoke yellow ringspot virus*, AYRV, *Nepovirus*), virus žute prstenaste pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV, *Orthotospovirus*), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV, *Orthotospovirus*), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV, *Cucumovirus*) i virus bijele prugavosti praziluka (*Leek white stripe virus*, LWSV, *Betanecrovirus*) (Katis et al., 2012).

Većina virusa koji su infektivni za lukove ne prenose se pravim sjemenom, tako da crni luk, praziluk i vlasac niču kao bezvirusne jedinke, međutim, bijeli luk i ljutika, koji se razmnožavaju vegetativnim putem, akumuliraju viruse iz prethodnih godina uzgajanja i održavaju ih u vegetativnom materijalu (Salomon, 2002). Međutim, iako crni luk i druge vrste koje se gaje iz sjemena niču kao bezvirusne biljke, ubrzo bivaju zaražene virusima koji su preživjeli u korovskim biljkama, samoniklim i divljim vrstama lukova usled efikasnog prenošenja virusa velikim brojem različitih vektora (Walkley, 2018). Zbog vegetativnog načina razmnožavanja smatra se da je sadni materijal bijelog luka skoro potpuno zaražen miješanim infekcijama u kojima su dominantni virusi iz rodova *Potyvirus* i *Carlavirus* koje prenose biljne vaši, kao i virusi roda *Allexivirus* koje prenose grinje (Van Dijk, 1993b; Cafrune et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2010; Katis et al., 2012). Upravo zbog toga, dolazi do akumulacije virusa u sadnom materijalu i povećanja gubitaka prinosa tokom sukcesivnog gajenja, zbog čega bijeli luk spada u najugroženije povrtarske biljke (Davis, 1995; Bagi i sar., 2010). Virusna oboljenja na lukovima su opšte rasprostranjena i izazivaju velike gubitke u čitavom svijetu (Delecolle and Lot, 1981; Van Dijk, 1993b). Najveće ekonomske štete koje se ogledaju u smanjenju težine i kvaliteta lukovica izazivaju virusi roda *Potyvirus*, dok se virusi iz rodova *Carlavirus* i *Allexivirus* uglavnom javljaju u latentnim infekcijama i ispoljavaju sinergizam sa virusima roda *Potyvirus* (Lunello et al., 2007; Perotto et al., 2010; Bagi et al., 2012). Procjenjuje se da virusi mogu da smanje prinos do 50% tokom sukcesivnog gajenja (Lot et al., 1998; Conci et al., 2003), a oboljenje “mozaik bijelog luka”, koje izaziva kompleks virusa, izaziva gubitak u težini glavica i do 88% (Walkey and Antill, 1989; Canaveli et al., 1998; Lot et al., 1998). Takođe, težina bezvirusnih glavica je od 32 do 216% veća nego kod zaraženih glavica kod većine ispitivanih kultivara (Walkey and Antill, 1989; Conci, 1997; Conci et al.,



2003; **Melo Filho et al.**, 2006). Istraživanja su pokazala i da bezvirusni bijeli luk ima 60-90% teže glavice od onog zaraženog OYDV (**Conci**, 1997), dok je kod bijelog luka zaraženog LYSV težina glavice bila smanjena do 28% (**Lunello et al.**, 2007).

Ekonomski značaj latentnih infekcija virusa roda *Allexivirus* i *Carlavirus* nije do kraja razjašnjen i izgleda da su štete koje izazivaju ograničene, ali ne i beznačajne. Tako, neki od virusa roda *Allexivirus* mogu da izazovu smanjenje prinosa od 12% do 32% u pojedinačnim infekcijama. Međutim, biljke koje su prvo zaražene virusima roda *Allexivirus*, a nakon toga i nekom vrstom iz roda *Potyvirus* i *Carlavirus* imaju značajno smanjen prinos (**Cafrune et al.**, 2006; **Perotto et al.**, 2010; **Celli et al.**, 2015). Da bi se uspješno kontrolisala infekcija lukova ovim virusima pravovremena i tačna dijagnostika je neophodna, kao i razvijanje metoda za dobijanje bezvirusnog sadnog materijala, kao polazne osnove za dobijanje zdravih usjeva (**Conci et al.**, 2005). Zbog šteta koje nanose i ekonomskog značaja virusi na lukovima predstavljaju jedan od najvažnijih ograničavajućih faktora proizvodnje lukova u svim regionima gajenja u svijetu.

#### **2.4. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja lukova u Srbiji**

U Srbiji se tradicionalno gaje različite vrste lukova. Viroze lukova donedavno nijesu predstavljale polje intenzivnog ispitivanja u svijetu i u našoj zemlji, jer su u poređenju sa drugim prouzrokovateljima bolesti bile manje značajne. Međutim, situacija se drastično promijenila posljednjih godina kada se pojavljuju novi virusi i dolazi do izmjene populacije vektora, što zajedno dovodi do pojave i rasprostranjenja novih virusa koji potencijalno mogu da ugroze proizvodnju luka (**Conci et al.**, 2003; **Lunello et al.**, 2007; **Bulajić et al.**, 2008, **Bagi et al.**, 2012; **Parrano et al.**, 2012; **Chodorska et al.**, 2012, **Celli et al.**, 2015).

Iako virusi zauzimaju značajno mjesto među prouzrokovateljima oboljenja različitih vrsta lukova, malo je podataka o njihovoj pojavi i raširenosti u Srbiji. Tokom 2008. godine **Bulajić et al.** (2008) detektovali su prvi put prisustvo IYSV na crnom luku u našoj zemlji, a zatim je obavljena i detaljna karakterizacija izolata ovog virusa u našoj zemlji (**Bulajić et al.**, 2009). Prva istraživanja viroza bijelog luka obuhvatila su testiranje genotipova jesenjeg bijelog luka iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo tokom 2009. godine i ukazala su na prisustvo dva virusa: OYDV i LYSV u Srbiji (**Bagi i sar.**, 2010). Od 2011. godine započinju intenzivnija istraživanja prisustva

virusa na različitim vrstama lukova i uglavnom su dio istraživanja u okviru ove disertacije. Na crnom i bijelom luku 2011. godine dokazano je prisustvo i TSWV, drugog virusa iz roda *Orthotospovirus* (Stanković et al., 2012), a zatim i GarCLV na bijelom luku (Vučurović et al., 2015). Istraživanja sprovedena 2011. i 2012. godine ukazuju na sve veće prisustvo GarCLV na bijelom luku u našoj zemlji. Pojedinih godina i na određenim lokalitetima, GarCLV je bio prisutan u velikom procentu, izazivajući izražene simptome koji mogu da dovedu do značajnih gubitaka u proizvodnji (Vučurović i sar., 2015). Takođe, u Srbiji je prvi put dokazano i prisustvo OYDV na ljutiki (Milošević et al., 2015) i LYSV na praziluku (Vučurović et al., 2016). Nakon prve detekcije LYSV na praziluku, tokom 2013. godine prisustvo LYSV dokazano je i na bijelom luku (Vučurović et al., 2017).

## 2.5. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa lukova

### 2.5.1. Virus žute patuljavosti crnog luka

Virus žute patuljavosti crnog luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) član je roda *Potyvirus*, familije *Potyviridae*. Prvi put je opisan na usjevima luka u Americi (Melhus et al., 1929), a kasnije je dokazan i u Evropi, Novom Zelandu, Sjevernoj Africi, Južnoj i Sjevernoj Americi, pri čemu je dijagnoza virusa bila zasnovana na simptomatologiji (Bos, 1983; Walkey, 1990).

OYDV se javlja u svim zemljama u kojima se gaje crni i bijeli luk (Bos, 1981; Van Dijk, 1993b). U uzorcima bijelog luka koji su prikupljeni širom svijeta učestalost OYDV bila je veoma visoka (Van Dijk, 1993b). Tokom istraživanja sprovedenih u Italiji i Grčkoj, OYDV se pokazao kao najučestaliji virus bijelog luka u svim ispitivanim regionima (Dovas et al., 2001a; Dovas and Vovlas, 2003).

Čestice OYDV su izdužene, filamentozne, dužine 772-823 nm i širine 12 nm. Genom OYDV čini jednolančana, linearna, infektivna RNK, [ss(+) RNK]. Genom je dugačak 10538 nukleotida (nt) i kodira poliprotein od 3403 amino kisjelina (aa), koji se proteolitičkim enzimima cijepa na 11 manjih funkcionalnih proteina (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro Nib, CP, PIPO) (Wylie et al., 2018), kao i kod ostalih predstavnika *Potyvirus* roda (Chen et al., 2003). Za 5' kraj nukleinske kisjeline, kovalentno je vezan protein koji se označava kao VPg (*viral protein genome-linked*), molekulske mase 24 kDa, a na 3' kraju se nalazi polyA region sastavljen od više

adenina. Ulogu proteaza imaju P1, HC-pro i NIa proteini. U građi virusnih čestica učestvuju CP protein koji gradi kapsid i VPg protein koji je kovalentno vezan za 5' kraj nukleinske kiseline. Ostali proteini su nestrukturani, javljaju se u zaraženim biljnim ćelijama i imaju ulogu u replikaciji virusa, širenju virusa u biljci i prenošenju virusa vašima (**Chen et al.**, 2003; **Wylie et al.**, 2018)

Osim izolata OYDV iz crnog luka, postoje i drugi sojevi vezani za specifične domaćine, kao što je OYDV-G koji inficira bijeli luk i OYDV-GHG koji zaražava *A. ampeloprasum* var. *holmense* (**Van Dijk**, 1993b). Ovi sojevi javljaju se isključivo na svojim domaćinima i ne mogu zaraziti crni luk i praziluk, kao i što OYDV izolati sa crnog luka ne mogu da zaraze bijeli luk. Sojevi OYDV (OYDV<sup>vir</sup>, OYDV<sup>com</sup>) koji se razlikuju u virulentnosti, utvrđeni su na crnom luku i ljutiki (**Van Dijk**, 1993b).

Prirodni domaćini OYDV su biljne vrste iz roda *Allium*, uglavnom crni i bijeli luk. Takođe, zaražava *Allium scorodoprasum* L., *A. fistulosum*, *A. cepa* var. *aggregatum*, *A. schoenoprasum* i *A. ampeloprasum* var. *porrum*. Takođe, OYDV je pronađen i na nekim vrstama ukrasnih biljaka roda *Allium* (**Krstić i sar.**, 2018). Prisustvo OYDV na praziluku nije često. Sredinom 70-ih godina XX vijeka **Šutić i Tošić** (1976) su utvrdili prisustvo OYDV na praziluku u Srbiji, a nedavno i **Fernández-Tabanera et al.** (2018) na praziluku u Španiji. U Holandiji virus nije detektovan u divljim vrstama roda *Allium*, kao što su: *A. viinale*, *A. oleraceum*, *A. ursinum* i *A. scorodoprasum* (**Van Dijk**, 1993b), iako se vrsta *A. viinale* navodi kao domaćin virusa (**Šutić**, 2005). Još jedan prirodni domaćin ovog virusa je *Narcissus pseudonarcissus* (**Van Dijk**, 1993b).

Kao eksperimentalni domaćini za umnožavanje OYDV mogu se koristiti crni i bijeli luk, kao i *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* i *C. album* (**Bos et al.**, 1978b; **Mahmoud et al.**, 2007).

Kod vrsta roda *Allium* virus izaziva zaostajanje u porastu biljaka, pojavu prugastih žutih pjega na listovima, kovrdžanje i lomljenje listova. Kod crnog luka simptomi su pretežno u vidu uvijanja cvjetonosnih stabala, smanjenja broja cvjetova i sjemena, kao i slabljenja kvaliteta sjemena. Zaražene glavice luka prijevremeno propadaju i ranije kličaju, a napadnute biljke su podložnije izmrzavanju (**Paludan**, 1980). Kod bijelog luka simptomi zavise od soja virusa i genotipa biljke. OYDV

uglavnom izaziva žutu i hlorotičnu prugavost, dok blaži sojevi izazivaju blaže simptome (**Van Dijk**, 1993b).

OYDV se održava u zaraženom sadnom materijalu, i predstavlja veliki problem prilikom zasnivanja novih zasada. Kod vrsta koje se razmnožavaju vegetativno ovo ima veoma veliki značaj, jer se teško dolazi do bezvirusnog sadnog materijala. Takođe, OYDV može da se održi u samoniklim lukovicama, u divljim lukovima, kao i u ukrasnim lukovima (**Van Dijk**, 1994; **Krstić i sar.**, 2018).

OYDV prenosi više od 50 vrsta biljnih vaši, na neperzistentan način (**Bos**, 1981). Najvažnije vrste vektori virusa su: *Myzus ascalonicus*, *M. persicae*, *Rhopalosiphum maidis* i *Acyrtosiphon pisum* (**Drake et al.**, 1933; **Van Dijk**, 1993b). Virus se prenosi i mehanički, ali ovaj način prenošenja ima značaja samo u eksperimentalnim uslovima. Prenosjenje sjemenom crnog luka nije utvrđeno (**Diekmann**, 1997).

### 2.5.2. Virus žute prugavosti praziluka

Virus žute prugavosti praziluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV) član je roda *Potyvirus*, familije *Potyviriidae*. Oboljenje koje ovaj virus izaziva prvi put je zapaženo 1937. godine, a opisao ga je **Kupke** (1957) (loc. cit. **Katis et al.**, 2012), dok je virus tek kasnije identifikovan i imenovan kao *Leek yellow stripe virus* (**Bos et al.**, 1976).

LYSV je jedan od najvažnijih i najrasprostranjenijih virusa bijelog luka i praziluka (**Bos**, 1981; **Diekmann**, 1997). Jedan je od najčešćih virusa u Izraelu (**Salomon et al.**, 1996; **Shibolet et al.**, 2001), Grčkoj (**Dovas et al.**, 2001a), Italiji (**Dovas and Vovlas**, 2003), Siriji (**Mohammad et al.**, 2007), Turskoj (**Fidan and Baloglu**, 2009), a takođe je prisutan u usjevima bijelog luka u Francuskoj, Egiptu, Sloveniji i Maroku (**Delecolle and Lot**, 1981; **Van Dijk**, 1993b; **Lot et al.**, 1998; **Mavrič and Ravnikar**, 2005). Detektovan je i u Brazilu (**Fajardo et al.**, 2001), Argentini (**Conci et al.**, 2002), SAD (**Pappu et al.**, 2005), Kini (**Chen et al.**, 2002), kao i u Vijetnamu (**Ha et al.**, 2007).

Čestice ovog virusa su izdužene, dužine od 700 do 750 nm i širine 14 nm (po nekim podacima 815-820 x 14-16 nm). Kao i kod prethodnog virusa, genom LYSV je izgrađen od jednolančane, linearne, infektivne RNK [ss(+)RNK] koja sadrži 10141 nukleotida (**Chen et al.**, 2002). Ukoliko se epidermalne ćelije zaraženih biljaka oboje

posebnim tehnikama, pod svjetlosnim mikroskopom se u blizini jedra mogu uočiti fibrozne ili granularne inkluzije, a na ultratankim presjecima zaraženog tkiva, pod elektronskim mikroskopom uočavaju se tubularne, lamelarne i „*pinwheel*“ inkluzije. Postoje izolati koji zaražavaju samo bijeli luk (LYSV-G), izolati koji zaražavaju samo ljutiku (LYSV-GhG) (**Van Dijk**, 1993b) i oni ne mogu da zaraze crni luk i praziluk. Izolati sa praziluka (LYSV-L) mogu da zaraze bijeli luk, ali u manjoj mjeri (**Diekman**, 1997). U Argentini otkriven je soj virusa (LYSV-L-Arg) koji, pored praziluka, može da zarazi i bijeli luk (**Lunello et al.**, 2002).

Virus je infektivan za praziluk, bijeli luk, *A. ameloprasum*. var. *holmense* i razne divlje i ukrasne vrste roda *Allium* (**Salomon et al.**, 1996; **Diekman**, 1997; **Dovas et al.**, 2001b). Slabo je infektivan za crni luk i ljutiku, dok je aljma imuna na ovaj virus (**Bos**, 1981; **Van Dijk**, 1993b; **Diekman**, 1997; **Lunello et al.**, 2002).

Simptomi na praziluku su veoma varijabilni i uglavnom zavise od sorte. Simptomi su izraženiji ukoliko su biljke istovremeno zaražene sa LYSV i latentnim virusom ljutike (*Shallot latent virus*, SLV) i običnim latentnim virusom bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV). Zaražene biljke su osjetljivije na rane mrazeve. Najtipičniji simptom je pojava manje ili više jasne žute prugavosti lista, koja počinje prvo da se javlja u osnovi lista, a zatim se širi prema vrhu. Često se javlja i isprekidani mozaik od kraćih ili dužih hlorotičnih pruga, kao i deformacija, naboranost i uvijenost lišća, praćena stanjivanjem i kržljavošću stabala, koja postaju lakša. Zaražene biljke često zaostaju u porastu. Ponekad cijele biljke postaju u potpunosti hlorotične i blago klonule (**Bos et al.**, 1978b).

Simptomi na bijelom luku javljaju se u vidu nepravilnih, isprekidanih svijetlo i tamno zelenih crtica i pruga na najmlađem lišću i jedva primijetnim mozaikom. Svijetlo-tamno zelena prugavost prelazi u žutu prugavost na donjem i srednjem lišću. U početku simptomi su slabije izraženi nego kod OYDV, a kasnije pred sazrijevanje postaju približnog inteziteta. Utiču na smanjenje prinosa oko 20%, u zavisnosti od sorte i vremena infekcije. Rane infekcije (mart) utiču na povećanje gubitka prinosa i do 30% u odnosu na infekcije ostvarene u aprilu (**Lot et al.**, 1998). Simptoma na crnom luku skoro i da nema, što ga razlikuje od OYDV (**Bos**, 1981).

LYSV se održava u zaraženim prezimljujućim biljkama, samoniklim lukovicama i u divljim lukovima koji predstavljaju glavni izvor zaraze za narednu

vegetaciju (Krstić i sar., 2018). Takođe, značajna odlika ovog virusa je da se uglavnom ne prenosi sa jedne biljne vrste na drugu, kao što se ne prenosi sa crnog na bijeli luk, tako da su ugroženi samo usjevi u kojima ima zaraženih biljaka, kao i susjedni usjevi iste vrste (Van Dijk, 1994).

Prenosi se vašima na neperzistentan način. *Aphis fabae* (Verhoyen and Horvat, 1973), *Myzus persicae* (Bos et al., 1978b), *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *A. nerii*, *Uroleucon sonchi*, *Hyperomyzus carduellinus* i *A. craccivora* (Abd El-Wahab, 2009) su biljne vaši za koje je eksperimentalno dokazano da prenose LYSV, a osim toga *Myzus persicae* može prenijeti LYSV-L-Arg sa praziluka na bijeli luk (Lunello et al., 2002). Virus se ne prenosi sjemenom luka (Bos et al., 1978b), a prenosi se mehanički, sokom zaraženih biljaka.

### 2.5.3. Obični latentni virus bijelog luka

Obični latentni virus bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV) je predstavnik roda *Carlavirus*, familije *Betaflexiviridae*, reda *Tymovirales*. Prvi put je opisan u Francuskoj (Delecolle and Lot, 1981), a kasnije i u Njemačkoj (Graichen and Leistner, 1987).

Danas, obični latentni virus bijelog luka je kosmopolitski virus, rasprostranjen svuda gdje se bijeli luk gaji. Virus je prevalentan u usjevu bijelog luka u Francuskoj, Španiji, Izraelu i Sloveniji (Delecolle and Lot, 1981; Pena-Iglesias and Ayouso, 1982; Van Dijk, 1993a; Shibolet et al., 2001; Mavrič and Ravnikar, 2005). Takođe, utvrđen je u Italiji (Bellardi et al., 1995; Dovas and Vovlas, 2003), Turskoj (Fidan and Baloglu, 2009), Siriji (Mohammad et al., 2007), Grčkoj (Dovas et al., 2001a), Brazilu (Fajardo et al., 2001) i SAD (Pappu et al., 2005).

Čestice ovog virusa su izduženog oblika, blago savitljive, dužine 650 nm i širine 12-15 nm. Genom je izgrađen od jednolančane, linearne, infektivne RNK, [ss(+) RNK] koja čini 6% težine čestice i sadrži šest ORF (*Open Reading Frame*) sa kratkim 3' i 5'UTR regionom. 5' kraj RNK je metilirani u formi m<sup>7</sup>G, a na 3' kraju se nalazi polyA region izgrađen od većeg broja adenina (Krstić i sar., 2018). ORF-1 kodira protein koji sadrži konzervativna mjesta za aktivnost metiltransferaze, helikaze i RNK zavisne RNK polimeraze. Manji ORF kodiraju proteine uključene u kretanje od ćelije do ćelije (*Triple gene block*, TGB), a nakon koga slijedi CP gen (Adams et al., 2012).

GarCLV ima širok krug prirodnih domaćina u okviru porodice Alliaceae. Iako je infektivan za više od 50 vrsta ove porodice, glavni domaćin mu je bijeli luk. Prvo je pronađen u bijelom luku, a zatim i u crnom luku, praziluku i *A. ampeloprasum* var. *holmense* (Van Dijk, 1993a).

Eksperimentalni domaćini za ovaj virus su praziluk i *Nicotiana occidentalis*. *N. occidentalis* je pogodna za izolaciju virusa, a praziluk za njegovo umnožavanje. Za izolaciju virusa moguće je i prenošenje pojedinačnih lokalnih lezija na *Chenopodium amaranticolor* ili *C. argentea* prije prenošenja na praziluk ili crni luk za umnožavanje (Van Dijk, 1993a) i prečišćavanje (Helguera et al., 1997).

U pojedinačnim infekcijama, ovaj virus ne izaziva izražene simptome. Zaražen bijeli luk i praziluk ispoljavaju veoma blage simptome ili se simptomi uopšte ne javljaju (latentne zaraze) (Bellardi et al., 1995). Međutim, u kompleksnim infekcijama sa drugim *Carlavirus*-ima i *Potyvirus*-ima, simptomi su izraženiji i štete su značajne. Utvrđeno je da se simptomi izazvani sa OYDV i LYDV značajno pojačavaju ukoliko je prisutan i GarCLV (Takaichi et al., 1998). Osnovni tip simptoma je mozaik, koji može da bude blag ili izražen. Na mladim listovima ispoljavaju se hlorotične uzane pruge i crtice. Hlorotične crtice se međusobno spajaju i šire se duž liske, što može izazvati opštu hlorozu lišća. Na donjim listovima javlja se žutilo koji može da prati nekroza koja počinje od vrha lista, a biljke zaostaju u porastu. Češnjevi su slabije razvijeni, a nedovoljno razvijene lukovice imaju znatno smanjenu težinu.

Uprkos velikom broju domaćina, zbog neefikasnog prenošenja vašima, najvažniji način održavanja ovog virusa je u zaraženim glavicama bijelog luka, koje se koriste za sadnju (Torriconi et al., 2015; Krstić i sar., 2018).

Najvažniji način prenošenja GarCLV je prenošenje vegetativnom propagacijom, naročito bijelog luka. Osim toga, virus se prenosi i biljnim vašima na neperzistentan način (Van Dijk, 1993a; Barg et al., 1994; Barg et al., 1997), ali prenošenje vašima nije tako efikasno kao prenošenje OYDV i LYDV (Torriconi et al., 2015). Prenosjenje sjemenom nije utvrđeno, a mehaničko prenošenje ima značaja samo u laboratorijskim uslovima (Katis et al., 2012).

#### 2.5.4. Latentni virus ljutike

Latentni virus ljutike (*Shallot latent virus*, SLV) pripada rodu *Carlavirus*, porodici *Betaflexiviridae*, redu *Tymovirales*. Prvi put je detektovan u Holandiji na ljutiki (Bos et al., 1978a).

SLV se uglavnom javlja u Aziji, Evropi i Meksiku (Bos, 1982; Van Dijk, 1993a; Barg et al., 1994). U Evropi je pronađen na bijelom luku u Grčkoj, Siriji, Sloveniji i Italiji (Dovas et al., 2001a; Dovas and Vovlas, 2003; Mavrič and Ravnikar, 2005; Mohammad et al., 2007), kao i na ljutiki u Francuskoj i Španiji (Van Dijk, 1993a).

Virusne čestice su izduženog oblika dužine oko 650 nm (Bos et al., 1978a). Genom sačinjava jednolančana, linearna, infektivna RNK [ss (+) RNK] dužine 8353-8363 nukleotida i ima šest otvorenih okvira čitanja (*Open Reading Frame*, ORF) (Chen et al., 2001; Song et al., 2002), kao kod prethodnog virusa.

Ima širok krug domaćina i prirodni krug domaćina čine samo vrste iz roda *Allium*: crni i bijeli luk, praziluk, ljutika, *A. scorodoprasum*, *A. aggregatum*, *A. ampeloprasum* var. *sectivum* i *A. fistulosum* (Van Dijk, 1993a). Kao eksperimentalni domaćini mogu se koristiti *Chenopodium album*, *C. amaranticolor* i *C. quinoa* na kojima SLV izaziva karakteristične lokalne pjege (Bos et al., 1978a).

SLV izaziva latentne zaraze na ljutiki, crnom i bijelom luku u slučaju pojedinačnih infekcija. Do pojave simptoma dolazi kada se virus javi u miješanim infekcijama sa virusima iz roda *Potyvirus*, usled sinergističkog djelovanja ovih virusa (Bos et al., 1978a). Na praziluku, u pojedinačnim infekcijama, se javljaju simptomi u vidu blage crtičaste hloroze, dok u miješanim infekcijama sa LYSV dolazi do izbjeljivanja, pa čak i propadanja biljaka (Paludan, 1980).

Najvažniji način održavanja ovog virusa imaju zaražene lukovice, odnosno vegetativni sadni materijal (Krstić i sar., 2018). Virus se prenosi vašima na neperzistentan način, a kao najznačajniji vektori navode se vrste: *Aulacorthum solani*, *Myzus ascalonicus*, *M. persicae*, *Neutoxoptera formosana* i *A. gossypii* (Bos et al., 1978a; Sako et al., 1990). U laboratorijskim uslovima virus mehanički može biti prenijet na veći broj biljnih vrsta.



### 2.5.5. Virus žute pjegavosti irisa

Virus žute pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV) je predstavnik roda *Orthotospovirus*, porodice *Tospoviridae*, reda *Bunyavirales*. Simptomi karakteristični za zaraze izazvane ovim virusom prvi put su uočeni 1989. godine na crnom luku u SAD, a zatim i na irisu u Holandiji. Kasnije, virus je detektovan i na crnom luku u Izraelu i Brazilu, a do 2004. godine njegovo prisustvo je potvrđeno u svim zemljama u zapadnom delu SAD.

Danas se IYSV ubraja u grupu veoma destruktivnih „*emerging*“ virusa čija se rasprostranjenost naglo povećala posljednjih godina i prisutan je u mnogim zemljama Sjeverne i Južne Amerike, Evrope, Azije, Afrike i Australije. Prisustvo virusa dokazano je u Njemačkoj, Holandiji, Austriji, SAD, Brazilu, Indiji, Australiji, Japanu, Južnoj Africi, Peru, Meksiku, Čileu (Cortes et al., 1998; Coutts et al., 2003; Creamer et al., 2004; du Toit et al., 2007; Gent et al., 2006; Kumar and Rawal, 1999; Leinhos et al., 2007; Mullis et al., 2004, 2006; Plenk and Grausgruber-Groger, 2011; Pozzer et al., 1999; Ravi et al., 2006; Rosales et al., 2005; Schwartz et al., 2002). U Mediteranskom regionu prisustvo virusa na crnom luku zabilježeno je u Izraelu (Gera et al., 1998), Francuskoj (Huchette et al., 2008), Srbiji (Bulajić et al., 2008, 2009), Španiji (Cordoba-Selles et al., 2005, 2007), Sloveniji (Mavrič and Ravnikar, 2000), Grčkoj (Chatzivassiliou et al., 2009), Egiptu (Elnagar et al., 2005), Italiji (Tomassoli et al., 2009) i Tunisu (Ben Moussa et al., 2005).

Čestice virusa su kvazisferične veličine 80-120 nm koje se sastoje od RNK, proteina, glikoproteina i lipida. Genom čine tri jednolančane, linearne RNK različite dužine koje su označene kao S (*short*), M (*middle*) i L (*large*). L RNK je najduža, neinfektivna i monocistronska i njen virusno-komplementaran lanac kodira RNK-zavisnu RNK polimerazu. M RNK je „*ambisense*“ RNK i bicistronska. Ona kodira NSm protein (*movement protein*) koji omogućava kretanje virusa i glikoproteine Gn i Gc koje kodira virusno-komplementarni lanac M RNK. S RNK je najmanja, takođe bicistronska i kodira NSs protein koji izaziva formiranje agregata ili filamenata u ćelijama zaraženim tospovirusima i ima funkciju utišavanja gena (*gene silencing*) i N protein (*nukleocapsid protein*), koji kodira virusno-komplementarni lanac S RNK. Tri genomne RNK su tijesno povezane sa N proteinom formirajući ribonukleoproteine (RNPs) okružene lipoproteinskim omotačem koji se sastoji od dva virusno kodirana

glikoproteina u vidu površinskih šiljaka i membrane koja potiče od ćelije domaćina (Mumford et al., 1996a; Soellick et al., 2000; Silva et al., 2001; Prins and Kormelink, 2004a; Pappu et al., 2008; Tsompana and Moyer, 2008; Pappu et al., 2009).

U prirodi IYSV može da zarazi 47 biljnih vrsta, a ekonomski značajna oboljenja pored ukrasnih biljaka, izaziva i na crnom luku, praziluku, bijelom luku, aljmi, ljutiki i drugim vrstama roda *Allium*. U prirodi zaražava i neke korovske vrste kao što su tatula (*Datura stramonium*), štir (*Amaranthus retroflexus*) i grahorica (*Vicia sativa*) u kojima se virus održava (Katis et al., 2012).

Na lišću merkantilnih usjeva crnog luka se javljaju brojne hlorotične pjege, koje se izdužuju i sasušuju, zbog čega biljke dobijaju slamast izgled. Zaražene biljke obrazuju nedovoljno razvijene lukovice. Najkarakterističniji simptom se javlja na cvjetonosnim stablima sjemenskog luka gdje se javljaju žućkaste ili žućkastomrke pjege u obliku dijamanta. Usled ovih spajanja pjega dolazi do lomljenja cvjetonosnog stabla i abortiranja sjemena (Stanković i sar., 2013).

IYSV se održava u zaraženim gajenim i korovskim biljkama, kao i u zaraženim tripsima (Krstić i sar., 2018). Tokom vegetacije se prenosi duvanovim (lukovim) tripsom (*Thrips tabaci*) na cirkulativan propagativan način (Kritzman et al., 2001; Mumford et al., 1996b; Nagata et al., 1999). *T. tabaci* je dugo bio opisan kao jedini vektor IYSV, ali su novija istraživanja potvrdila prenošenje IYSV još jednom vrstom tripsa, *Franklinella fusca*, mada je efikasnost prenošenja znatno manja u poređenju sa *T. tabaci*. Zapadni cvjetni trips (*F. occidentalis*) značajan vektor ostalih tospovirusa, nije vektor IYSV (Krstić i sar., 2018). Larva prvog stupnja (L1) usvaja virus prilikom ishrane na zaraženoj biljci, a prenose ga larve drugog stupnja (L2) i imaga (Prins and Kormelink, 2004b). Virus se ne prenosi sjemenom, a nije nađen ni u glavicama zaraženih biljaka (Kritzman et al., 2001). IYSV je od 1999. do 2011. godine bio na EPPO Alert listi, kada doneta je odluka da se IYSV skine sa karantinske EPPO Alert liste sa obrazloženjem da je virus prisutan i široko rasprostranjen u zemljama EPPO regiona, ali da ne pričinjava značajne štete.

### 2.5.6. Virus bronzavosti paradajza

Virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) je tipski predstavnik roda *Orthotospovirus*, porodice *Tospoviridae*, reda *Bunyavirales* (Matthews, 1979; ICTV, 2017). Oboljenje koje ovaj virus izaziva prvi put je opisano 1919. godine na paradajzu u Australiji (Brittlebank, 1919), dok je virus prouzročivač oboljenja dokazan znatno kasnije i imenovan kao *Tomato spotted wilt virus* (Samuel et al., 1930).

TSWV se ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa i njegovo prisustvo potvrđeno je u svim područjima svijeta gdje izaziva brojne epidemije na različitim usjevima. U tropskim, subtropskim i umjerenim područjima javlja se i u polju i u zaštićenom prostoru, dok je u hladnijim klimatskim područjima vezan za zaštićene prostore. Prisutan je u zemljama EPPO regiona i EU, Azije, Afrike, Sjeverne, Centralne i Južne Amerike, Karibima, kao i u zemljama Okeanije (OEPP/EPPO, 2004). U Srbiji je prvi put zabilježen na duvanu 1969. godine (Mickovski, 1969), a potom i na paprici i paradajzu (Mijatović i sar., 1999; Dukić i sar., 2002). Posljednjih godina XX vijeka zabilježena je ekspanzija i širenje kruga domaćina ovog virusa pa je tako virus detektovan u brojnim vrstama ukrasnih biljaka. Osim toga, prisustvo virusa zabilježeno je i na tikvama, kao i na crnom i bijelom luku (Stanković et al., 2012; Vučurović i sar., 2012).

Čestice ovog virusa su kvazisferične, prečnika od 70 do 120 nm i okružene dvostrukom lipoproteinskom membranom (Brunt et al., 1996; Anonymous, 2002). Kao i kod prethodnog virusa, genom čine tri jednolančane, linearne, neinfektivne RNK [ss (-) RNK] ili „ambisense” RNK [ss (+/-) RNK] označene kao S RNK, M RNK i L RNK (Mumford et al., 1996a; Soellick et al., 2000; Silva et al., 2001; Prins and Kormelink, 2004a; Pappu et al., 2008; Tsompana and Moyer, 2008; Pappu et al., 2009).

TSWV je izrazito polifagan virus i smatra se jednim od virusa sa najširim krugom domaćina među biljnim virusima. Kao prirodni domaćini ovog virusa navodi se veliki broj vrsta, preko 1300 vrsta iz 92 porodice, uključujući brojne povrtarske i industrijske kulture, kao i različite ukrasne i korovske vrste (Parrella et al., 2003; Zindović et al., 2014). Većina biljaka domaćina pripada familijama Asteraceae (247 vrsta), Solanaceae (172 vrste) i Fabaceae (60 vrsta).

Simptomi koje TSWV izaziva veoma su raznovrsni i variraju na istoj biljnoj vrsti u zavisnosti od sorte, starosti biljke, vremena infekcije i uslova spoljašnje sredine, od kojih temperatura ima veoma važnu ulogu u jačini ispoljavanja simptoma (**Allen et al.**, 1991). Na crnom luku TSWV izaziva simptome u vidu brojnih malih bjeličasih pjega, dok su simptomi na bijelom luku najčešće u vidu hlorotičnih pjega i pruga (**Stanković et al.**, 2012).

Virus infektivan za veliki broj biljnih vrsta, od kojih su mnoge korovi, zbog čega korovske vrste, domaćini ovog virusa i reproduktivni domaćini za vektore, omogućavaju održavanje TSWV u zimskom periodu i predstavljaju najznačajniji izvor inokuluma ovog virusa (**Krstić i sar.**, 2018).

Širenje TSWV u prirodi omogućeno je prenošenjem vektorima i zaraženim propagativnim biljnim materijalom. TSWV prenosi veći broj vrsta tripsa (Thysanoptera: Thripidae) na cirkulativan propagativni način, a najznačajniji vektori su vrste: *Frankliniella occidentalis* (zapadni cvjetni, kalifornijski trips), *F. schultzei* (pamukov trips), *F. fusca* (duvanov trips) i *Thrips tabaci* (lukov trips) (**Amin et al.**, 1981; **EPPO/CABI**, 1992; **Webb et al.**, 1997). Virus usvaja samo larva prvog stupnja (L1) prilikom ishrane na zaraženoj biljci, a prenose ga larve drugog stupnja (L2) i imaga (**Sakimura**, 1963; **Prins and Kormelink**, 2004b). Drugi značajan način širenja ovog virusa je širenje putem međunarodne trgovine biljnim materijalom, a prije svega rasadom i reznicama ukrasnih biljaka (**Hausbeck et al.**, 1992). Kao i kod drugih tospovirusa prenošenje TSWV pravim sjemenom nije zabilježeno, mada se virus može preneti lukovicama i krtolama nekih ukrasnih biljaka (**Robb et al.**, 1998; **Kucharek et al.**, 2000).

#### **2.5.7. Virusi roda *Allexivirus***

Početkom 90-ih godina XX vijeka primijećen je novi tip filamentoznih virusnih čestica u tkivima različitih vrsta roda *Allium* i svrstane su u rod *Allexivirus*, familiju *Alphaflexiviridae*, red *Tymovirales* (**Van Dijk et al.**, 1991; **Kanyuka et al.**, 1992; **Sumi et al.**, 1993; **Barg et al.**, 1994; **Pringle**, 1999). Za razliku od drugih vrsta virusa koji zaražavaju *Allium* vrste, ove viruse prenose grinje (**Van Dijk et al.**, 1991; **Barg et al.**, 1994) i ostaju latentni ili izazivaju veoma blage simptome.

Karakterizacija ovih virusa i njihovo razvrstavanje u vrste je otežano zbog činjenice da se oni često javljaju u međusobnim i/ili miješanim infekcijama sa drugim virusima i da je njihovo razdvajanje teško (**Katis et al.**, 2012). Biološki podaci koji se tiču ovih virusa su oskudni, tako da su podaci dobijeni sekvenciranjem genoma ovih virusa korišćeni za razvrstavanje u nekoliko vrsta i to: A, B, C, D, E i X virus bijelog luka (*Garlic virus*-A, -B, -C, -D, -E i -X, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X) (**Sumi et al.**, 1993, 1999; **Ryabov et al.**, 1996; **Song et al.**, 1998; **Chen et al.**, 2001), filamentozni virus bijelog luka koji se prenosi grinjama (*Garlic mite-borne filamentous virus*, GarMbFV) i X virus ljutike (*Shallot virus X*, ShVX) (**Kanyuka et al.**, 1992; **Vishnichenko et al.**, 1993).

Ekonomski značaj virusa roda *Allexivirus* nije do kraja rasvijetljen, zbog toga što izazivaju latentne infekcije i izgleda da su štete koje izazivaju na usjevima ograničene, mada neke vrste mogu da izazovu štete ekonomskog značaja (**Van Dijk and Van der Vlugt**, 1994). Veoma često virusi roda *Allexivirus* učestvuju u miješanim infekcijama sa *Potyvirus*-ima i *Carlavirus*-ima, kad su usled sinergističkog efekta i štete mnogo veće. **Cafrune et al.** (2006) je dokazao da je težina glavica bijelog luka zaraženog GarV-A manja do 32%, dok je kod biljaka zaraženih GarV-C smanjenje iznosilo do 15%. **Celli et al.** (2015) je dokazao da GarV-D dovodi do smanjenja težine glavice za 12,3% u odnosu na bezvirusni bijeli luk. Nedavne studije su pokazale da se prinos bijelog luka značajno smanjuje kod biljaka koje su prvo zaražene sa makar jednom vrstom *Allexivirus*-a, a zatim naknadno inficirane nekim od virusa iz roda *Potyvirus* ili *Carlavirus* koji se prirodno javljaju na biljkama bijelog luka (**Perotto et al.**, 2010).

*Allexivirus*-i su široko rasprostranjeni i zabilježeni su na bijelom luku u različitim regionima gajenja u svijetu (**Van Dijk et al.**, 1991; **Barg et al.**, 1994). Prisustvo GarV-C, GarV-D i GarV-B zabilježeno je u Grčkoj (**Dovas et al.**, 2001), dok su u Italiji detektovani GarV-A, GarV-C i GarV-D (**Dovas and Vovlas**, 2003; **Tabanelli et al.**, 2004; **Lanzoni et al.**, 2006). Prevalentno prisustvo *Allexivirus*-a u usjevu bijelog luka primijećeno je u Izraelu i povremeno u Sloveniji (**Shiboleth et al.**, 2001; **Mavrič and Ravnikar**, 2005). Takođe, u Kini je detektovan GarV-X i GarV-E (**Chen et al.**, 2001), u Iranu GarV-C, GarV-D i GarV-B (**Shahraeen et al.**, 2008), a u Poljskoj GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X (**Chodorska et al.**, 2012, 2013).

Česice ovih virusa su izdužene, filamentozne, dužine oko 700-800 nm i širine 12 nm. Genom je izgrađen od linearne, jednolančane, infektivne RNK [ss (+) RNK] i ima šest otvorenih okvira čitanja i kodira šest proteina (Adams et al., 2011).

*Allexivirus*-i imaju ograničen krug domaćina. Uglavnom zaražavaju bijeli luk, ali se mogu naći i na crnom luku i ljutiki (Adams et al., 2011).

Ovi virusi izazivaju najčešće latentne infekcije ili izazivaju veoma blage simptome u vidu blagog mozaika ili blage crtičavosti na lišću zaraženih biljaka (Van Dijk et al., 1991; Van Dijk and Van der Vlugt, 1994; Yamashita et al., 1995). Treba napomenuti da crtičavost i blagu deformaciju listova izaziva i *Aceria tulipae* vektor ovih virusa (Katis et al., 2012).

Najvažniji način prenošenja je prenošenje vegetativnom propagacijom, naročito bijelog luka, a širenje ovih virusa omogućavaju i vektori-grinje i to kako u polju, tako i u skladištima (Barg et al., 1997; Van Dijk et al., 1991). Jedini poznat vektor je *A. tulipae* za koju je dokazano da prenosi GarV-C i GarV-D (Zavriev, 2008). Ne prenose se pravim sjemenom svojih domaćina, ali se mogu prenijeti mehanički, sokom zaraženih biljaka u laboratorijskim uslovima (Van Dijk et al., 1991; Yamashita et al., 1995).

## 2.6. Kontrola virusa lukova

Glavni izvor virusa infektivnih za vrste roda *Allium* su sami usjevi, bijeli i crni luk i praziluk. Zavisno od tehnologije proizvodnje, odnosno načina razmnožavanja raznih lukova, različite mjere kontrole neophodne su za efikasnu kontrolu virusa (Katis et al., 2012).

Virusi iz rodova *Carlavirus*, *Potyvirus* i *Allexivirus* ne prenose se pravim sjemenom, pa osnovu kontrole virusa koji zaražavaju vrste roda *Allium*, koje se razmnožavaju sjemenom, čine:

- Prostorna izolacija. Rasadnici i polja sa bezvirusnim sadnim materijalom bi trebalo da su izolovani makar nekoliko stotina metara od osjetljivog usjeva;
- Upotreba bezvirusnog sjemena. Virus žute prstenaste pjegavosti artičoke *Artichoke yellow ringspot virus* (AYRSV) je jedini virus koji se prenosi pravim sjemenom, stoga u zemljama u kojima se javlja, na primjer u Grčkoj, preporučuje se korišćenje bezvirusnog sjemena;

- Kontrola vektora. Biljne vaši, tripsi i grinje su značajni vektori virusa lukova i čini se da bi smanjenje brojnosti njihove populacije moglo uzrokovati smanjenu učestalost virusa. Međutim, utvrđeno je da *Potyvirus*-i i *Carlavirus*-i koji se prenose na neperzistentan način ne mogu biti uspješno kontrolisani hemijskim tretmanima protiv vaši (**Perring et al.**, 1999). Kontrola grinja u skladištima tokom čuvanja glavica može da smanji prenošenje virusa iz roda *Allxivirus*;
- Uvođenje plodoreda. Kontinuirano gajenje istog usjeva u monokulturi predstavlja potencijalni izvor epidemije virusa, posebno za viruse sa veoma uskim krugom domaćina, kao što je LYSV. Gajenje crnog luka i ljutike na Novom Zelandu, kada su se usjevi vremenski preklapali je izazvalo epidemijsku pojavu OYDV (**Chamberlain and Baylis**, 1948). Slično tome gajenje praziluka u monokulturi u Holandiji dovelo je do epidemijske pojave LYSV (**Bos**, 1983). Dakle, OYDV i LYSV mogu biti efikasno kontrolisani smjenom usjeva, tako da tokom godine treba da postoji period kada se neće uzgajati osjetljivi domaćin. Ova strategija je uglavnom efikasna za kontrolu LYSV u usjevu praziluka i OYDV u usjevu crnog luka;
- Ukljanjanje zaraženih biljaka. Preporučuje se da se prati razvoj biljaka i da se uklone sve zaražene biljke. Ovo je od velikog značaja kada se primijeni rano u sezoni gajenja kada je učestalost virusa mala i kada se koristi sadni materijal visokog kvaliteta, odnosno bezvirusni sadni materijal. Ovo je, takođe, veoma važno i za usjeve vrsta koje se vegetativno razmnožavaju jer se smanjuje ukupan procenat zaraženih glavica, pošto je poznato da se zaraženim glavicama virusi najefikasnije prenose u narednu vegetaciju;
- Upotreba rezistentnih ili tolerantnih sorti. Sorte praziluka se razlikuju u njihovoj osjetljivosti prema LYSV. Sorte Lancelot, Bandit, Laura, Winta i Ligina tolerantne su na virus (**Matthieu et al.**, 1984). Takođe, utvrđene su razlike u osjetljivosti sorti crnog luka na IYSV (**Gent et al.**, 2004; **du Toit and Pelter**, 2005). Iako se genetsko modifikovanje koristi za stvaranje sorti koje su rezistentne na viruse, to još nije primijenjeno za kontrolu virusa lukova i to uglavnom zbog činjenice da lukovi kao što su crni luk, praziluk i bijeli luk nijesu pogodni za genetsku transformaciju (*recalcitrant*) (**Eady et al.**, 1996). Međutim, genetska transformacija vrsta roda *Allium* poboljšava se u posljednjih nekoliko

godina (**Kondo et al.**, 2000; **Sawahel**, 2002), pa bi u bliskoj budućnosti transfer gena virusa u vrste roda *Allium* mogao dovesti do pojave otpornih sorti.

Za vrste roda *Allium* koje se vegetativno razmnožavaju, kao što je bijeli luk, glavni izvor virusa je sadni materijal. Zbog ovog razloga navedene mjere su prilično neadekvatne za kontrolu virusa. Prvi korak ka smanjivanju potencijala virusa je odabir što većih glavica luka, zbog toga što postoji mogućnost da su one manje zaražene, odnosno sa manje virusa ili sa blažim sojevima virusa (**Van Dijk**, 1994). Razvijene su i metode za potpuno uklanjanje kompleksa virusa iz bijelog luka i dobijanje bezvirusnog osnovnog sadnog materijala. U te metode spadaju kultura meristema, termoterapija sa kulturom meristema, krioterapija i termoterapija sa krioterapijom (**Conci et al.**, 2004; **Ghaemizadeh et al.**, 2014; **Vieira et al.**, 2015). Takođe, globalna trgovina lukovima, uglavnom crnim i bijelim lukom, je potencijalni način širenja virusa po čitavom svijetu, tako da se uvezene lukovice obavezno moraju ispitati na prisustvo virusa (**Katis et al.**, 2012).

