

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dušan M. Nikolić

**DIVERZITET I KARAKTERIZACIJA
VIRUSA PARADAJZA U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dušan M. Nikolić

**DIVERSITY AND CHARACTERIZATION
OF TOMATO VIRUSES IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Komisija za ocenu i odbranu:

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

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

dr Goran Delibašić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

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

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

Datum odbrane: _____

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Branki Krstić, redovnom profesoru, koja mi je prenela neprocenjivo znanje iz biljne virusologije. Strpljenje, razumevanje i prijateljska podrška, bili su od presudnog značaja za izradu ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ivani Stanković, vanrednom profesoru, na znanju koje mi je prenela kao i pomoći tokom celog perioda izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr Goranu Delibašiću, redovnom profesoru, i dr Đorđu Moravčeviću, vanrednom profesoru, na korisnim savetima i podršci.

Veliku zahvalnost dugujem dr Danijeli Ristić, naučnom saradniku, na podršci i pomoći u toku izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Bulajić, redovnom profesoru, koja je korisnim savetima i predlozima uticala na moj rad.

Posebno se zahvaljujem kolegama, Ani Vučurović, naučnom saradniku, dr Katarini Zečević, naučnom saradniku, Dragani Đurić, tehničkom saradniku, Miri Vojvodić i Branki Petrović na podršci, pomoći i prijateljstvu koje su mi pružili tokom stvaranja ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici za sve savete, mudrosti, podršku i ljubav koju su mi pružali svih ovih godina.

DIVERZITET I KARAKTERIZACIJA VIRUSA PARADAJZA U SRBIJI

Rezime. U periodu od 2011. do 2015. godine, u okviru 22 administrativna okruga Srbije i 136 lokaliteta gajenja paradajza, utvrđeno je značajno prisustvo virusnih zaraza paradajza. Testiranjem 3486 sakupljenih uzoraka na prisustvo 10 virusa infektivnih za paradajz, primenom DAS-ELISA testa i/ili RT-PCR uz korišćenje virusno-specifičnih prajmera, detektovano je šest virusa paradajza: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV). Testiranjem semena paradajza komercijalno dostupnih sorti i hibrida, koje je izvedeno 2012. godine DAS-ELISA metodom, na prisustvo četiri virusa koji se prenose semenom: AMV, ToMV, TMV i virusa mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*, PepMV), nije utvrđeno prenošenje semenom paradajza ni jednog od ispitivanih virusa. Tokom petogodišnjeg perioda istraživanja utvrđeno je dominantno prisustvo CMV i PVY u različitim godinama istraživanja i lokalitetima gajenja paradajza. Pojedinačne infekcije su bile najznačajnije i njihova zastupljenost se kretala od 27,2% u 2014. godini do 60,7% tokom 2015. godine. Od mešanih infekcija najzastupljenije su bile dvostruke infekcije čija se zastupljenost kretala od 3% u 2014. godini do 33,7% tokom 2011. godine. Najzastupljeniju dvostruku infekciju činili su CMV i PVY čija se zastupljenost kretala od 5,8% tokom 2013. godine do 17,2% u 2011. godini. Trostruke i četvorostroke infekcije zabeležene su u manjem procentu i bile su značajne u pojedinim lokalitetima, a najviše su bile zastupljene sa 4,9% tokom 2011. godine.

Detekcija i identifikacija svih šest prouzrokovaca virusnih oboljenja na paradajzu u Srbiji potvrđena je RT-PCR metodom korišćenjem odgovarajućih specifičnih prajmera.

Tokom istraživanja unapređena je molekularna dijagnostika svih šest virusa do nivoa vrste ili nižih taksonomskih kategorija. Determinisane su nukleotidne sekvence određenih delova genoma virusa i ustanovljen je stepen homologije dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata deponovanih u NCBI bazi podataka.

Izolati CMV iz Srbije, na osnovu filogenetskih analiza sekvenci CP gena, grupisali su se u okviru podgrupa IA i II. Filogenetskom analizom na osnovu sekvenci P1 gena, PVY izolati poreklom iz Srbije svrstali su se u subklaster N Evropa u okviru klastera

nekrotičnih sojeva. Ispitivani izolati TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije svrstali su se u klaster sa izolatima poreklom iz Evrope gde su se tri izolata grupisala u okviru podgrupe 1, a u okviru podgrupe 2 preostalih pet izolata.

Filogenetske analize CMV satRNA poreklom iz paradajza pokazale su grupisanje izolata u okviru nekrogene i nenekrogene grupe.