Unakrsna zaštita je metoda koja se koristi za zaštitu biljaka od virusnih oboljenja, tako što se biljke „vakcinišu“ odnosno inokulišu sa blagim sojevima virusa. Ova metoda predložena je za zaštitu bijelog luka od OYDV (**Messiaen et al.**, 1981; **Van Dijk**, 1994), međutim, nije usvojena u praksi zbog niza nedostataka koji je prate.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Proizvodnju različitih vrsta lukova širom svijeta ugrožavaju brojne virusne zaraze. Dosadašnja istraživanja ukazuju da najveće štete na različitim vrstama lukova prouzrokuju predstavnici rodova *Potyvirus*, *Carlavirus* i *Allexivirus*. Predstavnici ovih rodova često se javljaju u kompleksnim infekcijama, prouzrokujući intenzivnije štete. Pored predstavnika navedenih rodova, značajne štete, naročito u proizvodnji crnog luka, ali i drugih vrsta, mogu da prouzrokuju predstavnici roda *Orthospovirus*, nerijetko izazivajući potpune štete. Epidemiologija oboljenja koje virusi lukova izazivaju značajno se razlikuje. Vektori vrsta iz rodova *Potyvirus* i *Carlavirus* su vaši, koje ove viruse prenose na neperzistentan način, dok viruse roda *Allexivirus* prenose grinje, a viruse roda *Orthospovirus* tripsi na cirkulativni propagativni način. Značajnu ulogu u epidemiologiji ima i sadni materijal, naročito kod vrsta lukova koji se vegetativno razmnožavaju, jer se tokom godina virusi akumuliraju u glavicama i na taj način prenose iz vegetacije u vegetaciju, obično prouzrokujući veće štete. Bez obzira što gajenje različitih vrsta lukova obezbjeđuje glavne izvore prihoda za brojna domaćinstva u Srbiji, a virusne infekcije predstavljaju najznačajniji problem u proizvodnji, do sada nema mnogo podataka o prisustvu, učestalosti i rasprostranjenosti virusa na lukovima u našoj zemlji. Ova doktorska disertacija ima za cilj da pokaže koji virusi se javljaju na najznačajnijim vrstama lukova u Srbiji, da utvrdi zastupljenost i učestalost virusa u različitim vrstama lukova i regionima gajenja, odnosno da da kompletnu sliku o prisustvu i značaju virusa u proizvodnji različitih vrsta lukova u Srbiji. Dobijene informacije o virusima lukova, naročito one o strukturi populacije najznačajnijih virusa u Srbiji mogu biti iskorišćene u oplemenjivanju i stvaranju otpornih sorti, koje su najefikasnija mjera kontrole virusa, a takođe i u osmišljavanju novih i poboljšanju postojećih strategija kontrole virusa u proizvodnji lukova.

Nepostojanje adekvatnih informacija vezanih za prisustvo, diverzitet i epidemiologiju virusa na različitim vrstama lukova u Srbiji, kao i nepostojanje brzih i pouzdanih metoda detekcije za pojedine viruse doveli su do definisanja osnovnih ciljeva ove disertacije:

- ispitivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa različitih vrsta lukova u Srbiji primjenom DAS-ELISA testa;

- ispitivanje prisustva vrsta *Allexivirus* roda na bijelom luk u Srbiji kao potencijalnog ograničavajućeg faktora uspješne proizvodnje bijelog luka;
- molekularna detekcija najznačajnijih virusa lukova u Srbiji i potvrda rezultata dobijenih serološkim metodama primjenom RT-PCR metode i specifičnih prajmera za detekciju pojedinih virusa;
- unaprijeđivanje RT-PCR protokola za detekciju pojedinih virusa dizajniranjem specifičnih prajmera optimizovanih za detekciju izolata virusa porijeklom iz Srbije;
- optimizacija RT-PCR multiplex metode za simultanu detekciju najzastupljenijih i najznačajnijih virusa koji se javljaju na lukovima u Srbiji;
- molekularna identifikacija i karakterizacija virusa lukova porijeklom iz Srbije primjenom BLAST analize i rekonstrukcijom filogenetskih stabala u cilju utvrđivanja međuodnosa izolata iz Srbije sa izolatima iz drugih djelova svijeta, kao i utvrđivanja genetičke varijabilnosti izolata najznačajnijih vrsta virusa lukova u Srbiji.

Rezultati istraživanja dobijeni izradom ove doktorske disertacije daće prvi uvid u prisustvo i rasprostranjenost najznačajnijih virusa na lukovima u Srbiji. Uspostavljenje savremenih tehnika detekcije i identifikacije omogućiće brzu i pouzdanu detekciju ovih virusa kao prvi i najznačajniji korak ka uspješnoj kontroli oboljenja koje oni izazivaju. Genetička povezanost izolata različitih virusa lukova iz Srbije sa izolatima iz drugih djelova svijeta ukazaće na moguće porijeklo naših izolata, načine introdukcije i širenja u našoj zemlji, što će ukazati na šta posebno treba obratiti pažnju prilikom trgovine i uvoza biljnog materijala u cilju sprečavanja novih introdukcija novih vrsta ili sojeva već postojećih virusa.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka oboljelih biljaka

Prisustvo, rasprostranjenost i učestalost virusa lukova u Srbiji ispitivano je tokom sedam godina, u periodu od 2010. do 2016. godine. U okviru ispitivanja pregledom je obuhvaćeno 111 različita lokaliteta gajenja crnog i bijelog luka, praziluka, i drugih vrsta lukova, kao što su ljutika, vlasac, aljma i biser luk koji se gaje u Republici Srbiji, kao i jedan lokalitet na kome raste divlja vrsta, sremuš.

Prilikom pregleda usjeva, za dalje analize, sakupljeni su uzorci sa simptomima koji su ukazivali na virusne zaraze i procijenjena je učestalost pojave simptoma. Uočeni simptomi su dokumentovani i fotografisani, pakovani u kese za uzorke, obilježeni etiketama na koje su zabilježeni podaci o biljnoj vrsti i lokalitetu uzorkovanja, a zatim transportovani u laboratoriju gdje su čuvani na temperaturi od 4°C kraći vremenski period, odnosno na -80°C duži vremenski period.

Procjena učestalosti simptoma koji podsjećaju na simptome virusnih zaraza, sprovedena je na osnovu vizuelnog pregleda usjeva, odnosno brojanjem biljaka sa simptomima i izračunavanjem procenta biljaka sa simptomima u odnosu na ukupan broj biljaka.

Tokom 2010. godine, iz sedam okruga na lokalitetima Medveđa, Ratina, Kisač, Hetin, Aleksandrovo, Đurđevo, Mokra, Žitište, Zemun i Družetić sakupljeno je devet uzoraka crnog luka i pet uzorka bijelog luka. Svi sakupljeni uzorci pokazivali su tipične simptome virusnih infekcija.

Sakupljanje uzoraka crnog i bijelog luka i praziluka tokom 2011. godine obavljeno je u tri okruga na lokalitetima: Rimski Šančevi, Gornji Tavankut, Ljutovo, Zemun i Slanci. Ukupno je sakupljeno pet uzoraka crnog luka, tri bijelog i dva praziluka.

Sakupljeni uzorci 2012. godine poticali su iz četiri okruga sa lokaliteta: Mihajlovo, Padinska Skela, Vladičin Han i Porodin. Ukupno je sakupljeno 11 uzoraka crnog luka, jedan bijelog i devet praziluka.

U 2013. godini pregledano je osam lokaliteta u pet okruga: Mladenovac, Medveđa, Padinska Skela, Arilje, Donji Tavankut, Popinci, Zemun i Porodin. Sakupljeno je 14 uzoraka crnog, 10 bijelog luka i dva uzorka praziluka.

Ispitivanje prisustva virusa lukova 2014. godine obuhvatilo je pregled 20 lokaliteta u sedam okruga: Bačka Palanka, Bačka Topola, Belosavci, Čelarevo, Crvenka, Đurđevo, Gospođinci, Kać, Kovilj, Kupusina, Ljutovo, Lok, Medar, Mrčajevci, Rimski Šančevi, Slatina, Sombor, Vilovo, Vladičin Han i Vrkalovo. Ukupno je sakupljeno i analizirano 77 uzoraka bijelog luka, 44 crnog i tri uzorka ljutike.

Tokom 2015. godine pregledano je 26 lokaliteta gajenja u 14 okruga: Arilje, Bački Jarak, Beograd, Bukovac, Čonoplja, Konjevići, Koševi, Lozničko Polje, Lozovik, Mačkovac, Medveđa, Mramorac, Mrčajevci, Odžaci, Polom, Popinci, Požarevac, Rimski Šančevi, Togočevce, Trbušani, Velika Drenova, Vinča, Vladičin Han, Vlačko Polje, Zemun i Zrenjanin. Tokom pregleda terena sakupljeno je 29 uzoraka bijelog luka, 53 crnog, 35 praziluka, 12 biser luka i jedan uzorak ljutike.

U 2016. godini pregledano je 10 lokaliteta gajenja iz četiri okruga: Bački Petrovac, Begeč, Despotovo, Dobanovci, Gospođinci, Karavukovo, Kisač, Kosmaj, Medveđa i Slanci. Tokom pregleda terena sakupljena su četiri uzorka bijelog luka, 10 crnog luka, 28 praziluka, pet vlasca, dva sremuša i jedan uzorak biser luka.

## **4.2. Serološka ispitivanja**

Serološke analize su sprovedene u cilju utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa lukova po okruzima i lokalitetima u pojedinačnim godinama.

### **4.2.1. Imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) primjenom poliklonalnih antitijela**

Za detekciju virusa prisutnih u sakupljenim uzorcima crnog i bijelog luka, praziluka i drugih vrsta lukova korišćena je direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) po protokolu koju su opisali **Clark and Adams** (1977), a prema uputstvu proizvođača dijagnostičkih ELISA kitova.

Uzorci biljaka sa simptomima virusne zaraze testirani su primjenom komercijalnih antiseruma specifičnih za detekciju virusa žute patuljivosti crnog luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), običnog latentnog virusa bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV), virusa žute prugavosti praziluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), virusa žute pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV) i virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) (Bioreba AG, Reinach,

Switzerland). Specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razrjeđenju 1:1000, dok su uzorci pripremani homogenizacijom biljnog materijala i pufera u razrjeđenju 1:6.

Polistirenske ploče obložene su unošenjem u svaki bunarčić po 200  $\mu$ l razrjeđenja IgG odgovarajućeg antiseruma u puferu za prekrivanje, a zatim inkubirane 4 h na 37°C. Nakon inkubacije ploče su isprane 4 puta puferom za ispiranje i u bunarčiće je dodato po 200  $\mu$ l pripremljenog ekstrakta ispitivanih uzoraka, komercijalne negativne i pozitivne kontrole i inkubirano na 4°C preko noći. Poslije ispiranja, u bunarčiće je uneto po 200  $\mu$ l razrjeđenja antitijela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (*antibody-AP-conjugate*) u konjugatnom puferu, a ploče su inkubirane 4 h na 37°C. Poslije inkubacije, mikrotitarske ploče su ispirane, a zatim je u svaki bunarčić unijeto po 200  $\mu$ l pripremljenog supstrata (p-nitrofenilfosfata) u supstratnom puferu (20  $\mu$ l/20 ml). Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi do pojave bojene reakcije. Hidroliza supstrata praćena je vizuelno i mjerenjem apsorpcije na 405 nm, 1 h po nanošenju supstrata.

Apsorpcija na 405 nm svakog pojedinačnog uzorka, mjerena na spektrofotometru (Microplate reader-DAS s.r.l., Italy), izračunata je kao srednja vrijednost apsorpcije dva bunarčića jednog uzorka. Uzorci čija je vrijednost apsorpcije na 405 nm bila dva i više puta veća od srednje vrijednosti apsorpcije negativne kontrole smatrani su pozitivnim na prisustvo odgovarajućeg virusa.

Za izvođenje ove metode korišćeni su sledeći puferi:

Puferi za DAS-ELISA test (Bioreba AG, Switzerland):

Pufer za prekrivanje ploča (*Coating buffer*), pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
NaN <sub>3</sub>	0,20 g
dH <sub>2</sub> O	1 l

Pufer za ispiranje (*Wash buffer*), pH 7,4

NaCl	8,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml

dH<sub>2</sub>O 5 l

Ekstrakcioni pufer (*Extraction buffer*), pH 7,4

TRIS	2,4 g
NaCl	8,0 g
PVP (viscosity K25)	20 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	1 l

Konjugatni pufer (*Conjugate buffer*), pH 7,4

PVP (viscosity K25)	20 g
bovine serum albumin	2 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g
NaCl	8,0 g
TRIS	2,4 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	1 l

Supstratni pufer (*Substrate buffer*), pH 9,8

diethanolamine	97 ml
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
dH <sub>2</sub> O	125 ml

### 4.3. Molekularna ispitivanja

Molekularna ispitivanja virusa lukova u Srbiji obavljena su u cilju potvrde rezultata dobijenih DAS-ELISA metodom, kao i u cilju identifikacije i karakterizacije najznačajnijih virusa koji se javljaju na različitim vrstama lukova u Srbiji. Molekularna detekcija urađena je primjenom metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*, RT-PCR) i specifičnih prajmera za detekciju OYDV, GarCLV, LYSV, SLV, IYSV, TSWV, kao i vrsta roda *Allexivirus*. Izolati virusa dobijeni na ovaj način su zatim sekvencirani, identifikovani i okarakterisani utvrđivanjem njihove filogenetske sličnosti sa ostalim izolatima odgovarajućeg virusa iz drugih dijelova svijeta.

#### 4.3.1. Ekstrakcija ukupnih RNK

Ekstrakcija ukupnih RNK iz biljnog materijala obavljena je upotrebom RNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Hilden, Germany), po protokolu proizvođača. Prvi korak ekstrakcije je usitnjavanje 100 mg zaraženog lišća lukova u avanu tučkom ili u ependorf tubici od 1,5 ml sa odgovarajućim plastičnim tučkom dodavanjem tečnog azota. Ukoliko je maceracija vršena u avanu, usitnjen biljni materijal i tečni azot su prebačeni u ependorf tubicu od 2 ml i nakon isparavanja tečnog azota, dodato je 450  $\mu$ l RLT pufera u koji je prethodno dodat  $\beta$ -merkaptetoanol (u odnosu 10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptetoanola na 1 ml RLT pufera). Ukoliko je maceracija vršena u ependorf tubici, RLT pufer je dodavan odmah nakon isparavanja azota. Sadržaj tubice zatim je kratko izmiješan vorteksovanjem. U cilju što efikasnije razgradnje biljnog tkiva tubice su inkubirane 3 min u vodenom kupatilu na 56°C. Nakon inkubacije uzorak je prebačen u QIAshredder spin filter u tubicama od 2 ml i centrifugiran 3 min na maksimalnom broju obrtaja (14 000 obrtaja/min) u cilju odstranjivanja ćelijskih djelova i dodatne homogenizacije lizata. Za dalji rad korišćen je supernatant pipetiran u novu ependorf tubicu u koju je dodato 225  $\mu$ l 96% etanola u cilju omogućavanja što kvalitetnijeg vezivanja za kolonu/membranu u narednom koraku. Sadržaj tubice je zatim pipetiran u RNase spin filter smješten u nove kolekcione tubice od 2 ml. Centrifugiranjem uzorka 15 s na  $\geq 10\,000$  rpm obezbijedeno je izdvajanje i vezivanje RNK za filter kao i uklanjanje većeg dijela DNK koji se odbacuje zajedno sa supernatantom. Nakon toga, RNase spin filter smješten je u kolekcionu tubicu i više puta ispiran različitim puferima. Prvo je pipetirano 700  $\mu$ l RW1 pufera za ispiranje, a zatim je ponovo centrifugirano 15 s na  $\geq 10\,000$  rpm. Tečna faza je odbačena, a na RNase spin filter je pipetirano 500  $\mu$ l RPE pufera i u cilju ispiranja RNK, tubica sa uzorkom centrifugirana je 15 s na  $\geq 10\,000$  rpm. Tečna faza je odbačena, a ispiranje RNase spin filtera je ponovljeno sa novih 500  $\mu$ l RPE pufera, centrifugiranjem 2 min na  $\geq 10\,000$  rpm. Nakon centrifugiranja, RNase spin filter je prebačen u novu kolekcionu tubicu i centrifugiran 1 min na maksimalnom broju obrtaja da bi se uklonili ostaci etanola i pufera. U cilju rastvaranja izolovanih RNK u RNase spin filter pipetirano je 50  $\mu$ l RNase free vode. Tako dobijena i izolovana RNK čuvana je na -80°C za dalji rad.

### 4.3.2. Reverzna transkripcija praćena lanćanom reakcijom polimeraze (RT-PCR)

Nakon izolacije ukupnih RNK iz biljnog materijala, RT-PCR metodom uz upotrebu specifićnih prajmera amplifikovan je odrećeni, ciljani fragment nukleinske kisjeline. Detekcija odrećenog virusa obavljena je pomoću „One-Step“ RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) korišćenjem specifićnih prajmera. Dobijene amplikone je moguće vizuelizovati, nakon elektroforetskog razdvajanja u agaroznom gelu i bojenja korišćenjem transiluminatora. U slućajevima uspješne amplifikacije, umnoćeni fragmenti vide se kao trake, ćija se velićina procjenjuje uporećivanjem sa markerom, koji sadrći mješavinu fragmenata poznatih velićina.

Molekularna ispitivanja, obuhvatila su pet virusa, koji su seroloćki detektovani u usjevima razlićitih vrsta lukova kod nas, OYDV, GarCLV, LYSV, TSWV i IYSV. Pored ovih virusa, dodatno su molekularno testirani uzorci bijelog luka na prisustvo virusa roda *Allexivirus*, kao i uzorci razlićitih vrsta lukova sa tipićnim simptomima na prisustvo SLV.

#### 4.3.2.1. Molekularna detekcija izolata OYDV

Molekularna detekcija odabranih izolata OYDV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i specifićnih prajmera 1-OYDV (5'-GCG GGG GAA GGA GAA GAT GCA G-3') i 2-OYDV (5'-CCG CAG CTG TGT GTC TTT CCG-3') (Parrano et al., 2012) ili prajmera dizajniranih tokom ovih istraćivanja OYDV-DESIGN-F (5'-ARG ATG CWG CRG CRC AAT CRR G-3') i OYDV-DESIGN-R (5'-ACA TYY TDA TMC CRA GYA AMG TGT G-3'). Prajmeri su dizajnirani na osnovu višestrukih porećenja 60 sekvenci dostupnih u GenBank bazi podataka i korišćenjem Primer 3 plus programa za dizajniranje prajmera (Untergasser et al., 2007). Sposobnosti formiranja homo- i heterodimera, kao i ukosnica koje onemogućavaju kvalitetno vezivanje dizajniranih prajmera za DNK matricu provjerena je korišćenjem IDT oligo-analyzer 3.1 (Integrated DNK Technologies, U.S. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Oba para primijenjenih prajmera obuhvataju dio gena za protein omotaća (*coat protein gene*, CP gen) i amplifikuju fragment velićine oko 730, odnosno 770 bp. Za ova ispitivanja odabrano je 26 izolata u kojima je ELISA testom dokazano prisustvo OYDV porijeklom iz razlićitih lokaliteta i godina



sakupljanja. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 1. Smješa za RT-PCR reakciju sadržala je: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera koji sadrži 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP mješavine koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smješi 400 µM, 1 µl Qiagen OneStep RT-PCR smješe enzima koji sadrži Omniscript Reverse transkriptazu, Sensiscript Reverse transkriptazu i HotStar Taq DNK polimerazu, po 1,5 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,6 µM, odnosno tri puta veću koncentraciju prajmera OYDV-DESIGN-F/OYDV-DESIGN-R zbog postojanja degenerativnih nukleotidnih mjesta u prajmerima, 1 µl izolovanih ukupnih RNK i RNase-free vode do ukupne zapremine 25 µl. Kao negativna kontrola korišćena je RNase free voda, kao i ukupna RNK izolovana iz zdravog lišća luka. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler (Biometra, UK).

Reakcija je izvedena po sljedećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNK polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kisjelina 15 min na 95°C, a zatim slijedi trostruki korak ciklusa, koji se ponavlja 35 puta, a čine ga denaturacija, hibridizacija prajmera (*annealing*) i elongacija. Uslovi trostrukog koraka za OYDV-1/OYDV-2 par prajmera su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 50°C i elongacija 60 s na 72°C. Uslovi trostrukog koraka za OYDV-DESIGN-F/OYDV-DESIGN-R par prajmera su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 58°C i elongacija 60 s na 72°C. Finalna elongacija je 10 min na 72°C.

**Tabela 1.** Izolati *Onion yellow dwarf virus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>
115-10	2010.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Aleksandrovo
116-10	2010.		Žitište
171-10	2010.		Mokra
181-13	2013.		Arilje
184-13	2013.	<i>A. cepa</i>	Arilje
185-13	2013.		Arilje
188-13	2013.		Arilje
242-13	2013.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Beograd
142-14	2014.	<i>A. cepa</i>	Vladičin Han
143-14	2014.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Vladičin Han
377-14	2014.	<i>A. cepa</i>	Čelarevo
500-14	2014.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Đurđevo

555-14	2014.		Kovilj
571-14	2014.		Kač
572-14	2014.	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Rimski Šančevi
108-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Mramorac
110-15	2015.	<i>A. cepa</i>	Vinča
111-15	2015.		Vinča
114-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Vinča
128-15	2015.	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Arilje
365-15	2015.	<i>A. fistulosum</i>	Vinča
457-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Rimski Šančevi
475-15	2015.	<i>A. cepa</i>	Čonoplja
476-15	2015.		Čonoplja
481-15	2015.		Čonoplja
108-16	2016.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Slanci

#### 4.3.2.2. Molekularna detekcija izolata LYSV

Molekularna detekcija odabranih izolata LYSV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i specifičnih prajmera 1LYSV (5'-TCA CTG CAT ATG CGC ACC AT-3') i 2LYSV (5'-GCA CCA TAC AGT GAA TTG AG-3') (Fajardo et al., 2001). Primijenjeni prajmeri obuhvataju dio gena za nuklearne inkluzije (*nuclear inclusion b*, NIb) i kompletan CP gen i amplifikuju fragment veličine oko 1020 bp. Za ova ispitivanja odabrana su tri izolata LYSV, u kojima je ELISA testom dokazano prisustvo virusa. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet i biljka domaćin prikazani su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Izolati *Leek yellow stripe virus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet
277-13	2013.	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Padinska Skela
298-13	2013.		Porodin
181-13	2013.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Arilje

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 120 s na 50°C i elongacija 120 s na 72°C. Ovaj trostruki korak ponavljan je 35 puta.

#### 4.3.2.3. Molekularna detekcija izolata GarCLV

Molekularna detekcija odabranih izolata GarCLV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i specifičnih prajmera 1-GCLV (5'-ATG TCA GTG AGT GAA ACA GAG G-3') i 2-GCLV (5'-CTA GTC TGC ATT GTT GGA TCC-3') (Parrano et al., 2012) koji omogućavaju umnožavanje cijelog CP gena i amplifikuju fragment veličine oko 960 bp.

Za ova ispitivanja odabrano je šest izolata GarCLV, u kojima je ELISA testom dokazano prisustvo virusa. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Izolati *Garlic common latent virus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>
89-10	2010.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Novi Beograd
171-10	2010.		Mokra
200-10	2010.		Družetić
553-11	2011.		Ljutovo
72-12	2012.		Vladičin Han
298-12	2012.	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Porodin
175-13	2013.	<i>A. cepa</i>	Mladenovac
544-14	2014.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Sombor
574-14	2014.	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Rimski Šančevi

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u prethodnom poglavlju. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 50°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak ponavljan je 34 puta.

#### 4.3.2.4. Molekularna detekcija izolata IYSV

Molekularna detekcija odabranih izolata IYSV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i para specifičnih prajmera IYSV56U (5'- TCC TAA GTA TTC ACC AT -3') i IYSV917L (5'- TAA AAC TTA ACT AAC ACA AA -3') (Robène-Soustrade et al., 2006) koji obuhvataju dio gena za nukleokapsid (*nucleocapsid gene*, N gen) i amplifikuju fragment veličine 896 bp. Za ova ispitivanja odabrano je 10 izolata IYSV, koji su prethodno okarakterisani serološki. Porijeklo

odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 4. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat IYSV porijeklom iz luka 605-07 (EU586203) (Bulajić et al., 2008).

**Tabela 4.** Izolati *Iris yellow spot tospovirus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet
127-14	2014.	<i>A. cepa</i>	Lok
160-14	2014.		Gospođinci
165-14	2014.		Medar
171-14	2014.		Vrkalovo
331-14	2014.		Ljutovo
342-14	2014.		Kupusina
112-15	2015		Vinča
365-15	2015.	<i>A. fistulosum</i>	Vinča
504-15	2015.	<i>A. cepa</i>	Bukovac
510-15	2015.		Bački Jarak

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 60 s na 94°C, hibridizacija prajmera 60 s na 40°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 40 puta.

#### 4.3.2.5. Molekularna detekcija izolata TSWV

Molekularna detekcija odabranih izolata TSWV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem para specifičnih prajmera TSWVCP-f (5'-GGT TAA GCT CAC TAA GAA ARC A-3') i TSWVCP-r (5'-TTT AAC YCC RAA CAT TTC ATA GA-3') (Vučurović et al., 2012) koji obuhvataju dio N gena i amplifikuju fragment veličine 738 bp.

Za ova ispitivanja odabrana su četiri izolata TSWV, koji su prethodno okarakterisani serološki. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 5. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat TSWV porijeklom iz duvana 33-06 (GQ355467) (Stanković et al., 2011).

**Tabela 5.** Izolati *Tomato spotted wilt tospovirus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>
114-10	2010.	<i>A. cepa</i>	Aleksandrovo
115-10	2010.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Aleksandrovo
354-11	2011.		Rimski Šančevi
560-11	2011.	<i>A. cepa</i>	Ljutovo

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u poglavlju *Molekularna detekcija izolata OYDV*, ali je zbog postojanja degenerativnih mjesta kod oba prajmera koncentracija prvog povećana dva puta, odnosno drugog četiri puta, dok je količina RNase-free vode smanjena onoliko koliko je povećana količina prajmera. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 60 s na 94°C, hibridizacija prajmera 60 s na 51°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 45 puta.

#### **4.3.2.6. Molekularna detekcija izolata SLV**

Molekularna detekcija odabranih izolata SLV obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i specifičnih prajmera SLV-F-design (5'-AAR CCY TTY G GK WCR CTT TAG GT-3') i SLV-R-design (5'-TTG ATC AAC ATC GAT TYT CYY T-3') dizajnirani tokom ovih istraživanja na osnovu 51 sekvence SLV dostupne u GenBank bazi podataka korišćenjem Primer 3 plus programa za dizajniranje prajmera (Untergasser et al., 2007). Sposobnosti formiranja homo- i heterodimera, kao i ukosnica koje onemogućavaju kvalitetno vezivanje dizajniranih prajmera za DNK matricu provjerena je korišćenjem IDT oligo-analyzer 3.1 (Integrated DNK Technologies, U.S. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Prajmeri obuhvataju dio CP gena i amplifikuju fragment veličine od oko 950 bp. Za ova ispitivanja odabrana su tri uzorka porijeklom iz različitih biljaka domaćina sa simptomima karakterističnim za SLV. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 6.

**Tabela 6.** Izolati *Shallot latent virus* iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>
553-11	2011.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Ljutovo
498-14	2014.		Đurđevo
365-15	2015.	<i>A. fistulosum</i>	Vinča

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25  $\mu$ l kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 50°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak ponavljan je 34 puta.

#### 4.3.2.7. Molekularna detekcija izolata *Allexivirus* spp.

Molekularna detekcija virusa iz roda *Allexivirus* obavljena je primjenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera specifičnih za detekciju svih vrsta roda *Allexivirus*: ALLEX 1 (5'-CYG CTA AGC TAT ATG CTG AAR GG-3') i ALLEX 2 (5'-TGT TRC AAR GTA AGT TTA GYA ATA TCA ACA-3') (Dovas et al., 2001a). Primijenjeni prajmeri obuhvataju visoko konzervativni region na 3' kraju ORF6 (*Nucleic acid binding protein gen*, NABP) i 3' kraju netranslirajućeg regiona (3' UTR) i amplifikuju fragmente očekivane veličine 183-192 bp. Za ova ispitivanja odabrano je 80 uzoraka bijelog luka, a porijeklo odabranih izolata, lokalitet i godina izolacije prikazani su u tabeli 7.

**Tabela 7.** Izolati *Allexivirus* spp. iz Srbije korišćeni za molekularnu detekciju

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Lokalitet</b>
89-10	2010.	Novi Beograd
115-10	2010.	Aleksandrovo
116-10	2010.	Žitište
171-10	2010.	Mokra
553-11	2011.	Ljutovo
174-13	2013.	Mladenovac
176-13	2013.	Mladenovac
189-13	2013.	Arilje
344-13	2013.	Zemun
121-14	2014.	Vladičin Han
143-14	2014.	Vladičin Han
144-14	2014.	Vladičin Han
499-14	2014.	Đurđevo

500-14	2014.	Đurđevo
501-14	2014.	Đurđevo
502-14	2014.	Đurđevo
503-14	2014.	Đurđevo
504-14	2014.	Đurđevo
505-14	2014.	Đurđevo
506-14	2014.	Đurđevo
507-14	2014.	Đurđevo
511-14	2014.	Đurđevo
512-14	2014.	Đurđevo
516-14	2014.	Bačka Topola
517-14	2014.	Bačka Topola
518-14	2014.	Bačka Topola
521-14	2014.	Bačka Palanka
526-14	2014.	Bačka Palanka
528-14	2014.	Bačka Palanka
530-14	2014.	Bačka Palanka
532-14	2014.	Bačka Palanka
534-14	2014.	Sombor
538-14	2014.	Sombor
539-14	2014.	Sombor
541-14	2014.	Sombor
544-14	2014.	Sombor
545-14	2014.	Sombor
546-14	2014.	Sombor
547-14	2014.	Sombor
548-14	2014.	Sombor
549-14	2014.	Sombor
551-14	2014.	Sombor
552-14	2014.	Sombor
554-14	2014.	Kovilj
555-14	2014.	Kovilj
556-14	2014.	Kovilj
558-14	2014.	Crvenka
559-14	2014.	Crvenka
561-14	2014.	Crvenka
562-14	2014.	Crvenka
566-14	2014.	Kač
567-14	2014.	Kač
569-14	2014.	Kač
571-14	2014.	Kač
73-15	2015.	Polom
96-15	2015.	Vladičin Han
99-15	2015.	Zemun
113-15	2015.	Vinča
114-15	2015.	Vinča
116-15	2015.	Vlaško Polje
202-15	2015.	Mačkovac

208-15	2015.	Mačkovac
213-15	2015.	Koševi
456-15	2015.	Rimski Šančevi
457-15	2015.	Rimski Šančevi
458-15	2015.	Rimski Šančevi
459-15	2015.	Rimski Šančevi
460-15	2015.	Zrenjanin
465-15	2015.	Zrenjanin
467-15	2015.	Rimski Šančevi
468-15	2015.	Rimski Šančevi
469-15	2015.	Rimski Šančevi
473-15	2015.	Rimski Šančevi
517-15	2015.	Odžaci
518-15	2015.	Odžaci
519-15	2015.	Odžaci
107-16	2016.	Slanci
108-16	2016.	Slanci
127-16	2016.	Bački Petrovac
128-16	2016.	Bački Petrovac

---

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25  $\mu$ l kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1., ali je zbog postojanja degenerativnih mjesta kod oba prajmera koncentracija prvog povećana dva puta, drugog tri puta, a količina RNase-free vode smanjena onoliko koliko je povećana količina prajmera. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 58°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 35 puta.

Molekularna detekcija virusa roda *Allexivirus* do nivoa vrste obavljena je primijenom prajmera specifičnih za šest vrsta ovog roda: GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X (Tabela 8). Prajmeri korišćeni za detekciju GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D obuhvataju dio CP gena i dio gena za *nucleic acid binding protein* (NABP), a prajmeri za detekciju GarV-E i GarV-X obuhvataju dio gena za replikazu (Chodorska et al., 2013).

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25  $\mu$ l kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1. Uslovi trostrukog koraka za korišćene prajmere bili su: denaturacija 30 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na različitoj temperaturu u zavisnosti od prajmera i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 35 puta. Sekvence korišćenih prajmera i temperature hibidizacije prajmera date su u tabeli 8.



**Tabela 8.** Sekvence korišćenih prajmera, temperatura hibridizacije prajmera i veličina dobijenih fragmenata

<b>Virus</b>	<b>Naziv prajmera</b>	<b>Sekvenca prajmera</b>	<b>Veličina amplikona</b>	<b>Temperatura hibridizacije °C</b>
GarV-A	ACPF	ATGTCGAATCCAACCTCAGTCG	444 bp	52
	ACPR	AGACCATGTTGGTGGCGCG		
GarV-B	BCPF	TGACGGGCAAACAGCAGAATAA	576 bp	50
	BCPR	ATATAGCTTAGCGGGTCCTTC		
GarV-C	CCPF	TTGCTACCACAATGGTTCCTC	679 bp	51
	CCPR	TACTGGCACGAGTTGGGAAT		
GarV-E	EF2	TTGCTAGACCACCTCAGTATTGAGAA	458 bp	55
	ER2	TATTGGGCGTACATCGGTGACTGT		
GarV-X	XF	GCGGTAATATCTGACACGCTCCA	386 bp	55
	XR	ACGTTAGCTTCACTGGGGTAGAATAT		
GarV-D	DCPF	AAGGAGCTACACCGAAGGAC	456 bp	52
	DCPR	TAAAGTCGTGTGGATGCATCAGA		

#### 4.3.2.8. Multiplex RT-PCR

Multiplex RT-PCR metoda za simultanu detekciju više virusa lukova korišćenjem prajmera specifičnih za najrasprostranjenije i najčešće zastupljene viruse u našoj zemlji (OYDV, GarCLV, LYSV, SLV, *Allexivirus*) obavljena je sa namjerom dobijanja brze i pouzdane metode za skrining prisustva ovih virusa u različitim vrstama lukova u našoj zemlji.

Za ova ispitivanja odabrano je pet izolata koji su molekularno detektovani i identifikovani u pojedinačnim reakcijama, a koji su bili zaraženi miješanim infekcijama navedenih virusa. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 9.

**Tabela 9.** Izolati iz Srbije korišćeni za multiplex RT-PCR

<b>Izolat</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Virusi dokazani molekularno</b>
115-10	2010.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	Aleksandrovo	OYDV, <i>Allexivirus</i>
553-11	2011.		Ljutovo	OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, <i>Allexivirus</i>
181-13	2013.		Arilje	OYDV, LYSV
498-14	2014.		Đurđevo	LYSV, SLV
365-15	2015.	<i>A. fistulosum</i>	Vinča	OYDV, SLV

Ova metoda urađena je pomoću „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem smješe prajmera specifičnih za detekciju OYDV, GarCLV, LYSV, SLV i vrsta roda *Allexivirus*. Svih pet pari prajmera amplifikuju fragmente različite veličine od 602, 481, 316, 203, odnosno 281 bp, što pogoduje jasnoj vizuelizaciji na agaroznom gelu (Nam et al., 2015). Sekvence korišćenih prajmera, veličina amplikona i region koji prajmeri obuhvataju dati su u tabeli 10.

**Tabela 10.** Prajmeri korišćeni u multiplex RT-PCR

<b>Virus</b>	<b>Naziv prajmera</b>	<b>Sekvenca prajmera</b>	<b>Veličina amplikona</b>	<b>Region koji prajmeri obuhvataju</b>
SLV	SL-N30	TATGGCTAACGAAGAAGAAGAACTC	203 bp	CP*
	SL-C10	CGTTCACGCTAGACAATTCAGACAT		
LYSV	LYS-N10	CGCATATGCAGTGATGTTTCGGTT	316 bp	CP+3'UTR
	LYS-C15	ATCAAATTCAGGCTGCTTATACAC		
GarCLV	GCL-N30	GCACCAGTGGTTTGGAATGA	481 bp	CP+NABP
	GCL-C40	AGCACTCCTAGAACAACCATTA		
OYDV	OYD-N25	CACCNTAYATAGCRGARACAGCTCT	602 bp	Nib+CP
	OYD-C06	ACTGAAATGCGCCATTATYTGCTA		
<i>Allexivirus</i>	AL-N30	CAYTCHATGAAYGCBAAARATGTC	281 bp	CP+NABP
	AL-C30	GGCTTATTYTGWCTAGYYTTACG		

Legenda: \*CP-coat protein; UTR-untranslated region; NABP-nucleic acid binding protein; Nib-nuclear inclusion B.

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25  $\mu$ l kako je opisano u poglavlju 4.3.2.1., s tim što je koncentracija prajmera u RT-PCR smješi bila 0,5  $\mu$ M za SLV, 0,0625  $\mu$ M za GarCLV, 0,125  $\mu$ M za LYSV, 0,25  $\mu$ M za OYDV i 0,5  $\mu$ M za vrste roda *Allexivirus*. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 20 s na 95°C, hibridizacija prajmera 30 s na 54°C i elongacija 30 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 35 puta.

### 4.3.3. Analiza RT-PCR produkata

Vizuelizacija umnoženih produkata RT-PCR reakcije obavljena je elektroforetskim razdvajanjem u 1% agaroznom gelu u prisustvu 1xTBE pufera, bojenjem Midori green Advance (Nippon Genetics, Japan) i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml 1x TBE pufera (90 mM Tris, 90 mM borna kisjelina i 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) i zagrevanjem do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature od 60°C i dodavanja Midori Green u količini od 5  $\mu$ l, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu sa postavljenim češljevima i ostavljen je da se ohladi i očvrstne. Nakon polimerizacije gela, češljevi su uklonjeni, a gel je uronjen u 1xTBE pufer u kadici za horizontalnu elektroforezu (Apelex PS 3003, Francuska). Nakon miješanja 5  $\mu$ l produkta RT-PCR reakcije sa 1  $\mu$ l boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) uzorci su unošeni u bunarčice u gelu i podvrgnuti elektroforezi pri konstantnoj struji od 40 mA u trajanju od 45 min.

Nakon završene elektroforeze, amplifikovani fragmenti posmatrani su na transiluminatoru (EBOX VX2, Vilber Lourmat, Francuska) pod UV svijetlošću i pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka odgovarajuće veličine za svaki korišćeni par prajmera. Veličina dobijenih traka određena je pomoću MassRuler<sup>TM</sup> DNA ladder, Mix markera (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), a dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela.

### 4.4. Molekularna identifikacija najznačajnijih vrsta virusa luka

U cilju molekularne identifikacije virusa lukova prisutnih u Srbiji obavljeno je sekvenciranje odabranih izolata za najrasprostranjenije i najčešće detektovane viruse lukova uključujući: OYDV, LYSV i GarCLV, ali i vrsta roda *Allexivirus* i SLV kao

novih virusa lukova u našoj zemlji. Poslije uspješne amplifikacije uzoraka odabranih za sekvenciranje, dobijeni amplikoni prečišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen) po uputstvu proizvođača. Jedna zapremina dobijenog PCR produkta pomiješana je sa pet zapremina PBI pufera, a zatim prebačena u QIAquick kolonu smještenu u kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13000 rpm) u cilju vezivanja DNK za filter. Nakon toga, tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolonu je pipetirano 750 µl PE pufera u cilju ispiranja DNK, poslije čega je tubica sa uzorkom centrifugirana 1 min na 13 000 rpm. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a QIAquick kolona vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na 13 000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera. U cilju rastvaranja DNK u QIAquick kolonu smještenu u novu tubicu od 1,5 ml pipetirano je 50 µl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13 000 rpm.

Nakon prečišćavanja uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu da bi se provjerila čistoća, molekularna težina i količina amplifikovane DNK. Količina umnoženih fragmenata u svakom uzorku određena je vizuelno, poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima komercijalnog markera 100 bp DNK Ladder (Serva GmbH, UK).

Reakcije sekvenciranja urađene su u MACROGEN Inc. (Macrogen Europe, Holandija) na ABI 3730XL automatskom kapilarnom sekvencionatoru. Umnoženi fragmenti odgovarajućeg gena svakog virusa sekvencirani su u oba smjera upotrebom istih prajmera koji su korišćeni za njegovo umnožavanje. Nakon sekvenciranja, dobijene sekvence odabranih izolata OYDV, GarCL, LYSV, SLV i vrsta roda *Allexivirus* obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., a konsenzus sekvence su dobijene međusobnim poređenjem obrađenih sekvenci uzvodnog i nizvodnog prajmera u CLUSTAL *W* programu, implementiranom u okviru MEGA softvera verzija X (**Kumar et al.**, 2018).

Molekularna identifikacija obavljena je pomoću BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) analize poređenjem sekvenci dobijenih izolata virusa lukova iz Srbije sa dostupnim sekvencama odgovarajućih gena virusa u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Proračun prosječne stope genetičkog diverziteta između izolata OYDV, GarCLV, LYSV, SLV i *Allexivirus* iz Srbije i sekvenci izolata ovih virusa iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank obavljen je

pomoću MEGA X softvera. Odabrane sekvence su prvo poravnate i međusobno upoređene pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson et al., 1994), dijelom programa MEGA verzija X (Kumar et al., 2018), čime je dobijena konsenzus sekvenca za svaki izolat.

#### 4.5. Filogenetske analize

Proračun evolutivne povezanosti izolata tri najzastupljenija virusa lukova iz Srbije (OYDV, GarCLV i LYSV), kao i četiri vrste roda *Allexivirus* (GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D) obavljen je rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci dobijenih u ovim istraživanjima i odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka. Prvo je u MEGA X programu sproveden test pronalaženja najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije metodom maksimalne vjerodostojnosti, na osnovu najniže vrijednosti BIC (*Bayesian Information Criterion*). Filogenetska stabla rekonstruisana su korišćenjem maximum parsimony, maximum-likelihood ili neighbour-joining metode sa „bootstrap“ podrškom u 1000 ponavljanja, a po rekonstrukciji stabla primjenom parametra određenog na osnovu model testa najbolje prilagođene nukleotidne supstitucije su izračunate vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između grupa izdvojenih u stablu. Sve analize su sprovedene korišćenjem MEGA X programa.

##### 4.5.1. Filogenetske analize OYDV

Rekonstrukcija filogenetskog stabla OYDV obavljena je na osnovu 24 sekvence CP gena dužine 580 bp dobijene tokom ovih istraživanja i 70 sekvenci ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (tabela 11), korišćenjem neighbour-joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu obavljeno je primjenom Tamura 3-parameter sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru MEGA X softvera.

**Tabela 11.** Izolati OYDV korišćeni za filogenetske analize

<b>Izolat</b>	<b>Geografsko porijeklo</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>GenBank Acc. No.</b>
115-10	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825508
116-10	Srbija		MK825527
171-10	Srbija		MK825509
181-13	Srbija		MK825511
183-13	Srbija		MK825525
184-13	Srbija	<i>A. cepa</i>	MK825512
185-13	Srbija		MK825513
188-13	Srbija		MK825514
473-13	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825530
142-14	Srbija	<i>A. cepa</i>	MK825515
143-14	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825529
555-14	Srbija		MK825516
571-14	Srbija		MK825517
572-14	Srbija	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	KR025485
108-15	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825531
110-15	Srbija	<i>A. cepa</i>	MK825518
111-15	Srbija		MK825519
114-15	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825510
128-15	Srbija	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	MK825520
365-15	Srbija	<i>A. fistulosum</i>	MK825521
457-15	Srbija	<i>A. sativum</i>	MK825528
475-15	Srbija	<i>A. cepa</i>	MK825522
476-15	Srbija		MK825523
481-15	Srbija		MK825524
108-16	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825526
220	Poljska	<i>A. sativum</i>	KF862691
219	Poljska		KF862690
OY209	Poljska		KF862689
OY208	Poljska		KF862688
OY207	Poljska		KF862687
OY206	Poljska		KF862686
53	Poljska		KF862683
Garw	Japan		AB000837
565-OYDV5	Argentina		GQ475386
558-OYDV2	Italija		GQ475410
586-OYDV2	Italija		GQ475409
593-OYDV2	Italija		GQ475408
590-OYDV2	Italija		GQ475407
537-OYDV2	Italija		GQ475406
547-OYDV2	Italija		GQ475405
541-OYDV2	Italija		GQ475404
543-OYDV2	Italija		GQ475403
510-OYDV2	Italija		GQ475402

509-OYDV2	Italija		GQ475401
507-OYDV1	Italija		GQ475400
501-OYDV1	Italija		GQ475399
503-OYDV1	Italija		GQ475398
496-OYDV1	Italija		GQ475397
497-OYDV1	Italija		GQ475396
498-OYDV1	Italija		GQ475395
511-OYDV2	Italija		GQ475394
538-OYDV2	Italija		GQ475393
Gfw	Japan		AB000838
YH2	Kina		AJ292223
XiXia	Kina		AJ307033
OYDV-SW9-Arg2	Argentina		KF632714
YH1	Kina		AJ292231
Guae	Japan		AB000839
Jammu	Indija		EU045557
OYDV-G <sub>BR</sub>	Brazil		AF228414
/**	Indija		DQ519034
Rajasthan	Indija		EU045556
Karnal	Indija		EU045558
YH3	Kina		AJ292224
Egyptian	Egypt		HM473189
Gzm	Japan		AB000840
587-OYDV2	Italija		GQ475392
552-OYDV2	Italija		GQ475390
557-OYDV2	Italija		GQ475389
608-OYDV3	SAD		GQ475360
606-OYDV3	SAD		GQ475359
607-OYDV3	SAD		GQ475358
Garlic	Izrael		AF071226
561-OYDV5	Argentina		GQ475378
563-OYDV5	Argentina		GQ475377
559-OYDV5	Argentina		GQ475376
566-OYDV5	Argentina		GQ475375
567-OYDV5	Argentina		GQ475374
564-OYDV5	Argentina		GQ475373
569-OYDV5	Argentina		GQ475372
Ac 41	Holandija	<i>A. cepa</i> var. <i>cepa</i>	Y11826
OYDV-Se	Argentina	<i>A. cepa</i>	JX433019
OYDV-At	Germany		JX433020
152.T	Italija		KF623530
154.T	Italija		KF623531
155.T	Italija		KF623532
9.L.Se	Italija		KF623533
11.L.Se	Italija		KF623534
5.L	Italija		KF623535
8.T	Italija		KF623536



6.L.Se	Italija	KF623537
13.L.Se	Italija	KF623538
2.T.Se	Italija	KF623539
27.T.Se	Italija	KF623540
O.70	Sudan	KF623541

Legenda: \* Podaci preuzeti iz GenBank; \*\*/-nema podataka.

#### 4.5.2. Filogenetske analize LYSV

Rekonstrukcija filogenetskog stabla LYSV obavljena je na osnovu tri sekvence CP gena dužine 349 bp dobijene u ovim istraživanjima, kao i 52 sekvence ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 12), korišćenjem neighbour-joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgrupa“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćene su LYSV sekvence iz Kine i Japana (AB194638, AJ409307 i NC\_004011). Prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu izračunate su korišćenjem Kimura 2-parametra i Gamma distribucijom (K2P+G) u okviru programa MEGA X.