Rezultati dobijeni tokom izrade ove disertacije ukazuju na dinamičnost i raznovrsnost virusa paradajza u Srbiji. Razlike u biološkim, epidemiološkim i molekularnim osobinama i njihov diverzitet daju objašnjenje njihovih sporadičnih pojava u obliku epidemija i ukazuju na značaj težine kontrole ovih patogena.

Ključne reči: paradajz, virusi, DAS-ELISA, molekularna detekcija, molekularna karakterizacija, CMV, CMV satRNA, PVY, TSWV

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 635.64:632.38(497.11)(043.3)

DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF TOMATO VIRUSES IN SERBIA

Abstract. In the period from 2011 to 2015, within the 22 administrative districts of Serbia and 136 localities of tomato cultivation, the significant presence of tomato virus infections was established. When testing 3486 collected samples for the presence of 10 viruses infectious to tomatoes by the DAS-ELISA test and/or RT-PCR using virus-specific primers, six tomato viruses were detected: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV). In 2012, tomato seeds of commercially available varieties and hybrids were tested using the DAS-ELISA method for the presence of four transmitted viruses (AMV, ToMV, TMV and PepMV) and the results show that no tomato seed transmissions of any of the tested viruses were detected. During the five-year research period, the dominant presence of CMV and PVY in different years of research and tomato cultivation sites was determined. Individual infections were most significant and their prevalence ranged from 27.2% in 2014 to 60.7% in 2015. Regarding the mixed infections, the most commonly reported cases were double infections with a prevalence ranging from 3% in 2014 to 33.7% in 2011. The most common double infection was made by CMV and PVY, whose presence ranged from 5.8% in 2013 to 17.2% in 2011. Triple and quadruple infections were minor and they were significant in certain localities, with the highest percentage of 4.9% in 2011.

The detection and identification of all six viruses causing infections on tomatoes in Serbia were confirmed by the RT-PCR method using appropriate specific primers.

During the study, the molecular diagnostics of all six viruses including the level of the species or lower taxonomic categories was improved. The nucleotide sequences of certain parts of the genome of the virus were determined and the degree of homology of the obtained sequences was verified determined with the sequences of other isolates deposited in the NCBI database.

Isolates of CMV from Serbia, based on phylogenetic analysis of the CP gene sequences, were grouped in subgroups IA and II. Using phylogenetic analysis, based on the sequences of P1 gene, PVY isolates originating in Serbia were classified in the subclass N Europe within the clusters of necrotic strains. The isolates of TSWV originating from tomatoes from Serbia were classified into a cluster of isolates originating

in Europe, where three isolates were grouped under the subgroup 1, and the remaining five isolates were categorized within the subgroup 2.

The phylogenetic analysis of satRNA originating from tomatoes from Serbia showed the grouping of isolates within the necrogenic and nonnecrogenic groups.

The results obtained during the preparation of this dissertation point to the dynamism and diversity of tomato viruses in Serbia. Differences in biological, epidemiological and molecular traits and their diversity give an explanation of their sporadic manifestations in the form of epidemics and indicate the importance of controlling these pathogens.

Key words: tomato, viruses, DAS-ELISA, molecular detection, molecular characterization, CMV, CMV satRNA, PVY, TSWV

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 635.64:632.38(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Paradajz kao gajena biljka.....	4
2.1.1. Poreklo paradajza.....	4
2.1.2. Naziv i podela paradajza.....	5
2.1.3. Morfologija paradajza.....	6
2.1.4. Gajenje paradajza u svetu.....	9
2.1.5. Gajenje paradajza u Srbiji.....	11
2.1.6. Upotreba paradajza i njegovih prerađevina.....	11
2.1.7. Značaj i perspektive gajenja i korišćenja paradajza.....	12
2.2. Bolesti i štetočine paradajza.....	13
2.3. Virus paradajza i njihov značaj.....	15
2.4. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja paradajza u svetu.....	17
2.5. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja paradajza u Srbiji.....	22
2.6. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa paradajza.....	24
2.6.1. Virus mozaika krastavca (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV) i satelitna RNA (CMV satRNA).....	24
2.6.2. Y virus krompira (<i>Potato virus Y</i> , PVY).....	29
2.6.3. Virus bronzavosti paradajza (<i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i> , TSWV)...	33
2.6.4. Virus mozaika lucerke (<i>Alfalfa mosaic virus</i> , AMV).....	38
2.6.5. Virus mozaika duvana (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV) i virus mozaika paradajza (<i>Tomato mosaic virus</i> , ToMV).....	41
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	47
4. MATERIJAL I METODE	49
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka.....	49
4.2. Serološka ispitivanja.....	50
4.2.1. Imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) primenom poliklonalnih antitela.....	50
4.2.2. Prenošenje virusa semenom paradajza.....	53
4.3. Molekularna detekcija.....	53
4.3.1. Ekstrakcija ukupnih RNA.....	53
4.3.2. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR). ..	54
4.3.2.1. Molekularna detekcija CMV	55
4.3.2.2. Molekularna detekcija PVY.....	56
4.3.2.3. Molekularna detekcija TSWV.....	56
4.3.2.4. Molekularna detekcija AMV.....	57
4.3.2.5. Molekularna detekcija TMV.....	58
4.3.2.6. Molekularna detekcija ToMV.....	58
4.3.2.7. Molekularna detekcija CMV satRNA.....	59
4.3.3. Analiza RT-PCR produkata.....	60
4.4. Molekularna identifikacija virusa paradajza.....	60
4.5. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa paradajza.....	61
4.5.1. Filogenetske analize izolata CMV	61
4.5.2. Filogenetske analize izolata PVY.....	63
4.5.3. Filogenetske analize izolata TSWV.....	64

4.5.4. Filogenetske analize izolata CMV satRNA.....	65
5. REZULTATI.....	67
5.1. Simptomi zabeleženi u polju i učestalost oboljenja.....	67
5.2. Serološko dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima paradajza.....	72
5.3. Serološka detekcija TMV, ToMV, AMV i PepMV u semenu paradajza.....	92
5.4. Detekcija virusa paradajza primenom RT-PCR metode.....	93
5.4.1. Detekcija CMV primenom RT-PCR metode.....	93
5.4.2. Detekcija PVY primenom RT-PCR metode.....	94
5.4.3. Detekcija TSWV primenom RT-PCR metode.....	95
5.4.4. Detekcija AMV primenom RT-PCR metode.....	95
5.4.5. Detekcija TMV primenom RT-PCR metode.....	96
5.4.6. Detekcija ToMV primenom RT-PCR metode.....	97
5.4.7. Detekcija CMV satRNA primenom RT-PCR metode.....	97
5.5. Molekularna identifikacija izolata virusa paradajza prisutnih u Srbiji.....	98
5.5.1. Molekularna identifikacija izolata CMV.....	99
5.5.2. Molekularna identifikacija izolata PVY.....	100
5.5.3. Molekularna identifikacija izolata TSWV.....	101
5.5.4. Molekularna identifikacija izolata AMV.....	102
5.5.5. Molekularna identifikacija izolata TMV.....	103
5.5.6. Molekularna identifikacija izolata ToMV.....	103
5.5.7. Molekularna identifikacija izolata CMV satRNA.....	104
5.6. Filogenetske analize.....	104
5.6.1. Filogenetske analize CMV.....	104
5.6.2. Filogenetske analize PVY.....	106
5.6.3. Filogenetske analize TSWV.....	109
5.6.4. Filogenetske analize CMV satRNA.....	110
6. DISKUSIJA.....	114
6.1. Simptomi u polju zabeleženi na biljkama paradajza.....	116
6.2. Učestalost oboljenja.....	118
6.3. Identifikacija virusa paradajza primenom DAS-ELISA testa.....	119
6.4. Rasprostranjenost virusa.....	122
6.5. Prenošenje TMV, ToMV, AMV i PepMV semenom paradajza.....	124
6.6. Molekularne analize.....	125
6.6.1. Molekularne analize CMV.....	125
6.6.2. Molekularne analize PVY.....	127
6.6.3. Molekularne analize TSWV.....	129
6.6.4. Molekularne analize AMV.....	131
6.6.5. Molekularne analize TMV i ToMV.....	133
6.6.6. Molekularne analize CMV satRNA.....	134
7. ZAKLJUČAK.....	137
8. LITERATURA.....	140
BIOGRAFIJA.....	171
IZJAVE.....	173

1. UVOD

Paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) je jednogodišnja dikotiledona biljka čiji se plod koristi za ishranu u botaničkoj zrelosti, ali i kao zeleni plod. Botanički zreli plod je ukusna salata, dodatak različitim jelima i sirovina za različite oblike prerade. Za ljudsku ishranu paradajz je posebno značajan u svežem stanju zbog sadržaja ugljenih hidrata, organskih kiselina i vitamina C, male kalorijske vrednosti i visokog sadržaja kalijuma. Paradajz sadrži glikoalkaloide koji daju karakterističan miris i gorak ukus lista i stabla. Osim toga, list i stablo sadrže i tomatin, koji ima insekticidna i fungicidna svojstva **(Marković i Ilin, 1998)**.