**Tabela 12.** Izolati LYSV korišćeni za filogenetske analize

Izolat*	Geografsko porijeklo	Biljka domaćin	GenBank Acc. No.
181-13	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MG242625
298-13	Srbija	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	MG242624
277-13	Srbija		KR075504
Netherlands1	Holandija		AB194627
Netherlands2	Holandija		AB194628
Okayama1	Japan		AB194625
Okayama2	Japan		AB194624
Lind3	Indonezija		AB005612
L	Argentina		AY007693
L	Njemačka		X89711
382-LYSV2	Italija	<i>A. sativum</i>	HQ873737
399-LYSV2	Italija		HQ873738
381-LYSV2	Italija		HQ873739
402-LYSV2	Italija		HQ873740
400-LYSV2	Italija		HQ873741
378-LYSV2	Italija		HQ873742
379-LYSV2	Italija		HQ873743
401-LYSV2	Italija		HQ873744
225-LYSV1	Italija		HQ873755
380-LYSV2	Italija		HQ873756

228-LYSV1	Italija	HQ873757
227-LYSV1	Italija	HQ873758
397-LYSV2	Italija	HQ873759
224-LYSV1	Italija	HQ873760
393-LYSV7	SAD	HQ873735
392-LYSV7	SAD	HQ873736
398-LYSV2	SAD	HQ873745
250-LYSV7	SAD	HQ873746
249-LYSV7	SAD	HQ873747
251-LYSV7	SAD	HQ873748
283-LYSV6	SAD	HQ873749
284-LYSV6	SAD	HQ873750
281-LYSV6	SAD	HQ873751
280-LYSV6	SAD	HQ873752
285-LYSV6	SAD	HQ873753
282-LYSV6	SAD	HQ873754
Hokkaido.043	Japan	AB194656
Hokkaido.042	Japan	AB194626
Aomori.021	Japan	AB194636
3mEl7	Japan	AB194621
1A3l	Japan	AB194623
/	Japan	D11118
/**	Japan	D28590
Aomori.044	Japan	AB194637
W-Ku	Japan	AB194622
Saga.Kikai#2	Japan	AB194639
pLYSVg	New Zealand	AY842136
Aomori.041	Japan	AB194629
LYSV-5CZ	Czech Republic	DQ299380
FLC-CP	Israel	AF071525
LYSV-22CZ	Czech Republic	DQ299381
LYSV-MG	Brazil	KP258216
Saga.Kikai#1	Japan	AB194638
yn1	China	AJ409307
Yuhang GYH	China	NC_004011

Legenda: \* -Podaci preuzeti iz GenBank; \*\* /-nema podataka.

#### 4.5.3. Filogenetske analize GarCLV

Rekonstrukcija filogenetskog stabla GarCLV obavljena je na osnovu 4 sekvence CP gena dužine 617 bp dobijene tokom ovih istraživanja i 50 sekvenci ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 13), korišćenjem maximum-likelihood metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgroup“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Carnation latent virus* (CLV, Acc. No. AJ010697). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela

nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Tamura 3-parameter sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru softvera MEGA X.

**Tabela 13.** Izolati GarCLV korišćeni za filogenetske analize

<b>Izolat</b>	<b>Geografsko porijeklo</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>GenBank Acc. No.</b>
298-12	Srbija	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	MK814829
553-11	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	KP208802
175-13	Srbija	<i>A. cepa</i>	MK814830
544-14	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814828
Blanco 1	Argentina	<i>A. sativum</i>	KJ124845
Blanco 2	Argentina		KJ124846
T8	Argentina		KJ801305
M13	Argentina		KJ801306
Morado 1	Argentina		KJ124847
Morado 2	Argentina		KJ124848
Colorado	Argentina		KJ801307
WA-1	Australija		JF320810
SW3.2	Australija		JQ899445
/**	Brazil		AF228416
336-GCLV4	Kina		HQ873853
334-GCLV4	Kina		HQ873854
197-GCLV4	Kina		HQ873855
335-GCLV4	Kina		HQ873857
338-GCLV4	Kina		HQ873858
337-GCLV4	Kina		HQ873859
340-GCLV4	Kina		HQ873861
GHAV	Japan		AB004805
P100	Njemačka		X81138
JNWG	Indija		JQ818255
Raug	Indija		JQ818256
Kolar	Indija		JQ818257
Anand	Indija		JQ818258
Jamuna Safed	Indija		JQ818259
GAMS	Japan		AB004804
49	Poljska		KF862692
196	Poljska		KF862693
197	Poljska		KF862694
198	Poljska		KF862695
GC200	Poljska		KF862696
GC206	Poljska		KF862697
GC207	Poljska		KF862698
GC208	Poljska		KF862699
GC209	Poljska		KF862700

227	Poljska	KF862701
228	Poljska	KF862702
229	Poljska	KF862703
K2	Južna Koreja	DQ520092
GF-1	Japan	AB004566
195-GCLV3	SAD	GQ475419
366-GCLV3	SAD	GQ475420
362-GCLV3	SAD	GQ475421
363-GCLV3	SAD	GQ475422
370-GCLV3	SAD	GQ475423
341-GCLV3	SAD	HQ873852
368-GCLV3	SAD	HQ873856
369-GCLV3	SAD	HQ873860
364-GCLV3	SAD	HQ873862
367-GCLV3	SAD	HQ873863

Legenda: \* Podaci preuzeti iz GenBank; \*\*/-nema podataka.

#### 4.5.4. Filogenetske analize vrsta roda *Allexivirus*

Molekularna karakterizacija vrsta roda *Allexivirus* obuhvatila je rekonstrukciju filogenetskih stabala na osnovu sekvenci GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D čije je prisustvo dokazano na bijelom luku u Srbiji.

#### 4.5.5. Filogenetske analize GarV-A

Filogenetsko stablo za GarV-A rekonstruisano je na osnovu sekvenci dijela CP i NABP gena dužine 441 bp šest izolata dobijenih u ovim istraživanjima i 29 sekvenci ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 14), korišćenjem maximum-likelihood metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura-2 parameter sa Gamma distribucijom i proporcijom invarijantnih mjesta (K2P+G+I) u okviru softvera MEGA X.

**Tabela 14.** Izolati GarV-A korišćeni za filogenetske analize

Izolat*	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
554-14	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814831
460-15	Srbija		MK814832
465-15	Srbija		MK814833
517-15	Srbija		MK814834

518-15	Srbija		MK814835
519-15	Srbija		MK814836
Bate1	Australija	<i>A. sativum</i>	JN019812
/**	Južna Koreja		AF478197
/	Japan		NC_003375
/	Japan		AB010300
SW3.1B	Australija		JQ899446
/	Južna Koreja		AY390254
GarVA-SP	Španija		KF632716
/	Japan		AB010303
/	Japan		AB010301
/	Japan		AB010302
STJ18	Brazil		KF955561
STJ17	Brazil		KF955560
STJ19	Brazil		KF955562
CRIS01	Brazil		KF955563
Grpv01	Brazil		JX488604
STJ01	Brazil		JX488605
STJ02	Brazil		JX488606
STJ03	Brazil		JX488607
STJ04	Brazil		JX488608
STJ05	Brazil		JX488609
STJ06	Brazil		JX488610
STJ07	Brazil		JX488611
Grpv02	Brazil		JX488612
STJ08	Brazil		JX488613
Grpv10	Brazil		JX488632
Btc02	Brazil		JX488633
Btc03	Brazil		JX488634
Btc04	Brazil		JX488635
Grpv11	Brazil		JX488636

Legenda: \* -Podaci preuzeti iz GenBank; \*\* /-nema podataka.

#### 4.5.6. Filogenetske analize GarV-B

Filogenetsko stablo za GarV-B rekonstruisano je na osnovu sekvenci CP i NABP gena dužine 272 bp šest izolata dobijenih u ovim istraživanjima i 14 sekvenci ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 15), korišćenjem maximum-likelihood metode i bootstrap analize sa 1000. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura-2 parameter i Gamma distribucija (K2P+G) u okviru softvera MEGA X.

**Tabela 15.** Izolati GarV-B korišćeni za filogenetske analize

<b>Izolati*</b>	<b>Zemlja</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>Pristupni broj</b>
89-10	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814837
518-14	Srbija		MK814838
554-14	Srbija		MK814839
460-15	Srbija		MK814840
108-16	Srbija		MK814841
127-16	Srbija		MK814842
SM01	Brazil	<i>A. sativum</i>	JX488614
SM02	Brazil		JX488615
Grpv03	Brazil		JX488616
SM03	Brazil		JX488617
SM04	Brazil		JX488618
SM05	Brazil		JX488619
SM06	Brazil		JX488620
Bate1	Australija		JN019813
/**	Južna Koreja		AF543829
/	Japan		AB010301
/	Japan		AB010302
/	Japan		AB010303
/	Japan		AB010300
/	Južna Koreja		AY390254

Legenda: \*-Podaci preuzeti iz GenBank; \*\*/-nema podataka.

#### 4.5.7. Filogenetske analize GarV-C

Filogenetsko stablo za GarV-C rekonstruisano je na osnovu sekvenci CP i NABP gena dužine 408 bp devet izolata ovog virusa dobijenih u ovim istraživanjima i 20 sekvenci ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 16), korišćenjem maximum-likelihood metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura-2 parameter sa Gamma distribucijom i proporcijom invarijantnih mjesta (K2P+G+I) u okviru softvera MEGA X.

**Tabela 16.** Izolati GarV-C korišćeni za filogenetske analize

<b>Izolati*</b>	<b>Zemlja</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>Pristupni broj</b>
89-10	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814843
500-14	Srbija		MK814844
518-14	Srbija		MK814845
534-14	Srbija		MK814846

554-14	Srbija		MK814847
558-14	Srbija		MK814848
96-15	Srbija		MK814849
458-15	Srbija		MK814850
460-15	Srbija		MK814851
Grpv04	Brazil	<i>A. sativum</i>	JX488621
SM07	Brazil		JX488637
SM08	Brazil		JX488638
SM09	Brazil		JX488639
SM10	Brazil		JX488640
SM11	Brazil		JX488641
SM12	Brazil		JX488642
Grpv12	Brazil		JX488643
Grpv13	Brazil		JX488644
Btu05	Brazil		KF955564
Btu06	Brazil		KF955565
Btu07	Brazil		KF955566
/**	Japan		AB010302
/	Japan		NC003376
SW3.3B	Australija		JQ899448
Bate1	Australija		JN019814
/	Južna Koreja		AF543829
Bate1	Australija		JN019815
Bate1	Australija		JN019812
/	Argentina		X98991

Legenda: \* -Podaci preuzeti iz GenBank; \*\* /-nema podataka.

#### 4.5.8. Filogenetske analize GarV-D

Filogenetsko stablo za GarV-D rekonstruisano je na osnovu sekvenci CP i NABP gena dužine 285 bp dva izolata ovog virusa dobijenih u ovim istraživanjima i 23 sekvence ovog virusa iz drugih djelova svijeta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 17), korišćenjem maximum-likelihood metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura-2 parameter sa Gamma distribucijom i proporcijom invarijantnih mjesta (K2P+G+I) u okviru softvera MEGA X.

**Tabela 17.** Izolati GarV-D korišćeni za filogenetske analize

Izolat*	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
96-15	Srbija	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814852
99-15	Srbija		MK814853

Btc01	Brazil	<i>A. sativum</i>	JX488622
STJ09	Brazil		JX488623
STJ10	Brazil		JX488624
STJ11	Brazil		JX488625
STJ12	Brazil		JX488626
Grpv05	Brazil		JX488627
Grpv06	Brazil		JX488628
Grpv07	Brazil		JX488629
Grpv08	Brazil		JX488630
Grpv09	Brazil		JX488631
STJ13	Brazil		KF955567
STJ14	Brazil		KF955568
STJ15	Brazil		KF955569
STJ16	Brazil		KF955570
Bate1	Australija		JN019815
/**	Japan		AB010303
GarVD-SW10	Argentina		KF555653
333	Poljska		KF446210
/	Južna Koreja		AF519572
Bate1	Australija		JN019812
/	Južna Koreja		AY390254
/	Japan		AB010301
/	Japan		NC003376

---

Legenda: \* -Podaci preuzeti iz GenBank; \*\* /-nema podataka.



## 5. REZULTATI

### 5.1. Simptomi u polju i učestalost oboljenja

Sedmogodišnje istraživanje prisustva i rasprostranjenosti virusa različitih vrsta lukova u Srbiji u periodu od 2010-2016. godine obuhvatilo je pregled i sakupljanje uzoraka iz 111 lokaliteta. Pregledani su usjevi crnog i bijelog luka, praziluka, vlasca, ljutike, biser luka i aljme koji se gaje u Republici Srbiji, kao i sremuša, divlje vrste, koji uspjeva u Republici Srbiji. Uočeni su simptomi koji su ukazivali na virusne infekcije. Najčešće uočeni simptomi javljali su se na lišću koje je ispoljavalo hromatske promjene, tipa mozaika (slika 1), prugastog mozaika (slika 2) i hlorotičnih prošaravanja. Takođe, javljalo se i sušenje vrha ili cijelih listova (slika 3). Pored toga, uočeni su simptomi tipa deformacija lišća u vidu uvijanja (slika 4), a pojedinih godina bila je karakteristična i pojava „dijamantskih“ pjega na cvjetonosnom stablu (slika 5). Takođe, zabilježene su i promjene opšteg izgleda biljke, u vidu zaostajanja u porastu i kržljivosti biljaka.



**Slika 1.** GarCLV: Mozaik na crnom luku



**Slika 2.** OYDV i TSWV: Prugasti mozaik na bijelom luku



**Slika 3.** OYDV i GarCLV: Sušenje vrhova



**Slika 4.** LYSV: Nekroza vrha i uvijanje lišća praziluka



**Slika 5.** IYSV: „Dijamantske“ pjege na cvjetonosnom stablu crnog luka

Tokom obilaska terena i pregleda usjeva 2010. godine uočeni su simptomi na oko 10-15% biljaka u polju. Najčešći simptomi koji su se javljali na pregledanim biljkama crnog i bijelog luka bili su hlorotična prošaravanja. Simptomi su se prvo javljali na donjem dijelu listova, a postepeno su zahvatali i cijeli list. Često je dolazilo i do sušenja simptomatičnih listova. Na pojedinačnim biljkama uočeni su simptomi izraženog žutog mozaika. Simptomi uočeni tokom pregleda usjeva crnog i bijelog luka i praziluka 2011. godine javili su se nešto ranije u toku vegetacije. Najčešće uočen tip simptoma je bio crtičasti mozaik (slika 6), koji se kretao od blagog do izraženog, a kod pojedinih biljaka došlo je i do uvijanja listova. Kod nekih biljaka crnog luka javile su se i mnogobrojne sitne bjeličaste pjege (slika 7). Uočeno je i da su kod simptomatičnih biljaka crnog i bijelog luka glavice bile manje u odnosu na glavice biljaka koje nijesu ispoljavale simptome. Broj simptomatičnih biljaka u polju bio je oko 20%. U toku 2012.

godine simptomi su se javili na oko 20-25% pregledanih biljaka. Kao i u prethodnim godinama, na biljkama su se javljali različiti vidovi mozaika i hlorotičnih prošaravanja, a posebno su bili izraženi simptomi žutog mozaika na praziluku (slika 8). Slična situacija u pogledu simptoma, kad su najčešće uočeni simptomi bili crtičasti mozaik (slika 9) i hlorotična prošaravanja, bila je i u toku obilaska usjeva lukova 2013. godine, a procenat simptomatičnih biljaka procijenjen je na preko 30%. Tokom 2014. godine zabilježena je izražena pojava crtičastog mozaika u merkantilnim usjevima crnog luka. Na sjemenskom luku je bila izražena pojava „dijamantskih“ pjega na cvjetonosnom stablu (slika 10). Susjedne pjege su se vrlo često spajale i dovodile do prelamanja cvjetonosnih stabala (slika 11) što je za posljedicu imalo rasipanje i propadanje sjemena, dok je u merkantilnom usjevu pored crtičastog mozaika bila izražena i pojava sušenja vrha listova (slika 12). U usjevima je zabilježena i velika brojnost tripsa, za koje je utvrđeno da pripadaju vrsti *Thrips tabaci* (slika 13). U pojedinim usjevima crnog luka sve biljke su ispoljavale simptome virusnih infekcija, dok je u ostalim intenzitet zaraze bio veoma visok, čak i preko 90%. Visok nivo zaraze u merkantilnom crnom luku doveo je do značajnog smanjenja mase glavice. Na bijelom luku najzastupljeniji simptomi kao i u prethodnim godinama, bio je žuti mozaik i prugavost (slika 14), dok je na ljutiki zabilježena izražena prugavost (slika 15) i deformacije listova u vidu uvijanja. U toku 2015. godine zabilježeni su raznovrsni simptomi na crnom, bijelom i biser luku, praziluku, ljutiki i aljmi. Simptomi su se ispoljavali na lišću, a uključivali su kao i prethodnih godina, različite vidove mozaika, mozaične prugavosti (slika 16), pojavu bjeličastih pjega i deformacije lišća. Procijenjeni nivo zaraženih biljaka u polju kretao se oko 30 do 40% u zavisnosti od lokaliteta i biljke domaćina. Pregled terena 2016. godine obuhvatio je usjeve crnog i bijelog luka, praziluka, vlasca i biser luka. Simptomi su se razlikovali u zavisnosti od lokaliteta i biljke domaćina, a najčešće zabilježeni su različiti vidovi mozaika, deformacije, uvijanje lišća i žuta prugavost. Takođe, sakupljeni su i uzorci slobodno rastuće vrste divljeg luka-sremuša koji su ispoljavali simptome virusnih zaraza (slika 17). Procijenjena učestalost zaraze kretala se oko 20%.

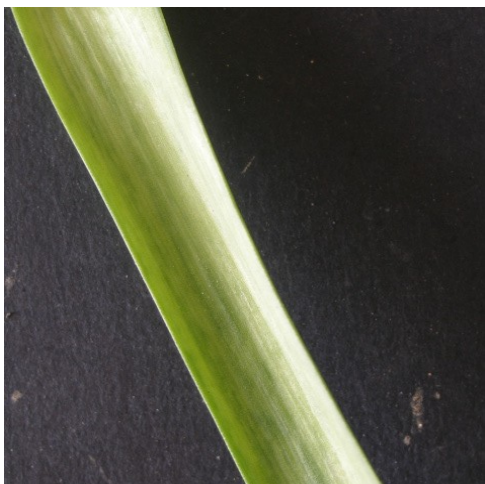


**Slika 6.** OYDV i GarCLV: Crtičaste hlorotične pjege na bijelom luku



**Slika 7.** TSWV: Bjeličaste pjege na crnom luku

Simptomi uočeni na različitim vrstama lukova u toku ovih sedmogodišnjih istraživanja najčešće su se javljali na lišću. Nekada se javljalo više tipova simptoma zajedno, koji su zahvatali cijelu biljku ili su bili ograničeni na njene pojedinačne djelove. Jačina simptoma zavisila je od vremena ostvarene infekcije, uslova spoljne sredine, vrste virusa, kao i da li su se virusi javili u pojedinačnim ili miješanim infekcijama. Najčešće uočeni tip simptoma je bio mozaik, čiji intenzitet je varirao od blagog do izraženog. Takođe, javljao se i žuti mozaik, ali i mozaična prugavost. Često su se javljale i bjeličaste i hlorotične crtičaste pjege, a na cvjetonosnim stablima crnog luka javljale su se i „dijamantske“ pjege. Pored hromatskih promjena, u toku ovih istraživanja zabilježene su i deformacije oblika lista, najčešće u vidu kovrdžanja i uvijanja, ali i propadanja vrha liske. Promjene opšteg izgleda biljke ogledale su se u zaostajanju u porastu i kržljivosti zaraženih biljaka. Izraženi simptomi na lišću prouzrokovali su smanjenje težine i kvaliteta glavica. Ispoljene simptome nije bilo moguće dovesti u vezu sa virusom prouzrokovačem, osim u slučaju „dijamantskih“ pjege na cvjetonosnom stablu crnog luka, koje su gotovo uvijek bile prouzrokovane IYSV.



**Slika 8.** LYSV: Izražen žuti mozaik na praziluku



**Slika 9.** OYDV: Crtičasti mozaik na crnom luku



**Slika 10.** IYSV: „Dijamantske“ pjege na cvjetonosnom stablu crnog luka



**Slika 11.** IYSV: Prelamanje cvjetonosnog stabla



**Slika 12.** IYSV: Sušenje vrhova lista



**Slika 13.** IYSV: Tripsi u osnovi lista



**Slika 14.** GarCLV: Mozaik na listu bijelog luka



**Slika 15.** OYDV: Prugavost na listu ljutike



**Slika 16.** OYDV: Izražena mozaična prugavost na aljmi

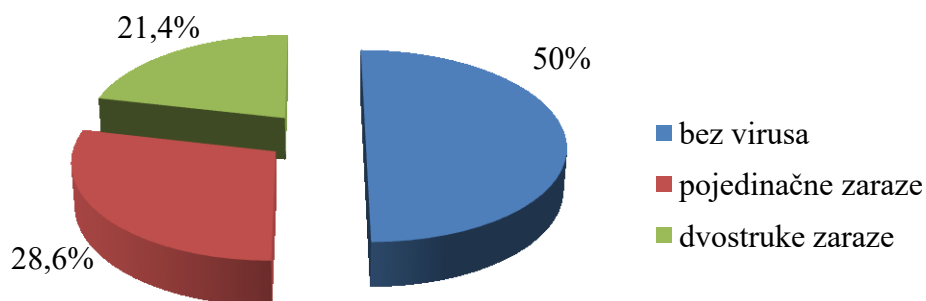


**Slika 17.** OYDV: Mozaik na sremušu

## 5.2. Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima lukova primjenom DAS-ELISA metode

Sa ciljem utvrđivanja prisustva i identifikacije virusa u usjevima lukova gajenih na teritoriji Republike Srbije, uzorci sakupljeni u periodu od 2010. do 2016. godine, testirani su primjenom poliklonalnih antiseruma za pet ekonomski najvažnijih i najrasprostranjenijih virusa lukova: OYDV, GarCLV, LYSV, TSWV i IYSV.

Tokom 2010. godine u Rasinskom, Srednjobanatskom, Raškom, Pirotskom, Mačvanskom, Južnobačkom i okrugu Grad Beograd, pregledom su obuhvaćeni lokaliteti: Medveđa, Beograd, Aleksandrovo, Žitište, Ratina, Mokra, Hetin, Družetić, Đurđevo i Kisač u kojima je sakupljeno četrnaest uzoraka od čega pet bijelog i devet crnog luka (slika 18). Primjenom DAS-ELISA testa utvrđeno je prisustvo tri virusa: OYDV, GarCLV i TSWV u 50% ispitivanih uzoraka (tabela 18, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virusi detektovani su OYDV i GarCLV u 28,6% ispitivanih uzoraka, dok je TSWV dokazan u 14,3% ispitivanih uzoraka.



**Grafikon 1.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2010. godine

Sva tri virusa javila su se u pojedinačnim i miješanim infekcijama. Miješane infekcije bile su zastupljene u 21,4% ispitivanih uzoraka, od kojih je dvostruka infekcija sa OYDV i GarCLV bila zastupljena u 14,3%, a dvostruka infekcija OYDV i TSWV u 7,1% ispitivanih uzorka. Pojedinačne infekcije GarCLV bile su zastupljene u 14,3%, dok su pojedinačne infekcije OYDV i TSWV bile zastupljene u 7,1% ispitivanih

uzoraka (grafikon 1). Od 13 lokaliteta pregledanih lokaliteta OYDV i GarCLV su dokazani u po četiri lokaliteta što ih čini najrasprostranjenijim virusima tokom 2010. godine (slika 18). GarCLV je detektovan u 60% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 11% ispitivanih uzoraka crnog luka, dok je TSWV detektovan u 20% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 11% ispitivanih uzoraka crnog luka. OYDV je detektovan u 80% ispitivanih uzoraka bijelog luka, ali ne i u ispitivanim uzorcima crnog luka. LYSV i IYSV nijesu detektovani u 2010. godini.



**Slika 18.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2010. godine u Srbiji

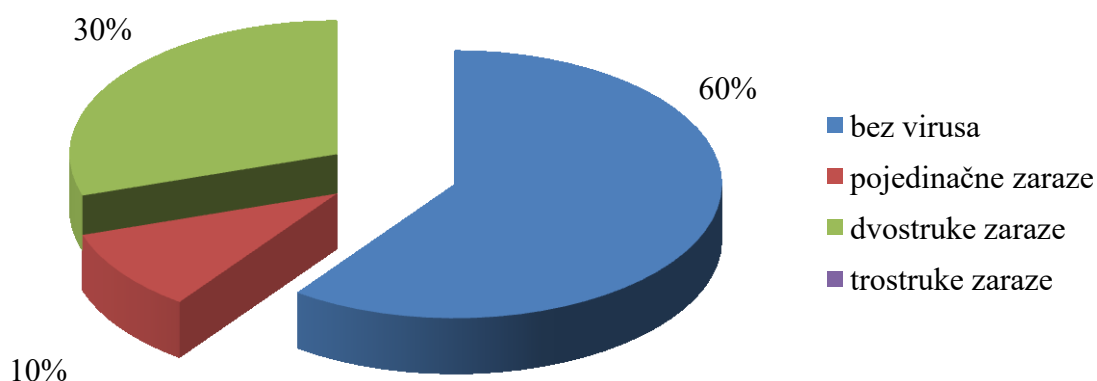


**Tabela 18.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa lukova u pojedinačnim i miješanim infekcijama 2010. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije		% negativnih uzoraka
			OYDV	GarCLV	TSWV	OYDV+TSWV	OYDV+GarCLV	
<i>Allium sativum</i>	Zemun	1	0	1(100)*	0	0	0	0
	Aleksandrovo	1	0	0	0	1(100)	0	0
	Žitište	1	1(100)	0	0	0	0	0
	Mokra	1	0	0	0	0	1(100)	0
	Družetić	1	0	0	0	0	1(100)	0
<i>Allium cepa</i>	Medveđa	1	0	0	0	0	0	1(100)
	Aleksandrovo	1	0	0	1(100)	0	0	0
	Ratina	1	0	0	0	0	0	1(100)
	Mokra	1	0	0	0	0	0	1(100)
	Hetin	1	0	0	0	0	0	1(100)
	Družetić	1	0	0	0	0	0	1(100)
	Đurđevo	1	0	1(100)	0	0	0	0
	Kisač	2	0	0	0	0	0	2(100)
<b>Ukupno</b>		<b>14</b>	<b>1(7,1)</b>	<b>2(14,3)</b>	<b>1(7,1)</b>	<b>1(7,1)</b>	<b>2(14,3)</b>	<b>7(50)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.

U uzorcima različitih vrsta lukova sakupljenim tokom 2011. godini u okruzima Južnobački, Severnobački i Grad Beograd pregledom u 2011. godini obuhvaćeni su lokaliteti: Rimski Šančevi, Ljutovo, Gornji Tavankut, Zemun i Slanci u kojima su sakupljena tri uzorka bijelog luka, pet uzoraka crnog luka i dva uzorka praziluka (slika 19). Primjenom DAS-ELISA testa dokazano je prisustvo tri virusa: OYDV, GarCLV i TSWV u 40% ispitivanih uzoraka (tabela 19, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virusu detektovani su TSWV i GarCLV u po 30% ispitivanih uzoraka, a zatim OYDV u 10% ispitivanih uzoraka. Miješane infekcije bile su zastupljene u 30% ispitivanih uzoraka, od kojih je dvostruka infekcija GarCLV i TSWV bila zastupljena u 20%, a dvostruka infekcija OYDV i GarCLV u 10% ispitivanih uzoraka. Jedini virus dokazan u pojedinačnim infekcijama bio je TSWV, detektovan u 10% ispitivanih uzoraka (grafikon 2). Od 7 pregledanih lokaliteta GarCLV i TSWV su dokazani na po 3 lokaliteta što ih čini najrasprostranjenijim virusima tokom 2011. godine (slika 19). GarCLV je dokazan u 66,7% ispitivanih uzoraka bijelog i u 20% ispitivanih uzoraka crnog luka, TSWV u 33,3% ispitivanih uzoraka bijelog i u 40% ispitivanih uzoraka crnog luka, dok je OYDV dokazan u 33,3% ispitivanih uzoraka bijelog luka, ali ne i u ispitivanim uzorcima crnog luka. Nijedan virus nije detektovan na praziluku u 2011. godini. LYSV i IYSV nijesu detektovani u 2011. godini.



**Grafikon 2.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2011. godine

**Tabela 19.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa lukova u pojedinačnim i miješanim infekcijama 2011. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne	Miješane infekcije		% negativnih uzoraka
			infekcije	TSWV	OYDV+GarCLV	
<i>Allium sativum</i>	Rimski Šančevi	1	0	0	1(100)	0
var. <i>sativum</i>	Ljutovo	2	0	1(50)	0	1(50)
<i>Allium cepa</i>	Rimski Šančevi	1	0	0	0	1(100)
	Zemun	1	0	0	1(100)	0
	Gornji Tavankut	2	0	0	0	2(100)
	Ljutovo	1	1(100)	0	0	0
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Slanci	2	0	0	0	2(100)
<b>Ukupno</b>		<b>10</b>	<b>1(10,0)</b>	<b>1(10,0)</b>	<b>2(20,0)</b>	<b>6(60,0)</b>

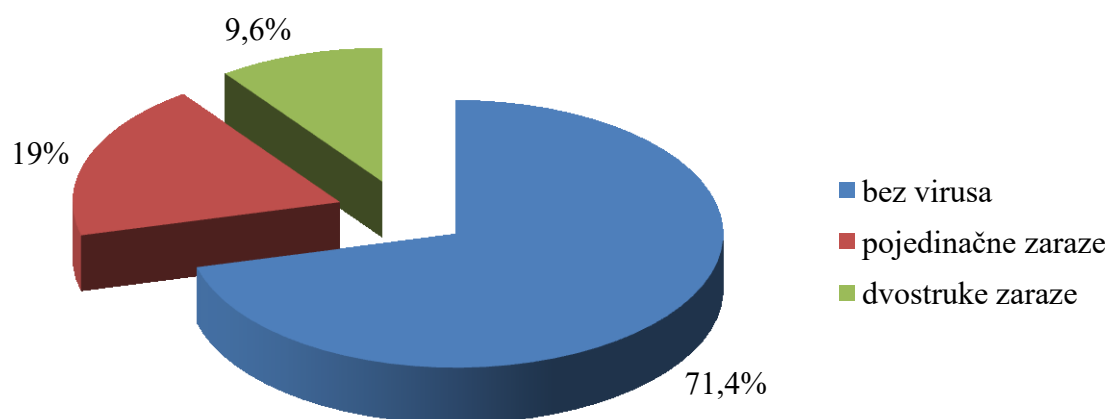
Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procent infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



**Slika 19.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2011. godine u Srbiji

U okruzima Pčinjski, Srednjobanatski, Grad Beograd, Braničevski i Rasinski pregledom u 2012. godini obuhvaćeni su lokaliteti: Vladičin Han, Mihajlovo, Padinska Skela, Porodin i Medveđa u kojima je sakupljen dvadeset jedan uzorak od čega jedan uzorak bijelog, jedanaest uzoraka crnog luka i devet uzoraka praziluka (slika 20). Primjenom DAS-ELISA testa u sakupljenim uzorcima dokazano je prisustvo tri virusa: OYDV, LYSV i GarCLV (tabela 20, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virus detektovan je OYDV u 19% ispitivanih uzoraka, zatim LYSV u 14,3%, dok je treći po zastupljenosti bio GarCLV koji je detektovan u 4,8% ispitivanih uzoraka. OYDV i

LYSV su se javili u miješanim i pojedinačnim infekcijama, dok se GarCLV javio samo u miješanim infekcijama. Miješane infekcije bile su zastupljene u 9,6% ispitivanih uzoraka, od kojih je dvostruka infekcija OYDV i LYSV bila zastupljena u 4,8% ispitivanih uzoraka, kao i dvostruka infekcija OYDV i GarCLV. Pojedinačne infekcije OYDV i LYSV bile su podjednako zastupljene sa po 9,5% ispitivanih uzoraka (grafikon 3). Od šest pregledanih lokaliteta LYSV je dokazan na 3 lokaliteta što ga čini najrasprostranjenijim virusom tokom 2012. godine (slika 20). OYDV je detektovan u 100% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 27,3% ispitivanih uzoraka crnog luka, LYSV u 33,3% ispitivanih uzoraka praziluka i 9,1% ispitivanih uzoraka bijelog luka, dok je GarCLV detektovan u 100% ispitivanih uzoraka bijelog luka, ali ne i u ostalim vrstama lukova. TSWV i IYSV nijesu detektovani u 2012. godini.



**Grafikon 3.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2012. godine

**Tabela 20.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u pojedinačnim i miješanim infekcijama 2012. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije		Miješane infekcije	OYDV +GarCLV	% negativnih uzoraka
			OYDV	LYSV	OYDV + LYSV		
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Vladičin Han	1	0	0	0	1(100)	0
<i>Allium cepa</i>	Mihajlovo	2	0	0	0	0	2(100)
	Padinska Skela	2	0	0	0	0	2(100)
	Medveđa	7	2(28,6)	0	1(14,3)	0	4(57,1)
<i>Allium</i> <i>ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Padinska Skela	4	0	1(25)	0	0	3(75)
	Porodin	5	0	1(20)	0	0	4(80)
<b>Ukupno</b>		<b>21</b>	<b>2(9,5)</b>	<b>2(9,5)</b>	<b>1(4,8)</b>	<b>1(4,8)</b>	<b>15(71,4)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



**Slika 20.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2012. godine u Srbiji

U okruzima Grad Beograd, Rasinski, Zlatiborski, Severnobački i Sremski pregledom tokom 2013. godine obuhvaćeni su lokaliteti: Mladenovac, Medveđa, Arilje, Padinska Skela, Donji Tavankut, Beograd, Popinci i Zemun u kojima je sakupljeno 24 uzorka, od kojih 10 uzorka bijelog, 14 uzorka crnog luka i tri uzorka praziluka (slika 21, grafikon 8). Primjenom DAS-ELISA testa utvrđeno je prisustvo tri virusa OYDV, GarCLV i LYSV (tabela 21 i 22). Kao najzastupljeniji virus detektovan je OYDV u 56% ispitivanih uzoraka, zatim GarCLV u 42% ispitivanih uzoraka, dok je treći po zastupljenosti bio LYSV koji je detektovan u 25% ispitivanih uzoraka. Sva tri virusa su

se javili i u miješanim i u pojedinačnim infekcijama. Miješane infekcije bile su zastupljene u 40% ispitivanih uzoraka, od kojih je trostruka infekcija OYDV, GarCLV i LYSV bila zastupljena u 20% ispitivanih uzoraka, dvostruka infekcija sa OYDV i GarCLV u 16%, a dvostruka infekcija OYDV i LYSV u 4% ispitivanih uzorka. Pojedinačne infekcije OYDV bile su zastupljene u 16% ispitivanih uzoraka, dok su pojedinačne infekcije GarCLV bile zastupljene u 8% ispitivanih uzoraka. Pojedinačne infekcije LYSV bile su zastupljene u 8% ispitivanih uzoraka (grafikon 4). Od 13 pregledanih lokaliteta OYDV, GarCLV i LYSV su dokazani u po 4 lokaliteta (slika 21). OYDV je detekovan u 100% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 28,6% ispitivanih uzoraka crnog luka, GarCLV u 80% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 21,4% ispitivanih uzoraka crnog, dok je LYSV je detektovan u 100% ispitivanih uzoraka praziluka, 60% ispitivanih uzoraka bijelog luka, ali ne i u ispitivanim uzorcima crnog luka. TSWV i IYSV nijesu detektovani u 2013. godini.

**Tabela 21.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u pojedinačnim infekcijama 2013. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			% negativnih uzoraka
			OYDV	GarCLV	LYSV	
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Mladenovac	2	1(50)	0	0	0
	Arilje	7	0	0	0	0
	Beograd	1	0	0	0	0
<i>Allium cepa</i>	Mladenovac	4	0	2(50)	0	2(50)
	Medveđa	2	0	0	0	2(100)
	Arilje	3	3(100)	0	0	0
	Donji Tavankut	1	0	0	0	1(100)
	Zemun	1	0	0	0	1(100)
	Popinci	3	0	0	0	2(66,7)
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Padinska Skela	1	0	0	1(100)	0
	Porodin	1	0	0	1(100)	0
<b>Ukupno</b>		<b>26</b>	<b>4(15,4)</b>	<b>2(7,7)</b>	<b>2(7,7)</b>	<b>8(30,8)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.

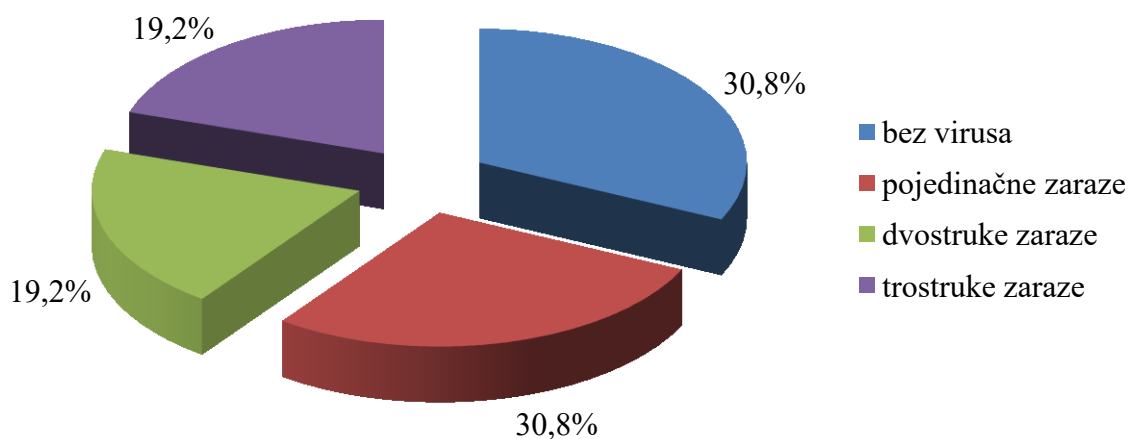
**Tabela 22.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u miješanim infekcijama 2013. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Miješane infekcije		
			OYDV+LYSV	OYDV+GarCLV	OYDV+LYSV+GarCLV
<i>Allium</i>	Mladenovac	2	0	1(50)	0



<i>sativum</i> var.	Arilje	7	1(14,3)	2(28,6)	4(57,1)
<i>sativum</i>	Beograd	1	0	0	1(100)
	Mladenovac	4	0	0	0
	Medveđa	2	0	0	0
	Arilje	3	0	0	0
<i>Allium cepa</i>	Donji	1	0	0	0
	Tavankut	1	0	0	0
	Zemun	1	0	0	0
	Popinci	3	0	1(33,3)	0
<i>Allium</i>	Padinska	1	0	0	0
<i>ampeloprasum</i>	Skela	1	0	0	0
var. <i>porrum</i>	Porodin	1	0	0	0
<b>Ukupno</b>		<b>26</b>	<b>1(3,9)</b>	<b>4(15,4)</b>	<b>5(19,2)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procent infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



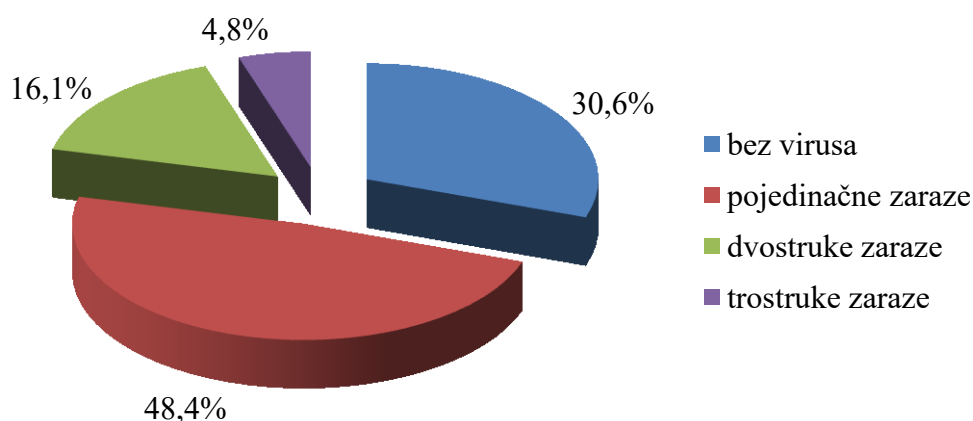
**Grafikon 4.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2013. godine



**Slika 21.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2013. godine u Srbiji

U okruzima Pčinjski, Južnobački, Šumadijski, Severnobački, Zapadnobački, Moravički i Pomoravski pregledom u 2014. godini obuhvaćen su lokaliteti: Vladičin Han, Lok, Belosavci, Gospođinci, Medar, Vrkalovo, Vilovo, Ljutovo, Kupusina, Mrčajevci, Slatina, Čelarevo, Đurđevo, Bačka Topola, Bačka Palanka, Sombor, Kovilj, Crvenka, Kać i Rimski Šančevi u kojima je sakupljeno 124 uzorka, od kojih 77 bijelog luka, 44 crnog luka i tri uzorka ljutike (slika 22). Primjenom DAS-ELISA testa utvrđeno je prisustvo četiri virusa OYDV, GarCLV, IYSV i LYSV (tabela 23 i 24, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virus detektovan je OYDV u 37,9% ispitivanih

uzoraka, zatim GarCLV detektovan u 33,1% ispitivanih uzoraka, dok je treći po zastupljenosti bio je IYSV detektovan u 16,1% ispitivanih uzoraka. Četvrti po zastupljenosti bio je LYSV detektovan u 8,1% ispitivanih uzoraka. Sva četiri virusa javila su se u pojedinačnim i miješanim infekcijama. Prisustvo miješanih infekcija je detektovano u 21% ispitivanih uzoraka. Prisustvo OYDV u miješanoj infekciji sa GarCLV dokazano je u 10,5%, a u miješanoj infekciji sa IYSV u 0,8% ispitivanih uzoraka. Prisustvo GarCLV u miješanoj infekciji sa LYSV dokazano je u 1,6%, a u miješanoj infekciji sa IYSV u 3,2% ispitivanih uzoraka. Trostruka infekcija sa OYDV, GarCLV i LYSV dokazana je u 4,8% ispitivanih uzoraka. Pojedinačna infekcija sa OYDV dokazana je u 21,8%, GarCLV u 12,9%, zatim IYSV u 12,1% i LYSV u 1,6% ispitivanih uzoraka. Tokom 2014. godine pregledan je 21 lokalitet, GarCLV je detektovan u 13, a OYDV u 12 lokaliteta, što čini GarCLV najrasprostranjenijim virusom tokom 2014. godine (slika22). OYDV je detektovan u 53,2% ispitivanih uzoraka bijelog luka, 33,3% ispitivanih uzoraka ljutike i 11,4% ispitivanih uzoraka crnog luka. GarCLV u 66,7% ispitivanih uzoraka ljutike, 33,8% ispitivanih uzoraka bijelog i 29,5% ispitivanih uzoraka crnog luka, dok je LYSV je detektovan u 66,7% ispitivanih uzoraka ljutike, 7,8% ispitivanih uzoraka bijelog luka i 4,5% ispitivanih uzoraka crnog luka. IYSV je detektovan u 45,5% ispitivanih uzoraka crnog luka, dok prisustvo ovog virusa nije detektovano u ostalim vrstama lukova sakupljenih tokom 2014. godine. TSWV nije detektovan u 2014. godini.



**Grafikon 5.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2014. godine

**Tabela 23.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u pojedinačnim infekcijama 2014. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije				% negativnih uzoraka
			OYDV	LYSV	GarCLV	IYSV	
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Vladičin Han	3	0	0	0	0	0
	Đurđevo	16	3(18,6)	1(6,3)	1(6,3)	0	9(56,3)
	Bačka Topola	7	1(14,3)	0	0	0	5(71,4)
	Bačka Palanka	13	6(46,2)	0	4(30,8)	0	0
	Sombor	20	8(40)	0	3(15)	0	7(35)
	Kovilj	4	0	0	0	0	1(25)
	Crvenka	8	5(62,5)	0	2(25,5)	0	1(12,5)
	Kač	6	4(66,7)	0	1(16,7)	0	0
<i>Allium cepa</i>	Belosavci	1	0	0	0	0	1(100)
	Vladičin Han	1	0	0	0	0	1(100)
	Gospođinci	8	0	0	0	3(37,5)	3(37,5)
	Medar	6	0	1(16,7)	0	2(33,3)	2(33,3)
	Vrkalovo	5	0	0	0	3(60)	2(40)
	Vilovo	3	0	0	2(66,7)	0	1(33,3)
	Lok	8	0	0	0	6(75)	0
	Ljutovo	1	0	0	0	0	0
	Kupusina	1	0	0	0	1(100)	0
	Mrčajevci	5	0	0	1(20)	0	4(80)
	Slatina	3	0	0	1(33,3)	0	0
	Čelarevo	2	0	0	1(50)	0	0
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Rimski Šančevi	3	0	0	0	0	1(33,3)
<b>Ukupno</b>		<b>124</b>	<b>27(21,8)</b>	<b>2(1,6)</b>	<b>16(12,9)</b>	<b>15(12,1)</b>	<b>38(30,6)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.