Paradajz ima širok areal rasprostranjenosti i njegova proizvodnja je zabeležena u 144 zemlje **(Maul, 1999)**. Najveći proizvođači su Kina, Indija, SAD, Turska, Egipat, Iran i Italija. Kina je najveći proizvođač i potrošač paradajza. Ukupna godišnja proizvodnja paradajza na svetskom nivou iznosi oko 223,5 miliona tona godišnje sa površine od 6 miliona hektara **(FAO, 2017)**. Godišnje se širom sveta preradi preko 40 miliona tona paradajza za proizvodnju: konzerviranog paradajza, kečapa, soka od paradajza, sosa i mnogih drugih proizvoda.

U strukturi ukupne potrošnje povrća u našoj zemlji, učešće paradajza je 11,6%, odnosno 15,2 kg po stanovniku godišnje **(Vlahović i Puškarić, 2012)**. Prosečna površina pod paradajzom u periodu od poslednjih nekoliko godina iznosi 10 hiljada ha sa tendencijom neznatnog rasta **(RZS, 2017)**. Prosečan prinos paradajza isnosi 15,9 t/ha, što je manje u odnosu na ostvareni evropski prosek od 45,6 t/ha **(FAO, 2017)**.

Više od 200 prouzrokovaca bolesti može da ugrozi proizvodnju paradajza širom sveta, međutim virusi kao prouzrokovaci bolesti paradajza zauzimaju značajno mesto imajući u vidu da je veliki broj biljnih virusa infektivan za paradajz i da su štete koje prouzrokuju zabeležene u svim regionima gajenja u svetu **(Jones et al., 2014)**. Paradajz je prirodni domaćin 146 virusa **(Ssekyewa, 2006)**, od kojih ekonomski najznačajnije štete u većini regiona gajenja ove kulture prouzrokuju virusi koji se na neperzistentan način prenose biljnim vašima uključujući virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Y virus krompira (*Potato virus Y*, PVY) i virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV). Među ekonomski najznačajnije viruse paradajza, ubrajaju se i virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) koji se prenosi

tripsima, kao i virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV) koji se prenose mehanički i semenom paradajza (Dovas et al., 2002; Parrella and Crescenzi, 2005; Hanssen et al., 2010; Jones et al., 2014).

Osim navedenih, sve veću pažnju privlače i virusi koji su u ekspanziji poslednjih godina (*emerging virusi*) i čije je prisustvo zabeleženo u mnogim evropskim zemljama. Najznačajniji „emerging” virusi prisutni u Evropi su virus mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*, PepMV) i virusi iz kompleksa žute uvijenosti lista paradajza (*Tomato yellow leaf curl diseases*, TYLCD), a sve češće proizvodnja paradajza biva ugrožena i pojavom novih virusa, uključujući virus hloroze paradajza (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), virus infektivne hloroze paradajza (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) i torado virus paradajza (*Tomato torrado virus*, ToTV) (Hanssen et al., 2010; Jones et al., 2014).

Značajne štete u proizvodnji paradajza u Francuskoj, zemljama mediteranskog regiona i Japanu zabeležene su i usled pojave sistemične nekroze izazvane prisustvom nekrogenog soja CMV satRNA (Kaper et al., 1976; Gallitelli et al., 1988; Kosaka et al., 1989; Jorda et al., 1992). Sat RNA su male nekodirajuće RNA dužine od 303 do 405 nukleotida i javljaju se kao pratioci nekih izolata CMV od kojih potpuno zavise u pogledu replikacije, enkapsidacije i prenošenja. Prisustvo CMV satRNA utiče na modifikaciju simptoma kod biljaka zaraženih CMV, ali uticaj CMV satRNA na simptome zavisi od soja CMV, satRNA i biljke domaćina (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Neke CMV satRNA ne izazivaju promene u ispoljavanju simptoma, većina ublažava ispoljavanje simptoma, dok neke CMV satRNA mogu izazvati sistemičnu nekrozu, kržljivost biljaka ili svetložutu hlorozu (Collmer and Howell, 1992; García-Arenal and Palukaitis, 1999; Simon et al., 2004). Na osnovu dosadašnjih saznanja, izolati CMV satRNA se mogu podeliti u dve grupe, nenekrogeni (*nonnecrogenic*) i nekrogeni (*necrogenic*) (Devic et al., 1990).

Iako podaci u svetu ukazuju na činjenicu da virusi izazivaju najbrojnija i najdestruktivnija oboljenja paradajza, malo je podataka o njihovoj pojavi i zastupljenosti u usevima paradajza u Srbiji. Dosadašnja proučavanja virusa paradajza u Srbiji bila su lokalnog karaktera (Mijatović et al., 2000; Krstić i sar., 2007). Od 2011. godine, zbog sve češće pojava simptoma virusnih oboljenja i značajnih šteta u proizvodnji, započeta su

intenzivna i sveobuhvatna istraživanja prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza u našoj zemlji (Nikolić i sar., 2012; Nikolić i sar., 2013; Nikolić et al., 2018) i deo su istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Istraživanja koja se odnose na molekularnu karakterizaciju pojedinih virusa infektivnih za paradajz, filogenetska proučavanja, epidemiologiju i kontrolu oboljenja nisu do sada sprovedena u našoj zemlji.

Sve učestalija pojava virusnih oboljenja na paradajzu poslednjih godina u Srbiji, izraženi simptomi, kako na lišću, tako i na plodovima, ukazali su na potrebu kompletne studije o virusima paradajza. Zbog velikog uticaja virusnih zaraza na prinos i kvalitet paradajza, kontinuirano praćenje prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti virusa paradajza, razvijanje i unapređivanje metoda detekcije i identifikacije virusa prouzrokovaca oboljenja, kao i filogenetska proučavanja doprineće boljem razumevanju potencijalnih izvora zaraze i načina širenja virusa u usevu paradajza. Etiološka i epidemiološka proučavanja sprovedena u okviru izrade ove doktorske disertacije imaju veliki značaj za primenu adekvatnih i pravovremenih mera kontrole virusnih oboljenja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Paradajz kao gajena biljka

2.1.1. Poreklo paradajza

U legendama i pričama iz perioda pre Kolumbovog otkrića Amerike paradajz je bio poznat kao biljka čijim su se plodom hranili vukodlaci. Kasnije se odomaćio u celoj Južnoj Americi, zatim je prenet u Evropu gde je u početku smatran za otrovnu biljku. Paradajz u današnje vreme zadobija sve više potrošača zbog raznovrsnosti upotrebe, kako u kuvanju, tako u komercijalnoj proizvodnji prerađevina. Nezaobilazan je u ponudi mnogih nacionalnih kuhinja (**Preedy and Watson, 2008**).

Paradajz vodi poreklo iz Amerike, iz oblasti Anda gde se najpre gajio (**Peralta et al., 2006**). Većina autora tvrdi da je kao domaća biljka prvi put gajen u Meksiku (**Sims, 1980; Harvey et al., 2002**). Međutim, postoje dve suprotstavljene teorije o tačnom mestu domestikacije. Alfons De Candolle je 1886. godine koristeći lingvističke dokaze kao što su nazivi „mala peruviana“ ili „Pommi del Peru“ (peruanska jabuka) tvrdio da paradajz potiče iz Perua. Pored toga, smatrao je „čeri“ (*cherry*) paradajz pretkom biljke koja se kasnije odomaćila u svetu, što su opovrgla genetska istraživanja koja ukazuju da je cherry paradajz nastao ukrštanjem divljih i gajenih tipova paradajza te se tako ne može povezati sa poreklom gajenog paradajza. Teoriju o poreklu iz Meksika razvio je Jenkins 1948. godine i takođe koristio lingvističko poreklo naziva. Nije jasno da li je biljka koja se navodi kao „tomatl“ iz Meksika gajeni paradajz ili divlja *Physalis* vrsta. Za *Physalis philadelphia* se u Meksiku koristi naziv „tomate“ ili „tomatillo“, dok se za gajeni paradajz sa velikim plodovima koristi naziv „jitomate“ (**Peralta et al., 2006**).

Poznato je da evropljani nisu odmah prihvatili paradajz zbog neprijatnog mirisa listova i stabla, vladalo je mišljenje da je čak i otrovan. Istina, u 19. veku, potvrđena je otrovnost stabla i lista, ali ne i plodova, a kako kaže čuveni francuski travar Mességué ne samo da nije otrovan već je vrlo hranljiva životna namirnica (rajska jabuka, jabuka ljubavi).

Na prostore Balkana paradajz je stigao iz Italije u 19. veku. U Srbiji se duže vreme koristio samo kao zimnica, odnosno za kišljenje (**Maksimović i Simović, 1991**).

2.1.2. Naziv i podela paradajza

Paradajz je prvi opisao italijanski botaničar i lekar Mattioli 1554. godine i dao mu naziv „Pomi d’oro“ (zlatna jabuka). Kasnije su se koristili različiti nazivi u mnogim svetskim jezicima što je trajalo sve do konačne naučne standardizacije. Švedski botaničar Carl Linnaeus je 1753. god. klasifikovao paradajz u rod *Solanum* zbog sličnosti sa krompirom i opisao *Solanum lycopersicum* (gajeni paradajz) i *Solanum peruvianum*. Sledeće godine Miller je prateći sistem koji je uspostavio Tournefort formalno opisao rod *Lycopersicon*. Dugo vremena paradajz je bio poznat pod nazivom *Lycopersicum esculentum* (Peralta et al., 2006). Naziv vrste poticao je od reči *lycopersicon*=vučja breskva i *esculentum*=jestiv (Preedy and Watson, 2008). Miller nije podržavao binomni sistem koji je uspostavio Linnaeus i nastavio je sa upotrebom polinomnih fraza za sve biljke sve do 1768. god. Kasnije, Miller počinje sa upotrebom binomnog sistema klasifikacije i izdaje opis za nekoliko vrsta roda *Lycopersicon*.