**Tabela 24.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u miješanim infekcijama 2014. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Miješane infekcije									
			OYDV GarCLV	+	OYDV IYSV	+	LYSV GarCLV	+	GarCLV IYSV	+	OYDV LYSV GarCLV	+
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Vladičin Han	3	3(100)		0		0		0		0	
	Đurđevo	16	2(12,5)		0		0		0		0	
	Bačka Topola	7	1(14,3)		0		0		0		0	
	Bačka Palanka	13	2(15,)		0		1(7,7)		0		0	
	Sombor	20	0		0		0		0		2(10)	
	Kovilj	4	2(50)		0		0		0		1(25)	
	Crvenka	8	0		0		0		0		0	
	Kač	6	0		0		0		0		1(16,7)	
<i>Allium cepa</i>	Belosavci	1	0		0		0		0		0	
	Vladičin Han	1	0		0		0		0		0	
	Gospođinci	8	0		0		0		1(12,5)		1(12,5)	
	Međar	6	0		0		0		1(16,7)		0	
	Vrkalovo	5	0		0		0		0		0	
	Vilovo	3	0		0		0		0		0	
	Lok	8	0		1(12,5)		0		1(12,5)		0	
	Ljutovo	1	0		0		0		1(100)		0	
	Kupusina	1	0		0		0		0		0	
	Mrčajevci	5	0		0		0		0		0	
	Slatina	3	2(66,7)		0		0		0		0	
Čelarevo	2	1(50)		0		0		0		0		
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Rimski Šančevi	3	0		0		1(33,3)		0		1(33,3)	
<b>Ukupno</b>		<b>124</b>	<b>13(10,5)</b>		<b>1(0,8)</b>		<b>2(1,6)</b>		<b>4(3,2)</b>		<b>6(4,8)</b>	

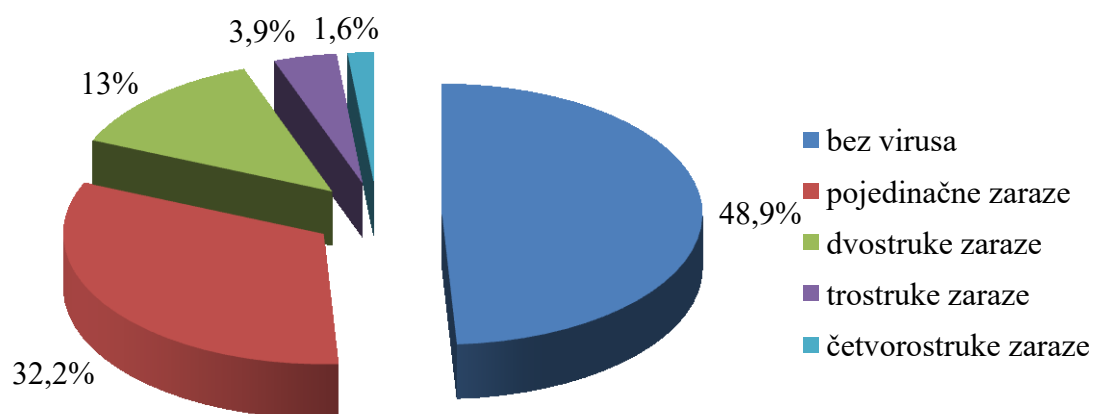
Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



**Slika 22.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2014. godine u Srbiji

U okruzima Sremski, Grad Beograd, Pčinjski, Braničevski, Podunavski, Šumadijski, Zaječarski, Zlatiborski, Jablanički, Rasinski, Mačvanski, Moravički, Južnobački, Srednjobanatski i Zapadnobački pregledom u 2015. godini obuhvaćeni su lokaliteti: Popinci, Zemun, Beograd, Polom, Vladičin Han, Požarevac, Mramorac, Vinča, Vlaško Polje, Arilje, Togočevce, Mačkovac, Koševi, Lozničko Polje, Lozovik, Konjevići, Mrčajevci, Trbušani, Rimski Šančevi, Zrenjanin, Čonoplja, Bukovac, Bački Jarak, Odžaci, Medveđa i Velika Drenova u kojima je sakupljen 131 uzorak od kojih 29 uzoraka bijelog, 53 crnog luka, 35 praziluka, pet aljme, osam biser luka i jedan uzorak

ljutike (slika 23). Primjenom DAS-ELISA testa utvrđeno je prisustvo pet virusa: OYDV, GarCLV, LYSV, TSWV i IYSV (tabela 25 i 26, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virus detektovan je LYSV u 27,5% ispitivanih uzoraka, dok je na drugom mjestu bio GarCLV detektovan u 23,7% ispitivanih uzoraka. Treći po zastupljenosti bio je OYDV detektovan u 19,8%, a četvrti i peti bili su IYSV detektovan u 3,1% odnosno TSWV detektovan u 1,5% ispitivanih uzoraka.



**Grafikon 6.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2015. godine

Svi virusi su detektovani u miješanim i pojedinačnim infekcijama, izuzev TSWV koji nije detektovan u pojedinačnim infekcijama. Miješane infekcije bile su zastupljene u 18,3% ispitivanih uzoraka. Prisustvo OYDV u miješanoj infekciji sa GarCLV dokazano je u 8,4%, a sa LYSV u 1,5% ispitivanih uzoraka. Prisustvo LYSV u miješanoj infekciji sa GarCLV dokazano je u 3,1%, dok je trostruka infekcija LYSV, GarCLV i IYSV dokazana u 0,8% ispitivanih uzoraka. Trostruka infekcija OYDV, TSWV i IYSV dokazana je u 0,8%, a miješana četvorostuka infekcija OYDV, LYSV, GarCLV i TSWV, kao i četvorostuka miješana infekcija OYDV, LYSV, GarCLV i IYSV dokazana je u 0,8% ispitivanih uzoraka. U pojedinačnim infekcijama LYSV je detektovan u 17,6% ispitivanih uzoraka, OYDV u 6,9%, GarCLV u 6,9%, a IYSV u 0,8% ispitivanih uzoraka. Od 39 pregledanih lokaliteta GarCLV i LYSV su dokazani u

po 13 lokaliteta što ih čini najrasprostranjenijim virusima tokom 2015. godine (slika 23). LYSV je detektovan u 87,5% ispitivanih uzoraka biser luka, 42,9% ispitivanih uzoraka praziluka, 22,6% ispitivanih uzoraka crnog luka, 20% ispitivanih uzoraka aljme i 3,4% ispitivanih uzoraka bijelog luka, dok nije detektovan u ispitivanim uzorcima ljutike. GarCLV je detektovan u 58,9% ispitivanih uzoraka bijelog luka, 25% ispitivanih uzoraka biser luka, 20,8% ispitivanih uzoraka crnog luka i 2,9% ispitivanih uzoraka praziluka. GarCLV nije detektovan u sakupljenim uzorcima aljme i ljutike. OYDV je detektovan u 51,8% ispitivanih uzoraka bijelog luka, 20,8% ispitivanih uzoraka crnog luka, 100% ispitivanih uzoraka ljutike, 20% ispitivanih uzoraka aljme, 12,5% ispitivanih uzoraka biser luka, ali ne i u uzorcima praziluka sakupljenih tokom 2015. godine. TSWV je detektovan u 20% ispitivanih uzoraka aljme i 3,8% ispitivanih uzoraka crnog luka. IYSV je detektovan u 20% ispitivanih uzoraka aljme i 6% ispitivanih uzoraka crnog luka. TSWV i IYSV nijesu detektovani u ispitivanim uzorcima bijelog luka, praziluka, biser luka i ljutike.



**Tabela 25.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u pojedinačnim infekcijama 2015. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije				% negativnih uzoraka
			OYDV	LYSV	GarCLV	IYSV	
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Polom	1	0	0	1(100)	0	0
	Vladičin Han	1	0	0	0	0	1(100)
	Zemun	1	0	0	0	0	1(100)
	Mramorac	1	0	0	0	0	0
	Vinča	2	0	0	0	0	0
	Vlaško Polje	2	0	0	0	0	0
	Mačkovac	2	0	0	2(100)	0	0
	Koševi	1	0	0	0	0	0
	Rimski Šančevi	8	1(12,5)	0	2(25)	0	2(25)
	Zrenjanin	7	2(28,6)	0	0	0	2(28,6)
	Odžaci	3	0	0	0	0	3(100)
<i>Allium cepa</i>	Popinci	1	0	0	0	0	1(100)
	Zemun	1		0	0	0	1(100)
	Polom	1	0	0	0	0	0
	Vladičin Han	1	0	0	0	0	0
	Požarevac	2	0	0	0	0	0
	Mramorac	1	0	0	0	0	1(100)
	Vinča	3	0	0	0	0	0
	Togočevce	2	0	0	0	0	2(100)
	Mačkovac	2	0	0	0	0	2(100)
	Koševi	1	0	0	0	0	0
	Lozničko Polje	2	0	0	0	0	2(100)
	Čonoplja	13	5(38,5)	0	0	0	8(61,5)
	Rimski Šančevi	3	0	0	0	0	3(100)

	Bukovac	11	0	1(9,1)	0	0	8(72,7)
	Bački Jarak	9	0	1(11,1)	2(22,2)	1(11,1)	5(55,5)
	Zemun	2	0	1(50)	0	0	1(50)
	Koševi	1	0	1(100)	0	0	0
	Vladičin Han	2	0	1(50)	0	0	1(50)
	Lozovik	24	0	10(41,7)	0	0	14(58,3)
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Konjevići	1	0	0	1(100)	0	0
	Mrčajevci	1	0	0	0	0	1(100)
	Trbušani	1	0	1(100)	0	0	0
	Medveđa	2	0	1(50)	0	0	1(50)
	Velika Drenova	1	0	0	0	0	1(100)
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Arilje	1	1(100)	0	0	0	0
<i>Allium fistulosum</i>	Vinča	1	1(100)	0	0	0	0
	Rimski Šančevi	4	0	1(25)	0	0	3(75)
<i>Allium ampeloprasum</i>	Rimski Šančevi	8	0	5(62,5)	1(12,5)	0	0
<b>Ukupno</b>		<b>131</b>	<b>6,9</b>	<b>17,6</b>	<b>6,9</b>	<b>0,8</b>	<b>48,9</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.

**Tabela 26.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u miješanim infekcijama 2015. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uзорaka	Miješane infekcije							
			OYDV+ LYSV	OYDV + GarCLV	LYSV + GarCLV	OYDV + LYSV + GarCLV	LYSV + GarCLV+ IYSV	OYDV + LYSV + GarCLV+ TSWV	OYDV + LYSV + GarCLV+ IYSV	
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Polom	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Vladičin Han	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Zemun	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Mramorac	1	0	1(100)	0	0	0	0	0	
	Vinča	2	0	2(100)	0	0	0	0	0	
	Vlaško Polje	2	0	2(100)	0	0	0	0	0	
	Mačkovac	2	0	0	0	0	0	0	0	
	Koševi	1	0	1(100)	0	0	0	0	0	
	Rimski Šančevi	8	0	3(37,5)	0	0	0	0	0	
	Zrenjanin	7	0	2(28,6)	0	1(14,3)	0	0	0	
	Odžaci	3	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Allium cepa</i>	Popinci	1	0	0	0	0	0	0	0
		Zemun	1	0	0	0	0	0	0	0
Polom		1	0	0	1(100)	0	0	0	0	
Vladičin Han		1	0	0	0	1(100)	0	0	0	
Požarevac		2	0	0	2(100)	0	0	0	0	
Mramorac		1	0	0	0	0	0	0	0	
Vinča		3	0	0	0	1(33,3)	0	1(33,3)	1(33,3)	
Togočevce		2	0	0	0	0	0	0	0	
Mačkovac		2	0	0	0	0	0	0	0	

	Koševi	1	0	0	0	1(100)	0	0	0
	Lozničko	2	0	0	0	0	0	0	0
	Polje								
	Čonoplja	13	0	0	0	0	0	0	0
	Rimski								
	Šančevi	3	0	0	0	0	0	0	0
	Bukovac	11	1(9,1)	0	0	0	1(9,1)	0	0
	Bački								
	Jarak	9	0	0	0	0	0	0	0
	Zemun	2	0	0	0	0	0	0	0
	Koševi	1	0	0	0	0	0	0	0
	Vladičin								
	Han	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Allium ampeloprasum var. porrum</i>	Lozovik	24	0	0	0	0	0	0	0
	Konjevići	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mrčajevci	1	0	0	0	0	0	0	0
	Trbušani	1	0	0	0	0	0	0	0
	Medveđa	2	0	0	0	0	0	0	0
	Velika								
	Drenova	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Allium cepa</i> var <i>aggregatum</i>	Arilje	1	0	0	0	0	0	0	0
	Vinča	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Allium fistulosum</i>	Rimski								
	Šančevi	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Allium ampeloprasum</i>	Rimski								
	Šančevi	8	1(12,5)	0	1(12,5)	0	0	0	0
Ukupno		<b>131</b>	<b>1,5</b>	<b>8,4</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>

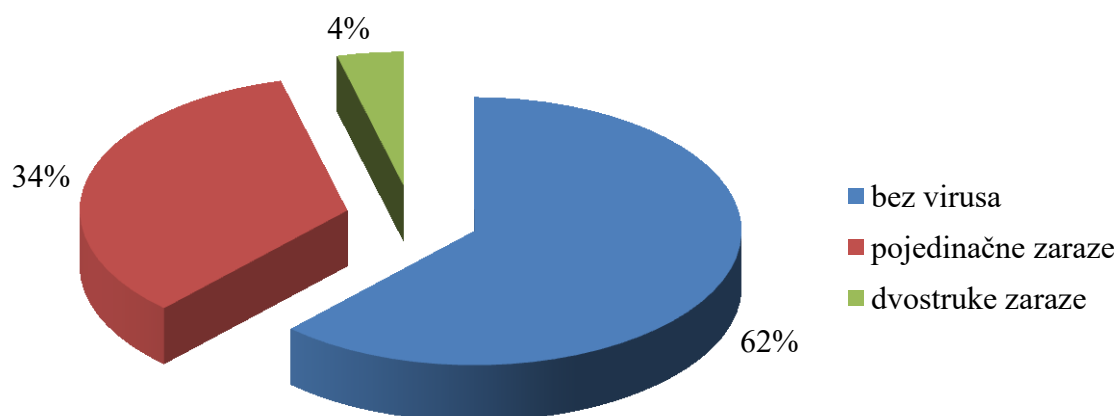
Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procent infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



**Slika 23.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2015. godine u Srbiji

U okruzima Južnobački, Zapadnobački, Rasinski i Grad Beograd pregledom u 2016. godini obuhvaćeni su lokaliteti: Gospođinci, Despotovo, Karavukovo, Bački Petrovac, Kisač, Medveđa, Slanci, Begeč, Dobanovci i Kosmaj u kojima je sakupljeno 50 uzoraka od kojih četiri uzorka bijelog luka, deset uzoraka crnog luka, 28 uzoraka praziluka, jedan uzorak biser luka, pet uzoraka vlasca i dva uzorka sremuša (slika 24). Primjenom DAS-ELISA testa u sakupljenim uzorcima utvrđeno je prisustvo tri virusa: OYDV, GarCLV i LYSV (tabela 27, grafikon 8). Kao najzastupljeniji virus detektovan

je GarCLV u 16% ispitivanih uzoraka, na drugom mjestu bio je LYSV detektovan u 14% ispitivanih uzoraka, dok je treći po zastupljenosti bio OYDV detektovan u 12% ispitivanih uzoraka. Sva tri virusa su se javila u miješanim i u pojedinačnim infekcijama. Prisustvo miješanih infekcija detektovano je u 4% ispitivanih uzoraka i to mješana infekcija GarCLV sa OYDV ili sa LYSV u po 2% ispitivanih uzoraka. U pojedinačnim infekcijama LYSV je detektovan u 12% ispitivanih uzoraka, GarCLV takođe u 12%, dok je OYDV detektovan u 10% ispitivanih uzoraka (grafikon 7). Od 15 pregledanih lokaliteta OYDV i GarCLV su dokazani u po 3 lokaliteta što ih čini najrasprostranjenijim virusima tokom 2016. godine (slika 24). GarCLV je detektovan u 60% ispitivanih uzoraka vlasca, 25% ispitivanih uzoraka bijelog luka, 10,7% ispitivanih uzoraka praziluka i 10% ispitivanih uzoraka crnog luka, ali ne i u sakupljenim i analiziranim uzorcima sremuša i biser luka. LYSV je detektovan u 100% ispitivanih uzoraka biser luka, 20% ispitivanih uzoraka vlasca i 17,9% ispitivanih uzoraka praziluka. Prisustvo LYSV nije detektovano u uzorcima sremuša, bijelog i crnog luka sakupljenih tokom 2016. godine. OYDV je detektovan u 50% ispitivanih uzoraka bijelog luka, ljutike i sremuša, kao i 30% ispitivanih uzoraka crnog luka, ali ne i u sakupljenim i analiziranim uzorcima biser luka i praziluka. TSWV i IYSV nijesu detektovani u 2016. godini.



**Grafikon 7.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa lukova 2016. godine

**Tabela 27.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa na lukovima u pojedinačnim i miješanim infekcijama 2016. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije		% negativnih uzoraka
			OYDV	LYSV	GarCLV	OYDV + GarCLV	LYSV+ GarCLV	
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>	Slanci	2	1(50)	0	0	1(50)	0	0
	Bački Petrovac	2	0	0	0	0	0	2(100)
<i>Allium cepa</i>	Gospodinci	3	0	0	0	0	0	3(100)
	Despotovo	6	3(50)	0	0	0	0	3(50)
	Bački Petrovac	1	0	0	1(100)	0	0	0
	Karavukovo	9	0	4(44,4)	3(33,3)	0	0	2(22,2)
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Kisač	5	0	0	0	0	0	5(100)
	Medveđa	1	0	1(100)	0	0	0	0
	Begeč	3	0	0	0	0	0	3(100)
	Bački Petrovac	8	0	0	0	0	0	8(100)
	Dobanovci	2	0	0	0	0	0	2(100)
<i>Allium ursinum</i>	Kosmaj	2	1(50)	0	0	0	0	1(50)
<i>Allium schoenoprasum</i>	Karavukovo	2	0	0	1(50)	0	0	1(50)
	Bački Petrovac	3	0	0	1(33,3)	0	1(33)	1(33,3)
<i>Allium ampeloprasum</i>	Dobanovci	1	0	1(100)	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>		<b>50</b>	<b>5(10)</b>	<b>6(12)</b>	<b>6(12)</b>	<b>1(2)</b>	<b>1(2)</b>	<b>31(62)</b>

Legenda: \*broj zaraženih uzoraka/procentat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja sakupljenih i analiziranih uzoraka.



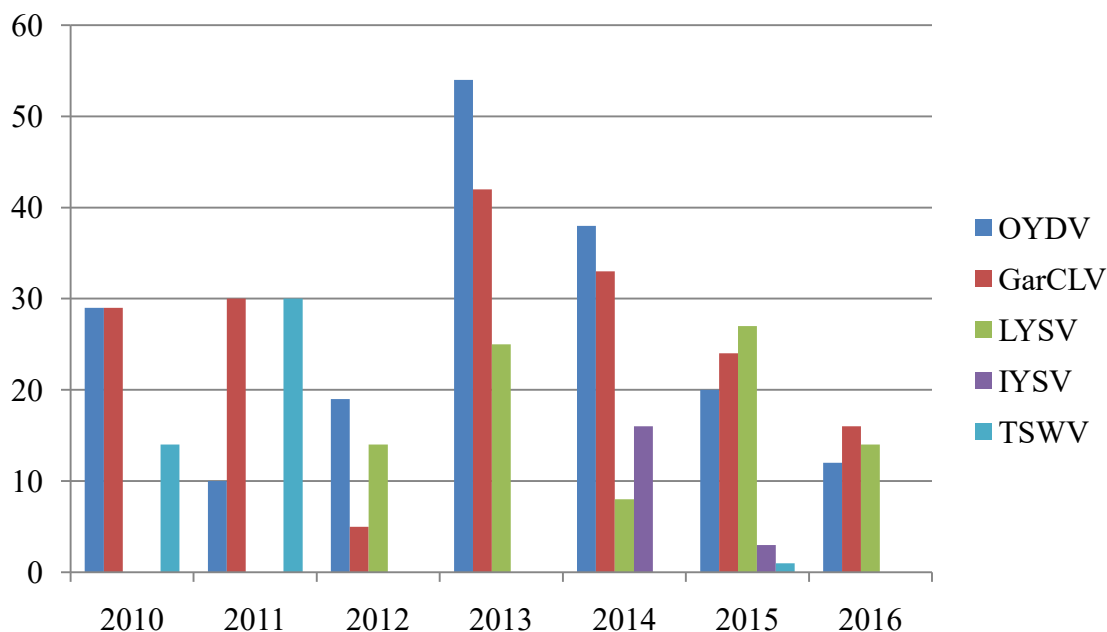
**Slika 24.** Pregledani lokaliteti gajenja različitih vrsta lukova tokom 2016. godine u Srbiji

Od ukupno 374 sakupljena i analizirana uzorka lukova tokom ovih istraživanja, kao najzastupljeniji virus se pokazao OYDV detektovan u 27% ispitivanih uzoraka. Drugi po zastupljenosti bio je GarCLV detektovan u 26,2% ispitivanih uzoraka, zatim LYSV detektovan u 16,6% ispitivanih uzoraka, IYSV detektovan u 6,4% ispitivanih uzorka i na kraju TSWV detektovan u 1,9% ispitivanih uzoraka (grafikon 8).

Tokom ovih istraživanja najrasprostranjeniji virus u različitim usjevima lukova u Srbiji bio je GarCLV čije je prisustvo dokazano na 41 (37%) pregledanom lokalitetu, dok je drugi po rasprostranjenosti bio OYDV dokazan na 37 (33%) lokaliteta. Na



značajnom broju pregledanih lokaliteta 31 (28%) dokazan je i LYSV, dok su IYSV i TSWV dokazani samo na 9 (8%), odnosno 5 (5%) pregledanih lokaliteta.



**Grafikon 8:** Procentualna zastupljenost virusa lukova po godinama

U sedmogodišnjim ispitivanjima kao najzastupljeniji virus na crnom luku bio je GarCLV detektovan u 20,5%, dok je drugi po zastupljenosti bio OYDV detektovan u 17,1% ispitivanih uzoraka crnog luka. Treći po zastupljenosti bio je IYSV detektovan u 15,6%, zatim LYSV detektovan u 9,6% i na kraju TSWV koji je detektovan u samo 2,7% ispitivanih uzoraka crnog luka.

Kao najzastupljeniji virus na bijelom luku detektovan je OYDV i to u 57,4% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Drugi po zastupljenosti je bio GarCLV detektovan u 45%, zatim LYSV detektovan u 10,1% i na kraju TSWV detektovan 1,6% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Prisustvo IYSV nije detektovan u sakupljenim i analiziranim uzorcima bijelog luka (tabela 28).

Kao najzastupljeniji virus na praziluku bio je LYSV detektovan u 32,4% ispitivanih uzoraka praziluka. Drugi po zastupljenosti bio je GarCLV detektovan u 5,4% ispitivanih uzoraka praziluka. Prisustvo OYDV, TSWV i IYSV nije detektovano u sakupljenim i analiziranim uzorcima praziluka.

Kao najzastupljeniji virus na ljutiki bili su OYDV, LYSV i GarCLV detektovani u po 50% ispitivanih uzoraka ljutike. TSWV i IYSV nijesu detektovani na ljutiki tokom ovih ispitivanja.

Najzastupljeniji virus na vlasu bio je GarCLV detektovan u 60% ispitivanih uzoraka, dok je drugi detektovani virus LYSV bio prisutan u 20% ispitivanih uzoraka. OYDV, TSWV i IYSV nijesu detektovani na vlasu u tokom ovih ispitivanja.

Kao najzastupljeniji virus na aljmi bili su OYDV, LYSV, TSWV i IYSV detektovani u po 20% ispitivanih uzoraka. GarCLV nije detektovan na aljmi tokom ovih ispitivanja.

Najzastupljeniji virus na biser luku bio je LYSV detektovan u 88,9% ispitivanih uzoraka. Drugi po zastupljenosti bio je GarCLV detektovan u 22,2%, dok je treći virus po zastupljenosti bio OYDV detektovan u samo 1,1% ispitivanih uzoraka biser luka. TSWV i IYSV nijesu detektovani na biser luku tokom ovih ispitivanja.

Jedini virus čije je prisustvo dokazano na sremušu bio je OYDV detektovan u 50% ispitivanih uzoraka. Prisustvo LYSV, GarCLV, TSWV i IYSV nije detektovano u sakupljenim i analiziranim uzorcima sremuša.

**Tabela 28.** Procentualna zastupljenost virusa na različitim vrstama lukova tokom sedmogodišnjih ispitivanja

	<b>Godina</b>	<b>Virus</b>				
		OYDV	LYSV	GarCLV	IYSV	TSWV
<i>Allium cepa</i>	2010.	0	0	11,1	0	11,1
	2011.	0	0	20	0	40
	2012.	18,2	0	0	0	0
	2013.	28,6	0	21,4	0	0
	2014.	11,4	4,5	29,5	45	0
	2015.	20,8	22,6	20,8	6	3,8
	2016.	30	0	10	0	0
	<b>Ukupno</b>	<b>17,1</b>	<b>9,6</b>	<b>20,5</b>	<b>15,6</b>	<b>2,7</b>
<i>Allium sativum</i> var. <i>sativum</i>				<b>Virus</b>		
		<b>Godina</b>	OYDV	LYSV	GarCLV	TSWV
		2010.	80	0	60	20
		2011.	33,3	0	66,7	33
		2012.	100	0	100	0
		2013.	100	60	80	0
		2014.	53,2	7,8	33,8	0
		2015.	51,7	3,4	58,6	0
	2016.	50	0	25	0	

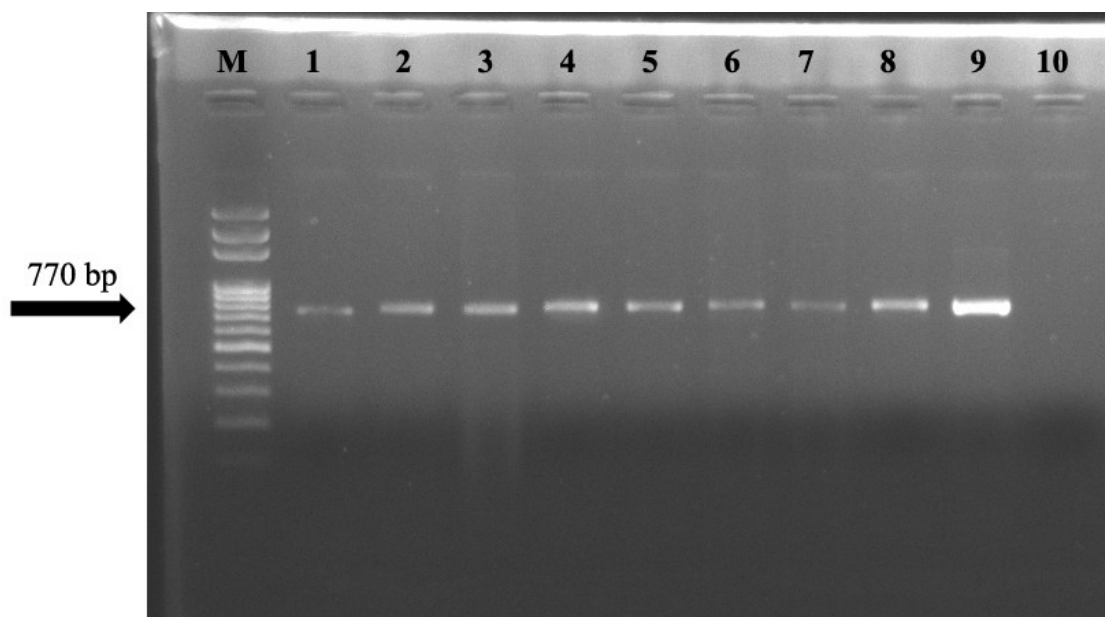
	<b>Ukupno</b>	<b>57,4</b>	<b>10,1</b>	<b>45</b>	<b>1,6</b>
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	LYSV	GarCLV		
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	2012.	33,3	0		
	2013.	42,9	0		
	2015.	17,9	2,9		
	2016.	31,1	10,7		
	<b>Ukupno</b>	<b>32,4</b>	<b>5,4</b>		
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	OYDV	LYSV	GarCLV	
<i>Allium ampeloprasum</i>	2015.	12,5	87,5	25	
	2016.	0	100	0	
	<b>Ukupno</b>	<b>11,1</b>	<b>88,9</b>	<b>22,2</b>	
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	LYSV	GarCLV		
<i>Allium schoenoprasum</i>	2016.	20	60		
	<b>Ukupno</b>	<b>20</b>	<b>60</b>		
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	OYDV	LYSV	IYSV	TSWV
<i>Allium fistulosum</i>	2015.	20	20	20	20
	<b>Ukupno</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	OYDV	LYSV	GarCLV	
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	2014.	33,3	66,7	66,7	
	2015.	100	0	0	
	<b>Ukupno</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	
		<b>Virus</b>			
	<b>Godina</b>	OYDV			
<i>Allium ursinum</i>	2016.	50			
	<b>Ukupno</b>	<b>50</b>			

### 5.3. Molekularna detekcija virusa lukova

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje odgovarajućih prajmera potvrđeni su rezultati dobijeni primjenom seroloških analiza o prisustvu OYDV, GarCLV, LYSV, IYSV i TSWV u različitim vrstama lukova u Srbiji, ali je utvrđeno i prisustvo SLV, kao i vrsta roda *Allexivirus* po prvi put u našoj zemlji.

### 5.3.1. Detekcija OYDV primjenom RT-PCR metode

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje 1-OYDV i 2-OYDV ili OYDV-DESIGN-F i OYDV-DESIGN-R prajmera, koji umnožavaju dio CP gena, potvrđeno je prisustvo OYDV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine kod svih ispitivanih izolata. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 25.

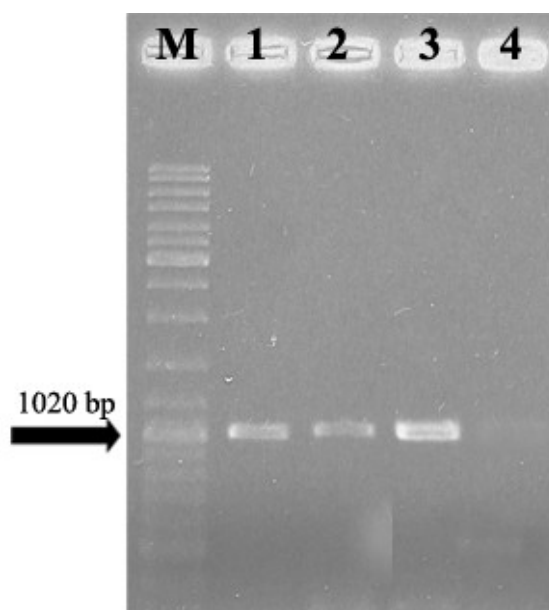


**Slika 25.** Detekcija odabranih izolata OYDV primjenom RT-PCR metode i OYDV-DESIGN-F/OYDV-DESIGN-R prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 115-10 iz bijelog luka, 2-izolat 184-13 iz crnog luka, 3-izolat 242-13 iz bijelog luka, 4-izolat 143-14 iz bijelog luka, 5-izolat 377-14 iz crnog luka, 6-izolat 572-14 iz ljutike, 7-izolat 108-15 iz bijelog luka, 8-izolat 365-15 iz aljme, 9-izolat 188-13 iz crnog luka, 10-negativna kontrola.

### 5.3.2. Detekcija LYSV primjenom RT-PCR metode

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje 1LYSV i 2LYSV prajmera, koji umnožavaju dio NIb i kompletan CP gen, potvrđeno je prisustvo LYSV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 1020 bp kod svih ispitivanih uzoraka (slika 26). Amplifikacija je

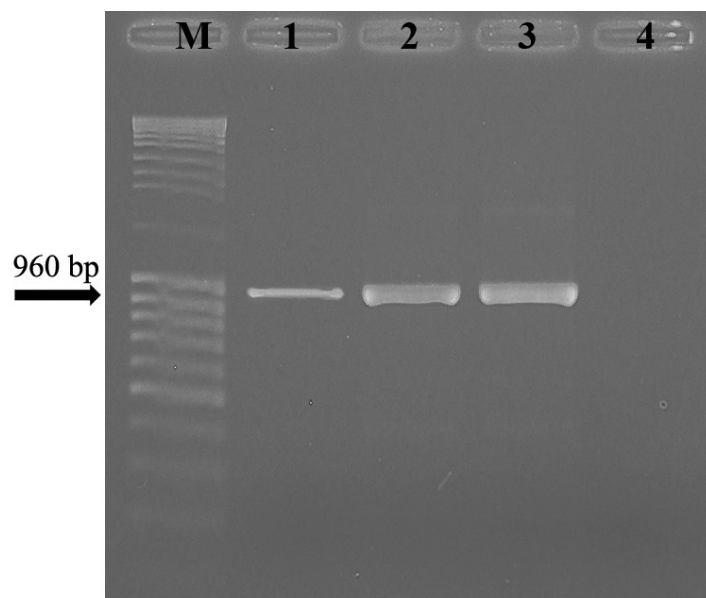
izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli.



**Slika 26.** Detekcija odabranih izolata LYSV primjenom RT-PCR metode i 1LYSV/2LYSV prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 277-13 iz praziluka, 2-izolat 298-12 iz praziluka, 3-izolat 181-13 iz bijelog luka, 4-negativna kontrola.

### 5.3.3. Detekcija GarCLV primjenom RT-PCR metode

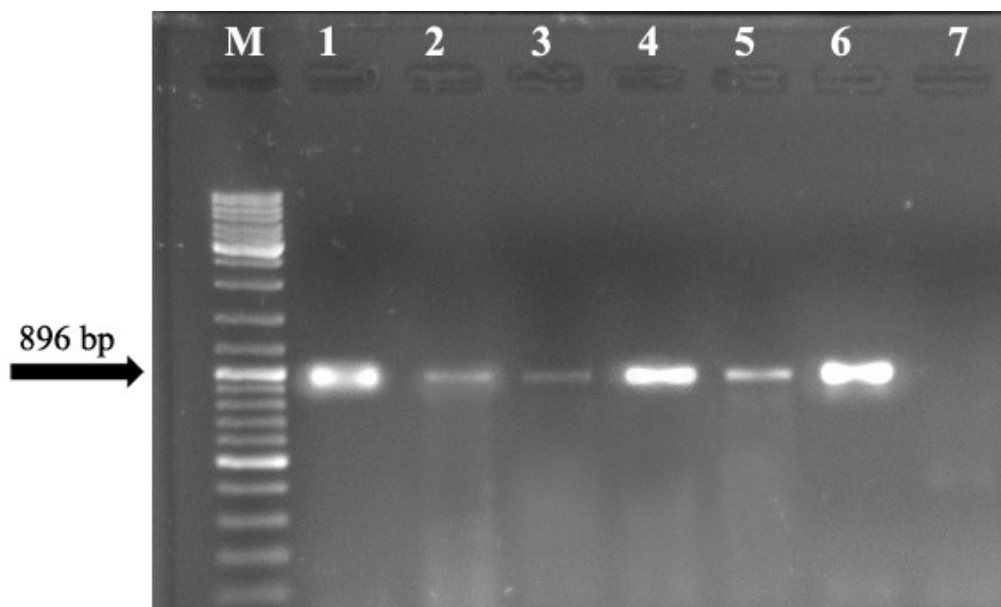
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje 1-GCLV i 2-GCLV prajmera, koji umnožavaju kompletan CP gen, potvrđeno je prisustvo GarCLV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 960 bp kod svih ispitivanih izolata. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 27.



**Slika 27.** Detekcija odabranih izolata GarCLV primjenom RT-PCR metode i 1-GCLV i 2-GCLV prajmera. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 171-10 iz crnog luka, 3-izolat 553-11 iz bijelog luka, 4- negativna kontrola.

#### 5.3.4. Detekcija IYSV primjenom RT-PCR metode

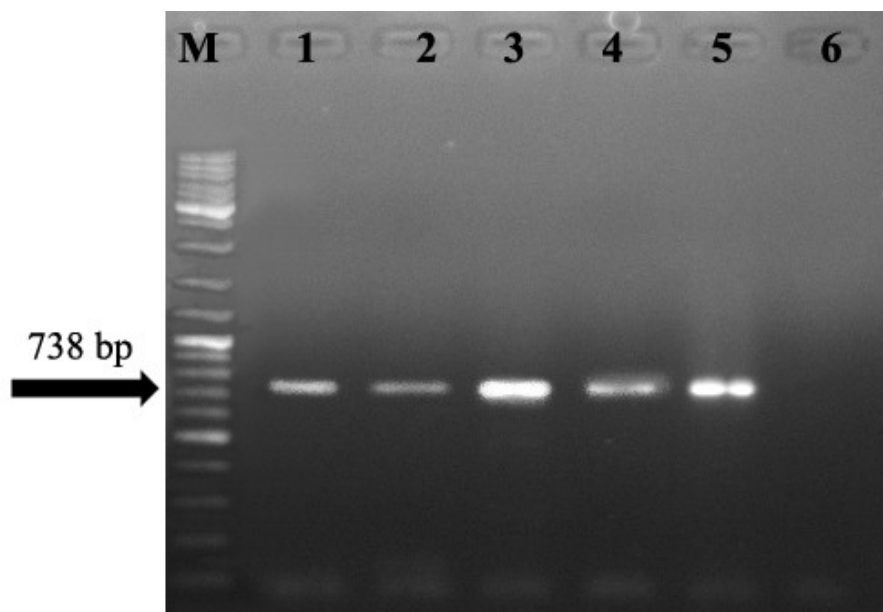
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje IYSV56U i IYSV917L prajmera, koji umnožavaju dio N gena, potvrđeno je prisustvo IYSV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 896 bp kod svih ispitivanih uzoraka, kao i kod pozitivne kontrole. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 28.



**Slika 28.** Detekcija odabranih izolata IYSV primjenom RT-PCR metode i IYSV56U/IYSV917L prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 127-14 iz crnog luka, 2-izolat 160-14 iz crnog luka, 3-izolat 171-14 iz crnog luka, 4-izolat 331-14 iz crnog luka, 5-izolat 365-15 iz aljme, 6-pozitivna kontrola izolat 605-07 iz crnog luka, 7-negativna kontrola.

### 5.3.5. Detekcija TSWV primjenom RT-PCR metode

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje TSWVCP-f i TSWVCP-r prajmera, koji umnožavaju dio N gena, potvrđeno je prisustvo TSWV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 738 bp kod svih ispitivanih uzoraka, kao i kod pozitivne kontrole (slika 29). Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli.

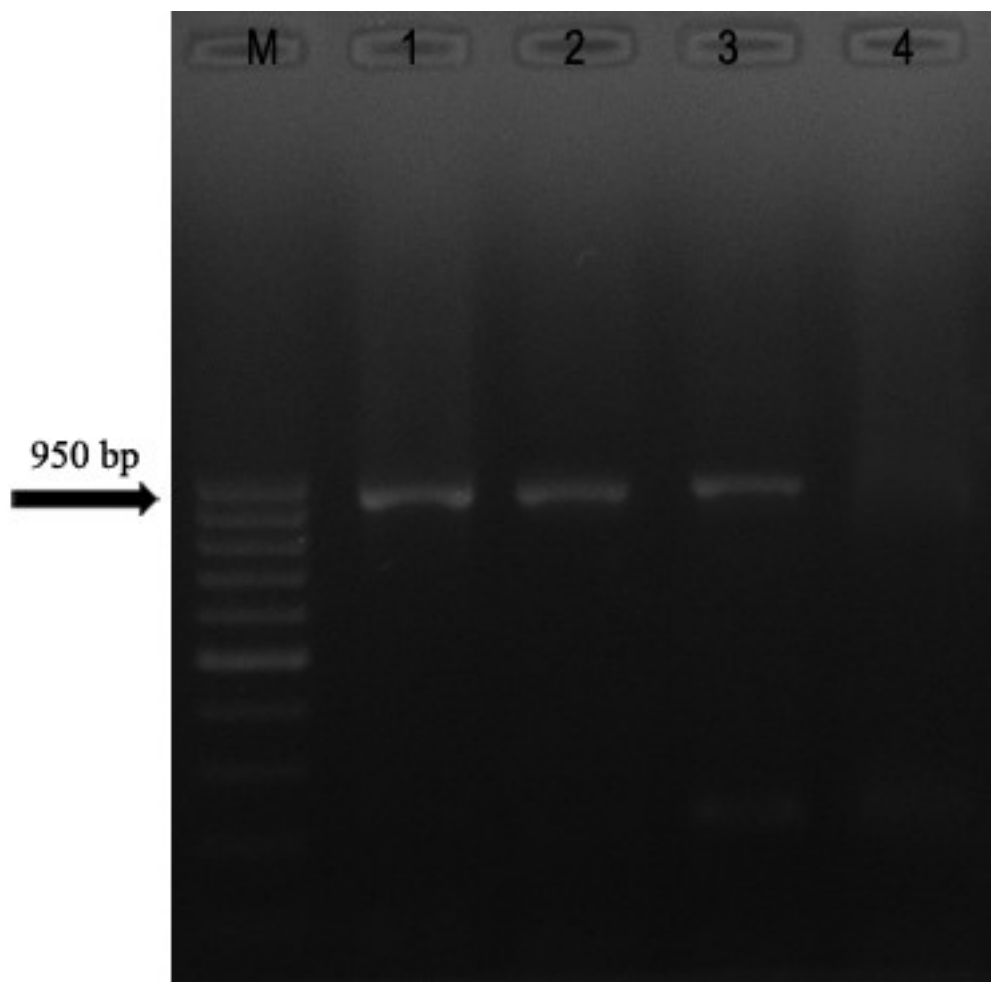


**Slika 29.** Detekcija odabranih izolata TSWV primjenom RT-PCR metode i TSWVCP-f/TSWVCP-r prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 114-10 iz crnog luka, 2-izolat 115-10 iz bijelog luka, 3-izolat 354-11 iz bijelog luka, 4-izolat 560-11 iz crnog luka, 5- pozitivna kontrola, izolat 33-06 iz duvana, 6-negativna kontrola.

### 5.3.6. Detekcija SLV primjenom RT-PCR metode

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje SLV-F-design i SLV-R-design prajmera, koji umnožavaju dio CP gena, potvrđeno je prisustvo SLV u različitim vrstama lukova. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 950 bp kod svih ispitivanih uzoraka (slika 30). Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli.

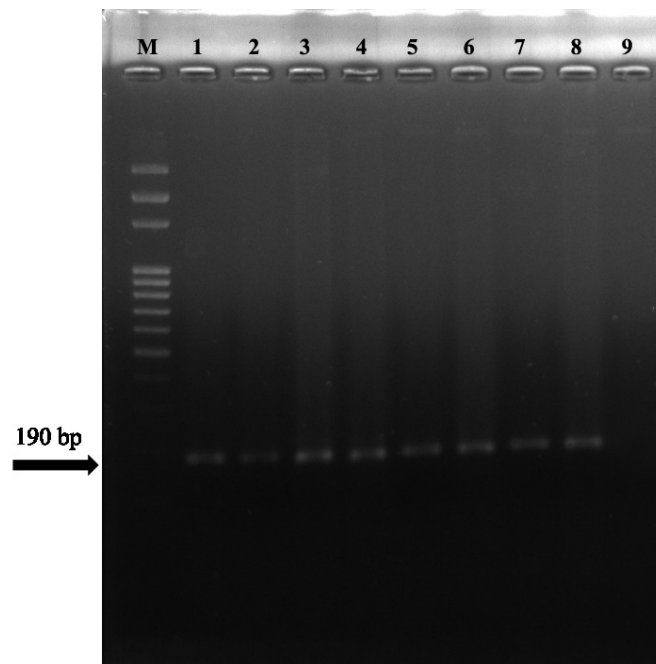




**Slika 30.** Detekcija odabranih izolata SLV primjenom RT-PCR metode i SLV-F-design /SLV-R-design prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 553-11 iz bijelog luka, 2-izolat 498-14 iz bijelog luka, 3-izolat 365-15 iz aljme, 4-negativna kontrola.

#### **5.4. Molekularno dokazivanje izolata vrsta roda *Allexivirus***

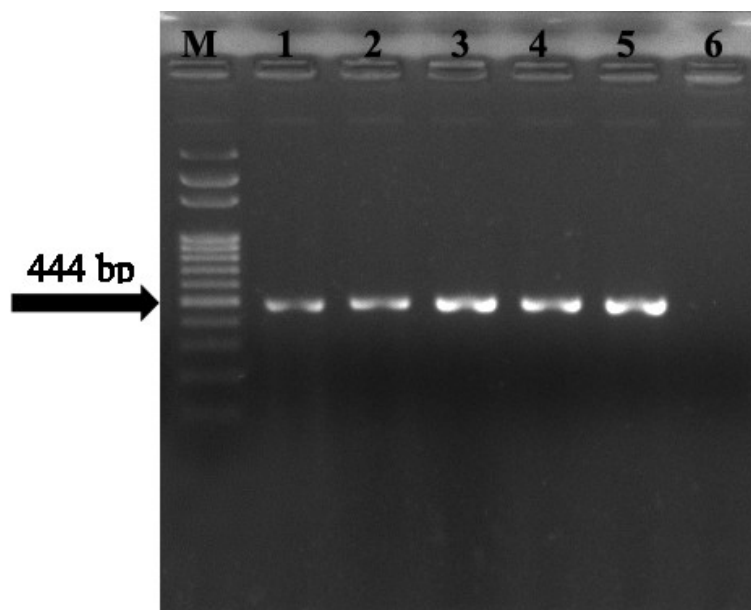
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje ALLEX 1 i ALLEX 2 prajmera, koji umnožavaju dio NABP i 3' UTR, potvrđeno je prisustvo *Allexivirus*-a u 85,9% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 183 do 192 bp kod uzoraka bijelog luka iz Srbije. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 31.



**Slika 31.** Detekcija odabranih izolata virusa *Alexivirus* roda primjenom RT-PCR metode i ALLEX 1/ALLEX 2 prajmera. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 553-11 iz bijelog luka, 3-izolat 189-13 iz bijelog luka, 4-izolat 501-14 iz bijelog luka, 5-izolat 511-14 iz bijelog luka, 6- izolat 545-14 iz bijelog luka, 7-izolat 73-15 iz bijelog luka, 8-izolat 107-16 iz bijelog luka, 9-negativna kontrola.

#### 5.4.1. Detekcija GarV-A primjenom RT-PCR metode

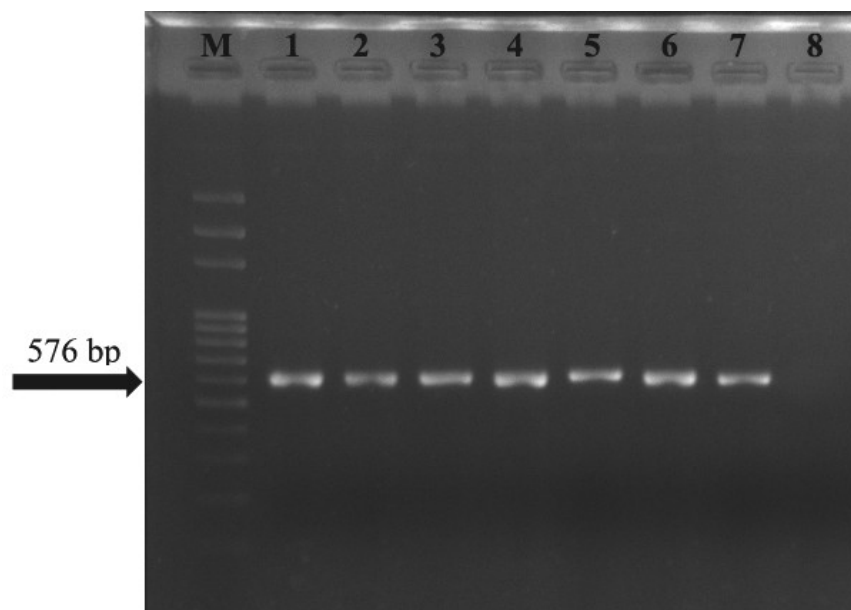
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje ACPF i ACPR prajmera, koji umnožavaju dio gena za CP i NABP, potvrđeno je prisustvo GarV-A u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 444 bp kod 20% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 32.



**Slika 32.** Detekcija odabranih izolata GarV-A primjenom RT-PCR metode i ACPF/ACPR prajmera. Kolone: M-MassRuler<sup>TM</sup>DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 554-14 iz bijelog luka, 2-izolat 460-16 iz bijelog luka, 3-izolat 465-15 iz bijelog luka, 4-izolat 517-15 iz bijelog luka, 5-izolat 518-15 iz bijelog luka, 6-negativna kontrola.

#### 5.4.2. Detekcija GarV-B primjenom RT-PCR metode

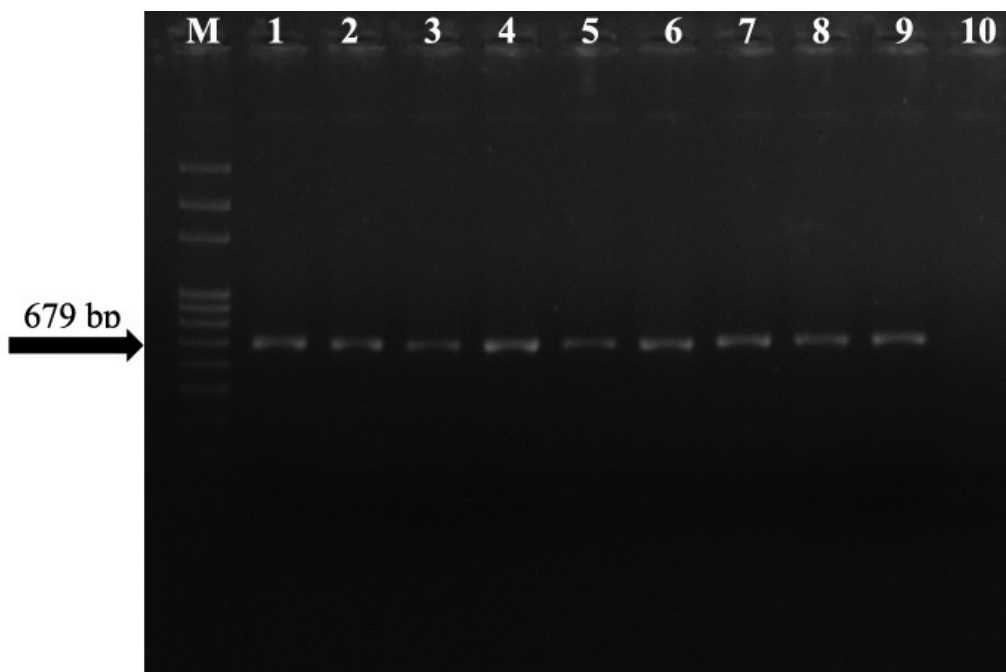
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje BCPF i BCPR prajmera, koji umnožavaju dio gena za CP i NABP, potvrđeno je prisustvo GarV-B u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 576 bp kod 80% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 33.



**Slika 33.** Detekcija odabranih izolata GarV-B primjenom RT-PCR metode i BCPF/BCPR prajmera. Kolone: M-MassRuler<sup>TM</sup>DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 500-14 iz bijelog luka, 3-izolat 518-14 iz bijelog luka, 4-izolat 534-14 iz bijelog luka, 5-izolat 108-16 iz bijelog luka, 6- izolat 460-15 iz bijelog luka, 7-izolat 127-16 iz bijelog luka, 8-negativna kontrola.

#### 5.4.3. Detekcija GarV-C primjenom RT-PCR metode

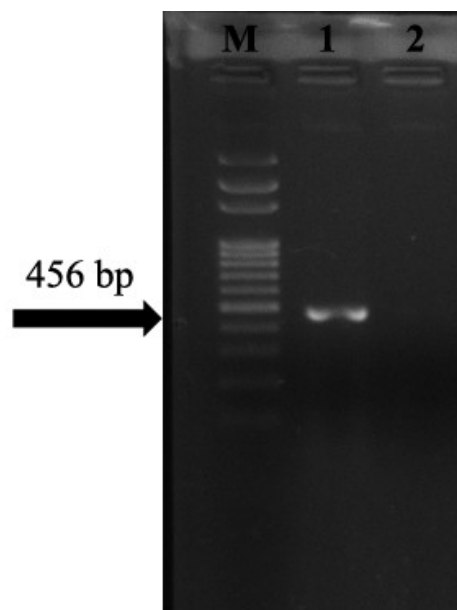
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje CCPF i CCPR prajmera, koji umnožavaju dio gena za CP i NABP, potvrđeno je prisustvo GarV-C u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 679 bp kod 57,1% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 34.



**Slika 34.** Detekcija odabranih izolata GarV-C primjenom RT-PCR metode i CCPF/CCPR prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 500-14 iz bijelog luka, 3-izolat 518-14 iz bijelog luka, 4-izolat 534-14 iz bijelog luka, 5-izolat 554-14 iz bijelog luka, 6- izolat 558-14 iz bijelog luka, 7-izolat 96-15 iz bijelog luka, 8-izolat 458-15 iz bijelog luka, 9- izolat 460-15 iz bijelog luka, 10-negativna kontrola.

#### 5.4.4. Detekcija GarV-D primjenom RT-PCR metode

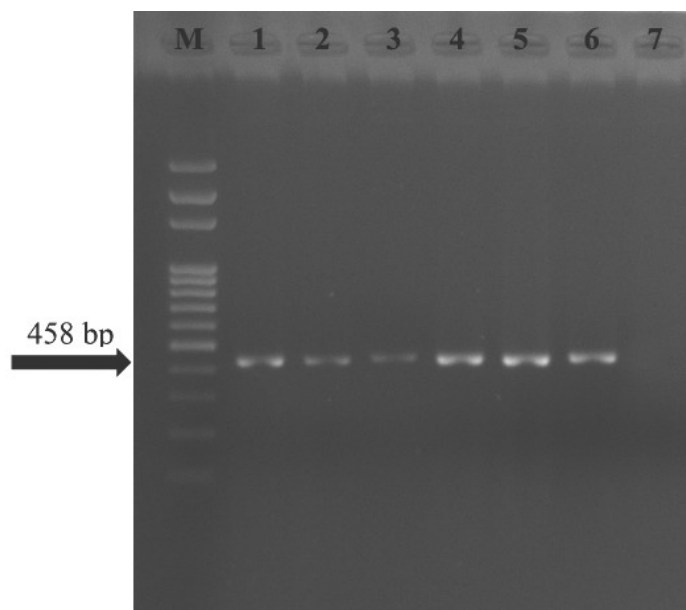
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje DCPF i DCPR prajmera, koji umnožavaju dio gena za CP i NABP, potvrđeno je prisustvo GarV-D u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 456 bp kod 5,7% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 35.



**Slika 35.** Detekcija odabranih izolata GarV-D primjenom RT-PCR metode i DCPF/DCPR prajmera. Kolone: M-MassRuler<sup>TM</sup>DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 96-15 iz bijelog luka, 2-negativna kontrola

#### 5.4.5. Detekcija GarV-E primjenom RT-PCR metode

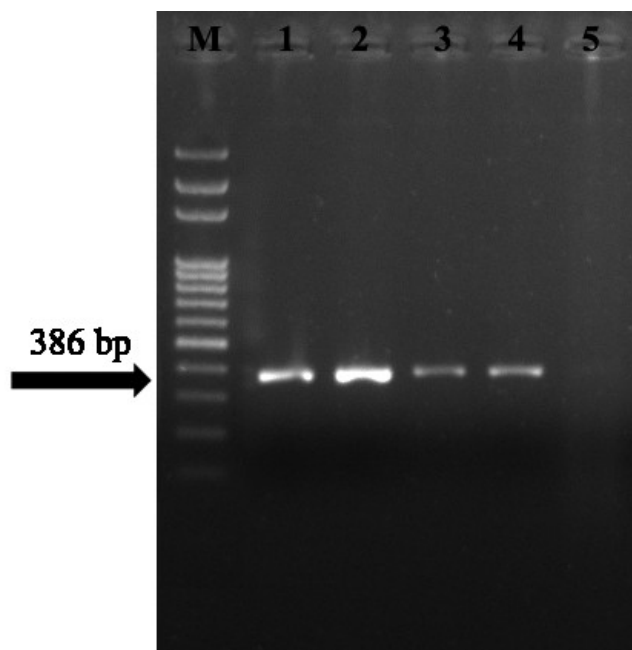
Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje EF2 i ER2 prajmera, koji umnožavaju dio gena za replikazu, potvrđeno je prisustvo GarV-E u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 386 bp kod 17,1% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 36.



**Slika 36.** Detekcija odabranih izolata GarV-E primjenom RT-PCR metode i EF2/ER2 prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 518-14 iz bijelog luka, 3-izolat 554-14 iz bijelog luka, 4-izolat 99-15 iz bijelog luka, 5-izolat 467-15 iz bijelog luka, 6-izolat 468-15 iz bijelog luka, 7-negativna kontrola

#### 5.4.6. Detekcija GarV-X primjenom RT-PCR metode

Primjenom RT-PCR metode uz korišćenje XF i XR prajmera, koji umnožavaju dio gena za replikazu, potvrđeno je prisustvo GarV-X u bijelom luku u Srbiji. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo fragmenta očekivane veličine od 456 bp kod 48,6% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća bijelog luka, odnosno u negativnoj kontroli. Dio dobijenih rezultata je prikazan na slici 37.

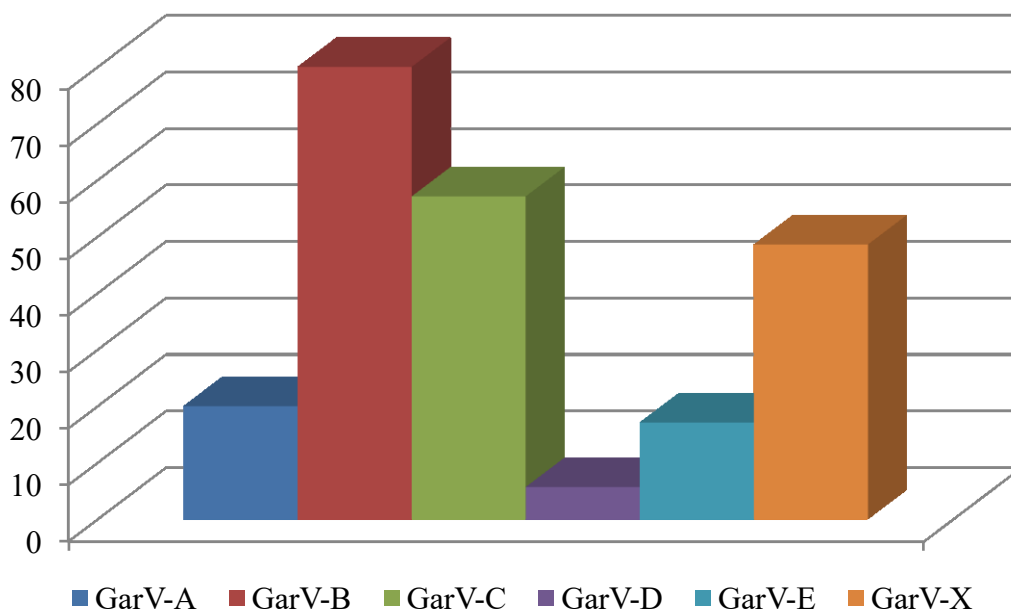


**Slika 37.** Detekcija odabranih izolata GarV-X primjenom RT-PCR metode i XF/XR prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 89-10 iz bijelog luka, 2-izolat 500-14 iz bijelog luka, 3-izolat 506-14 iz bijelog luka, 4-izolat 554-14 iz bijelog luka, 5-negativna kontrola.

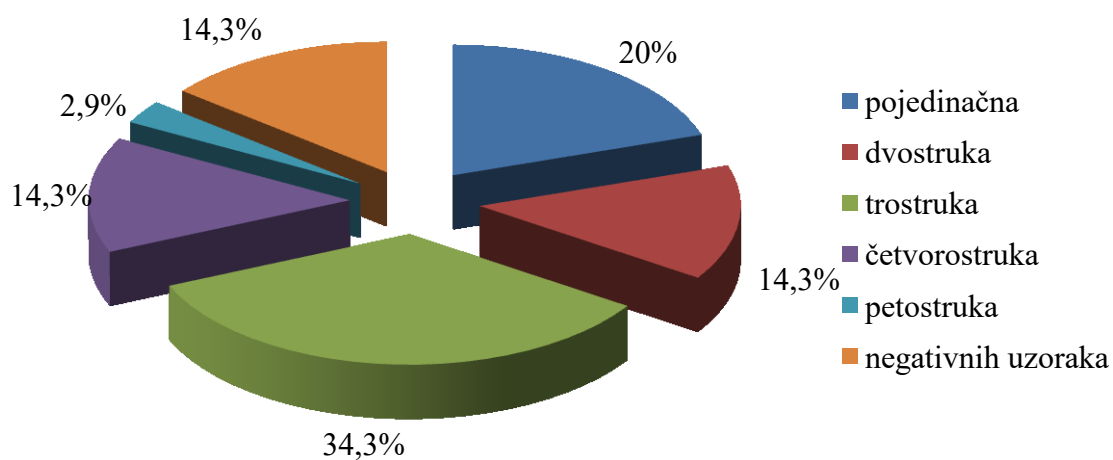
### 5.5. Učestalost virusa roda *Allexivirus*

Nakon primjene RT-PCR metode sa opštim prajmerima ALLEX1/ALLEX2, utvrđeno je da je 85,9% ispitanih uzoraka bijelog luka bilo zaraženo nekom vrstom virusa roda *Allexivirus*. Daljom analizom, primjenom specifičnih prajmera za vrste roda *Allexivirus* i RT-PCR metode utvrđeno je da je GarV-B najzastupljeniji virus roda *Allexivirus* na bijelom luku u Srbiji. Prisustvo GarV-B detektovano je u 80% testiranih uzoraka bijelog luka. Drugi po zastupljenosti je bio GarV-C, detektovan u 57,1% sakupljenih uzoraka bijelog luka. Treći po zastupljenosti je bio GarV-X detektovan u 48,6%, a zatim su slijedili GarV-A detektovan u 20%, GarV-E detektovan u 17,1% i GarV-D detektovan u 5,7% ispitivanih uzoraka (grafikon 9). Virus roda *Allexivirus* su se javili u pojedinačnim i u miješanim infekcijama. Prisustvo miješanih infekcija detektovano je u 65,8% testiranih uzoraka bijelog luka. Najučestalije su bile infekcije sa tri virusa detektovane u 34,3%, zatim infekcije sa dva, odnosno četiri virusa detektovanih u po 14,3% i na kraju infekcije sa pet virusa detektovane u 2,9% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Pojedinačne infekcije su utvrđene u 20% ispitivanih uzoraka bijelog luka (grafikon 10).





**Grafikon 9.** Procentualna zastupljenost vrsta virusa u ispitivanim uzorcima bijelog luka

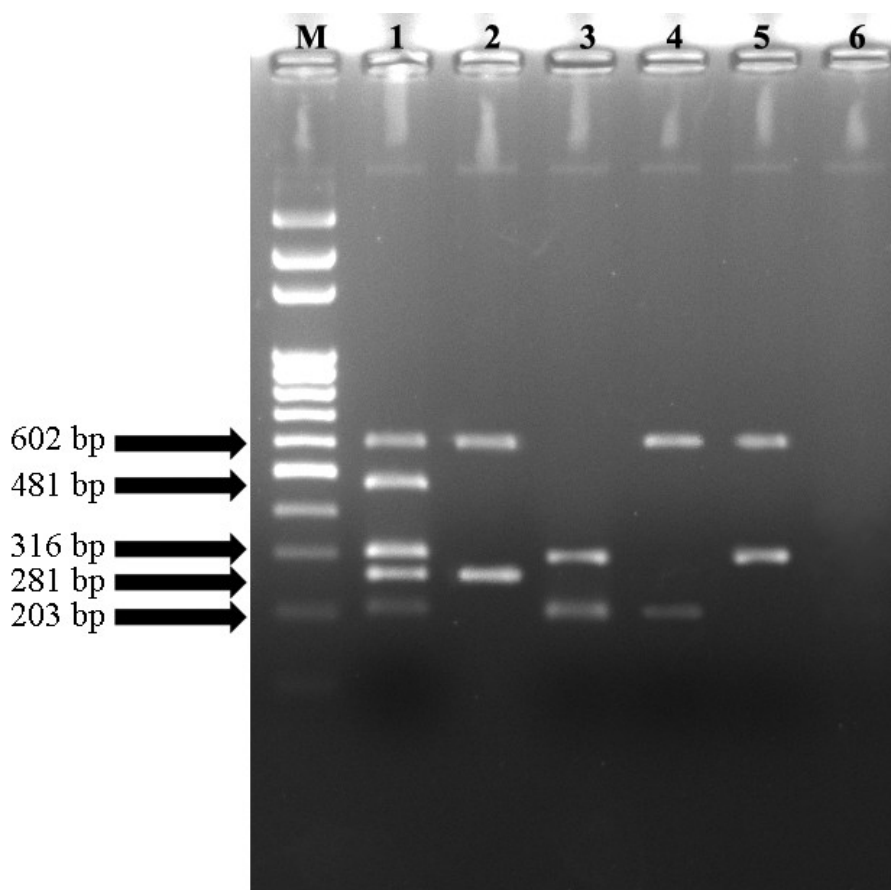


**Grafikon 10.** Zastupljenost pojedinačnih i miješanih infekcija virusa roda *Alexivirus*

### 5.6. Simultana detekcija najznačajnijih virusa lukova

U cilju iznalaženja brze i pouzdane metode za simultanu detekciju najrasprostranjenijih i najčešće zastupljenih virusa lukova u našoj zemlji OYDV, GarCLV, LYSV, SLV i virusa roda *Alexivirus*, primjenjena je multiplex RT-PCR

metoda uz korišćenje smješe prajmera koji omogućavaju detekciju ovih virusa. Upoređivanjem fragmenata, koji su amplifikovani RT-PCR metodom i odabranim prajmerima, sa markerom, uspješno je detektovano prisustvo jednog ili više fragmenata očekivanih veličina od 602, 481, 316, 203, odnosno 281 bp kod svih ispitivanih uzoraka (slika 38). Amplifikacija je izostala kod ekstrakta RNK pripremljenog od nezaraženog lišća luka, odnosno u negativnoj kontroli.



**Slika 38.** Detekcija odabranih izolata primjenom multiplex RT-PCR metode i OYD-N25/OYD-C06, GCL-N30/GCL-C40, LYS-N10/LYS-C15, SL-N30/SL-C10 i AL-N30/AL-C30 prajmera. Kolone: M-MassRuler<sup>TM</sup> DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 553-11 iz bijelog luka, 2-izolat 115-10 iz bijelog luka, 3-izolat 498-14 iz bijelog luka, 4-izolat 365-15 iz aljme, 5-izolat 181-13 iz bijelog luka, 6-negativna kontrola.

### 5.7. Molekularna identifikacija i filogenetske analize virusa lukova prisutnih u Srbiji

Sekvenciranjem i obradom sekvenci, dobijene su kosenzus sekvence izolata najrasprostranjenijih virusa lukova OYDV, GarCLV, LYSV, kao i za četiri virusa roda

*Allexivirus* i SLV čije je prisustvo prvi put dokazano u našoj zemlji. Dobijene sekvence su najprije identifikovane primjenom BLAST analize, a kasnije i okarakterisane višestrukim uparivanjem sa sekvencama koje su pokazivale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi i proračunom genetičke sličnosti korišćenjem MEGA X softvera. Sve sekvence koje su dobijene tokom ovih istraživanja prijavljene su u GenBank bazu podataka gdje im je dodijeljen pristupni broj (tabela 29). Molekularna karakterizacija virusa lukova OYDV, GarCLV, LYSV, kao i virusa roda *Allexivirus* obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala i proučavanjem evolutivne povezanosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama odgovarajućeg virusa preuzetih iz GenBank baze podataka.

**Tabela 29.** Izolati najznačajnijih virusa lukova u Srbiji sekvencirani tokom ovih istraživanja

<b>Virus</b>	<b>Izolat</b>	<b>Godina sakupljanja</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>GenBank Acc. No.</b>
OYDV	115-10	2010.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825508
OYDV	116-10	2010.		MK825527
OYDV	171-10	2010.		MK825509
OYDV	181-13	2013.		MK825511
OYDV	183-13	2013.		MK825525
OYDV	184-13	2013.	<i>A. cepa</i>	MK825512
OYDV	185-13	2013.		MK825513
OYDV	188-13	2013.		MK825514
OYDV	473-13	2013.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825530
OYDV	142-14	2014.	<i>A. cepa</i>	MK825515
OYDV	143-14	2014.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825529
OYDV	555-14	2014.		MK825516
OYDV	571-14	2014.		MK825517
OYDV	572-14	2014.	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	KR025485
OYDV	108-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825531
OYDV	110-15	2015.	<i>A. cepa</i>	MK825518
OYDV	111-15	2015.		MK825519
OYDV	114-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825510
OYDV	128-15	2015.	<i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	MK825520
OYDV	365-15	2015.	<i>A. fistulosum</i>	MK825521
OYDV	457-15	2015.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825528
OYDV	475-15	2015.	<i>A. cepa</i>	MK825522
OYDV	476-15	2015.		MK825523
OYDV	481-15	2015.		MK825524
OYDV	108-16	2016.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK825526

GarCLV	298-12	2012.	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	MK814829
GarCLV	553-11	2011.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	KP208802
GarCLV	175-13	2013.	<i>A. cepa</i>	MK814830
GarCLV	544-14	2014.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK814828
LYSV	181-13	2013.		MG242625
LYSV	298-13	2013.	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	MG242624
LYSV	277-13	2013.		KR075504
SLV	553-11	2011.	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i>	MK930363
SLV	498-14	2014.		MK930364
GarV-A	554-14	2014.		MK814831
GarV-A	460-15	2015.		MK814832
GarV-A	465-15	2015.		MK814833
GarV-A	517-15	2015.		MK814834
GarV-A	518-15	2015.		MK814835
GarV-A	519-15	2015.		MK814836
GarV-B	89-10	2010.		MK814837
GarV-B	518-14	2014.		MK814838
GarV-B	554-14	2014.		MK814839
GarV-B	460-15	2015.		MK814840
GarV-B	108-16	2016.		MK814841
GarV-B	127-16	2016.		MK814842
GarV-C	89-10	2010.		MK814843
GarV-C	500-14	2014.		MK814844
GarV-C	518-14	2014.		MK814845
GarV-C	534-14	2014.		MK814846
GarV-C	554-14	2014.		MK814847
GarV-C	558-14	2014.		MK814848
GarV-C	96-15	2015.		MK814849
GarV-C	458-15	2015.		MK814850
GarV-C	460-15	2015.		MK814851
GarV-D	96-15	2015.		MK814852
GarV-D	99-15	2015.		MK814853

### 5.7.1. Molekularna identifikacija i filogenetske analize OYDV

Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dijela CP gena, dobijenih prajmerima 1-OYDV/2-OYDV ili OYDV-DESIGN-F/OYDV-DESIGN-R dužine 576 bp, pokazalo je da odabrani izolati OYDV porijeklom iz Srbije dijele 80,2-100% nt sličnosti, odnosno da se ne razlikuju ili se razlikuju u maksimalno 114 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 88,5% do 100%, odnosno odabrani izolati razlikovali su se u maksimalno 23 aminokisjeline.

BLAST analiza pokazala je 86,85-92,71% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama OYDV iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 576 bp. Sekvenca izolata 457-15 pokazala je najviši stepen nt sličnosti 99,8% (100% aa sličnosti) sa izolatom GQ475393 porijeklom iz *A. sativum* iz Italije. Sekvence izolata 184-13 i 185-13 pokazale su najviši stepen nt sličnosti 99,5% (100% aa sličnosti) sa izolatima KF623530, 35 i 36 porijeklom iz *A. cepa* iz Italije. Izolati 571-14, 572-14, 110-15, 111-15, 365-15, 475-15, 476-15 i 481-15 najveću nt i aa sličnost dijele sa izolatom JX433020 iz Njemačke porijeklom iz *A. cepa* i to: izolat 572-14 98,4% nt (100% aa), izolat 571-14 98,3% nt (100% aa), izolati 111-15 i 365-15 97,2% nt (100% aa), izolat 110-15 96,5% nt (98,4% aa), dok izolati 475-15, 476-15 i 481-15 najveću sličnost od 96,9% nt (99,5% aa) pored ovog izolata dijele i sa dva izolata porijeklom iz Italije (KF623538 i 39). Najviši stepen nt sličnosti 99,5% (96,4% aa) sekvence izolata 183-13 i 188-13 pokazale su sa izolatom KF623541 porijeklom iz *A. cepa* iz Sudana, dok je sekvenca izolata 128-15 sa istim izolatom pokazala 95,3% nt (95,8% aa). Najviši stepen nt sličnosti 93,1% (97,9% aa sličnosti) sekvenca izolata 116-10, odnosno 92,7% (97,4% aa) sekvenca izolata 115-10 i 92,2% (97,4% aa sličnosti) sekvenca izolata 108-16 pokazale su sa izolatom iz *A. sativum* cv. Berber porijeklom iz Sudana (KC207713). Najviši stepen nt sličnosti 91,7% (95,3% aa) sekvenca izolata 143-14, odnosno 90,3% (95,3% aa sličnosti) sekvenca izolata 555-14 i 89,8% (94,8% aa sličnosti) sekvenca izolata 108-15 pokazale su sa izolatom KF862691 iz *A. sativum* porijeklom iz Poljske. Sekvenca izolata 181-13 pokazala je najviši stepen nt sličnosti 92,7% (97,9% aa sličnosti) sa izolatom GQ475369 porijeklom iz *A. sativum* iz SAD, dok izolat 142-14 najveću nt sličnost 92,2% (96,9% aa sličnosti) dijeli sa izolatima porijeklom iz *A. sativum* iz Italije (HQ873782 i 86). Izolat 473-15 najveću nt sličnost 92% (99% aa sličnosti) dijeli sa dva izolata iz *A. sativum* porijeklom iz Argentine (GQ475376 i 77), dok je izolat 171-10 najveću nt sličnost 91% (96,4% aa sličnosti) pokazao sa jednim izolatom iz *A. sativum* porijeklom iz Italije (GQ475397). Najviši stepen nt i aa sličnosti izolat 114-15 od 89,4% nt (92,7% aa), dijeli sa izolatom porijeklom iz *Chenopodium quinoa* iz Argentine (GQ475382).

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP gena dužine 576 bp 25 izolata OYDV porijeklom iz lukova iz Srbije i 70 OYDV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem neighbour-joining metode sa Tamura 3-parameter i Gamma distribucijom (T92+G) i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja integrisane unutar MEGA X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 39, došlo je do grupisanja izolata u dvije grupe: A i B. Grupa A sa unutargrupnom sličnosti ( $0,1512 \pm 0,0119$ ), gdje su se grupisali uglavnom izolati sa bijelog luka može se podijeliti na šest podgrupa sa unutargrupnom sličnosti: podgrupa I ( $0,0773 \pm 0,0077$ ), podgrupa II ( $0,1120 \pm 0,0119$ ), podgrupa III ( $0,0000 \pm 0,0000$ ), podgrupa IV ( $0,1209 \pm 0,0181$ ), podgrupa V ( $0,1621 \pm 0,0143$ ) i podgrupa VIII ( $0,0312 \pm 0,0062$ ). Grupa B sa unutargrupnom sličnosti ( $0,1013 \pm 0,0095$ ), gdje su se grupisali uglavnom izolati sa crnog luka može se podijeliti na dvije podgrupe sa unutargrupnom sličnosti: podgrupa VI ( $0,1667 \pm 0,0223$ ) i podgrupa VII ( $0,0911 \pm 0,0092$ ). Međugrupna varijabilnost između dvije grupe je bila  $0,2364 \pm 0,0214$ , dok se varijabilnost među podgrupama kretala od  $0,1388 \pm 0,0189$  do  $0,2654 \pm 0,0266$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,1847 \pm 0,0148$ . Izolati OYDV porijeklom iz lukova iz Srbije svrstali su se u obje grupe, a u okviru četiri podgrupe. U podgrupi I svrstalo se sedam izolata OYDV iz Srbije sa izolatima porijeklom iz Italije, Poljske, Japana i Argentine, dok podgrupu VIII čine izolati OYDV samo iz Srbije. U podgrupi VI svrstao se jedan izolat OYDV iz Srbije sa izolatima porijeklom iz Izraela, a u podgrupi VII se svrstalo 14 izolata OYDV iz Srbije sa izolatima porijeklom iz Argentine, Italije, Njemačke, Holandije i Italije.



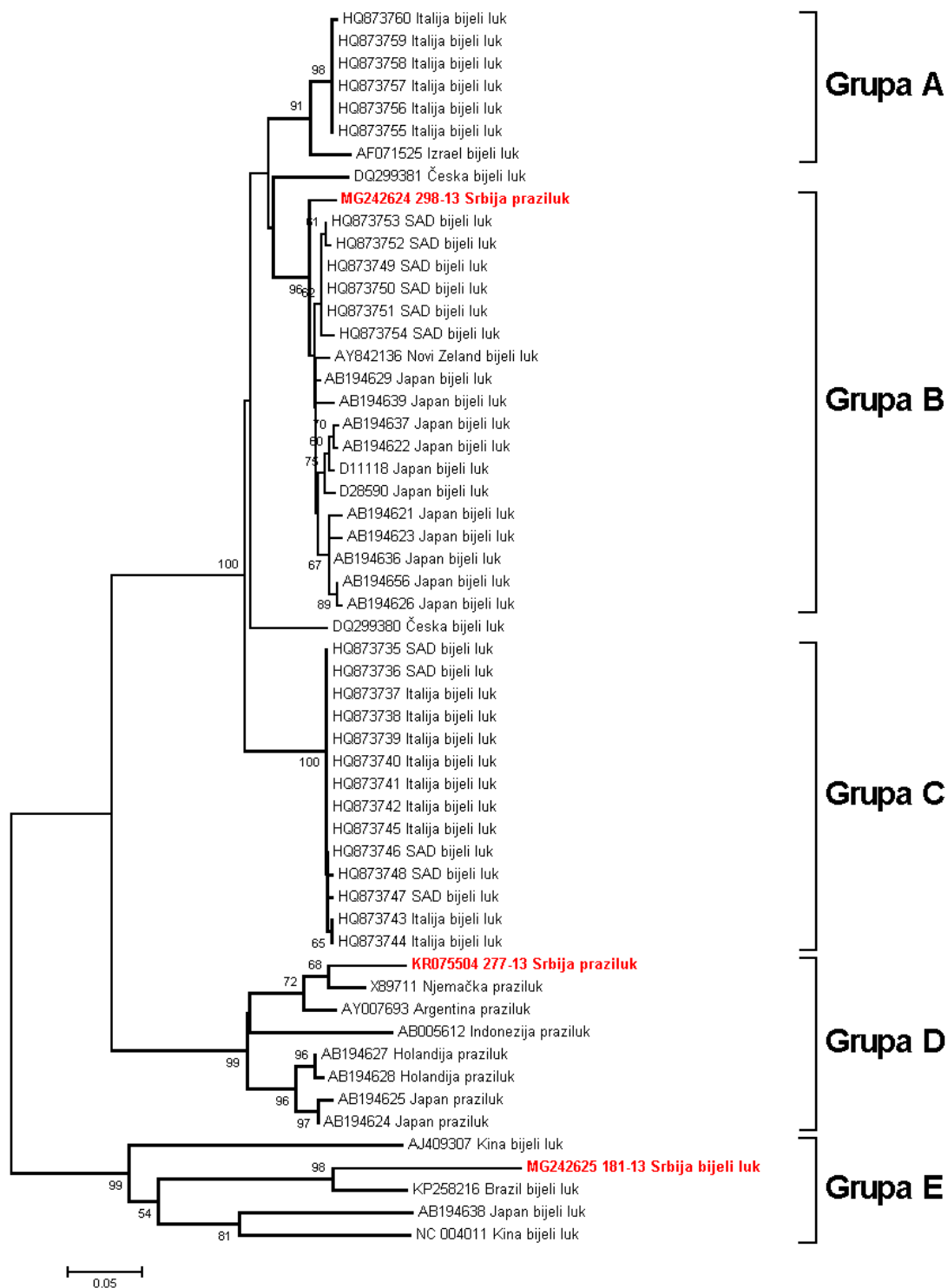
### 5.7.2. Molekularna identifikacija i filogenetske analize LYSV

Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci dijela NIB i kompletnog CP gena, dobijenih prajmerima 1LYSV/2LYSV dužine 914 bp, utvrđeno je da odabrani izolati LYSV porijeklom iz Srbije dijele 78,9-84,1% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 145-193 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 80,9% do 86,8%, odnosno odabrani izolati su se razlikovali u maksimalno 58 aminokisjelina.

BLAST analiza pokazala je 89,92-90,09% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama LYSV iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 914 bp. Najviši stepen nt sličnosti 97,9% (98,3% aa) sekvenca izolata 298-13 pokazala je sa izolatom AB194622 porijeklom iz *A. sativum* iz Japana, sekvenca izolata 277-13 najviši stepen nt sličnosti 95,1% (94,7% aa) pokazala je sa izolatom X89711 iz *A. ampeloprasum* var. *porrum*, dok je sekvenca izolata 181-13 najviši stepen nt sličnosti 89,9% (95% aa) pokazala sa izolatom KP258216 porijeklom iz *A. sativum* iz Brazila.

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela NIB i CP gena dužine 349 bp tri izolata LYSV porijeklom iz lukova iz Srbije i 52 LYSV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem neighbour-joining metode sa Kimura-2 parameter i Gamma distribucijom (K2P+G) i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja integrisane unutar MEGA X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 40 razdvojilo se pet grupa sa unutargrupnom sličnosti: grupa A ( $0,0125 \pm 0,0035$ ), grupa B ( $0,0199 \pm 0,0041$ ), grupa C ( $0,0016 \pm 0,0009$ ), grupa D ( $0,1038 \pm 0,014$ ), grupa E ( $0,3430 \pm 0,0370$ ) i dva izolata koja se nijesu grupisala. Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,0878 \pm 0,0181$  do  $0,5143 \pm 0,0640$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,203 \pm 0,021$ . Izolati LYSV porijeklom iz lukova iz Srbije svrstali su se u okviru grupe B sa izolatima porijeklom iz SAD, Japana i Novog Zelanda, grupe D sa izolatima porijeklom iz Japana, Holandije, Njemačke i Argentine i grupe E sa izolatima porijeklom iz Kine, Japana i Brazila.





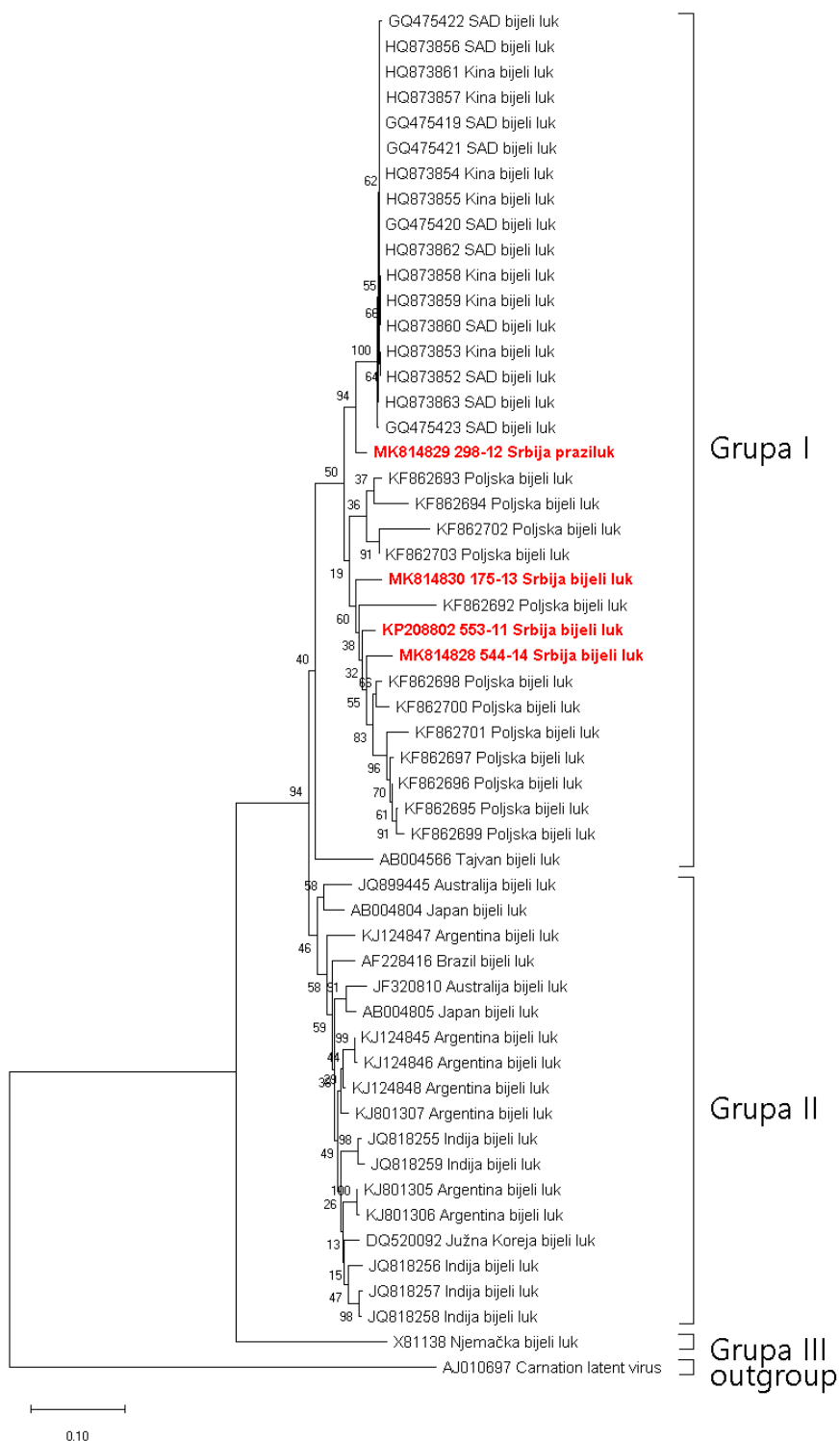
**Slika 40.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci N1b i CP gena 55 izolata *Leek yellow stripe virus* korišćenjem neighbour-joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati LYSV iz Srbije iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

### 5.7.3. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarCLV

Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci CP gena, dobijenih prajmerima 1-GCLV/2-GCLV dužine 620 bp, pokazalo je da odabrani izolati GarCLV porijeklom iz Srbije dijele 87,8-96,1% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 24-75 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 85,1% do 98%, odnosno odabrani izolati su se razlikovali u maksimalno 30 aminokisjelina.

BLAST analiza je pokazala 83,58-97,96% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama GarCLV iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom istraživanju sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 620 bp. Izolati 553-11 i 175-13 najveću nt sličnost 98,4% i 90,6% (99,5% i 86,6% aa sličnosti) dijele sa izolatom porijeklom iz Južne Koreje (AF538951). Izolat 298-12 najveću nt sličnost 96,6% (99% aa) dijeli sa izolatom porijeklom iz *Allium sativum* iz USA (HQ873852), dok najviši stepen nukleotidne sličnosti 96,1% (95,5% aa) izolat 544-14 dijeli sa izolatom porijeklom iz *A. sativum* iz Poljske (KF862698).

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP gena dužine 617 bp četiri izolata GarCLV porijeklom iz lukova iz Srbije i 50 GarCLV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem maximum-likelihood metode sa Tamura 3-parameter i Gamma distribucijom (T92+G) i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja integrisane unutar MEGA X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 41 došlo je do grupisanja izolata u tri grupe sa unutargrupnom sličnosti: grupa I ( $0,0607 \pm 0,0053$ ), grupa II ( $0,0459 \pm 0,0042$ ) i grupa III u koju se svrstao samo jedan izolat porijeklom iz Njemačke. Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,1128 \pm 0,0099$  do  $0,2161 \pm 0,0158$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,0991 \pm 0,00066$ . Izolati GarCLV porijeklom iz lukova iz Srbije svrstali su se u okviru I grupe sa izolatima porijeklom iz Kine, SAD, Tajvana i Poljske.



**Slika 41.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci CP gena 54 izolata *Garlic common latent virus* korišćenjem maximum-likelihood metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca *Carnation latent virus* je korišćena kao „outgroup“. Izolati GarCLV iz Srbije iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

#### **5.7.4. Molekularna identifikacija SLV**

Međusobnim poređenjem sekvenci CP gena odabranih izolata SLV, amplifikovanih korišćenjem dizajniranih prajmerima SLV-F-design i SLV-R-design dužine 950 bp, pokazalo je da izolati SLV porijeklom iz Srbije dijele 79,6% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 174 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata bila je 93,8%, odnosno odabrani izolati su se razlikovali u 17 aminokisjelina.

BLAST analiza je pokazala 77,91-85,31% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama SLV iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom istraživanju sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 851 bp. Izolati 553-11 najveću nt sličnost 83,1% (97,5% aa) dijele sa izolatom porijeklom iz *A. sativum* iz Poljske (KF862706), dok izolat 498-14 najveću nt sličnost 85,3% (96,5% aa sličnosti) dijeli sa izolatom porijeklom iz *Allium sativum* iz Kine (AJ310199).

#### **5.7.5. Molekularna identifikacija i filogenetske analize virusa roda**

##### *Allexivirus*

Molekularna identifikacija i karakterizacija vrsta roda *Allexivirus* obuhvatila je filogenetske analize četiri virusa ovog roda čije je prisustvo po prvi put detektovano u Srbiji: GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D.

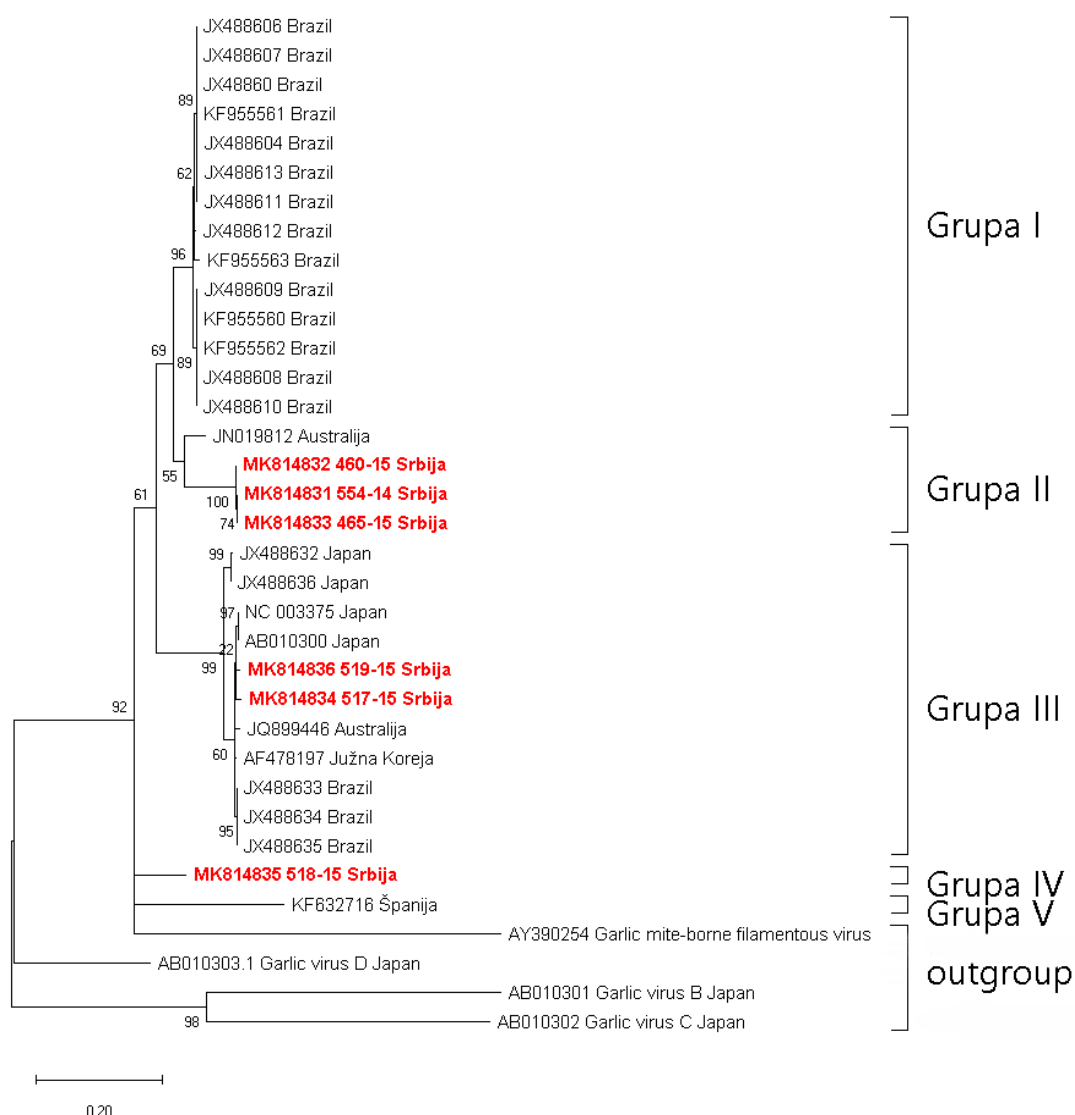
#### **5.7.6. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-A**

Međusobno poređenje sekvenci dijela CP i NABP gena, dobijenih prajmerima ACPF/ACPR dužine 441 bp pokazalo je da odabrani izolati GarV-A porijeklom iz Srbije dijele 84,1-100% nt sličnosti, odnosno da se ne razlikuju ili se razlikuju u maksimalno 70 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 95,2% do 100%, odnosno odabrani izolati se nisu razlikovali ili su se razlikovali u maksimalno 7 aminokisjelina.

BLAST analiza je pokazala 86,57-90,93% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama GarV-A iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi

podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom radu sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 441 bp. Najviši stepen nt sličnosti 90,9% (95,2% aa sličnosti) sekvence izolata 554-14 i 465-15, odnosno 99,7% (95,2% aa sličnosti) sekvenca izolata 460-15 pokazale su sa izolatom iz *A. sativum* porijeklom iz Australije (JN019812). Sekvence izolata 517-15 i 519-15 pokazale su najviši stepen nt sličnosti 99,1% (100% aa sličnosti) odnosno 99,3% (100% aa) sa tri izolata (KX889752-54) porijeklom iz *A. sativum* iz Poljske. Izolat 518-15 najviši stepen nt sličnosti 99,3% (100% aa sličnosti) pokazao je sa jednim izolatom iz *A. sativum* porijeklom iz Kine (MF136746).

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP i NABP gena dužine 441 bp šest izolata GarV-A porijeklom iz bijelog luka iz Srbije i 29 GarV-A izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem maximum-likelihood metode sa Kimura-2 parameter, Gamma distribucijom i proporcijom invarijantnih mjesta (K2P+G+I) i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja u okviru Mega X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 42 izdvojilo se pet grupa sa unutargrupnom sličnosti: grupa I ( $0,0093 \pm 0,0027$ ), grupa II ( $0,0550 \pm 0,0090$ ), grupa III ( $0,0204 \pm 0,0039$ ) i dvije grupe koje su sadržale po samo jedan izolat. Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,1163 \pm 0,0171$  do  $0,2744 \pm 0,0354$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,1998 \pm 0,0174$ . Tri izolata GarV-A porijeklom iz bijelog luka iz Srbije svrstali su se sa izolatom iz Australije u grupu III, dva izolata su se svrstala sa izolatima iz Brazila, Japana, Australije i Južne Koreje u grupu II, dok je se jedan izolat GarV-A porijeklom iz Srbije izdvojio u samostalnu grupu, grupu IV.