Prateći ranu fazu Miller-ovog rada veliki broj klasičnih i modernih autora smatra da paradajz pripada rodu *Lycopersicum*, dok ga taksonomi svrstavaju u rod *Solanum*. Danas, na osnovu dokaza koje pružaju filogenetska istraživanja, upotrebom DNA sekvenci i složenija istraživanja morfologije biljaka, može se doći do konačnog i nedvosmislenog zaključka da paradajz pripada redu Solanales, porodici Solanaceae i rodu *Solanum*. Upotreba naziva roda *Solanum* je prihvaćena od strane naučne zajednice koja se bavi taksonomijom, genetikom i oplemenjivanjem. Rod *Solanum* obuhvata gajeni paradajz i njegove divlje srodnike bogate genetske varijabilnosti (Knap and Peralta., 2016; Preedy and Watson, 2008).

Na Listi priznatih sorti poljoprivrednog bilja dozvoljenog za gajenje u Republici Srbiji u 2017. godini nalazilo se 174 sorte i hibrida paradajza (<http://www.sorte.minpolj.gov.rs>). U svetu se danas gaji više stotina sorti i hibrida paradajza za različite vidove proizvodnje (Bauchet and Causse, 2012).

Gajene sorte i hibridi paradajza se razlikuju po veličini ploda, obliku, nameni, hemijskom sastavu, ranostasnosti i veličini stabla. U našoj zemlji, podela paradajza na osnovu visine stabla izvršena je na sledeći način:

- Visoke (indeterminantne) sorte i hibridi: Ovu grupu sorti karakteriše neograničen visoki rast stabla i bujno grananje. Biljke se gaje uz oslonac na

jedno, ređe dva stabla. Cvasti se javljaju posle 9-11 listova. Namena ovih sorti i hibrida je uzgoj u staklenicima, plastenicima i za ranu proizvodnju na otvorenom polju, kao i baštensku proizvodnju. Plodovi iz ove proizvodnje namenjeni su svežoj potrošnji, odnosno zelenoj pijaci.

- Poluvisoke (semideterminantne) sorte i hibridi: Ovu grupu sačinjava mali broj hibrida koji se gaje obično u plastenicima i na otvorenom polju, a namenjeni su za svežu potrošnju. Obično se gaje na dva stabla, ređe na jedno ili tri. To su u stvari niski hibridi nešto veće bujnosti. Na glavnom stablu obrazuju četiri do šest cvetnih grana, nakon čega prestaju sa rastom.
- Niske (determinantne) sorte i hibridi: Sorte i hibride iz ove grupe karakteriše niži rast (visina biljaka je 65-85cm), gusto razmešteni listovi i cvasti. Prva cvast se javlja iznad 5-6 lista, a sledeća posle svakog drugog lista. Bočne grane i vrh biljke završavaju se cvetnom granom ili listom. Tako biljke same ograničavaju svoj rast i dobijaju žbunast izgled. Sorte iz ove grupe najčešće dobijaju žbunast izgled i najčešće se gaje iz direktne setve na parceli, mada mogu i iz rasada. Ova proizvodnja pretežno je orijentisana ka prerađivačkoj industriji mada se neke sorte mogu gajiti i za svežu upotrebu. Karakteristika ove grupe sorti je brz porast, rano stasavanje i ujednačeno sazrevanje, što je posebno značajno za primenu mehanizacije u berbi (**Takač, 2008**).

2.1.3. Morfologija paradajza

Korenov sistem je dosta razgranat, jednim delom može da proдре u dubinu i preko 100 cm, ali glavna masa korenovog sistema nalazi se do 50 cm. U početku rasta nesrazmerno brže se razvija korenov sistem u odnosu na nadzemni deo biljke. Tako, na primer, nakon 20 dana posle nicanja koren se razvije i dostigne dubinu oko 50 cm, dok nadzemni deo u to vreme pored kotiledona, ima jedan razvijen list, a drugi se nalazi u začetku razvoja. Kasnije, taj se odnos postepeno menja u korist nadzemnog dela (**Maksimović i Simović, 1991**). U direktnoj setvi za 4-5 nedelja posle nicanja centralni koren dostiže dubinu od 100-150 cm i zahvata oko 1,25 m³ zemlje. Time se objašnjava relativno visoka otpornost na sušu useva gajenog iz direktne setve. Kod proizvodnje iz rasada, centralni koren biva prekinut čime se podstiče razvoj bočnih žila. Paradajz ima

sposobnost formiranja adventivnih (bočnih) korenova iz bilo kog dela stabla, tako da se može razmnožavati i vegetativnim putem.