**Slika 42.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci dijela CP i NABP gena 35 izolata GarV-A korišćenjem maximum-likelihood metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence *Garlic mite-borne filamentous virus*, GarV-B, GarV-C i GarV-D su korišćene kao „outgroup“. Izolati GarV-A iz Srbije iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

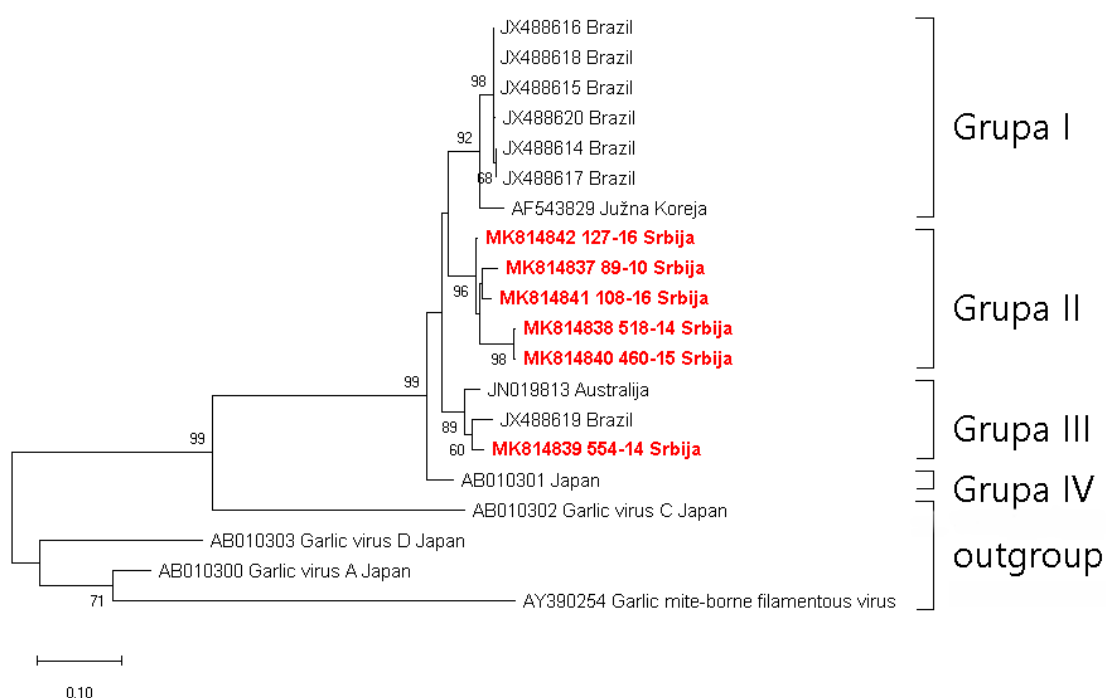
### 5.7.7. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-B

Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dijela CP i NABP gena, dobijenih prajmerima BCPF/BCPR dužine 436 bp pokazalo je da odabrani izolati GarV-B porijeklom iz Srbije dijele 90,1-99,8% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 1-43

nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 74% do 99,2%, odnosno odabrani izolati su se razlikovali u maksimalno 34 aminokisjeline.

BLAST analiza pokazala je 91,06-94,67% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama GarV-B iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 436 bp. Izolati 89-10, 518-14, 554-14, 460-15, 108-16 i 127-16 najveću nt i aa sličnost dijele sa izolatom iz *A. sativum* cv. Landrace porijeklom iz Češke (JX682833) i to: izolat 89-10 95% nt (88,5% aa), izolat 518-14 92,2% nt (83,1% aa), izolat 554-14 91,7% nt (80,8% aa), izolat 460-15 92,4% nt (83,8% aa), izolat 108-16 95,4% nt (90,8% aa) i izolat 127-16 96,6% nt (91,5% aa).

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP i NABP gena dužine 272 bp šest izolata GarV-B porijeklom iz bijelog luka iz Srbije i 14 GarV-B izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem maximum-likelihood metode sa Kimura-2 parameter i Gamma distribucijom i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja u okviru Mega X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 43 izdvojilo se četiri grupe sa unutargrupnom sličnosti: grupa I ( $0,0152 \pm 0,0043$ ), grupa II ( $0,0428 \pm 0,0097$ ), grupa III ( $0,0672 \pm 0,0125$ ) i grupa IV koju čini samo jedan izolat. Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,1170 \pm 0,0223$  do  $0,1033 \pm 0,0173$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,2316 \pm 0,0259$ . Izolati iz GarV-B porijeklom iz bijelog luka iz Srbije svrstali su se u dvije grupe, grupu II koju čine samo izolati iz Srbije i jedan izolat u grupu III sa izolatima iz Australije, Brazila i Japana.



**Slika 43.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci dijela CP i NABP gena 20 izolata GarV-B korišćenjem maximum-likelihood metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence *Garlic mite-borne filamentous virus*, GarV-A, GarV-C i GarV-D su korišćene kao „outgroup“. Izolati GarV-B iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

### 5.7.8. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-C

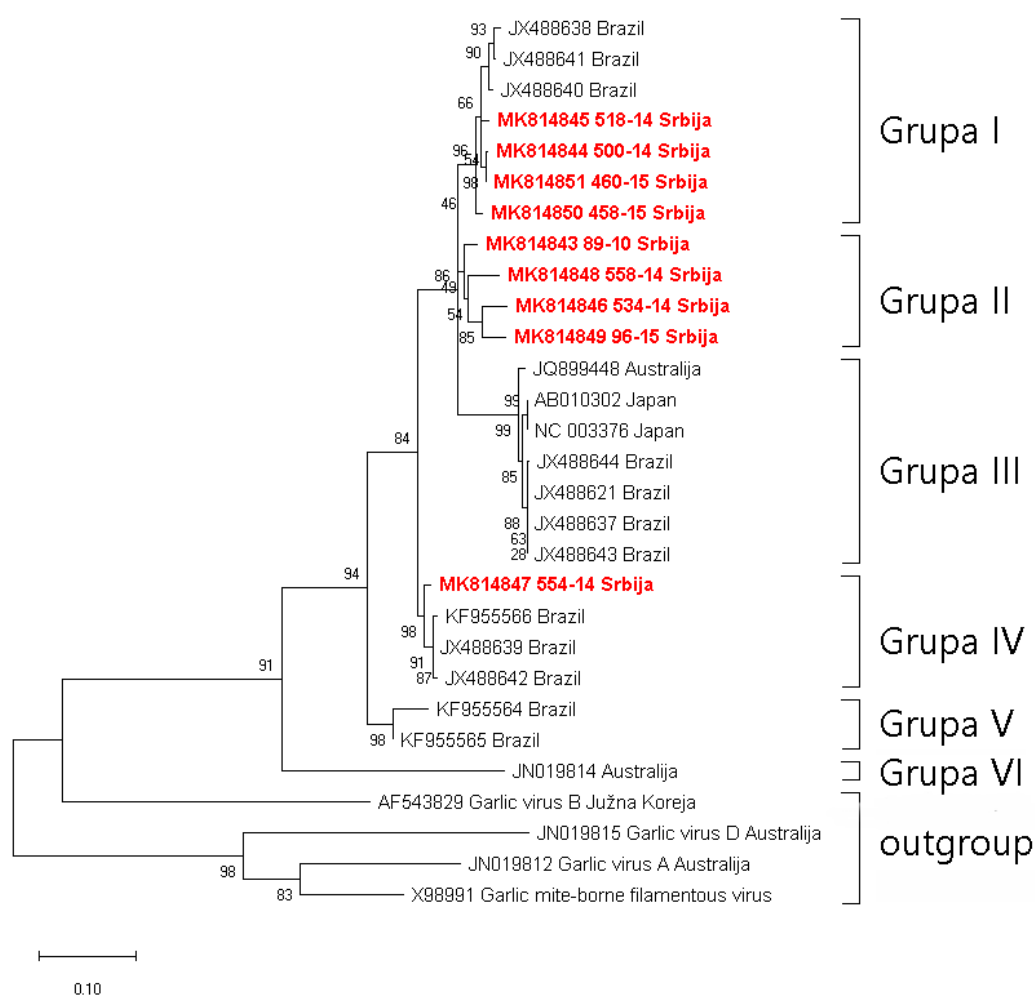
Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dijela CP i NABP gena, dobijenih prajmerima CCPF/CCPR dužine 665 bp, pokazalo je da odabrani izolati GarV-C porijeklom iz Srbije dijele 90,2-99,7% nt, odnosno da se razlikuju u 2-65 nukleotida. Aminokisjelinska sličnost odabranih izolata kretala se od 94,5% do 99,5%, odnosno odabrani izolati razlikovali su se u maksimalno 12 aminokisjelina.

BLAST analiza pokazala je 94,09-95,69% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama GarV-C iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 665 bp. Izolati 89-10, 500-14, 518-14, 554-14, 458-15 i 460-15



najveću nt i aa sličnost dijele sa izolatom iz *A. sativum* cv. Bzenecky porijeklom iz Češke (JX682842), i to: izolat 89-10 95,6% nt (98,6% aa), izolat 518-14 98,3% nt 100% aa), izolat 554-14 91,1% nt (95,4% aa), izolat 458-15 97,9% nt (98,2% aa) i izolati 500-14 i 460-15 98,5% nt (99,1% i 99,5% aa). Sekvenca izolata 534-14 i 96-15 najviši stepen nt sličnosti 97,6% (97,3% aa sličnosti) odnosno 96,4% (96,8% aa) pokazale su sa izolatom JX682843 porijeklom iz *A. sativum* cv. Landrace iz Češke, dok je sekvenca izolata 558-14 najviši stepen nt sličnosti 92,8% (95,4% aa) sličnosti pokazala sa izolatom JX682840 iz *A. sativum* cv. Podebradsky iz Češke.

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP i NABP gena dužine 408 bp, devet izolata GarV-C porijeklom iz bijelog luka iz Srbije i 20 GarV-C izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem maximum-likelihood metode sa Kimura-2 parameter i Gamma distribucijom i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja u okviru Mega X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 44 izdvojilo se šest grupa sa unutargrupnom sličnosti: grupa I ( $0,0207 \pm 0,0044$ ), grupa II ( $0,0572 \pm 0,0097$ ), grupa III ( $0,0096 \pm 0,0031$ ), grupa IV ( $0,0138 \pm 0,0043$ ), grupa V ( $0,0362 \pm 0,0097$ ) i grupa VI sa samo jedinim izolatom iz Australije. Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,0696 \pm 0,0107$  do  $0,3213 \pm 0,0441$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,1858 \pm 0,0174$ . Izolati GarV-C porijeklom iz bijelog luka iz Srbije svrstali su se u tri grupe: grupu I zajedno sa izolatima iz Brazila, grupu II koju čine samo izolati iz Srbije, i jedan izolat u grupu IV takođe sa izolatima iz Brazila.



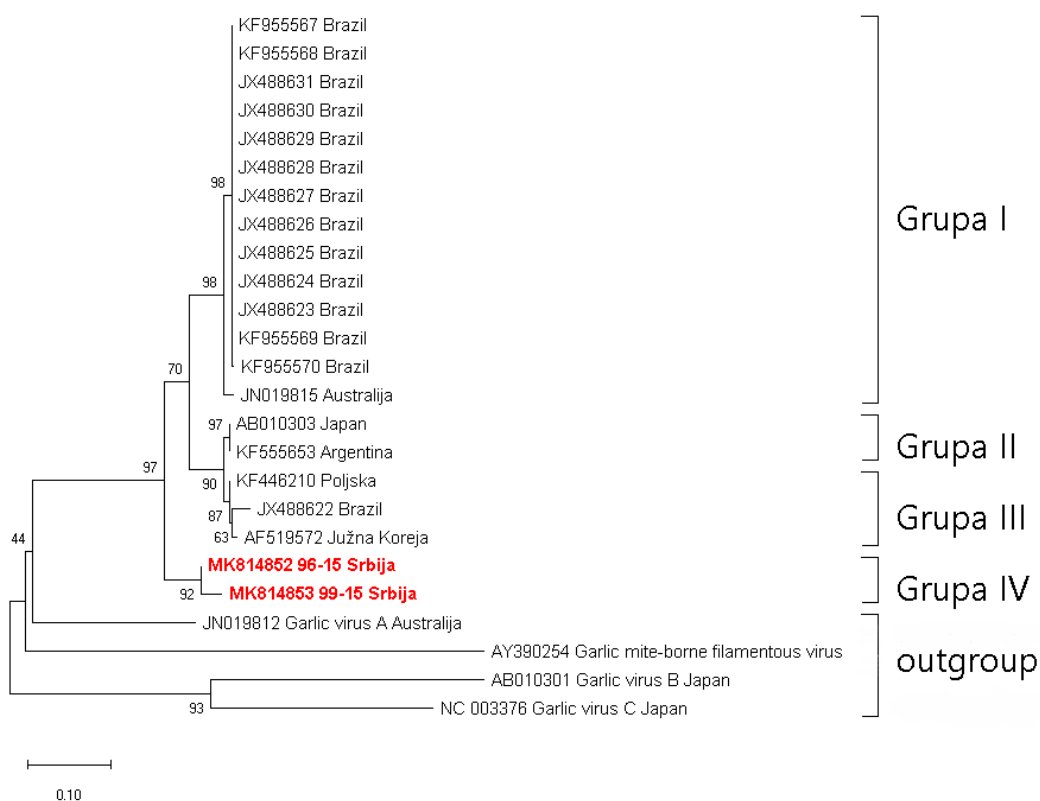
**Slika 44.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci dijela CP i NABP gena 29 izolata GarV-C korišćenjem maximum-likelihood metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence *Garlic mite-borne filamentous virus*, GarV-A, GarV-B i GarV-D su korišćene kao „outgroup“. Izolati GarV-C iz Srbije iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

### 5.7.9. Molekularna identifikacija i filogenetske analize GarV-D

Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dijela CP i NABP gena, dobijenih prajmerima DCPF/DCPR dužine 576 bp, pokazalo je da odabrani izolati GarV-D porijeklom iz Srbije dijele 97,6% nt sličnosti. Razlika od 14 nukleotida između ove dvije sekvence izazvala je promjenu 6 aminokisjelina tako da je njihova aa sličnost iznosila 96,8%.

BLAST analiza pokazala je 86,68-98,43% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama GarV-D iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 576 bp. Najviši stepen sličnosti odabrane sekvence pokazale su sa tri izolata GarV-D porijeklom iz *A. sativum* cv. Landrace iz Rusije (JX682885), iz *A. sativum* cv. Vekan iz Češke (JX682882) i iz *A. sativum* cv. Landrace iz Mađarske (JX682870) i to: 98,3% nt sličnosti (97,3% aa sličnosti) izolat 96-15, a 97,9% nt sličnosti (97,3% aa sličnosti) izolat 99-15.

Uparivanjem i međusobnim poređenjem sekvenci dijela CP i NABP gena dužine 285 bp dva izolata GarV-D porijeklom iz bijelog luka iz Srbije i 23 GarV-D izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem maximum-likelihood metode sa Kimura-2 parameter i Gamma distribucijom i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja u okviru Mega X softvera. Unutar filogenetskog stabla prikazanog na slici 45 izdvojile su se četiri grupe sa unutargrupnom sličnosti: grupa I ( $0,0036 \pm 0,0014$ ), grupa II ( $0,0000 \pm 0,0000$ ), grupa III ( $0,0219 \pm 0,0074$ ) i grupa IV ( $0,0258 \pm 0,0102$ ). Međugrupna varijabilnost se kretala od  $0,0272 \pm 0,0086$  do  $0,1301 \pm 0,0257$ , a ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je  $0,1754 \pm 0,0196$ . Izolati iz GarV-D porijeklom iz bijelog luka iz Srbije svrstali su se u odvojenu grupu IV koju čine samo izolati iz Srbije.



**Slika 45.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci dijela CP i NABP gena 25 izolata GarV-D korišćenjem maximum-likelihood metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence *Garlic mite-borne filamentous virus*, GarV-A, GarV-B i GarV-C su korišćene kao „outgroup“. Izolati GarV-D iz Srbije iz lukova su naglašeni i obojeni u crveno.

## 6. DISKUSIJA

Na različitim vrstama gajenih lukova javlja se veliki broj prouzrokovaca bolesti biotske i abiotske prirode, kao i štetočina, koji mogu da izazovu ozbiljne gubitke u proizvodnji, uzrokujući direktne štete, ali i narušavajući kvalitet lukovica (**Aleksić i sar.**, 1990; **Ivanović i Ivanović**, 2001; **Šutić**, 2005; **Mijatović i sar.**, 2007; **Katis et al.**, 2012; **Rabinowitch**, 2018; **Walkley**, 2018). Međutim, smatra se da su virusi lukova najznačajniji ograničavajući faktor u proizvodnji često prouzrokujući velike ekonomske štete (**Cafrune et al.**, 2006; **Perez-Moreno et al.**, 2010; **Katis et al.**, 2012; **Walkley**, 2018). Ove štete su još izraženije ako su u pitanju miješane infekcije sa dva ili više virusa (**Lot et al.**, 1998; **Perotto et al.**, 2010). Zbog vegetativnog načina razmnožavanja, smatra se da je sadni materijal bijelog luka skoro potpuno zaražen miješanim infekcijama u kojima su prevalentni virusi iz rodova *Potyvirus* i *Carlavirus* koje prenose biljne vaši, kao i *Allexivirus* koje prenose grinje (**Van Dijk**, 1993a, 1993b; **Cafrune et al.**, 2006; **Perez-Moreno et al.**, 2010; **Katis et al.**, 2012). Prva pojava tada novog virusa žute patuljavosti crnog luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) na crnom luku početkom 20-tih godina XX vijeka izazvala je katastrofalne posljedice za proizvodnju ove vrste u SAD i Njemačkoj (**Melhus et al.**, 1929; **Bremer**, 1937; **loc. cit. Walkley**, 2018). Međutim, detaljno upoznavanje epidemiologije ovog oboljenja dovelo je do definisanja preventivnih mjera koje su prvo značajno smanjile intenzitet zaraza, a zatim i spriječile pojavu novih epidemija (**Walkley**, 2018). Danas se za OYDV smatra da više nije ekonomski značajan u Zapadnoj Evropi i SAD zbog mjera kontrole, pogotovo plodoređa i gajenja crnog luka iz sjemena, međutim, u djelovima svijeta gdje se crni luk još razmnožava vegetativno, posebnu pažnju treba obratiti na upotrebu zdravog sadnog materijala (**Dovas et al.**, 2001a; **Walkley**, 2018). Na crnom luku mogu još da se jave obični latentni virus bijelog luka (*Garlic common latent virus*, GarCLV), latentni virus ljutike (*Shallot latent virus*, SLV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV), kao i virus žute pjegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus*, IYSV) koji mogu da prouzrokuju veoma značajne štete (**Van Dijk**, 1993a; **Katis et al.**, 2012; **Stanković et al.**, 2012).

Virusi lukova iz rodova *Potyvirus* i *Carlavirus* prenose se biljnim vašima na neperzistentan način, *Orthospovirus*-i se prenose na cirkulativan propagativni način tripsima, dok se virusi roda *Allexivirus* prenose grinjama (Cafrune et al., 2006; Katis et al., 2012). Usled vegetativnog razmnožavanja, dolazi do akumulacije virusa u sadnom materijalu i omogućava se širenje virusa i gubitak prinosa tokom sukcesivnog gajenja, zbog čega bijeli luk spada u najugroženije povrtarske biljke (Davis, 1995; Bagi i sar., 2010). Virusi iz rodova *Potyvirus*, *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Potexvirus* i *Orthospovirus* koji se javljaju na bijelom luku obično se zbirno zovu kompleks virusa bijelog luka (*garlic-viral-complex*, GVC) (Manjunathgowda et al., 2017). Takođe, pojava miješanih infekcija, odnosno prisustvo jednog i/ili više virusa u biljkama bijelog luka otežava njihovu preciznu identifikaciju (Fajardo et al., 2001). Zanimljiva je i česta pojava različitih sojeva kod virusa lukova koji su se adaptirali i specijalizovali za određene domačine koji se gaje ili javljaju na području u određenim klimatskim uslovima, a za koju se smatra da je vjerovatno posljedica dugogodišnjeg vegetativnog razmnožavanja (Barg et al., 1995). Najznačajnije vrste virusa koji se javljaju na lukovima uglavnom imaju uzak krug domaćina ograničen na predstavnike roda *Allium*, međutim i pored toga njihova identifikacija je bila veoma složena zbog donekle sličnih karakteristika koje ispoljavaju, kao što su izgled čestice i načini prenošenja (Walkley, 2018). Unaprijeđivanje tehnika detekcije i identifikacije omogućilo je brzu i pouzdanu detekciju virusa lukova, pa danas imamo na raspolaganju veliki broj komercijalnih DAS-ELISA kitova za većinu najznačajnijih virusa, kao i različite tehnike koje se zasnivaju na PCR metodi i upotrebi specifičnih prajmera za vrstu ili rod (Katis et al., 2012).

Kod nas crni luk spada u povrtarske vrste koje odlikuje značajna stabilnost površina, koja se duguje povoljnim prirodnim uslovima, tradiciji proizvodnje kao i svakodnevnoj upotrebi. Dominantno učešće u ukupnoj proizvodnji imaju mala gazdinstva stoga je neophodno uvažavati njihove specifičnosti u cilju daljeg unaprijeđenja ove proizvodnje (Bošnjak i sar., 2007). Ukupna površina na kojoj se obavlja proizvodnja bijelog luka je u trendu opadanja, dok se prinosi blago povećavaju kao i za crni luk (FAO, 2016).

Iako se u Srbiji različite vrste lukova tradicionalno gaje i zauzimaju značajno mjesto po površinama koje zahvataju, do sada su proučavanja prisutva i

rasprostranjenosti virusa na lukovima bila malobrojna i često samo lokalnog karaktera ili usmjerena samo na određenu vrstu virusa (**Bulajić et al.**, 2008, 2009; **Bagi et al.**, 2012). Zbog toga je ova doktorska disertacija imala za cilj da da detaljnu sliku o prisustvu, rasprostranjenosti i epidemiologiji virusa na lukovima u Srbiji, kroz intenzivna istraživanja sprovedena od 2010. godine (**Stanković et al.**, 2012; **Krstić i sar.**, 2014; **Milošević et al.**, 2015; **Vučurović i sar.**, 2015; 2015; **Vučurović et al.**, 2015, 2016, 2017), a takođe i da omogući iznalaženje i implementaciju savremenih metoda detekcije i identifikacije, kako bi se razvile i uspostavile efikasne i održive mjere kontrole.

### 6.1. Simptomi i učestalost oboljenja u polju

Sedmogodišnje ispitivanje virusa lukova u Srbiji sprovedeno u periodu od 2010. do 2016. godine obuhvatilo je pregled usjeva najznačajnijih vrsta lukova koji se gaje u Srbiji. U važnijim regionima gajenja pregledani su usjevi crnog i bijelog luka, praziluka, ljutike, aljme, vlasca i biser luka, kao i sremuša, vrste koja spontano raste u Srbiji. Uočeni su simptomi koji su ukazivali na virusne infekcije, a jačina ispoljavanja simptoma najčešće je zavisila od toga da li su se virusi javili u pojedinačnim ili miješanim infekcijama. Takođe, jačina simptoma zavisila je i od biljke domaćina, vremena ostvarene infekcije, soja virusa, kao i temperature u periodu inkubacije. Obično su se izraženiji simptomi javljali na biljkama sa miješanim infekcijama i biljkama koje su bile zaražene rano u toku vegetacije. Izraženije simptome imale su biljke sa pojedinačnim infekcijama OYDV, LYSV, TSWV i IYSV u odnosu na biljke zaražene pojedinačnim infekcijama sa GarCLV. Slične simptome opisali su i **Van Dijk** (1993b) i **Bellardi et al.** (1995).

U toku ovih ispitivanja na različitim vrstama lukova uočeni su brojni i raznovrsni simptomi, najčešće na lišću, ali i na cvjetonosnim stablima kod crnog luka. Najčešći simptomi koji su se javljali na najznačajnijim gajenim vrstama roda *Allium*, crnom i bijelom luku, u toku ovih istraživanja bili su hlorotična prošaravanja, tipičan simptom za zaraze izazvane virusima (**Bos et al.**, 1978b; **Paludan**, 1980). Takođe, žuta prugavost i crtičavost javljala se kod pojedinačnih biljaka, a nekada su listovi postajali potpuno hlorotični. Simptomi su se prvo javljali pri osnovi listova, a postepeno su zahvatali i cijeli list. Biljke zaražene u ranijim fazama razvoja pokazivale su simptome

zaostajanja u porastu, sa uvrtnjem listova kao što su opisali i **Bos (1981)** i **Lot et al. (1998)**. Kod pojedinih biljaka dolazilo je i do sušenja simptomatičnih listova. Osim toga uočeni su i simptomi izraženog žutog mozaika kao što su zabilježili brojni autori (**Van Dijk and Van der Vlugt, 1994; Yamashita et al., 1995; Takaichi et al., 1998**). Nekada su listovi crnog luka gubili svoj karakterističan cilindričan oblik i postajali manje ili više spljošteni, što su zapazili i drugi istraživači (**Walkley, 2018**). Na merkantilnom crnom luku su se javljale i slamasto-žute pjege, dok su se na cvjetonosnim stablima javljale dijamantske pjege, simptom karakterističan za zarazu IYSV (**Bag et al., 2015; Karavina and Gubba, 2017**). Zapaženo je i da su kod simptomatičnih biljaka crnog i bijelog luka glavice bile sitnije u odnosu na glavice biljaka koje nijesu ispoljavale simptome. Kod crnog luka glavice su imale skraćen period skladištenja, zbog prijevremenog klijanja. Kod biljaka sjemenskog crnog luka usled virusnih infekcija često je dolazilo do lomljenja cvjetonosnih stabala, što je za posljedicu imalo smanjen prinos sjemena.

Od ostalih vrsta lukova uključenih u ova istraživanja, po značaju se izdvaja praziluk. Na praziluku su se, kao i na drugim vrstama, javljali varijabilni simptomi koji su zavisili od vremena ostvarene infekcije. Najčešće su se javljali različiti vidovi mozaika, hloroze i žute prugavosti, a nekada su listovi bili deformisani ili su cijele biljke zaostajale u porastu. Raznovrsne simptome na praziluku prouzrokovane virusnim infekcijama navode i drugi autori (**Katis et al., 2012; Testen et al., 2014; Vončina et al., 2016; Vučurović et al., 2016; Walkley, 2018**). Na ostalim manje značajnim ili vrstama lokalnog značaja uključenim u ova testiranja javili su se tipični virusni simptomi koji su uključivali prugavost, mozaik i deformacije lišća najčešće u vidu uvijanja što je u saglasnosti sa navodima drugih autora (**Milošević et al., 2015; Walkley, 2018**).

Tokom ovih istraživanja na nekim vrstama su se javljali i veoma izraženi simptomi deformacija i zaostajanja u porastu. Iako nije direktno praćeno, uočeno je kod crnog, a naročito kod bijelog luka značajno smanjenje težine glavice, a samim tim i prinosa. Ovakvi simptomi mogu biti posljedica miješanih infekcija virusa iz roda *Potyvirus* najčešće sa virusima iz rodova *Allexivirus* i *Carlavirus* usled pojave sinergističkog efekta (**Cafrune et al., 2006; Perotto et al., 2010; Katis et al., 2012; Celli et al., 2015**).



Slično kao i kod drugih povrtarskih biljaka (**Vučurović et al., 2012; Nikolić et al., 2018**), na osnovu ispoljenih simptoma moglo se pretpostaviti da su posljedica infekcije nekim od virusa, ali ne i o kom konkretnom virusu prouzrokovavaču je riječ. Na osnovu toga se može zaključiti da simptomi virusnih infekcija na lukovima nijesu od dijagnostičkog značaja, osim u slučaju infekcije sjemenskog usjeva crnog luka, kada se na cvjetonosnom stablu pojavljuju karakteristične pjege oblika dijamantskog oka koje se smatraju i dijagnostičkim simptomom za IYSV (**Pozzer et al., 1994; Pappu et al., 2008; Bag et al., 2015**).

Tokom ovih istraživanja prisustvo bar jednog od testiranih virusa zabilježeno je kod većine biljaka koje su ispoljavale simptome virusnih infekcija. Međutim, u 44,9% testiranih biljaka nije dokazano prisustvo testiranih virusa primjenom DAS-ELISA metode, iako su biljke ispoljavale simptome karakteristične za virusne infekcije. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica infekcije nekim drugim ekonomski manje značajnim virusima koji nijesu uključeni u serološka ispitivanja ili virusima za čiju detekciju još uvijek ne postoje odgovarajući DAS-ELISA kitovi. Takođe, odsustvo testiranih virusa u simptomatičnim biljkama može da ukaže na abiotski faktor kao mogućeg prouzrokovачa simptoma (**Schwartz et al., 2007**).

Sedmogodišnja ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa lukova obuhvatila su i procjenu učestalosti oboljenja za svaku godinu. Učestalost je procijenjena vizuelno, kao i brojanjem biljaka koje su pokazivale simptome tipične za virusne infekcije. Incidenca simptomatičnih biljaka varirala je po godinama i usjevima. U toku 2010. godine učestalost simptomatičnih biljaka se kretala od 10 do 15%, dok je tokom naredne dvije godine istraživanja rasla, pa je 2012. godine procijenjena na 20-25%, da bi 2013. godine bila i više od 30%. Naredna, 2014. godina ispitivanja karakteriše se pojavom epidemije u usjevima crnog luka, naročito u okolini Novog Sada, gdje je zabilježeno preko 90% simptomatičnih biljaka, uz izuzetno veliku brojnost *Thrips tabaci*. Pojava povremenih epidemija u crnom luku nije neuobičajena i najčešće je izazvana IYSV koga prenose tripsi (**Gent et al., 2006**). Oboljenje izazvano ovim virusom prvi put je opisano u Srbiji 2007. godine, kao potencijalno velika prijetnja za proizvodnju crnog luka, međutim, poslije prve pojave njegovog prisustvo nije zabilježeno narednih pet godina, pa se smatralo da je izvršena uspješna eradikacija (**Bulajić et al., 2008; Bulajić et al., 2012**). Ostali usjevi pokazivali su nižu, ali ipak

značajnu učestalost zaraze procijenjenu na oko 30%. Učestalost zaraze tokom 2015. godine kretala se oko 30 do 40%, a 2016. godine bila je oko 20%.

Variranje u učestalosti pojave virusnih simptoma na različitim vrstama lukova zabilježeno tokom ovih istraživanja kretalo se od 10% (2010. godine), pa do preko 90% (2014. godine). Ove razlike nijesu neuobičajene, s obzirom na razlike u načinu gajenja pojedinih vrsta lukova, ali i razlike u epidemiologiji najznačajnijih virusa lukova, odnosno razlike u načinima njihovog prenošenja i održavanja (**Katis et al.**, 2012; **Walkey**, 2018). Takođe, značajnu ulogu najverovatnije imaju i klimatski uslovi, koji su bili veoma varijabilni u različitim godinama ispitivanja, pa su presudno uticali na prezimljujuće populacije vektora i domaćina u kojima se virusi održavaju. Slična variranja u zastupljenosti različitih virusa zabilježena su i u drugim usjevima u Srbiji (**Stanković et al.**, 2011; **Vučurović et al.**, 2012; **Nikolić et al.**, 2018).

## **6.2. Primjena DAS-ELISA testa u identifikaciji virusa lukova u Srbiji**

Pojava i rasprostranjenost virusa infektivnih za lukove praćena je u periodu od 2010. do 2016. godine. U cilju inventarizacije virusa pregledano je ukupno 111 lokaliteta u najznačajnijim regionima gajenja lukova u Srbiji i sakupljeno 374 uzorka osam različitih vrsta lukova, koji su testirani primjenom DAS-ELISA metode na prisustvo pet najznačajnijih virusa (OYDV, GarCLV, LYSV, IYSV i TSWV).

Rezultati praćenja pojave i rasprostranjenosti virusa lukova u našoj zemlji primjenom seroloških analiza, pokazali su prisustvo OYDV, GarCLV, LYSV, IYSV i TSWV, odnosno svih testiranih virusa, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili **Bulajić et al.** (2008), **Bagi i sar.** (2010), **Bagi et al.** (2012), **Stanković et al.** (2012), **Vučurović et al.** (2015), **Milošević et al.** (2015) i **Vučurović et al.** (2016) ispitujuću prisustvo virusa na različitim vrstama lukova u Srbiji. Sedmogodišnja ispitivanja, pokazala su prisustvo bar jednog od testiranih virusa u preko 55% testiranih uzoraka koji su ispoljavali virusne simptome. Posmatrano po godinama istraživanja, incidenca virusa je značajno varirala od nešto ispod 30% 2012. godine, pa do skoro 70% 2013. i 2014. godine. U usjevima crnog luka, 2014. godina je označena kao epidemijska kada je na skoro svim lokalitetima u jednom od najznačajnijih područja gajenja crnog luka u okolini Novog Sada incidenca dostigla i 100%. U ostalim godinama ispitivanja incidence su bile oko 40% 2011. i 2016., odnosno oko 50% 2010. i 2015. godine.

Incidence od preko 50% pratila je pojava veoma izraženih simptoma na biljkama, dok su u godinama sa nižom incidencom simptomi bili umjereno izraženi do izraženi.

Tokom sedam godina istraživanja pojava i zastupljenost virusa se mijenjala u zavisnosti od godine ispitivanja, lokaliteta gajenja, kao i vrste luka. Detektovani virusi su se tokom ispitivanja javljali u pojedinačnim i miješanim infekcijama, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača (**Lot et al.**, 1998; **Dovas et al.**, 2001a; **Klukáčková et al.**, 2007; **Kumar et al.**, 2010; **Katis et al.**, 2012; **Jemal et al.**, 2015).

Samo je prisustvo OYDV i GarCLV dokazano u svim godinama ispitivanja, dok je prisustvo LYSV dokazano u pet godina, TSWV u tri, a IYSV u dvije godine ispitivanja. Ukupno posmatrano najzastupljeniji virus u ovim istraživanjima bio je OYDV, koji je detektovan u 27% testiranih uzoraka, dok je, takođe, bilo veoma značajno prisustvo GarCLV (26,2%). Treći po zastupljenosti bio je LYSV detektovan u 16,6% testiranih uzoraka. Svi virusi su dokazani i u pojedinačnim i u miješanim infekcijama. Pojedinačne infekcije su bile češće i dokazane su u preko 36%, a miješane u 19,2%. Od miješanih su najčešće bile dvostruke (14%) i to one sa dva najčešća virusa lukova u Srbiji, OYDV i GarCLV (8,8%), a zatim trostruke i četverostruke infekcije. Ovakvo prisustvo virusa *Potyvirus* i *Carlavirus* rodova nije iznenađujuće jer se ovi virusi smatraju najznačajnijim i najčešćim virusima na *Allium* vrstama (**Katis et al.**, 2012, **Walkley**, 2018). Takođe, tokom ovih ispitivanja dokazano je i prisustvo virusa koji se prenose tripsima, IYSV i TSWV, koji su detektovani u 6,4%, odnosno 1,9% testiranih uzoraka. Prisustvo IYSV tokom 2014. godine, povezano je sa epidemijskom pojavom ovog virusa u merkantilnom i sjemenskom crnom luku na pet lokaliteta u okolini Novog Sada gdje je bio najzastupljeniji virus sa incidencom od 60 do 100%. Ovaj virus je u Srbiji prvi put dokazan 2007. godine, na dva lokaliteta gajenja, Sirig i Obrenovac (**Bulajić et al.**, 2008, 2009). Poslije ovih nalaza u skladu sa preporukama **Sansford and Woodhall** (2007) preduzete su sve mjere u cilju njegove eradikacije, a s obzirom da višegodišnjim pregledima terena do 2012. godine nije ponovo utvrđeno prisustvo ovog virusa, smatralo se da je izvršena uspješna eradikacija (**Bulajić et al.**, 2012). Međutim, pojava IYSV tokom 2014. godine, a zatim ponovo mada u manjem procentu uzoraka i 2015. godine, zajedno sa informacijama o prvom nalazu IYSV na crnom luku u Bosni i Hercegovini (**Trkulja et al.**, 2013b) ukazuje na potrebu intenzivnog nadzora nad ovim virusom kako bi se spriječilo eventualno dalje širenje i

ograničile štete koje može da izazove. Rasprostranjenost IYSV se poslije 2000. godine u svijetu značajno povećala, pa ovaj virus predstavlja jednu od najznačajnijih prijetnji proizvodnji crnog luka, jer ima složenu epidemiologiju u kojoj značajnu ulogu imaju tripsi koji ga prenose, kao i korovi, koji služe kao domaćini za održavanja virusa i vektora (**Gent et al.**, 2006; **Pappu et al.**, 2009). Iako se TSWV ne javlja često na predstavnicima *Allium* vrsta, jedan je od najznačajnijih virusa na povrtarskim i ukrasnim biljkama, kao i duvanu (**Pappu et al.**, 2009), njegovo prisustvo u tri godine ispitivanja na crnom i/ili bijelom luku ukazuje na širenje njegovog prirodnog kruga domaćina na crni i bijeli luk kod nas (**Stanković et al.**, 2012). Sve ove činjenice ukazuju na potrebu za monitoringom ovog virusa u lukovima kod nas, s obzirom na njegov značaj i potencijalne štete koje može da nanese, zbog stalnog prisustva izvora inokuluma u okolnim usjevima i korovskim biljkama. Nalaz TSWV 2010. godine u Srbiji na bijelom luku, predstavlja prvi publikovani nalaz ovog virusa u svijetu, jer su do tada postojali samo neobjavljeni nalazi Marchoux i saradnika (**Parrella et al.**, 2003). Takođe, malobrojni su podaci o prirodnim infekcijama crnog luka ovim virusom (**Louro**, 1996), pa njegovo prisustvo, poslije prvog nalaza (**Stanković et al.**, 2012) na različitim lokalitetima u više godina ovih istraživanja ukazuje na potencijalni rizik od širenje ove vrste na crnom luku kod nas. Virusi *Orthotospovirus* roda u budućnosti u Srbiji mogu predstavljati značajan problem na različitim kulturama uključujući i usjeve lukova, prije svega zbog klimatskih promjena čiji smo svjedoci posljednjih godina, kao i zbog veoma teške kontrole njihovih vektora, tripsa.

Tokom prve godine ispitivanja, najzastupljeniji su bili OYDV i GarCLV čije je prisustvo dokazano u više od 28% testiranih uzoraka, dok su u drugoj godini ispitivanja najzastupljeniji bili TSWV i GarCLV koji su dokazani u po 30% ispitivanih uzoraka. U uzorcima sakupljenim 2012. godine najzastupljeniji je bio OYDV detektovan u 19% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio LYSV dokazan u preko 14% testiranih uzoraka. Naredne dvije godine istraživanja karakterisalo je dominantno prisustvo OYDV (56%, odnosno 37,9% testiranih uzoraka), dok je GarCLV u obje godine bio drugi virus po učestalosti (42%, odnosno 33,1% testiranih uzoraka). Tokom 2015. godine najzastupljeniji je bio LYSV, dokazan u preko 27% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio GarCLV (23,7%). U posljednjoj godini ispitivanja ponovo su dva najučestalija virusa bili GarCLV i LYSV, s tim što je GarCLV

detektovan u nešto većem broju uzoraka (16%), a LYSV u 14% testiranih uzoraka. Ukupno posmatrano, nije iznenađujuće prisustvo *Potyvirus*-a OYDV i LYSV u visokim procentima, s obzirom da se ova dva virusa u većini područja u svijetu smatraju najznačajnijim virusima na *Allium* vrstama (Conci et al., 1992; Van Dijk, 1993a; Barg et al., 1997; Tsuneyoshi et al., 1998; Chen et al., 2001; Klukačkova et al., 2007). Drugi po zastupljenosti virus u ovim istraživanjima GarCLV je rasprostranjen širom svijeta na različitim vrstama lukova (Barg et al., 1994, 1997). Često se javlja u visokom procentu u usjevima čak i do 98%, a nerijetko je i prevalentni virus (Delecolle and Lot, 1981; Van Dijk, 1993b; Bellardi et al., 1995; Shibolet et al., 2001; Dovas and Vovlas, 2003; Mavrič and Ravnkar, 2005; Mohammad et al., 2007). Iako još sa sigurnošću nije utvrđen uticaj ovog virusa na gubitke u prinosu (Perotto et al., 2010), njegova visoka zastupljenost u usjevima različitih vrsta lukova je veoma značajna i predstavlja veliku potencijalnu opasnost jer može da dovede do značajnih gubitaka u prinosu u koinfekciji sa *Potyvirus*-ima zbog sinergističkog efekta (Paludan, 1980; Sako, 1989). U ovim istraživanjima, GarCLV je dokazan u ukupno 15,6% miješanih infekcija sa jednim ili dva *Potyvirus*-a. Posmatrajući samo miješane infekcije, one sa GarCLV i *Potyvirus*-ima činile su preko 80% svih miješanih infekcija.

Posmatrano po vrstama, na crnom luku je dokazano prisustvo svih pet virusa, a najzastupljeniji bio je GarCLV (20,5%), zatim OYDV (17,1%), pa IYSV (15,6%). Ovi rezultati ukazuju na potrebu detaljnog praćenja virusa, naročito IYSV kako bi se spriječile značajnije štete koje ovaj virus može da izazove. Prisustvo GarCLV i OYDV u nešto nižim procentima od očekivanih je vjerovatno posljedica promjene načina proizvodnje, jer se crni luk u Srbiji sve više proizvodi iz sjemena, a sve rjeđe upotrebom vegetativnog materijala koji je često zarazažen ovim virusima, pa su i njihove incidence niže, kao što navode Dovas et al. (2001a) i Walkley (2018) u različitim regionima gajenja lukova u svijetu. Kod bijelog luka virusi su dokazani u znatno većem procentu, što je bilo i za očekivati s obzirom na vegetativno razmnožavanje. Utvrđeno je da je 91,5% ispitivanih uzoraka bijelog luka bilo zaraženo bar jednim od virusa. Najučestaliji je bio OYDV (58%), a zatim GarCLV (45%), dok su LYSV i TSWV detektovani u znatno manjem broju uzoraka 10%, odnosno 1,6%. Prisustvo OYDV u ovako visokom procentu u bijelom luku je uobičajeno, čak se smatra da je na globalnom nivou prisutan u 73% uzoraka bijelog luka (Van Dijk, 1993b). U Francuskoj se čak smatra za najveći

problem u proizvodnji bijelog luka (**Delecolle and Lot, 1981; Delecolle et al., 1985**), dok je u Španiji sadni materijal bijelog luka hronično zaražen ovim virusom (**Pena-Iglesias and Ayuso, 1982**). Osim toga, prevalentan je u usjevu bijelog luka u Izraelu, Italiji i Grčkoj (**Koch and Salomon, 1994; Shibolet et al., 2001; Dovas et al., 2001a; Dovas and Vovlas, 2003**). Najzastupljeniji virus na praziluku bio je LYSV (32%), dok su ostali virusi bili zastupljeni u mnogo manjem procentu. Do ovih istraživanja nije bilo mnogo podataka o prisustvu i rasprostranjenosti LYSV na praziluku u Srbiji. Njegovo prisustvo na praziluku prvi put je dokazano 2013. godine (**Vučurović et al., 2016**), a kasnija istraživanja ukazala su da je to najzastupljeniji virus na praziluku kod nas (**Vučurović et al., 2017**), kao i u drugim krajevima svijeta (**Shahraeen et al., 2008**). Ovaj virus je široko rasprostranjen na praziluku i njegovo prisustvo je uočeno u najznačajnijim regionima gajenja praziluka u Italiji, Francuskoj i Turskoj, dok je u Grčkoj bio jedini virus koji se javio sa visokom incidencijom, čak do 90% na praziluku (**Grancini, 1951; Cornuet, 1959; Korkmaz and Cevik, 2009; Dovas et al., 2001a**). Kod ostalih vrsta uključenih u istraživanja sa manjim brojem uzoraka, prisustvo tri virusa, OYDV, LYSV i GarCLV dokazano je u ljutiki i biser luku, dok je na aljmi uz ove viruse dokazan i TSWV. Na vlasu su dokazani GarCLV i LYSV, a na sremušu samo OYDV. Rezultati dobijeni na sremušu predstavljaju prve nalaze ovog OYDV i uopšte virusa na ovoj vrsti luka u našoj zemlji.

### **6.3. Rasprostranjenost virusa lukova u Srbiji**

Tokom ovih istraživanja najrasprostranjeniji virus u različitim usjevima lukova u Srbiji bio je GarCLV čije je prisustvo dokazano na 37% pregledanih lokaliteta, dok je drugi po rasprostranjenosti bio OYDV dokazan na 33% lokaliteta. Ova dva virusa su bila i jedini virusi čije prisustvo je dokazano u svim godinama istraživanja. Na značajnom broju pregledanih lokaliteta (28%) dokazan je i LYSV, dok su IYSV i TSWV dokazani samo u 8%, odnosno 5% pregledanih lokaliteta.

Tokom 2010. godine najrasprostranjeniji virusi bili su OYDV i GarCLV, detektovani u 31% lokaliteta, a zatim TSWV dokazan u 8% pregledanih lokaliteta. Naredne godine najrasprostranjeniji su bili GarCLV i TSWV, dokazani na 43% lokaliteta. Pored njih, tokom 2011. jedino je još dokazano prisustvo OYDV u 14% testiranih lokaliteta. U toku 2012. LYSV je bio prvi po rasprostranjenosti prisutan na

50% lokaliteta. Drugi je bio OYDV čije prisustvo je dokazano na 33% lokaliteta, treći GarCLV čije je prisustvo dokazano na 17% lokaliteta. Tokom 2013. godine OYDV, LYSV i GarCLV su dokazani na po 31% lokaliteta. U narednoj godini ispitivanja, GarCLV je bio dominantan. Njegovo prisustvo je dokazano na 62% lokaliteta, a drugi po rasprostranjenosti je bio OYDV (57%). Treći po rasprostranjenosti bio je LYSV čije je prisustvo dokazano na 33% lokaliteta. Tokom 2015. godine, dokazano je prisustvo svih pet virusa, a najrasprostranjeniji su bili GarCLV i LYSV prisutni na po 33% lokaliteta, a zatim OYDV (28% lokaliteta). U posljednjoj godini ispitivanja najrasprostranjeniji je bio LYSV prisutan na 27% lokaliteta, a drugi, odnosno treći po rasprostranjenosti bili su GarCLV i OYDV čije je prisustvo dokazano na po 20% lokaliteta. Dobijeni rezultati nijesu iznenađujući, jer su ova dva virusa bila dominantna i po broju uzoraka u kojima su detektovani, s tim što je OYDV bio malo učestaliji, dok GarCLV ima veću rasprostranjenost. Značajno je prisustvo i LYSV, koji je po rasprostranjenosti i učestalosti treći detektovani virus. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali prisustvo virusa na različitim vrstama lukova u svijetu, koji upravo ukazuju na najveći značaj *Potyvirus*-a, OYDV i LYSV, s obzirom na njihovu široku rasprostranjenost, kao i *Carlavirus*-a (Conci et al., 1992; Van Dijk, 1993a; 1993b; Barg et al., 1997; Chen et al., 2001; Klukačkova et al., 2007; Katis et al., 2012). Takođe, ovi rezultati su u skladu sa rezultatima malobrojnih ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa bijelog luka i praziluku u Srbiji (Bagi i sar., 2010; Bagi et al., 2012; Vučurović et al., 2017).

Tokom ovih istraživanja, nijesu uočene značajne razlike u distribuciji virusa po lokalitetima, osim u slučaju IYSV čije je prisustvo u najvećem broju slučajeva dokazano u okolini Novog Sada. Pojava visoke incidence ovog virusa tokom 2014. godine, najvjerojatnije je posljedica aktivnosti njegovog vektora, koji je usled nižih zimskih temperatura preživio zimu u većoj brojnosti, a u povoljnim uslovima razvoja vektora tokom vegetacije došlo je do njegovog prenamnoženja. Izvor inokuluma u ovom slučaju su najvjerojatnije bile korovske biljke odakle su tripsi prenijeli virus na crni luk, imajući u vidu da se virus ne prenosi lukovicama i pravim sjemenom crnog luka (Diekmann, 1997). Tri prevalentna virusa su manje-više ravnomjerno raspoređena po cijeloj teritoriji Srbije, na različitim vrstama lukova, što predstavlja dodatnu poteškoću prilikom kontrole, jer je inokulum stalno prisutan, kao i njihovi vektori.

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji, mogu poslužiti kao osnova za detaljno ispitivanje epidemiologije ovih virusa, a takođe i kao putokaz u kom smjeru treba usmjeriti kontrolu, s obzirom na dominantno prisustvo OYDV i GarCLV na svim vrstama, kao i LYSV u usjevima praziluka. Posebnu pažnju prilikom kontrole treba obratiti na vektore, biljne vaši za prevalentne i najrasprostranjenije viruse, odnosno tripse za IYSV čija je epidemijska pojava zabilježena 2014. godine.

#### **6.4. Molekularna ispitivanja**

Tokom ovih istraživanja obavljena su molekularna ispitivanja najznačajnijih virusa koji se javljaju na različitim vrstama lukova u Srbiji. Molekularna ispitivanja su obavljena primjenom lančane reakcije polimeraze (PCR) kojoj je prethodila reverzna transkripcija (RT). Ova ispitivanja obuhvatila su molekularnu detekciju i/ili karakterizaciju za OYDV, GarCLV, LYSV, IYSV, TSWV, SLV i predstavnike roda *Allexivirus*, kao i unaprijeđenje metoda brze i pouzdane detekcije ovih virusa. Takođe, u okviru ove disertacije dati su prvi rezultati molekularne karakterizacije najznačajnijih i najrasprostranjenijih virusa na lukovima.

##### **6.4.1. Simultana detekcija najznačajnijih virusa lukova**

U cilju unaprijeđenja i pojednostavljenja molekularne detekcije, dizajnirana je rutinska, brza i pouzdana metoda pri čemu se istovremeno mogu dokazati svi važniji virusi luka (OYDV, LYSV, GarCLV, SLV i virusa roda *Allexivirus*). Kao što navode **Nam et al.** (2015) korišćeni prajmeri amplifikuju fragmente različitih veličina što pogoduje jasnoj vizuelizaciji na agaroznom gelu. Razvijena multiplex RT-PCR metoda se pokazala pogodnom za rutinsku detekciju svih navedenih virusa, kako u pojedinačnim tako i u miješanim infekcijama, čime je olakšana i unaprijeđena detekcija najznačajnijih virusa lukova u našoj zemlji.

##### **6.4.2. Molekularna ispitivanja OYDV**

Molekularna detekcija izolata OYDV obavljena je upotrebom dva para specifičnih prajmera 1-OYDV i 2-OYDV, kao i OYDV-DESIGN-F i OYDV-DESIGN-R koji su dizajnirani u ovim istraživanjima. Oba para prajmera umnožavaju dio gena za CP veličine 730 bp (prvi par), odnosno 760 bp (drugi par). Korišćeni prajmeri 1-OYDV



i 2-OYDV (**Parrano et al., 2012**) su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju izolata OYDV porijeklom iz crnog luka iz Srbije (**Milošević et al., 2015**), dok su prajmeri dizajnirani u ovoj studiji pokazali još veću osjetljivost, odnosno mogli su da umnože veći broj različitih izolata ovog virusa porijeklom iz različitih vrsta lukova iz Srbije.

Odabrani OYDV izolati porijeklom iz različitih lokaliteta u Srbiji, sekvencirani su i upoređena je njihova genetička sličnost međusobno, kao i sa izolatima ovog virusa iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi. Sličnost sekvenci 25 odabranih izolata OYDV iz Srbije bila je preko 86% na nukleotidnom nivou (preko 89% na aminokisjelinom nivou) sa sekvencama izolata ovog virusa iz GenBank, što je potvrdilo pripadnost naših izolata vrsti OYDV na osnovu demarkacionih kriterijuma za razdvajanje vrsta *Potyvirus* roda (**Verdaguer et al., 1997; Shukla and Ward, 1988; King et al., 2011**).

Međusobnim poređenjem sekvence izolata OYDV porijeklom iz različitih vrsta lukova iz Srbije ustanovljen je značajan diverzitet 80,2-100% nt sličnosti, što je pokazalo i filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu ukupno 95 sekvenci ovog virusa porijeklom iz različitih djelova svijeta. U filogenetskom stablu izdvojile su se dvije grupe koje se dalje mogu podeliti na osam podgrupa. Izgled filogenetskog stabla donekle je uslovljen geografskim porijeklom izolata, kao i biljkom domaćinom uz manje izuzetke (**Chen et al., 2002; Parrano et al., 2012; Bereda et al., 2015**). Naši izolati grupisali su se u okviru četiri podgrupe, od čega je podgrupa VIII samo sa izolatima iz bijelog luka iz Srbije. Podgrupu VII u filogenetskom stablu činili su većinom izolati sa crnog luka, porijeklom iz Srbije, kao i izolati iz Italije, Argentine, Holandije i Njemačke. Izuzeci u ovoj podgrupi su bila tri izolata iz bijelog luka iz Srbije i Argentine, kao i dva izolata porijeklom iz ljutike iz Srbije. Ostali izolati iz Srbije većinom su se svrstali u podgrupu I sa izolatima iz Italije, Poljske, Japana i Argentine. Ovu podgrupu izolata čine samo izolati iz bijelog luka, uz izuzetak jednog izolata iz crnog luka iz Srbije. Podgrupu VI je činio jedan izolat porijeklom iz Srbije iz bijelog luka sa izolatom porijeklom iz Izraela. Izolati OYDV iz Srbije koji pripadaju određenoj podgrupi nijesu ograničeni na određenu regiju Srbije, već su raspoređeni širom zemlje, što ukazuje na intenzivnu trgovinsku razmjenu biljnog materijala u našoj zemlji. Takođe, grupisanje srpskih izolata u različite podgrupe, zajedno sa izolatima ovog virusa iz različitih, često veoma udaljenih djelova svijeta ukazuje na više introdukcija

ovog virusa u Srbiju, što je u skladu sa intenzivnim uvozom sadnog materijala bijelog, ali i crnog luka. Visok nivo diverziteta između izolata OYDV iz Srbije ukazuje da je ovaj virus odavno prisutan u našoj zemlji i da na oblikovanje populacije ovog virusa utiče intenzivan protok gena, kako iz različitih dijelova svijeta, tako i među različitim *Allium* vrstama, ali i evolutivne sile, kao što su mutacije i rekombinacije, a upravo su rekombinacije najznačajniji mehanizam adaptacija virusa na nove domaćine (**Garcia-Arenal et al., 2001; Li and Roossinck, 2004; Chikh Ali et al., 2007; Baghalian et al., 2010; Lian et al., 2013**). Ova istraživanja su pokazala da iako postoji značajan genetski diverzitet između ispitivanih sekvenci OYDV iz Srbije, filogenetsko grupisanje izolata iz crnog zajedno sa izolatima iz bijelog luka iz Srbije ukazuje i na protok gena između glavnih domaćina ovog virusa. Značajan uticaj na oblikovanje populacije ima i efekat uskog grla (*bottleneck*) do kog dolazi prilikom sistemične infekcije virusom, a koji za posljedicu ima ograničen i veoma mali broj varijanti virusa koji kolonizuju novo tkivo koje se koristi za vegetativnu propagaciju kod bijelog luka. Ovaj proces dovodi do *founder effect*, kojim se može objasniti manja varijabilnost kod bijelog luka koji se razmnožava lukovicama (**Jridi et al., 2006; Parrano et al., 2012**).

Pojedini autori, na osnovu bioloških i genetičkih analiza, ukazuju na postojanje velikog diverziteta između izolata OYDV iz bijelog i crnog luka, kao i na potrebu detaljne analize i razjašnjava taksonomskih međuodnosa između OYDV izolata porijeklom sa različitih *Allium* vrsta (**Celli et al., 2013; Mangli et al., 2014**), međutim, na osnovu demarkacionih kriterijuma za familiju *Potyviriidae* ipak se radi samo o sojevima jednog istog virusa (**King et al., 2011**).

#### **6.4.3. Molekularna ispitivanja LYSV**

Upotrebom para prajmera 1LYSV i 2LYSV koji umnožavaju dio gena za nuklearne inkluzije, kao i kompletan CP gen, umnoženi su fragmenti očekivane veličine od 1020 bp kod različitih vrsta lukova. Korišćeni prajmeri su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju različitih izolata ovog virusa, a poznato je da je tačna i brza detekcija početni korak ka uspješnoj kontroli oboljenja koje ovaj virus izaziva. Prajmeri 1LYSV/2LYSV (**Fajardo et al., 2001**) korišćeni u ovim istraživanjima pokazali su se uspješnim za detekciju LYSV (**Fidan and Baloglu, 2009; Vučurović et al., 2016; Vučurović et al., 2017**).

Odabrani LYSV izolati porijeklom iz različitih lokaliteta u Srbiji, sekvencirani su i upoređena je njihova genetička sličnost međusobno, kao i sa izolatima ovog virusa iz drugih dijelova svijeta dostupnih u GenBank bazi. Sličnost sekvenci tri odabrana izolata LYSV iz Srbije bila je preko 90% na nukleotidnom nivou (preko 94% na aminokisjelinskom nivou) sa sekvencama izolata ovog virusa iz GenBank, što je potvrdilo pripadnost naših izolata vrsti LYSV na osnovu demarkacionih kriterijuma za razdvajanje vrsta *Potyvirus* roda (**Verdaguer et al.**, 1997; **Shukla and Ward**, 1988; **King et al.**, 2011).

Analizom sekvenci izolata LYSV iz Srbije porijeklom iz različitih domaćina i lokaliteta utvrđeno je postojanje značajnog stepena genetičkog diverziteta između njih. Rekonstruisano filogenetsko stablo, takođe je pokazalo visok diverzitet među sekvencama ovog virusa iz Srbije. Iako priroda ovog diverziteta i dalje nije jasna, postoje faktori koji mogu da utiču na sastav prirodne populacije nekog virusa u određenom području, a to su: geografske barijere koje razdvajaju populacije virusa i domaćine, osjetljivost biljaka ili njihovih tkiva, kao i to da li su infekcije lokalnog ili sistemskog karaktera (**Takaki et al.**, 2005; **Li and Roossinck**, 2004). Bez obzira na ove faktore, istraživanja ukazuju da se izolati LYSV donekle grupišu na osnovu geografskog porijekla ili biljke domaćina (**Chen et al.**, 2002; **Parrano et al.**, 2012). Struktura filogenetskog stabla dobijenog u ovom radu je slična stablima koje su dobili **Takaki et al.** (2005) i **Parrano et al.** (2012), a na osnovu njih svjetska populacija ovog virusa se dijeli u tri glavne grupe označene kao A, B i C (**Parrano et al.**, 2012). Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu djelimičnog CP gena 52 sekvence LYSV, uključujući i tri sekvence LYSV iz Srbije pokazalo je grupisanje izolata ovog virusa u 5 grupa, što je podržano visokim bootstrap vrijednostima. Dva izolata iz Češke Republike nijesu svrstana ni u jednu od grupa, što ukazuje na politomiju, odnosno na nedostatak genetičkih informacija koje bi mogle da ukažu na porijeklo ovih sekvenci, kao i njihovu preciznu evolutivnu povezanost sa drugim sekvencama ovog virusa. Vrijednosti genetičkog diverziteta u okviru grupa A, B i C su bile niske i ukazale su na visoku sličnost ovih sekvenci u odnosu na sekvence D, a naročito E grupe. Ipak, međugrupne sličnosti su bile niže od grupnih, čime je potvrđeno grupisanje u pet grupa u stablu. Veće razlike u okviru grupa D i E ukazuju da su te populacije evolutivno "starije" u odnosu na one gdje je sličnost veća (**Garcia-Arenal et al.**, 2001). Grupisanje sekvenci u

okviru stabla je na osnovu geografskog principa, uz manje izuzetke. U okviru grupe A su sekvence iz Italije, kao i jedan izuzetak, sekvenca iz Izraela. Grupisanje na osnovu geografskog porijekla može da ukaže na migracije virusa, kao i na različite evolutivne sile koje oblikuju populaciju virusa, kao što je slučaj kod virusa prstenaste pjegavosti papaje (*Papaya ringspot potyvirus*, PRSV) i LYSV (Bateson et al., 1994; Takaki et al., 2005). Neke grupe su se formirale na osnovu biljke domaćina, pa je grupa C od izolata iz bijelog luka, a D iz praziluka. Izolati LYSV iz Srbije su se grupisali u veoma udaljenje grupe B, D i E, što ukazuje da je ovaj virus odavno prisutan i rasprostranjen u našoj zemlji. Takođe, i dva izolata iz praziluka iz Srbije su se grupisala u okviru udaljenih grupa. Izolat 298-13 je u grupi B sa izolatima iz bijelog luka, a izolat 273-13 je u grupi D sa drugim izolatima iz praziluka. Grupisanje izolata iz praziluka sa izolatim iz bijelog luka ukazuje na protok gena između ovih usjeva, što se može objasniti prenošenjem vašima. Izolat ovog virusa iz Argentine sa praziluka je mogao biti prenijet na bijeli luk i vašima i mehanički (Lunello et al., 2007).

#### 6.4.4. Molekularna ispitivanja GarCLV

Upotrebom para prajmera 1-GCLV i 2-GCLV (Parrano et al., 2012) koji umnožavaju kompletan CP gen, dobijeni su fragmenti očekivane veličine od 960 bp kod izolata porijeklom iz različitih vrsta lukova iz Srbije. Korišćeni prajmeri su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju različitih izolata ovog virusa.

Odabrani izolati GarCLV porijeklom sa različitih lokaliteta u Srbiji, sekvencirani su i upoređena je njihova genetička sličnost međusobno, kao i sa izolatima ovog virusa iz drugih dijelova svijeta dostupnih u GenBank bazi. Sličnost sekvenci četiri odabrana izolata GarCLV iz Srbije bila je preko 83% na nukleotidnom nivou (preko 86% na aminokisjelinom nivou) sa sekvencama izolata ovog virusa iz GenBank, što je potvrdilo pripadnost izolata porijeklom iz Srbije vrsti GarCLV na osnovu demarkacionih kriterijuma za razdvajanje vrsta *Carlavirus* roda (Adams et al., 2012).

Analiza sekvenci GarCLV iz Srbije porijeklom iz bijelog luka i praziluka pokazala je postojanje određenog stepena diverziteta kod ovog virusa. Takođe, i rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na diverzitet populacije ovog virusa. Mnoga istraživanja ukazuju da je GarCLV najčešći virus na bijelom luku (Van Dijk, 1993a; Tsuneyoshi et al., 1998; Klukáčková et al., 2007). S obzirom da se bijeli luk

razmnožava isključivo vegetativno, smatra se da se virusi na taj način prenose iz generacije u generaciju, kao i da je najvjerojatnije sav sadni materijal zaražen virusima, što doprinosi širenju ovog virusa putem intenzivne razmjene sadnog materijala širom svijeta (**Van Dijk**, 1993a). Rekonstruisano filogenetsko stablo potvrdilo je grupisanje izolata ovog virusa, na osnovu geografskog porijekla, u dvije grupe označene kao I i II, što je u skladu sa rezultatima **Pramesh and Baranwal** (2013). Izolat X81138 sa bijelog luka iz Njemačke samostalno je formirao odvojenu grupu III, kao što je slučaj u istraživanjima **Tsuneyoshi et al.** (1998) i **Torrìco et al.** (2015). Izolati GarCLV iz Srbije grupisali su se u okviru grupe I sa izolatima iz Poljske, Kine, SAD i jednim izolatom sa Tajvana. **Torrìco et al.** (2015) pretpostavljaju da izolati grupe I u filogenetskom stablu, kojoj pripadaju i izolati iz Srbije, vode porijeklo iz Kine. Izolat GarCLV iz praziluka iz Srbije donekle se samostalno izdvojio u okviru grupe I, bliže grupi izolata iz SAD, što može da ukaže na uticaj biljke domaćina na grupisanje, dok su se izolati iz bijelog luka iz Srbije grupisali zajedno sa izolatima iz Poljske. Osim toga, ovo može da ukaže i na dvije potencijalne introdukcije GarCLV u Srbiju. Drugu grupu izolata činili su izolati porijeklom iz Australije, Njemačke, Južne Koreje i Indije, kao i izolati iz Brazila i Argentine za koje se smatra da su upravo porijeklom iz ovih zemalja (**Torrìco et al.**, 2015). Zajedničko grupisanje izolata iz geografski veoma udaljenih dijelova svijeta može da ukaže na značaj konstantne razmjene vegetativnog propagativnog materijala bijelog luka širom svijeta, putem međunarodne trgovine, ali takođe iziskuje buduća opsežna ispitivanja kako bi se detaljno utvrdilo porijeklo izolata ovog virusa, odnosno sprovele adekvatne mjere kontrole.

#### **6.4.5. Molekularna ispitivanja IYSV**

Upotrebom para prajmera IYSV56U i IYSV917L koji umnožavaju gen za nukleokapsid, umnoženi su fragmenti očekivane veličine od 896 bp kod dvije različite vrste luka. Korišćeni prajmeri su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju različitih izolata ovog virusa. Prajmeri IYSV56U/IYSV917L (**Robène-Soustrade et al.**, 2006) korišćeni u ovim istraživanjima pokazali su se uspješnim za detekciju IYSV (**Bulajić et al.**, 2008; **Trkulja et al.**, 2013b; **Trkulja et al.**, 2013c).

#### 6.4.6. Molekularna ispitivanja TSWV

Upotrebom para prajmera TSWVCP-f i TSWVCP-r koji umnožavaju dio gena za nukleokapsid, umnoženi su fragmenti očekivane veličine od 738 bp kod izolata porijeklom iz različitih vrsta lukova. Korišćeni prajmeri su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju različitih izolata ovog virusa. Prajmeri TSWVCP-f/TSWVCP-r (Vučurović et al., 2012) korišćeni u ovim istraživanjima pokazali su se uspješnim za detekciju TSWV porijeklom i iz drugih biljaka domaćina (Vučurović et al., 2012; Nikolić et al., 2013; Stanković et al., 2013; Trkulja et al., 2013a; Bulajić et al., 2014; Delić et al., 2018; Kohnić et al., 2018; Nikolić et al., 2018).

#### 6.4.7. Molekularna ispitivanja SLV

Upotrebom para prajmera SLV-F-design i SLV-R-design dizajniranih u ovim istraživanjima koji umnožavaju dio gena za CP, umnoženi su fragmenti očekivane veličine od 950 bp kod izolata porijeklom iz dvije različite vrste luka. Korišćeni prajmeri su se pokazali pogodnim za rutinsku detekciju različitih izolata ovog virusa. Potreba za dizajniranjem novih prajmera za detekciju SLV se javila zbog nemogućnosti umnožavanja svih izolata SLV porijeklom iz Srbije ranije opisanim prajmerima (Majumder et al., 2008) za detekciju ovog virusa, a i kako bi se obuhvatio što veći dio CP gena koji je pogodan za identifikaciju izolata ovog virus. Upotrebom dizajniranih prajmera umnoženi su amplikoni odgovarajuće veličine kod sva tri ispitivana izolata SLV iz Srbije čime je unaprijeđena detekcija ovog virusa i stvoren preduslov za dalju karakterizaciju izolata ovog virusa porijeklom iz Srbije.

Odabrani SLV izolati porijeklom iz različitih lokaliteta u Srbiji, sekvencirani su i upoređena je njihova genetička sličnost međusobno, kao i sa izolatima ovog virusa iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi. Sličnost sekvenci dva odabrana izolata SLV iz Srbije bila je preko 83% na nukleotidnom nivou (preko 96% na aminokisjelinom nivou) sa sekvencama izolata ovog virus iz GenBank, što je potvrdilo pripadnost naših izolata vrsti SLV na osnovu demarkacionih kriterijuma za razdvajanje vrsta *Carlavirus* roda (Adams et al., 2012). Analiza sekvenci SLV iz Srbije porijeklom iz bijelog luka pokazala je da izolati SLV porijeklom iz Srbije dijele 79,6% nt sličnosti.

#### 6.4.8. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija vrsta roda *Allexivirus*

Primjenom para prajmera ALLEX1/ALLEX2 koji omogućavaju umnožavanje dijela *Nucleic acid binding protein* gena (NABP) i 3'UTR regiona došlo je do umnožavanja fragmenta, odgovarajuće veličine od 183 do 192 bp, kod svih ispitivanih izolata iz bijelog luka iz Srbije. Ovi prajmeri su univerzalni i omogućavaju detekciju svih vrsta roda *Allexivirus* (Dovas et al., 2001a). Tako je primjenom ovih prajmera dokazano prisustvo virusa u 85,9% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju virusa roda *Allexivirus* do nivoa roda, kao što je i dokazano (Cafrune et al., 2006) i da mogu da posluže kao polazna osnova za detekciju prisustva i rasprostranjenosti virusa ovog roda.

Dalje analize bile su usmjerene ka identifikaciji pojedinačnih vrsta unutar roda, kao i detaljnijoj karakterizaciji detektovanih virusa. Tako primjenom para prajmera ACPF/ACPR (Chodorska et al., 2013) koji umnožavaju dio CP i NABP gena GarV-A, došlo je do umnožavanja amplikona odgovarajuće veličine 441 bp kod 20% analiziranih izolata porijeklom iz bijelog luka iz Srbije. Slične rezultate ispitivanja prisutnosti GarV-A dokazala je Chodorska et al. (2013). Ovaj virus se pokazao kao najzastupljeniji predstavnik roda, ali i uzročnik značajnih gubitaka u proizvodnji bijelog luka u različitim djelovima svijeta (Cafrune et al., 2006; Oliveira et al., 2014). GarV-A je vrsta koja može da uzrokuje značajno smanjenje prinosa bijelog luka od 14% do 32% (Cafrune et al., 2006). Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-A, kao što je predložila Chodorska et al. (2013) i da mogu da posluže kao polazna osnova za dalju karakterizaciju virusa. Odabrani izolati GarV-A porijeklom sa različitih lokaliteta u Srbiji, sekvencirani su i upoređena je njihova genetička sličnost međusobno, kao i sa izolatima ovog virusa iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi. Sličnost sekvenci šest odabranih izolata GarV-A iz Srbije bila je preko 86,57% na nukleotidnom nivou sa sekvencama izolata ovog virus iz GenBank, ovo je potvrđuje pripadnost izolata iz Srbije virusu GarV-A po predlogu Adams et al. (2011) da 72% nukleotidne, odnosno 80% aminokisjelinske sličnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Allexivirus*.

Analiza sekvenci GarV-A iz Srbije porijeklom iz bijelog luka pokazala je postojanje određenog stepena diverziteta kod ovog virusa (84,1-100% nt, odnosno 95,2%-100%, aa sličnosti). Analiza nukleotidnih sekvenci GarV-A kao i rekonstruisano filogenetsko stablo ukazali su na određeni stepen diverziteta populacije ovog virusa porijeklom iz bijelog luka iz Srbije. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom radu sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da izolati iz Srbije imaju najviše sličnosti sa izolatima porijeklom iz Australije, Poljske i Kine. U rekonstruisanom filogenetskom stablu izdvojilo se pet grupa, a topologija stabla je u skladu sa rezultatima **Oliveira et al.** (2014). Većina izolata iz Srbije se grupisala u okviru grupa II i III, dok je jedan izolat (518-15) formirao posebnu grupu IV što ukazuje na nedostatak filogenetski značajnih informacija koje bi ukazale na bliže grupisanje ovog izolata, kao i na njegovu vezu sa ostalim izolatima ovog virusa iz Srbije. Tri izolata GarV-A iz Srbije su se grupisala u okviru grupe II zajedno sa jednim izolatom iz Australije. Ostala dva izolata iz Srbije, zajedno sa izolatima iz Japana, Australije, Južne Koreje i Brazila čine filogenetski najraznovrsniju grupu III u okviru populacije GarV-A. Izolat iz Španije koji čini grupu V na osnovu izgleda stabla, odnosno dužine grane, se smatra jednim od osnovnih izolata iz kojih se razvijala populacija ovog virusa, odnosno izolatom koji je najbliži predačkom izolatu (izolatu ancestoru) (**Wylie et al.**, 2014; **Oliveira et al.**, 2014; **Bereda et al.**, 2017). Grupisanje izolata iz Srbije u različite grupe, sa izolatima iz različitih djelova svijeta, može da ukaže na više potencijalnih introdukcija ovog virusa u Srbiju. S obzirom na ograničen broj informacija koje se odnose na strukturu populacije ovog virusa na međunarodnom nivou, jasno je da je neophodno uključiti veći broj sekvenci kako bi se dobila što realnija slika populacije GarV-A. Detaljna, sveobuhvatna analiza populacije ovog virusa dala bi odgovore na pitanja vezana za porijeklo ovog virusa, kao i puteve njegovog širenja i introdukcije u različite krajeve svijeta. Dosadašnja ispitivanja pokazuju da na širenje ovog virusa značajan uticaj ima međunarodna trgovina, pa čak i trgovina konzumnim lukovicama, jer se i one često koriste za zasnivanje novih usjeva, i mogu biti odgovorne za unošenje novih virusa u neku zemlju (**Melo-Filho et al.**, 2004).

Primjenom para prajmera BCPF/BCPR (**Chodorska et al.**, 2013) koji umnožavaju dio CP i NABP gena GarV-B, došlo je do umnožavanja amplicona od 576



bp kod 80% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja, što je ujedno i procentualno najzastupljenija vrsta roda *Allexivirus* na bijelom luku u Srbiji. **Chodorska et al.** (2013) navodi podatak o zastupljenosti GarV-B od 54% u Poljskoj, dok **Bereda et al.** (2017) navodi prisutnost GarV-B od 15%. U Poljskoj GarV-B je bio treći po zastupljenosti virus u 2012. godini, odnosno četvrti po zastupljenosti u 2016. godini (**Chodorska et al.**, 2013; **Bereda et al.**, 2017). Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-B i kao što je predložila **Chodorska et al.** (2013) mogu da posluže kao polazna osnova za dalju karakterizaciju virusa.

Genetička sličnost odabranih izolata GarV-B porijeklom iz bijelog luka iz Srbije, ispitana je međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci, koje je pokazalo da odabrani izolati dijele 90,1-99,8% nt, odnosno 74%-99,2% aminokisjelinke sličnosti.

BLAST analiza je pokazala 86,57-90,93% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Ovim je potvrđena pripadnost izolata iz Srbije virusu GarV-B po predlogu **Adams et al.** (2011) da 72% nukleotidne, odnosno 80% aminokisjelinke sličnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Allexivirus*.

Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinke divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom radu sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da naši izolati imaju najviše sličnosti sa izolatima porijeklom iz Češke. Izolati GarV-B iz Srbije ukazali su na postojanje diverziteta u okviru populacije ovog virusa u Srbiji, što je potvrđeno i filogenetskim analizama. Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazalo je podjelu populacije ovog virusa u tri grupe, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (**Oliveira et al.**, 2014) uz izdvajanje nove grupe izolata, označene kao grupa II u koju se svrstalo pet izolata iz Srbije. Preostali izolat iz Srbije grupisao se u okviru grupe III sa izolatima iz Brazila i Australije. Većina autora ukazuje na nedostatak genetičke diferencijacije između vrsta roda *Allexivirus*, kao i na invazivan protok gena (*gene flow*) kod vrsta ovog roda kako između udaljenih djelova svijeta, različitih država, tako i u okviru regija iste države (**Koo et al.**, 2002; **Chen et al.**, 2004; **Melo-Filho et al.**, 2004; **Wylie et al.**, 2012; **Wylie et al.**, 2014; **Bereda et al.**, 2017).

Primjenom para prajmera CCPF/CCPR (**Chodorska et al.**, 2013) koji umnožavaju dio CP i NABP gena GarV-C, došlo je do umnožavanja amplikona od 665 bp kod 57,1% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja, što ukazuje da je GarV-C drugi virus iz roda *Allexivirus* po zastupljenosti na bijelom luku u Srbiji. **Chodorska et al.** (2013) navodi podatak o zastupljenosti GarV-C od 13,21%, što je značajno manje nego prisustvo koje je zabilježeno u Srbiji. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-C i kao što je predložila **Chodorska et al.** (2013) mogu da posluže kao polazna osnova za dalje analize.

Genetička sličnost odabranih izolata GarV-C porijeklom iz bijelog luka iz Srbije, ispitana je međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci, koje je pokazalo da odabrani izolati dijele 90,2-99,7% nt, odnosno 94,5%-99,5%, aminokisjelinke sličnosti.

BLAST analiza je pokazala 94,09-95,69% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Ovim je potvrđena pripadnost izolata iz Srbije GarV-C po predlogu **Adams et al.** (2011) da 72% nukleotidne, odnosno 80% aminokisjelinke sličnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Allexivirus*.

Kao i kod GarV-A i GarV-B, i sekvence GarV-C su ispoljile izvjestan stepen nukleotidnog diveziteta, a višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinke divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom radu sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da naši izolati imaju najviše sličnosti sa izolatima porijeklom iz Češke. U rekonstruisanom filogenetskom stablu izolati GarV-C iz Srbije grupisali su se u okviru tri grupe. Grupa I se sastojala od izolata iz Brazila i četiri izolata iz Srbije, dok je grupa II sadržala samo četiri izolata iz Srbije. Preostali izolat iz Srbije grupisao se sa izolatom iz Brazila u okviru grupe IV. Treba istaći da je izolat iz Australije (JN019814) sam formirao udaljenu grupu VI i na osnovu filogenetskog stabla možda se ne mora smatrati izolatom ove vrste, što zajedno sa velikim nukleotidnim razlikama vjerovatno ukazuje da ovaj dio genoma nije dovoljan kriterijum za klasifikaciju predstavnika ove vrste (**Adams et al.**, 2012; **Oliveira et al.**, 2014).

Primjenom para prajmera DCPF/DCPR (**Chodorska et al.**, 2013) koji umnožavaju dio CP i NABP gena GarV-D, došlo je do umnožavanja amplikona od 456

bp kod 5,7% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. **Chodorska et al.** (2013) navodi podatak o zastupljenosti GarV-D od 83,68%, dok **Bereda et al.** (2017) takođe navodi veoma visoku prisutnost GarV-D od 96% na bijelom luku. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-D, kao što je predložila **Chodorska et al.** (2013) i da mogu da posluže kao polazna osnova za dalju karakterizaciju virusa.

Genetička sličnost odabranih izolata GarV-D porijeklom iz bijelog luka iz Srbije, ispitana je međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci, koje je pokazalo da odabrani izolati dijele 97,6% nt, odnosno 96,8% aminokisjelinske sličnosti.

BLAST analiza je pokazala 86,68-98,43% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank bazi podataka. Ovim je potvrđena pripadnost izolata iz Srbije GarV-D po predlogu **Adams et al.** (2011) da 72% nukleotidne, odnosno 80% aminokisjelinske sličnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Allexivirus*.

Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokisjelinske divergentnosti sekvenci dobijenih u ovom radu sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da naši izolati imaju najviše sličnosti sa izolatima porijeklom iz Rusije, Češke i Mađarske. Izolati GarV-D pokazali su najmanji diverzitet u rekonstruisanom filogenetskom stablu. Dva izolata iz Srbije formirala su grupu IV odvojenu od ostale tri grupe (I, II i III) izolata ovog virusa, koje su sadržale izolate iz Australije, Brazila, Argentine, Japana i Južne Koreje. Ovakav izgled stabla je u skladu sa rezultatima **Oliveira et al.** (2014). I druga istraživanja strukture populacije GarV-D, pokazala su nizak stepen diverziteta što ukazuje da je cijela populacija ovog virusa bliska izolatu pretku (ancestoru) *Allexivirus*-a (**Bereda et al.**, 2015; **Bereda et al.**, 2017).

Istraživanja vezana za karakterizaciju virusa roda *Allexivirus* sprovedena u okviru ove doktorske disertaciji dala su prvi uvid u strukturu populacije virusa ovog roda prisutnih u našoj zemlji. Takođe, ukazala su na značajno mjesto koje ovi virusi zauzimaju u okviru kompleksa virusnih oboljenja na bijelom luku, s obzirom na njihovo prisustvo i rasprostranjenost.

Primjenom para prajmera EF2/ER2 (**Chodorska et al.**, 2013) koji umnožavaju dio gena za replikazu GarV-E, došlo je do umnožavanja amplikona od 386 bp kod

17,1% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. **Chodorska et al.** (2013) navodi podatak o zastupljenosti GarV-E od 50,75%. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-E i kao što je predložila **Chodorska et al.** (2013) mogu da posluže kao polazna osnova za dalje analize.

Primjenom para prajmera XF/XR (**Chodorska et al.**, 2013) koji umnožavaju dio gena za replikazu GarV-X, došlo je do umnožavanja amplikona od 456 bp kod 48,6% uzoraka bijelog luka sakupljenih tokom ovih istraživanja. **Chodorska et al.** (2013) navodi podatak o zastupljenosti GarV-X od 67% u usjevu bijelog luka u Češkoj Republici. Rezultati ovih istraživanja su pokazala da su odabrani prajmeri odgovarajući za uspješnu detekciju GarV-X i kao što je predložila **Chodorska et al.** (2013) mogu da posluže kao polazna osnova za dalje analize.

Tokom ovih istraživanja kao najučestaliji virus roda *Allexivirus* dokazan je GarV-B detektovan u 80% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Kao drugi najučestaliji javio se GarV-C detektovan u 57,1% ispitivanih uzoraka bijelog luka, dok je treći po zastupljenosti bio je GarV-X detektovan u 48,6% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Četvrti i peti virusi po zastupljenosti bili su GarV-A detektovan u 20% i GarV-E detektovan u 17,1% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Kao najmanje zastupljen virus roda *Allexivirus*, u ovom istraživanju, javio se GarV-D detektovan u 5,7% ispitivanih uzoraka bijelog luka. Virusi roda *Allexivirus* javljaju se u pojedinačnim i u miješanim infekcijama. Najčešće miješane infekcije su bile sa tri virusa detektovane u 34,3% ispitivanih uzoraka, kao i u istraživanju koje je sprovela **Chodorska et al.** (2013). Dvostruke i četvorostruke infekcije detektovane su u 14,3% ispitivanih uzoraka bijelog luka, a petostruke infekcije javile su se u 2,9% ispitivanih uzoraka bijelog luka. **Bereda et al.** (2017) navodi podatak u svojim istraživanjima da nije bilo pojedinačnih infekcija, dok su u ovom istraživanju pojedinačne infekcije detektovane u 20% ispitivanih uzoraka bijelog luka.

Isključivo vegetativno razmnožavanje bijelog luka je najvjerovatniji način prenošenja virusa roda *Allexivirus* iz vegetacije u vegetaciju, pa se tako za skoro sav sadni materijal smatra da je zaražen virusima, a da intenzivna razmjena sadnog materijala doprinosi njihovoj rasprostranjenosti širom svijeta (**Van Dijk**, 1993a). Razna istraživanja su pokazala da ne postoji dominantna vrsta *Allexivirus*-a koja se javlja sa

većom učestalošću (**Dovas et al., 2001a; Chodorska et al., 2013; Bereda et al., 2017**). Značajan faktor u prenošenju ovih virusa je grinja *Aceria tulipae* koja prenosi *Allexivirus*-e, kako u polju tako i u skladištu (**Fayad-Andre et al., 2011; Bereda et al., 2017**). Ovi virusi, koji ne samo da mogu zaraziti biljke u polju, već i tokom skladištenja ili transporta, značajno utiču na proizvodnju bijelog luka i zbog toga je neophodno voditi računa prilikom skladištenja i transporta merkantilnog bijelog luka, a pogotovo sjemenskog materijala (**Bereda et al., 2017**).

Istraživanja vezana za detekciju, identifikaciju i karakterizaciju vrsta roda *Allexivirus* sprovedena u okviru ove disertacije nedvosmisleno ukazuju na značaj virusa ovog roda na bijelom luku u Srbiji. Takođe, prve informacije vezane za filogenetske međuodnose u okviru GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D ukazuju na veliki uticaj internacionalne trgovine sadnim i merkantilnim materijalom na diverzitet populacija i širenje ovih virusa. Dio gena za replikazu, koji umnožavaju prajmeri korišćeni za detekciju GarV-E i GarV-X, pokazao se kao pogodan za uspješnu detekciju ova dva virusa, ali nije dobar za njihovu dalju identifikaciju i karakterizaciju. Dobijeni rezultati predstavljaju dobru polaznu osnovu za implementaciju novih metoda detekcije kao što su one zasnovane na *High throughput sequencing* (HTS), kao i usavršavaju postojećih u cilju brze i pouzdane detekcije i identifikacije virusa *Allexivirus* roda. Dalja istraživanja *Allexivirus*-a u Srbiji trebaju da se baziraju na rasvjetljavanju najznačajnijih epidemiološki karakteristika, kao i pronalaženju prevalentnih sojeva i vrsta na kojima bi trebalo da se zasniva selekcija na otpornost, ali i definišu integralne mjere kontrole, kako bi se spriječile značajne štete koje ovi virusi mogu da prouzrokuju u proizvodnji bijelog luka u Srbiji.

## 7. ZAKLJUČAK

Sedmogodišnja istraživanja (2010-2016) prisustva i rasprostranjenosti virusa lukova u Srbiji ukazala su na stalno prisustvo virusa u usjevima lukova. Virusi predstavljaju ozbiljnu prijetnju proizvodnji različitih vrsta lukova, a prije svega bijelog i crnog luka i praziluka. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na raznovrsnost virusa lukova u Srbiji, kako u pogledu njihove zastupljenosti i rasprostranjenosti tako i u pogledu ispoljenih razlika na molekularnom nivou. Procijenjeni intezitet zaraze mijenjao se tokom ispitivanja i kretao se od niskog tokom 2010. pa sve do jako visokog 2014. godine kada je u pojedinim lokalitetima dostizao i 90%.

Pregledom 111 lokaliteta gajenja različitih vrsta lukova uključujući crni i bijeli luk, praziluk, ali i manje zastupljene vrste kao što su biser luk, ljutika, vlasac i sreмуš, zabilježena je pojava raznovrsnih simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu. Najčešće uočeni simptomi javljali su se na lišću koje je ispoljavalo hromatske promjene, tipa mozaika, prugavosti i crtičavosti, praćeni često promjenama opšteg izgleda biljaka u vidu zaostajanja u porastu i kržljivosti.

Serološkim analizama 374 uzorka sakupljena tokom ovih istraživanja utvrđeno je prisustvo pet virusa: OYDV, GarCLV, LYSV, IYSV i TSWV, kako u pojedinačnim tako i miješanim infekcijama. Pojava i zastupljenost detektovanih virusa lukova varirali su od godine do godine i mijenjali su se u zavisnosti od godine ispitivanja, ali i lokaliteta gajenja i vrste luka. Samo je prisustvo OYDV i GarCLV dokazano u svim godinama ispitivanja, dok je prisustvo LYSV dokazano u pet godina, TSWV u tri, a IYSV u dvije godine ispitivanja. Ukupno posmatrano, najzastupljeniji virus u usjevima različitih vrsta lukova bio je OYDV. Takođe, utvrđeno je i značajno prisustvo GarCLV, dok je treći po zastupljenosti bio LYSV. Najrasprostranjeniji virus na svim pregledanim lokalitetima bio je GarCLV, a drugi po rasprostranjenosti bio je OYDV. Serološkim analizama na crnom luku dokazano je prisustvo svih pet virusa (OYDV, LYSV, GarCLV, TSWV i IYSV), a najzastupljeniji i najrasprostranjeniji bio je GarCLV. Na bijelom luku dokazano je prisustvo četiri virusa (OYDV, LYSV, GarCLV i TSWV), a najučestaliji i najrasprostranjeniji bio je OYDV. Na praziluku dokazano je prisustvo dva virusa (LYSV i GarCLV), a najzastupljeniji i najrasprostranjeniji virus bio je LYSV. Na

ljutiki i biser luku dokazano prisustvo OYDV, LYSV i GarCLV, a na aljmi je dokazan i TSWV i SLV. Na vlasцу je dokazano prisustvo GarCLV i LYSV, a na sremušu OYDV.

Usled nedostatka podataka o prisustvu i rasprostranjenosti virusa lukova u našoj zemlji, mnogi od ovih podataka predstavljaju uopšte prvi nalaz nekog virusa u našoj zemlji ili na novom domaćinu kod nas. Prvi put je dokazano prisustvo GarCLV na bijelom i crnom luku, praziluku, ljutiki, vlasцу i biser luku, OYDV na ljutiki, aljmi, biser luku i sremušu, LYSV na praziluku, crnom luku, ljutiki, vlasцу i biser luku, kao i TSWV i IYSV na aljmi.

Prisustvo svih serološki detektovanih virusa potvrđeno je i primjenom RT-PCR metode uz korišćenje odgovarajućih prajmera čime je unaprijeđena detekcija virusa lukova u našoj zemlji. Osim toga, primjenom molekularnih metoda prvi put su detektovani SLV na bijelom luku i aljmi, kao i virusi roda *Allexivirus* u usjevu bijelog luka.

Prisustvo virusa *Allexivirus* roda dokazano je u 85,9% testiranih uzoraka bijelog luka. Dokazano je prisustvo šest vrsta roda *Allexivirus*: GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X. Kao najzastupljeniji virus detektovan je GarV-B dokazan u 80% testiranih uzoraka. Virusi roda *Allexivirus* dokazani su u pojedinačnim i miješanim infekcijama, od kojih u najvećem procentu miješane infekcije sa tri virusa roda *Allexivirus*.

Razvijena je brza i pouzdana metoda za simultanu detekciju OYDV, LYSV, GarCLV, SLV i virusa roda *Allexivirus*, čime je unaprijeđena detekcija virusa lukova u dijagnostičkim laboratorijama.

Molekularna identifikacija tri najzastupljenija i najrasprostranjenija virusa lukova, OYDV, GarCLV i LYSV, kao i novo detektovanih virusa za našu zemlju SLV i vrsta roda *Allexivirus* obavljena je nakon sekvenciranja odgovarajućih genskih regiona i proračunom genetičkog diverziteta sa sekvencama izolata odgovarajućeg virusa deponovanih u GenBank bazi.

Analizom 25 sekvenci CP gena izolata OYDV iz Srbije utvrđen je visok stepen diverziteta sekvenci izolata ovog virusa, što pokazuje i filogenetsko stablo u kojem su se izolati OYDV iz Srbije svrstali u različite podgrupe. Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazalo je grupisanje u dvije grupe sa osam podgrupa, a izolati OYDV iz Srbije su se grupisali u četiri podgrupe, od čega je jedna podgrupa bila samo sa izolatima OYDV iz

bijelog luka iz Srbije. Grupisanje izolata iz Srbije u različite podgrupe, zajedno sa izolatima ovog virusa iz različitih, često veoma udaljenih djelova svijeta ukazuje na više introdukcija ovog virusa u Srbiju, zatim da je ovaj virus odavno prisutan u našoj zemlji i da na oblikovanje populacije ovog virusa utiče intenzivan protok gena, kako iz različitih djelova svijeta, tako i među različitim *Allium* vrstama.

Analiza tri sekvence CP gena izolata LYSV sa različitih biljnih vrsta iz Srbije pokazala je značajan stepen genetičkog diverziteta kako između sekvenci iz Srbije, tako i sa sekvencama izolata iz raznih djelova svijeta. Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazalo je grupisanje izolata LYSV u pet grupa, A, B, C, D i E. Dva izolata LYSV iz Srbije iz praziluka svrstali su se u grupe B i D sa izolatima iz bijelog luka odnosno praziluka, dok se izolat iz bijelog luka svrstao u grupu E sa izolatima iz bijelog luka. Grupisanje izolata ukazuje na protok gena između različitih usjeva, kao i na različite evolutivne sile koje oblikuju populaciju virusa.

Analiza četiri sekvence CP gena izolata GarCLV iz bijelog luka i praziluka pokazala je određeni stepen genetičkog diverziteta. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na grupisanje izolata u tri grupe, a izolati iz Srbije iz bijelog luka i praziluka su se svrstali u grupu I. Samostalno izdvajanje izolata GarCLV iz praziluka u odnosu na izolate iz bijelog luka ukazuje na dvije potencijalne introdukcije ili uticaj biljke domaćina na grupisanje.

Analiza šest sekvenci CP i NABP gena izolata GarV-A iz bijelog luka pokazala je određeni stepen genetičkog diverziteta. Rekonstruisano filogenetsko stablo je ukazalo na diverzitet populacije ovog virusa i pokazalo je grupisanje u pet grupa. Izolati iz Srbije grupisali su se u tri grupe: grupu II, III i V, a grupu V je činio samo izolat iz Srbije. Grupisanje izolata iz Srbije u različiti grupe, sa izolatima iz različitih djelova svijeta, može da ukaže na više potencijalnih introdukcija ovog virusa u Srbiju.

Analiza šest sekvenci CP i NABP gena izolata GarV-B iz bijelog luka pokazala je postojanje diverziteta u populaciji ovog virusa. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na podjelu populacije ovog virusa u tri grupe. Izolati GarV-B iz Srbije iz bijelog luka svrstali su se u dvije grupe: grupu II i III. Grupisanje izolata iz Srbije ukazuje na nedostatak genetičke diferencijacije između vrsta roda *Allexivirus*, kao i na protok gena (*gene flow*) kod vrsta ovog roda kako između udaljenih djelova svijeta, različitih država, tako i u okviru regija iste države



Analiza devet sekvenci CP i NABP gena izolata GarV-C iz bijelog luka pokazala je postojanje određenog stepena diverziteta u populaciji ovog virusa. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na grupisanje populacije ovog virusa u šest grupa. Izolati GarV-C iz Srbije iz bijelog luka svrstali su se tri grupe: grupu I, II i IV.

Analiza dvije sekvence CP i NABP gena izolata GarV-D iz bijelog luka pokazala je najmanji stepena diverziteta u populaciji ovog virusa. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na grupisanje populacije ovog virusa u četiri grupe. Izolati GarV-D iz Srbije iz bijelog luka svrstali su se u grupu IV koju su činili samo izolati iz Srbije. Izolati ovog virusa pokazali su nizak stepen diverziteta i u drugim istraživanjima strukture populacije ove vrste, što ukazuje da je cijela populacija ovog virusa bliska ancestoru.