Stablo je zeljasto, sočno, ispunjeno srži, razgranato, a pri osnovi odrveni. Pri slobodnom rastu stablo je jako razgranato, što biljci daje žbunast izgled (ukoliko se ne uklanjaju bočni izdanci). Bočne grane (zaperci) izrastaju iz pazuha listova. Najjači zaperak je ispod prve cvasti i često se on ostavlja, ukoliko se paradajz gaji na dva stabla. Stablo ima sposobnost formiranja adventivnih korenova. Boja stabla je zelena sa slabije ili jače izraženom ljubičastom nijansom, naročito kod mladih biljaka. Na stablu se nalaze dlačice koje sadrže solanin. Visina stabla varira od 40 cm kod patuljastih (štambovnih) tipova, pa i do 3 m kod visokih (indeterminantnih). U proizvodnji su zastupljene i niske (determinantne) sorte i hibridi, koje su namenjene direktnoj setvi. Kod ovih sorti zipperci se završavaju cvetom, te tako biljka sama ograničava svoj rast. Visina stabla kod ovih biljaka je od 60-80 cm. Stablo je kolencima podeljeno na internodije. Kod žbunastih sorti one iznose oko 3 cm, dok kod visokih iznose i do 15 cm. Kod biljaka koje se gaje u zaštićenom prostoru internodije su duže od onih koje se gaje na otvorenom polju. Visoke sorte se gaje uz potporu ili oslonac, a zipperci im se uklanjaju. Kad dostignu željenu visinu vrši se dekaptacija, odnosno odstranjuje se vršni pupoljak. Ovo se vrši tako da se ostave dva lista iza poslednje cvasti, te se odseče vrh stabla. Iz stabla rastu i cvasti-grozdovi, sa cvetovima i plodovima. Grozd ne raste iz pazuha lista (kao zipperci) već direktno iz stabla. Dešava se da grozd svoj rast ne završi cvetom, već nastavlja da formira lišće i stablo. Ovo se dešava kod biljaka koje su jako bujne i imaju hrane i vode u izobilju. U takvim slučajevima treba odstraniti listove i novoformirano stablo iza poslednjeg cveta. U zavisnosti od načina uzgoja čovek formira i stablo i to: jedno, dva, ili tri (**Takač, 2011**). Kod svih formi paradajza grananje je jako izraženo, tako da cela biljka čini gust žbun. To utiče na formiranje i sazrevanje plodova, a pored toga i teže se štiti od prouzrokovala bolesti (**Maksimović i Simović, 1991**).

List je neparno perast, sa liskom razdeljenom dubokim urezima na izdvojene manje i veće listiće. Većina kulturnih formi ima takozvani obični (normalni ili paradajz) tip lista, dok postoje sorte i sa krompirovim tipom lista. Rane sorte imaju obično sitnije listove. Veličina lista kod jedne iste sorte varira zavisno od klimatskih i zemljišnih uslova. Paradajz gajen u plasteniku ili stakleniku ima i do dva puta, veće listove od onog gajenog na otvorenom polju. Broj listova na stablu do prvog grozda varira u zavisnosti od sorte i

uslova uspevanja. Obično kod niskih sorti on iznosi 4-6, a kod visokih 8-10. U nepovoljnim uslovima za cvetanje broj listova do prvog grozda može biti i do 16. Broj listova između grozda je, takođe, različit. Kod niskih sorti on iznosi 2-3, a kod visokih 3-4 lista.

Cvet paradajza se javlja u cvastima (cvetne grančice), koje mogu biti proste i složene (razgranate). Cvet je hermafroditan (dvopolan), samooplodan, sastavljen najčešće od šest čašičnih i šest kruničnih listića. Krunični listići su žute boje i u osnovi su srasli sa prašnicima, tako da se prilikom kastriranja obično lako odvoje zajedno sa krunicom. Broj prašnika je isti kao i kruničnih listića. Prašnici su žute boje, srasli u vidu konusa (cevčice), koji potpuno obuhvata plodnik i tučak. Polen je higroskopan i lako se lepi za žig tučka. Polen paradajza je osetljiv na kolebanja temperature i ne klija ako je temperatura ispod 13°C i iznad 30°C. Na sobnoj temperaturi polen je sposoban za oplodnju oko dva dana, a ukoliko se čuva u frižideru i do osam dana. Ovaj podatak je veoma bitan kod proizvodnje semena hibridnog paradajza, ali isto tako i kod rane proizvodnje konzumnog paradajza u staklenicima i plastenicima. Kod veoma malog broja sorti tučak nadrasta prašnike (heterostilija) i tu je moguća stranooplodnja iako je paradajz samooplodna vrsta, a zbog sadržaja solanina insekti ga ne posećuju. Tučak paradajza je zelenkasto žut, odebljao i na vrhu loptast. Po oplodnji od plodnika nastaje plod, u čijoj će osnovici na dršci ostati zeleni čašični listići. Krunični listići opadaju ubrzo po oplodnji. Cvetovi su sakupljeni u cvasti-grozdove, koji su raspoređeni po etažama (spratovima). Po obliku, cvasti mogu biti: proste, dvostrane i složene. Obično se cvetovi otvaraju oko 45 dana nakon nicanja (Takač, 2011).