Rezultati molekularne karakterizacije prevalentnih i najrasprostranjenijih virusa luka u Srbiji ukazuju na veliki uticaj međunarodne trgovine sadnim i merkantilnim materijalom na širenje ovih virusa.

Rezultati ove disertacije predstavljaju nova i sveobuhvatna saznanja o prisustvu i rasprostranjenosti virusa lukova u našoj zemlji, ali i prve podatke o diverzitetu populacije prisutnih virusa. Dinamičnost u pogledu zastupljenosti virusa lukova u Srbiji, kao i razlike u njihovoj epidemiologiji ukazuju na potrebu stalnog praćenja njihovog prisustva i zastupljenosti, zbog pravovremene detekcije pojave mogućih novih vrsta, kao i proučavanja varijabilnosti i genetičke strukture populacije najrasprostranjenijih virusa, a sve u cilju razvijanja i implementacije odgovarajućih mjera kontrole.

## 8. LITERATURA

- Abd El-Wahab, A. S. (2009): Aphid-Transmission Efficiency of Two Main Viruses on Garlic in Egypt, Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV-G) and Leek Yellow Stripe Virus (LYSV-G). *Academic Journal of Entomology* 2: 40-42.
- Adams, M. J., Candresse, T., Hammond, J., Kreuze, J. F., Martelli, G. P., Namba, S., Pearson, M. N., Ryu, K. H., Saldarelli, P., Yoshikawa, N. (2012): Family *Betaflexiviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 920-941.
- Adams, M. J., Candresse, T., Hammond, J., Kreuze, J. F., Martelli, G. P., Namba, S., Pearson, M. N., Ryu, K. H. and Vaira, A. M. (2011): Family *Alphaflexiviridae*. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier-Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 904-919
- Aleksić, Ž., Aleksić, D., i Šutić, D. (1990): *Bolesti povrća i njihovo suzbijanje*. Beograd: Nolit
- Aleman-Verdaguer, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N. and Fauquet, C. (1997): Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology* 78: 1253-1264.
- Allen, W. R., Matteoni, J. A. and Broadbent, A. B. (1991): Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemum infected with *Tomato spotted wilt virus*. In: Hsu, H. T. and Lawson, R. H. (eds.): *Virus-thrips-plant interactions of TSWV*. Springfield, National Technology Information Service, pp. 28-45.
- Amin, P. W., Reddy, D. V. R. and Ghanekar, A. M. (1981): Transmission of *Tomato spotted wilt virus*, the causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. *Plant Disease* 65: 663-665.
- Anonymous (2002): *Plant Protection Compendium*. CAB International, Wallingford, UK.

- Bag, S., Schwartz, H. F., Cramer, C. S., Havey, M. J. and Pappu, H. R. (2015): Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. *Molecular plant pathology* 16: 224-237.
- Baghalian, K., Kim, O. K. and Natzuaki, K. T. (2010): Molecular variability and genetic structure of the population of Onion yellow dwarf virus infecting garlic in Iran. *Virus genes* 41: 282-291.
- Bagi, F., Gvozdanović Varga, J., Budakov, D., Stojšin, V., Jančićjević, M., Šantić, M. i Jasnčić, S. (2010): Zaraženost belog luka virusom žute patuljivosti luka (OYDV) i virusom žute prugavosti praziluka (LYMV). X savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 57-58.
- Bagi, F., Stojšcaron, V., Budakov, D., El Swaeh, S. M. A. and Gvozdanović-Varga, J. (2012): Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic (*Allium sativum* L.) in Serbia. *African Journal of Agricultural Research* 7: 2386-2390.
- Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J. and Green, S. K. (1994): Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and Southeast Asia. *Acta Horticulturae*. 358: 251-258.
- Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J. and Green, S. K. (1997): Viruses of alliums and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Horticulturae*. 433: 607-616.
- Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J. and Schonfelder, M. (1995): Differentiation of potyviruses infecting cultivated *Allium* species. Proceedings of the 8th Conference on Virus Diseases of Vegetables, Prague, Czech Republic, pp. 29-31.
- Bateson, M. F., Henderson, J., Chaleeprom, W., Gibbs, A. J. and Dale, J. L. (1994): Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia). *Journal of General Virology* 75: 3547-3553.
- Bellardi, M. G., Marani, F., Betti, L. and Rabiti, A. L. (1995): Detection of garlic common latent virus (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 34: 58-61.
- Ben Moussa, A., Marrakchi, M. and Makni, M. (2005): Characterisation of Tospovirus in vegetable crops in Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution* 5: 312-322.

- Bereda, M., Kalinowska, E., Paduch-Cichal, E. and Szyndel, M. S. (2015): Low genetic diversity of a natural population of Garlic virus D from Poland. *European Journal of Plant Pathology* 142: 411-417.
- Bereda, M., Paduch-Cichal, E. and Dąbrowska, E. (2017): Occurrence and phylogenetic analysis of allelixiviruses identified on garlic from China, Spain and Poland commercially available on the polish retail market. *European Journal of Plant Pathology* 149: 227-237.
- Block, E. (2010): *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 454.
- Bos, L. (1976): Leek yellow stripe virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, pp. 240.
- Bos, L. (1981): Onion yellow dwarf virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, pp. 158.
- Bos, L. (1982): Shallot latent virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 250.
- Bos, L. (1983): Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae*, pp. 127: 11-29.
- Bos, L., Huttinga, H. and Maat, D. Z. (1978a): Shallot latent virus, a new carlavirus. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 84: 227-237.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H. and Maat, D. Z. (1978b): Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 84: 185-204.
- Boswell, J. J. (ed.) (1883): *English Botany Vol. 9*, George Bell and Sons, London, UK.
- Bošnjak, D., Gvozdanović-Varga, J., Vasić, M. (2007): Pedeset godina proizvodnje crnog luka u Vojvodini. *Letopis naučnih radova* 1: 131-139.
- Bremer, H. (1937): Über die bisher fälschlich 'Zwiebelrotz' genannte Gelbstreifigkeit an Zwiebelsamenträgern. *Phytopathologische Zeitschrift* 10: 79-105.
- Brewster, J. L. (2008): *Onions and other vegetable alliums (Vol. 15)*. CABI.
- Brittlebank, C. C. (1919): Tomato diseases. *Journal of Agriculture of Victoria* 17: 213-235.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (1996): *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Viruses On line: Descriptions and Lists*

- from the VIDE Database. Version: 20<sup>th</sup> August 1996. (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>).
- Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Petrov, M., Djekić, I. and Krstić, B. (2008): First report of Iris yellow spot virus on onion (*Allium cepa*) in Serbia. *Plant Disease* 92: 1247.
- Bulajić, A., Djekić, I., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A. and Krstić, B. (2009): Incidence and distribution of Iris yellow spot virus on onion in Serbia. *Plant disease* 93: 976-982.
- Bulajić, A., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Trkulja, V. and Krstić, B. (2012): *Iris yellow spot virus* - emerging pathogen and serious threat for the production of *Allium* species. Proceedings of „International Symposium on Current Trends in Plant Protection“, Belgrade, Serbia, pp. 231-238.
- Bulajić, A., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Ivanović, M. and Krstić, B. (2014): Tomato spotted wilt virus-potato cultivar susceptibility and tuber transmission. *American journal of potato research* 91: 186-194.
- Cafrune, E. E., Balzarini, M. and Conci, V. C. (2006): Changes in the concentration of Allxivirus during the crop cycle of two garlic cultivars. *Plant Disease* 90: 1293-1296. doi: [doi.org/10.1094/PD-90-1293](https://doi.org/10.1094/PD-90-1293)
- Canavelli, A., Nome, S. F. and Conci, V. C. (1998): Efecto de distintos virus en la produccion de ajo (*Allium sativum*) Rosado Paraguayo. *The Fitopatologia Brasileira* 23: 354-358.
- Celli, M. G., Perotto, M. C., Buraschi, D. and Conci, V. C. (2015): Biological and molecular characterization of garlic virus D and its effects on yields of garlic. In VII International Symposium on Edible Alliaceae 1143: 193-200.
- Chamberlain, E. E. and Baylis, G. T. S. (1948): Onion yellow dwarf. Successful eradication. *New Zealand Journal of Science and Technology* A29: 300-301.
- Chatzivassiliou, E. K., Giavachtsia, V., Orestiada, N., Mehraban, A. H., Hoedjes, K., Peters, D. (2009): Identification and incidence of *Iris yellow spot virus*, a new pathogen in onion and leek in Greece. *Plant Disease* 93: 761.
- Chen, J., Chen, J. and Adams, M. J. (2001): Molecular characteristics of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of Virology* 146: 1841-1853.

- Chen, J., Chen, J. P. and Adams, M. J. (2002): Characterisation of some carla- and potyviruses from bulb crops in China. Brief report. Archives of Virology 147: 419-428.
- Chen, J., Adams, M. J., Zheng, H. Y. and Chen, J. P. (2003): Sequence analysis demonstrates that Onion yellow dwarf virus isolates from China contain a P3 region much larger than other potyviruses. Archives of Virology 148: 1165-1173.
- Chen, J., Zheng, H. Y., Antoniw, J. F., Adams, M. J., Chen, J. P. and Lin, L. (2004): Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. Archives of Virology 149: 435-445.
- Chikh Ali, M., Maoka, T. and Natsuaki, K. T. (2007): The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVYNW and PVYNTN. Journal of Phytopathology 155: 409-415.
- Chodorska, M., Paduch-Cichal, E., Kalinowska, E. and Szyndel, M. S. (2013): Occurrence of the viruses belonging to the Allexivirus genus on garlic plants in Poland. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, 53: 605-609.
- Chodorska, M., Nowak, P., Szyndel, M. S., Paduch-Cichal, E. and Sala-Rejczak, K. (2012): First report of Garlic virus A, B and C in garlic in Poland. Journal of Plant Pathology 94.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977): Characteristics of micro plate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-482.
- Conci, V. C. (1997): Virus y Fitoplasmas de ajo. In “50 Temas Sobre Produccion de Ajo” (J. L. Burba, ed.), pp. 267-293. EEA-INTA La Consulta, Mendoza.
- Conci, V. C., Canavelli, A. and Lunello, P. (2003): Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. Plant Disease 87: 1411-1415.
- Conci, V. C., Lunello, P. and Buraschi, D. (2002): Variations of *Leek yellow stripe virus* Concentration in Garlic and Its Incidence in Argentina. Plant Disease 86: 1085-1088.
- Conci, V. C., Nome, S. F. and Milne, R. G. (1992): Filamentous viruses of garlic in Argentina. Plant Disease 76: 594-596.

- Conci, V.C., Perotto, M.C., Cafrune, E. and Lunello, P. (2005): Program for intensive production of virus-free garlic plants. *Acta Horticulturae* 688: 195-200.
- Conci, V. C., Cafrune, E. E., Lunello, P., Nome, S. and Perotto, C. (2004): Producción de planas de ajo libres de virus. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Parte VIII, Cap, 6.
- Córdoba-Sellés, C., Martínez-Priego, L., Muñoz-Gómez, R. and Jordá-Gutiérrez, C. (2005): *Iris yellow spot virus*: A new onion disease in Spain. *Plant Disease* 89: 1243.
- Córdoba-Sellés, C., Cebrián-Mico, C., Alfaro-Fernández, A., Muñoz-Yerbes, M. J. and Jordá-Gutiérrez, C. (2007): First report of *Iris yellow spot virus* in commercial leek (*Allium porrum*) in Spain. *Plant Disease* 91: 1365.
- Cornuet, P. (1959): *Maladies a virus des plantes cultivees et methodes de lutte* (p 440). Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique
- Cortés, I., Livieratos, I. C., Derks, A., Peters, D. and Kormelink, R. (1998): Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct Tospovirus species. *Phytopathology* 88: 1276-1282.
- Coutts, B. A., McMichael, L. A., Tesoriero, L., Rodoni, B. C., Wilson, C. R., Wilson, A. J., Persley, D. M. and Jones, R. A. C. (2003): *Iris yellow spot virus* found infecting onions in three Australian states. *Australasian Plant Pathology* 32: 555-557.
- Creamer, R., Sanogo, S., Moya, A., Romero, J., Molina-Bravo, R., Cramer, C. (2004): *Iris yellow spot virus* on onion in New Mexico. *Plant Disease* 88: 1049.
- Davis, R. M. (1995): Diseases caused by viruses and mycoplasma-like organisms. In: Schwartz, H.F. and Mohan, S.K. (Eds.). *Compendium of onion and garlic diseases*. St. Paul. APS Press. pp. 54
- Delecolle, B. and Lot, H. (1981): Garlic viruses, 1: detection and partial characterization with immune electron microscopy of three viruses in different garlic populations with mosaic [Onion Yellow Dwarf Virus]. *Agronomie (France)*.
- Delecolle, B., Lot, H. and Michel, M. J. (1985): Application of ELISA for detecting onion yellow dwarf virus in garlic and shallot seeds and plants. *Phytoparasitica* 13: 266-267.

- Delić, D., Balech, B., Radulović, M., Đurić, Z., Lolić, B., Santamaria, M. and Đurić, G. (2018): Molecular identification of Tomato spotted wilt virus on pepper and tobacco in Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina). *European journal of plant pathology* 150: 785-789.
- Diekmann, M. (1997): FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 18. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Dovas, C. I. and Vovlas, C. (2003): Viruses infecting *Allium* spp. in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 85: 135.
- Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y. and Katis, N. I. (2001a): Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 107: 677-684.
- Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y. and Katis, N. I. (2001b): Comparisons of methods for virus detection in *Allium* spp. *Journal of Phytopathology* 149: 731-737.
- Drake, C. J., Tate, H. D. and Harris, H. M. (1933): The relationship of aphids to the transmission of yellow dwarf of onions. *Journal of Economic Entomology* 26: 841-846.
- du Toit, L. J. and Pelter, G. Q. (2005): Susceptibility of storage onion cultivars to Iris yellow spot in the Columbia Basin of Washington. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases* 20: V006.
- du Toit, L. J., Burger, J. T., McLeod, A., Engelbrecht, M. and Viljoen, A. (2007): *Iris yellow spot virus* in onion seed crops in South Africa. *Plant Disease* 91: 1203.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I., Duduk, B. (2002): Molekularna identifikacija virusa bronzavosti paradajza na paprici. Zbornik rezimea XII Simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, Srbija, str. 72.
- Eady, C. C., Lister, C. E., Suo, Y. and Schaper, D. (1996): Transient expression of uidA constructs in in vitro onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and Agrobacterium-mediated DNA delivery. *Plant Cell Reports* 15: 958-962.



- Elnagar, S., El-Sheikh, M. A. K., and Abdel Wahab, A. S. (2005): Iris yellow spot virus (IYSV): A newly isolated thrips-borne tospovirus in Egypt. In Proceedings of the 7th International Conference on Pests in Agriculture, pp. 26-27.
- EPPO/CABI (1992): *Frankliniella occidentalis*. In: Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R. and Harris, K. M. (eds): Quarantine Pests for Europe. CAB International, Wallingford, UK.
- Etoh, T. and Simon, P.W. (2002): Diversity, fertility and seed production of garlic. In: Rabinowitch, H.D. and Currah, L. (eds) *Allium Crop Science: Recent Advances*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 101-117.
- Fajardo, T. V. M., Nishijima, M., Buso, J. A., Torres, A. C., Avila, A. C. and Resende, R. O. (2001): Garlic viral complex: Identification of potyviruses and carlavirus in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 619-626.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2016): statistics. [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org).
- Fayad-André, M. S., Dusi, A. N. and Resende, R. O. (2011): Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36: 341-349.
- Fenwick, G. R., Hanley, A. B. and Whitaker, J. R. (1985): The genus *Allium*—part 1. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 22: 199-271.
- Fernández-Tabanera, E., Fraile, A., Lunello, P., García-Arenal, F. and Ayllón, M. A. (2018): First Report of Onion yellow dwarf virus in Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) in Spain. *Plant disease* 102: 256-256.
- Fidan, H. and Baloglu, S. (2009): First report of Onion yellow dwarf virus and Leek yellow stripe virus in Garlic in Turkey. *Plant Disease* 93: 672.
- Fritsch, R.M. and Friesen, N. (2002): Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch, H.D. and Currah, L. (eds) *Allium Crop Science: Recent Advances*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 5-30.
- Fritsch, R. M., Blattner, F. R. and Gurushidze, M. (2010): New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton (Horn)* 49: 145-220.
- García-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2001): Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 156-186.

- Gent, D. H., Schwartz, H. F. and Khosla, R. (2004): Managing Iris yellow spot virus of onion with cultural practices, host genotype, and novel chemical treatments. *Phytopathology* 94: S34.
- Gent, D. H., du Toit, L. J., Fichtner, S. F., Mohan, S. K., Pappu, H. R., Schwartz, H. F., (2006): Iris yellow spot virus: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90: 1468-1480.
- Gera, A., Cohen J., Salomon, R. and Raccach, B. (1998): Iris yellow spot tospovirus detected in onion (*Allium cepa*) in Israel. *Plant Disease* 82: 127.
- Ghaemizadeh, F., Dashti, F., Khodakaramian, G. and Sarikhani, H. (2014): Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate Allieviruses and Onion yellow dwarf virus from garlic (*Allium sativum* cv. Hamedan). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47: 499-507.
- Graichen, K. and Leistner, H. U. (1987): Zwiebelgelbstreifen-Virus (onion yellow dwarf virus) verursacht Knoblauchmosaik. *Archives Phytopathological Pflanzensch* 23: 165-168.
- Grancini, P. (1951): Malattie da virus degli ortaggi il mosaic della cipolla. *Flora*, 6 (19).
- Ha, C., Revill, P., Harding, R. M., Vu, M. and Dale, J. L. (2007): Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of Virology* 153: 45-60
- Hausbeck, M. K., Welliver, R. A., Derr, M. A. and Gildow, F. E. (1992): *Tomato spotted wilt virus* survey among greenhouse ornamentals in Pennsylvania. *Plant Disease* 76: 795-800.
- Hedrick, U. P., (1972): *Sturtevant's Edible Plants of the World*, Dover Publications, New York, pp. 30.
- Helguera, M., Bravo-Almonacid, F., Kobayashi, K., Rabinowicz, P. D., Conci, V. C. and Mentaberry, A. (1997): Immunological detection of a GarV-type virus in Argentine garlic cultivars. *Plant Disease* 81: 1005-1010.
- Huchette, O., Bellamy, C., Filomenko, R., Pouleau, B., Seddas, S. and Pappu, H. R. (2008): *Iris yellow spot virus* on shallot and onion in France. *Plant health progress* 9: 46.

- ICTV (2017): Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses, The Online (10th) Report of the ICTV. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)
- Ivanović, M., i Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Beograd: Poljoprivredni fakultet
- Jemal, K., Abraham, A. and Feyissa, T. (2015): The occurrence and distribution of four viruses on garlic (*Allium sativum* L.) in Ethiopia. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 5-11.
- Jridi, C., Martin, J. F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G. and Blanc, S. (2006): Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *Journal of Virology* 80: 2349-2357.
- Kanyuka, K. V., Vishnichenko, V. K., Levay, K. E., Kondrikov, E. V., Ryabov, E. V. and Zavriev, S. K. (1992): Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 50-proximal cistron closely related to those of the potexviruses and a unique arrangement of the 30-proximal cistrons. *Journal of General Virology* 73: 2553-2560.
- Karavina, C. and Gubba, A. (2017): Iris yellow spot virus in Zimbabwe: Incidence, severity and characterization of *Allium*-infecting isolates. *Crop protection* 94: 69-76.
- Katis, N., Maliogka, V. and Dovas, C. (2012): Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region, In: Gad Loebenstein and Hervé Lecoq, Editor(s), *Advances in Virus Research*, Academic Press, 2012, Volume 84, pp. 163-208.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. and Carstens, E. B. (Eds.). (2011): *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier.
- Klukačková, J., Navratil, M. and Duchoslav, M. (2007): Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Disease and Plant Protection* 114: 97-100.
- Koch, M. and Salomon, R. (1994): Serological detection of onion yellow dwarf virus in garlic. *Plant Disease* 78: 785-788.

- Kohnić, A., Radulović, M. and Delić, D. (2018): First report of tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology* 1-1.
- Kojić, M., Pekić, S. i Dajić, Z. (2001): *Botanika*. Naučna knjiga, Beograd.
- Kondo, T., Hasegawa, H. and Suzuki, M. (2000): Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports* 19: 989-993.
- Koo, B. J., Kang, S. G. and Chang, M. U. (2002): Survey of garlic virus disease and phylogenetic characterization of garlic viruses of the genus *Allexivirus* isolated in Korea. *Journal of Plant Pathology* 18: 237-243.
- Korkmaz, S. and Cevik, B. (2009): Leek yellow stripe virus newly reported in Turkey. *Plant Pathology* 58: 787.
- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. (2001): Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease* 85: 838-842.
- Крстић, Б., Станковић, И., Булајић, А. (2014): Појава, распрострањеност и контрола вируса жуте пегавости ириса у усеву црног лука у Србији. Зборник радова XV Саветовања „Савремена производња поврћа“, Нови Сад, Србија, стр. 17-23.
- Krstić, B., Stanković, I. i Vučurović, A. (2018): Viroze ratarskog, povrtarskog i ukrasnog bilja. Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Kucharek, T., Brown, L., Johnson, F. and Funderburk, J. (2000): *Tomato spotted wilt virus* of agronomic, vegetable and ornamental crops. *Plant Pathology Fact Sheet*. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. <http://plantpath.ifos.ufl.edu/takextpub/FactSheet/circ0914.pdf>
- Kumar, N. K. K. and Rawal, R. D. (1999): Onion thrips, *Thrips tabaci*, a vector of onion tospovirus. *Insect Environment* 5: 52.
- Kumar, S., Baranwal, V. K., Joshi, S., Arya, M. and Majumder, S. (2010): Simultaneous detection of mixed infection of Onion yellow dwarf virus and an *Allexivirus* in RT-PCR for ensuring virus free onion bulbs. *Indian Journal of Virology* 21: 64-68.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018): MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35: 1547-1549.
- Kupke, W. (1957): Die Gelbstreifigkeit, eine gefährliche Krankheit des Porrees. *Rheinische Monatsschrift für Gemüse Obst-Gartenbau* 45: 173.
- Lanzoni, C., Ratti, C., Turina, M., Pisi, A., Tedeschi, P. and Autonell, C. R. (2006): Molecular characterization of Allexiviruses from garlic in Italy. *Journal of Plant Pathology* 88: S47.
- Leinhos, G., Müller, J., Heupel, M. and Krauthausen, H. J. (2007): *Iris yellow spot virus* an Bund- und Speisezwiebeln-erster Nachweis in Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 59: 310-312.
- Li, H. and Roossinck, M. J. (2004): Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population. *Journal of Virology* 78: 10582-10587.
- Lian, S., Lee, J. S., Cho, W. K., Yu, J., Kim, M. K., Choi, H. S. and Kim, K. H. (2013): Phylogenetic and recombination analysis of tomato spotted wilt virus. *PLoS one* 8: e63380.
- Lot, H., Chevelon, V., Souche, S. and Dellecolle, B. (1998): Effects of Onion yellow dwarf virus and Leek yellow dwarf virus on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82: 1381-1385.
- Louro, D. (1996): Detection and identification of tomato spotted wilt virus and impatiens necrotic spot virus in Portugal. *Acta Horticulturae* 431: 99-105.
- Lunello, P., Di Rienzo, J. and Conci, V. (2007): Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant Disease* 91: 153-158.
- Lunello, P., Ducasse, D. A., Helguera, M., Nome, S. F. and Conci, V. C. (2002): An Argentinean isolate of leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84: 11-17.
- Mahmoud, S. Y. M., Abo-El Maaty, S. A., El-Borollosy, A. M. and Abdel-Ghaffar, M. H. (2007): Identification of Onion yellow dwarf potyvirus as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences* 2: 746-755.

- Majumder, S., Baranwal, V. K. and Joshi, S. (2008): Simultaneous detection of Onion yellow dwarf virus and Shallot latent virus in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 371-374.
- Manglli, A., Mohammed, H. S., El Hussein, A. A., Agosteo, G. E., Albanese, G. and Tomassoli, L. (2014): Molecular analysis of the 3'terminal region of Onion yellow dwarf virus from onion in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 438-450.
- Manjunathagowda, D. C., Gopal, J., Archana, R. and Asiya, K. R. (2017): Virus-free seed production of garlic (*Allium sativum* L.): Status and prospects. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 2446-2456.
- Matthews, R. E. F. (1979): Classification and nomenclature of viruses. 3rd report of the International Committee on Taxonomy on Viruses. *Intervirology* 12: 131-296.
- Matthieu, J. L., Meurens, M., Ceustermans, N., Benoit, M. and Verhoyen, M. (1984): Influence of the epicuticular wax layer on the susceptibility of different leek varieties against leek chlorotic streak virus. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 36: 433-441.
- Mavrič, I. and Ravnikar, M. (2000): *Iris yellow spot tospovirus* in Slovenia. *Proc. Congr. Eur. Found. Plant Pathol. 5th. Taormina-Giardini Naxos, Italy*, pp. 223-225.
- Mavrič, I. and Ravnikar, M. (2005): A carlavirus serologically closely related to Carnation latent virus in Slovenian garlic. *Acta agriculturae Slovenica* 85: 343-349.
- Melhus, I. E., Reddy, C., Shenderson, W. J. and Vestal, E. (1929): A new virus disease epidemic on onions. *Phytopathology* 19: 73-77.
- Melo-Filho, P., Resende, R. O., Torres Cordeiro, C. M., Buso, J., Torres, A. C. and Dusi, A. N. (2006): Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 116: 95-101.
- Melo-Filho, P. A., Nagata, T., Dusi, A. N., Buso, J. A., Torres, A. C., Eiras, M. and Resende, R. de O. (2004): Detection of three Allexiviruses species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 39: 375-340.

- Messiaen, C. M., Youcef-Benkada, M. and Beyries, A. (1981): Potential yield and tolerance to virus disease in garlic (*Allium sativum* L.). *Agronomie* 1: 759-762.
- Mickovski, J. (1969): *Tomato spotted wilt virus* na duvanu u Jugoslaviji (*Licopersicum virus 3-Smith*). *Zaštita bilja* 105: 203-214.
- Mijatović, M., Obradović, A., i Ivanović, M. (2007): Zaštita povrća od bolesti, štetočina i korova. Smederevska Palanka: AgroMivas.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M., i Stevanović, D. (1999): Rasprostranjenost i intenzitet pojave nekih virusa parazita paprike u Srbiji. *Zaštita bilja* 50: 151-159.
- Milošević, D., Gvozdanović-Varga, J., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Vučurović, I., Vučurović, A. and Stanković, I. (2015): First report of *Onion yellow dwarf virus* infecting shallot in Serbia. *Plant Disease* 99: 1450-1450.
- Mohammad G., Kawas, H. and Al-Safadi, B. (2007): Survey of garlic viruses in southern Syria.  
<http://www.damascusuniversity.sy/mag/farm/images/stories/2550.pdf>.
- Moravčević, Đ., Todorović, V. i Pavlović, N. (2017): Povrtarstvo (praktikum). Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 102.
- Mullis, S. W., Gitaitis, R. D., Nischwitz, C., Csinos, A. S., Rafael Mallaupoma, Z. C. and Inguil Rojas, E. H. (2006): First report of onion (*Allium cepa*) naturally infected with *Iris yellow spot virus* in Peru. *Plant Disease* 90: 377.
- Mullis, S. W., Langston Jr D. B., Gitaitis, R. D., Sherwood, J. L., Csinos, A. C., Riley, D. G., Sparks, A. N., Torrance, R. L. and Cook, M. J. (2004): First report of Vidalia onion (*Allium cepa*) naturally infected with *Tomato spotted wilt virus* and *Iris yellow spot virus* (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus) in Georgia. *Plant Disease* 88: 1285.
- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996a): An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 57: 109-115.
- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996b): The biology of *Tospoviruses*. *Annals of Applied Biology* 128: 159-183.

- Nagata, T., Almeida, A. C. L., Resende, R. de O. and de Avila, A. C. (1999): The identification of the vector species of Iris yellow spot tospovirus occurring on onion in Brazil. *Plant Dis* 83: 399.
- Nam, M., Lee, Y. H., Park, C. Y., Lee, M. A., Bae, Y. S., Lim, S., Lee, J. H., Moon, J. S. and Lee, S. H. (2015): Development of multiplex rt-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. *The plant pathology journal* 31: 90-96.
- Nikolić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Bulajić, A. and Krstić, B. (2013): First Report of Tomato spotted wilt virus on *Brugmansia* sp. in Serbia. *Plant disease* 97: 850-850.
- Nikolić, D., Vučurović, A., Stanković, I., Radović, N., Zečević, K., Bulajić, A. and Krstić, B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European journal of plant pathology* 152: 225-235.
- OEPP/EPPO (2004): Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/34. *Tomato spotted wilt virus, Impatiens necrotic spot virus and Watermelon silver mottle tospovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 271-279.
- Oliveira, M. L., De Marchi, B. R., Mituti, T., Pavan, M. A. and Krause-Sakate, R. (2014): Identification and sequence analysis of five allexiviruses species infecting garlic crops in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39: 483-489.
- Paludan, N. (1980): Virus attack on leek: survey, diagnosis, tolerance of varieties and winterhardiness. *Tidsskrift for Planteavl* 84: 371-385.
- Pappu, H. R., Hellier, B. C. and Dugan, F. M. (2005): First Report of Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus, and Garlic common latent virus in Garlic in Washington State. *Plant Disease* 89: 205.
- Pappu, H. R., Jones, R. A. C. and Jain, R. K. (2009): Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research* 141: 219-236.
- Pappu, H. R., Rosales, I. M. and Druffel, K. L. (2008): Serological and molecular assays for rapid and sensitive detection of Iris yellow spot virus infection of bulb and seed onion crops. *Plant Disease* 92: 588-594.
- Parrano, L., Afunian, M., Pagliaccia, D., Douhan, G. and Vidalakis, G. (2012): Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from



- different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 549–565.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C. and Marchoux, G. (2003): An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology* 227-264.
- Pena-Iglesias, A. and Ayuso, P. (1982): Characterization of Spanish garlic viruses and their elimination by in vitro shoot apex culture. *Acta Horticulturae* 127: 183-193.
- Pérez-Moreno, L., Navarro-León, M. J., Ramírez-Malagón, R. and Mendoza-Celedón, B. (2010): Impacto e Identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum* L), en el estado de Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología* 28: 97-110.
- Perotto, M. C., Cafrune, E. E. and Conci, V. C. (2010): The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Alexiviruses. *The European Journal of Plant Pathology* 126: 489-495.
- Perring, T. M., Gruenhagen, N. M. and Farrar, C. A. (1999): Management of plant virus diseases through chemical control of insect vectors. *The Annual Review of Entomology* 44: 457-481.
- Plenk, A. and Grausgruber-Groger, S. (2011): First report of Iris yellow spot virus in onions (*Allium cepa*) in Austria. *New Disease Reports* 23: 13.
- Popović, M. (1984): *Povrtarstvo*. Nolit, Beograd.
- Popović, M. (1991): *Povrtarstvo*. Nolit, Beograd.
- Pozzer, L., Nagata, T., Lima, M. I., Kitajima, E. W., Resende, R. de O. and de Avila, A. C. (1994): “Sapeca”: An onion disease in SubMedio Sao Francisco region, Brazil, is caused by a tospovirus with a serologically distinct nucleocapsid protein. *The Fitopatologia Brasileira* 19: 321.
- Pozzer, L., Bezerra, I. C., Kormelink, R., Prins, M., Peters, D., Resende, R. de O. and de Ávila, A. C. (1999): Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345-350.
- Pramesh, D. and Baranwal, V. K. (2013): Molecular characterization of coat protein gene of Garlic common latent virus isolates from India: an evidence for distinct phylogeny and recombination. *Virus Genes* 47: 189-193.

- Pringle, C. R. (1999): Virus taxonomy at the XIth International congress of Virology in Sydney, Australia. Archives of Virology 144: 2065-2070.
- Prins, M. and Kormelink, R. (2004a): Genetic organization of the Tospoviral genome. [http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t\\_1\\_3.html](http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t_1_3.html)
- Prins, M. and Kormelink, R. (2004b): Transmission and epidemiology. [http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t\\_1\\_5.html](http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t_1_5.html)
- Rabinowitch, H. D. (2018): Onions and Allied Crops: Agronomy, Biotic Interactions, Pathology, and Crop Protection. CRC Press.
- Ravi, K. S., Kitkaru, A. S. and Winter, S. (2006): Iris yellow spot virus in onions: A new tospovirus record from India. Plant Pathology 55: 288.
- Robb, K., Casey, C., Whitfield, A., Campbell, L. and Ullman, D. (1998): A new weapon to fight INSV and TSWV. Growers talk (February) 64-73.
- Robène-Soustrade, I., Hostachy, B., Roux-Cuvelier, M., Minatchy, J., Hédont, M., Pallas, R., Couteau, A., Cassam, N. and Wuster, G. (2006): First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb and seed production fields in Reunion Island. Plant Pathology 55: 288.
- Rosales, M., Pappu, H. R., López, L., Mora, R. and Aljaro, A. (2005): *Iris yellow spot virus* in onion in Chile. Plant Disease 89: 1245.
- Ryabov, E. V., Generozov, E. V., Vetten, H. J. and Zavriev, S. K. (1996): Analysis of the 30-region of the mite born filamentous virus genome testifies its relation to the shallot virus X group. Molecular Biology 30: 103-110.
- Sakimura, K. (1963): *Frankliniella fusca*, an additional vector of *Tomato spotted wilt virus*, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. Phytopathology 53: 412-415.
- Sako, I. (1989): Occurrence of garlic latent virus in *Allium* species. Plant Protection 43: 389-392.
- Sako, I., Taniguchi, T., Osaki, T. and Inouye, T. (1990): Transmission and translocation of garlic latent virus in rakkyo (*Allium chinense* G. Don). Proceedings of the Kansai Plant Protection Society 32: 21-27.
- Salomon, R. (2002): 13 Virus Diseases in Garlic and the Propagation of Virus-free Plants. *Allium Crop Science: Recent Advances* pp. 311.
- Salomon, R., Koch, M., Levy, S. and Gal-On, A. (1996): Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic. In Symposium Proceedings No.

- 65: Diagnostics in Crop production, British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp. 193-198.
- Samuel, G., Bald, J. G. and Pittman, H. A. (1930): Investigations on „spotted wilt“ of tomatoes. Australian Council of Science and industrial Research Bulletin 44: 64.
- Sansford, C. and Woodhall, J. (2007): Pest Risk Analysis for Iris Yellow Spot Virus. CSL, York, UK. Available at: <https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/downloadExternalPra.cfm?id=3882>
- Sawahel, W. A. (2002): Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 49-59.
- Schwartz, H. F. and Mohan, S. K. (2007): Compendium of onion and garlic diseases and pests. APS Press, St. Paul, MN, US, pp. 127.
- Schwartz, H. F., Brown, W. M., Jr., Blunt, T. and Gent, D. H. (2002): Iris yellow spot virus on onion in Colorado. Plant Disease 86: 560.
- Schwartz, H. F., Mohan, S. K., Havey, M. J. and Crowe, F. J. (2006): Introduction. In “Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests” (H. F. Schwartz and S. K. Mohan, eds.). 2nd edn. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, US.
- Shahraeen, N., Lesemann, D. E. and Ghotbi, T. (2008): Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. OEPP/EPPO Bulletin 38: 131-135.
- Shemesh, E., Scholten, O., Rabinowitch, H. D. and Kamenetsky, R. (2008): Unlocking variability: inherent variation and developmental traits of garlic plants originated from sexual reproduction. Planta 227: 1013-1024.
- Shiboleth, Y. M., Gal-On, A., Koch, M., Rabinowitch, H. D. and Salomon, R. (2001): Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. Annals of Applied Biology 138: 187-195.
- Shukla, D. D. and Ward, C. W. (1988): Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the Potyvirus group. Journal of General Virology 69: 2703-2710.

- Silva, M. S., Martins, C. R. F., Bezerra, I. C. M., Nagata, I., de Avila, A. C. and de Resende, R. O. (2001): Sequence diversity of NSm movement protein of *Tospoviruses*. *Archives of Virology* 146: 1267-1281.
- Soellick, T. R., Uhrig, J. F., Bucher, G. L., Kellmann, J. W. and Schreier, P. H. (2000): The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 2373-2378.
- Song, S. I., Song, J. T., Kim, C. H., Lee, J. S. and Choi, Y. D. (1998): Molecular characterization of the garlic virus X genome. *Journal of General Virology* 79: 155-159.
- Song, S. I., Choi, J. N., Song, J. T., Ahn, J. H., Lee, J. S., Kim, M., Cheong, J. J. and Choi, Y. D. (2002): Complete genome sequence of garlic latent virus, a member of the carlavirus family. *Molecules and Cells* 14: 205-213.
- Stanković, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): Virusi ukrasnih biljaka sa osvrtom na rod *Tospovirus*. *Biljni lekar* 41: 651-663.
- Stankovic, I., Bulajic, A., Vucurovic, A., Ristic, D., Jovic, J. and Krstic, B. (2011): First report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. *Plant Disease* 95: 226.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D., Krstić, B. (2012): First Report of *Tomato spotted wilt virus* infecting Onion and Garlic in Serbia. *Plant Disease* 96: 918.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D. and Krstić, B. (2013): First Report of Tomato spotted wilt virus on Chrysanthemum in Serbia. *Plant disease* 97: 150-150.
- Sumi, S., Matsumi, T. and Tsuneyoshi, T. (1999): Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus *Allexivirus*. *Archives of Virology* 144: 1819-1826.
- Sumi, S., Tsuneyoshi, T. and Furutani, H. (1993): Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *Journal of General Virology* 74: 1879-1885.

- Šutić, D. (2005): Viroze biljaka. Beograd: Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Srbija.
- Šutić, D. i Tošić, M. (1976): Virozna infekcija belog luka u našoj zemlji. III kongres mikrobiologa Jugoslavije, Bled, Jugoslavija, str. 184-185.
- Tabanelli, D., Bertaccini, A. and Bellardi, M. G. (2004): Molecular detection of filamentous viruses infecting garlic from different geographic origins. *Journal of Plant Pathology* 86: 335.
- Takaichi, M., Yamamoto, M., Nagacubo, T. and Oeda, K. (1998): Four garlic viruses identified by the reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease* 82: 694-698.
- Takakaki, F., Santo, T., Yamashita, K., Fujita, T., Oeda, K. and Kato, T. (2005): Complete nucleotide sequence of attenuated and severe isolate of Leek yellow stripe virus from garlic in Northern Japan: identification of three distinct virus types in garlic and leek worldwide. *Archives of Virology* 150: 1135-1149.
- Testen, A. L., Mamiro, D. P., Meulia, T., Subedi, N., Islam, M., Baysal-Gurel, F. and Miller, S. A. (2014): First report of Leek yellow stripe virus in garlic in Ohio. *Plant Disease* 98: 574.
- 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.
- Tomassoli, L., Tiberini, A., Masenga, V., Vicchi, V. and Turina, M. (2009): Characterization of Iris yellow spot virus isolates from onion crops in Northern Italy. *Journal of Plant Pathology* 91: 733-739.
- Torrico, A. K., Celli, M. G., Conci, L. R. and Conci, V. C. (2015): Incidence of Garlic common latent virus in Argentina, and phylogenetic and recombination analyses of isolates. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 363-373.
- Trkulja, V., Salapura, J. M., Ćurković, B., Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A. and Krstić, B. (2013a): First Report of Tomato spotted wilt virus on Gloxinia in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease* 97: 429-429.

- Trkulja, V., Salapura, J. M., Kovačić, D., Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A. and Krstić, B. (2013b): First report of Iris yellow spot virus infecting onion in Bosnia and Herzegovina. *Plant disease* 97: 430-430.
- Trkulja, V., Salapura, J. M., Kovačić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Bulajić, A. and Krstić, B. (2013c): Iris yellow spot virus a new pathogen of onion in Republic of Srpska. *Zaštita bilja* 64: 90-100.
- Tsompana, M. and Moyer, J. W. (2008): *Tospoviruses*. In: Mahy, B. W. J. and Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, Vol. 5, 3rd edition. Elsevier Ltd., Oxford, UK, pp. 157-162.
- Tsuneyoshi, T., Matsumi, T., Deng, T. C., Sako, I. and Sumi, S. (1998): Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Archives of virology* 143: 1093-1107.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. and Leunissen, J. A. (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 35: W71-W74.
- Van Dijk, P. (1993a): Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 233-257.
- Van Dijk, P. (1993b): Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 1-48.
- Van Dijk, P. (1994): Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. *Acta Horticulturae* 358: 299-306.
- Van Dijk, P. and Van der Vlugt, R. A. A. (1994): New mite-borne virus isolates from rakkyo, shallot and wild leek species. *European Journal of Plant Pathology* 100: 269-277.
- Van Dijk, P., Verbeek, M. and Bos, L. (1991): Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 381-399.
- Verhoyen, M. and Horvat, F. (1973): La striure chlorotique du porreau. 1. Identification de l'agent causal. *Parasitica* 29: 16-28.
- Vieira, R. L., da Silva, A. L., Zaffari, G. R., Steinmacher, D. A., de Freitas Fraga, H. P. and Guerra, M. P. (2015): Efficient elimination of virus complex from garlic

- (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta physiologiae plantarum*, 37: 1733.
- Vishnichenko, V. K., Konareva, T. N. and Zavriev, S. K. (1993): A new filamentous virus in shallot. *Plant Pathology* 42: 121-126.
- Vončina, D., Ćurić, K., Fabek, S. and Toth, N. (2016): First report of Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus, and Garlic common latent virus on garlic in Croatia. *Plant Disease* 100: 656.
- Vučurović, A., Stanković, I., Milojević, K., Nikolić, D., Berenji, J., Bulajić, A. and Krstić, B. (2012): Tomato spotted wilt virus-novi patogen tikava u Srbiji. *Zbornik rezimea radova XIV Simpozijuma o zaštiti bilja i IX Kongresa o korovima*, Zlatibor, Srbija, str. 109-110.
- Vučurović, A., Vučurović, I., Stanković, I., Bulajić, A., Nikolić, D., Teodorović, S. and Krstić, B. (2015): First report of *Garlic common latent virus* infecting garlic in Serbia. *Plant Disease* 99: 894.
- Vučurović, I., Nikolić, D., Radović, N., Vučurović, A., Ristić, D., Krstić, B. and Stanković, I. (2017): Incidence and distribution of *Leek yellow stripe virus* in *Allium* crops in Serbia. *Pesticides and phytomedicine* 32: 145-155.
- Vučurović, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Bulajić, A., Milošević, D., Krstić, B. and Stanković, I. (2016): First Report of *Leek yellow stripe virus* in Leek in Serbia. *Plant Disease* 100: 230.
- Vučurović, I., Vučurović, A., Stanković, I., Bulajić, A., Nikolić, D., Teodorović, S. i Krstić, B. (2015): *Garlic common latent virus*-značajan patogen belog luka u Srbiji. *Zbornik rezimea XIII Savetovanja o zaštiti bilja*, Zlatibor, Srbija, str. 25.
- Walkey, D. G. A. (1990): Virus diseases. In “Onion and allied crops” (H. D. Rabinowitch and J.-L. Brewster, eds.), Vol II, CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp. 191-212.
- Walkey, D. G. A. (2018): Virus diseases. In *Onions and allied crops*. CRC Press, pp. 203-224.
- Walkey, D. G. A. and Antill, D. N. (1989): Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64: 53-60.

- Webb, S. E., Kok-Yokomi, M. L. and Tsai, J. H. (1997): Evaluation of *Frankliniella bispinosa* as a potential vector of *Tomato spotted wilt virus*. *Phytopathology* 87: 102.
- Wylie, S. J., Li, H. and Jones, M. G. K. (2012): Phylogenetic analysis of allexiviruses identified on garlic from Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 7: 23-27.
- Wylie, S. J., Hua, L., Saqib, M. and Jones, M. G. K. (2014): The global trade in fresh produce and the vagility of plant viruses: a case study in garlic. *PloS One* 9: e105044.
- Wylie, S. J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J. J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F. M., and ICTV Report Consortium (2018): ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae, *Journal of General Virology* 98: 352-354.
- Yamashita, K., Sakai, J. and Hanada, K. (1995): Leek yellow stripe virus (LYSV) isolated from garlic and its relationship to garlic mosaic (GMV). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 273-278.
- Zavriev, S. K. (2008): Allexivirus. In “*Encyclopedia of Virology*”(BWJ Mahy and MHV Van Regenmortel, eds.).
- Zindovic, J., Ciuffo, M. and Turina, M. (2014): Molecular characterization of tomato spotted wilt virus in Montenegro. *Journal of plant pathology* 96: 201-205.



## BIOGRAFIJA

Ivan Vučurović je rođen 17.2.1989. godine u Nikšiću, Crna Gora. Poljoprivredni fakultet u Beogradu, studijski program Biljna proizvodnja, modul Fitomedicina završio je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,68 (osamšestdesetosam). Završni rad pod nazivom „Molekularno dokazivanje virusa bronzavosti paradajza (Tomato spotted wilt virus, TSWV) u hrizantemi“ odbranio je sa ocenom 10 (deset). Upisao je master akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, studijski program Fitomedicina, a završio 21.2.2014. godine sa prosečnom ocenom 9,25 (devetdvadesetpet). Master rad pod naslovom „Prisustvo i rasprostranjenost virusa luka u Srbiji“ odbranio je sa ocenom 10 (deset). Doktorske studije upisao je na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, studijski program Poljoprivredne nauke, modul Fitomedicina školske 2014/15. godine. Zaposlen je na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, gde je radi na zadacima i aktivnostima projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja“ – TR 31018. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

Najznačajnije oblasti istraživanja obuhvataju virusna oboljenja povrća, ratarskih kultura i ukrasnih biljaka; karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka; *Tomato spotted wilt virus*, *Iris yellow spot virus* i drugi virusi roda *Tospovirus*; *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus* i *Potato virus Y* roda *Potyvirus*; *Garlic common latent virus* roda *Carlavirus*; *Garlic virus-A, -B, -C, -D, -E, -X* roda *Allexivirus*; Prenošenje virusa semenom; Dijagnozu virusnih oboljenja biljaka; Detekcija i identifikacija biljnih virusa; Serološke metode detekcije; Molekularnu karakterizaciju biljnih virusa.

Do sada je objavio i saopštio 23 naučna rada.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Ivan Vučurović

Broj indeksa FM 14/12

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Diverzitet vrsta i molekularna karakterizacija prevalentnih virusa infektivnih za vrste  
roda *Allium* u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 14. 06. 2018. godine

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ivan Vučurović  
Broj indeksa FM 14/12  
Studijski program Fitomedicina  
Naslov rada Diverzitet vrsta i molekularna karakterizacija  
prevalentnih virusa infektivnih za vrste roda *Allium* u Srbiji  
Mentor prof. dr Ivana Stanković, vanredni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 14. 06. 2018. godine

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Diverzitet vrsta i molekularna karakterizacija prevalentnih virusa infektivnih za vrste roda *Allium* u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 14. 06. 2018. godine

\_\_\_\_\_

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.