Plod je sočna bobica, različitog oblika, boje, veličine i ukusa. Plodovi se razlikuju i po tome što su sa više ili manje semena, sa potpuno ili delimično ispunjenim unutrašnjim delom, sa više ili manje pregrada, a mogu se znatno razlikovati po ukusu i hemijskom sastavu (Maksimović i Simović, 1991). Plod može biti težak od 3 g kod *Lycopersicum hirsutum*, pa do 1000 g kod nekih populacija (Takač, 2011). Najveći procenat ploda paradajza čini voda (90-95%), zatim šećeri, kiseline i mnoga druga jedinjenja. Ukus ploda paradajza najpre određuje odnos rastvorljivih šećera (glukoza i fruktoza) i organskih kiselina (limunska i jabučna), kao i složena mešavina isparljivih aromatičnih jedinjenja (Jones et al., 2014). Glavni hranljivi sastojci ploda paradajza su vitamin C (askorbinska kiselina) i provitamin A (β -karoten) (Davis et al., 2012). Prednosti plodova paradajza i

njegovih prerađevina pripisuju se visokom sadržaju likopena, koji čini 80-90% ukupnih karotenoida. Količina likopena u svežem plodu paradajza varira od 4,3 do 116,7 mg/kg⁻¹, a cherry tipovi paradajza sadrže najveće količine (**Preedy and Watson, 2008**). Proizvodi nastali preradom ploda paradajza sadrže viši nivo dostupnog likopena u odnosu na sveže plodove. Likopen i β -karoten, kao antioksidanti, važni su činioci zdravih dijeta. Poznato je da se unosom likopena, kao glavnog pigmenta, utiče na smanjenje rizika od raka prostate, pluća i organa za varenje kod ljudi (**Davis et al., 2012; Preedy and Watson, 2008**). Mogućnost sinteze likopena i β -karotena je skoro podjednaka kod zelenih i formiranih plodova koji se beru pre sazrevanja i kod plodova koji sazrevaju na biljci (**Huevelink, 2005**). Plodovi se obično svrstavaju u sitne, težine do 60 g, srednje krupne od 60-120 g i krupne preko 120 g. Oblik ploda može biti jabučast, spljošten, okrugao, šljivolik, kruškolik, izdužen, sa nizom prelaznih formi. Boja ploda može biti narandžasta, žuta, crvena, ljubičasta pa čak i bela. Najcjenjeniji deo ploda su pregrade i spoljašnji zid. U ovim delovima ploda je najveći procenat suve materije. Kvalitet ploda je bolji što je debljina zida i pregrada veća. Površina pokožice može biti sjajna ili mat. Za neke sorte karakteristično je pucanje pokožice koje može biti radijalno i koncentrično.

Seme paradajza je sitno, pljosnato, bubrežastog oblika, obraslo beličasto sivim dlačicama. Seme je dužine 2-4 mm. Masa 1000 semenki (apsolutna težina) iznosi 2,7-3,5 g, odnosno 1 litar semena je težak 300-350 g, a 1 kg semena sadrži 300-350 hiljada semenki. Seme u uslovima pravilnog čuvanja zadržava klijavost 4-6 godina, da bi posle tog perioda naglo pala energija klijanja (očitava se peti dan), a klijavost, doduše slabu, seme može zadržati i do osam godina (**Takač, 2011**).

2.1.4. Gajenje paradajza u svetu

Zahvaljujući mogućnosti proizvodnje iz rasada, paradajz se može gajiti u širokom arealu od 55° severne do 35° južne geografske širine, tj. od Nemačke i Poljske na severu do Južnoafričke Republike na jugu. Prve opisane sorte paradajza su Stone i Ponderosa, koje su stvorene 1860. godine u SAD iz gajenih formi, koje su Evropljani doneli u Ameriku. Prva selekcionisana sorta je Large Red iz 1870. godine. Interesantno je da se sorta Ponderosa preko 100 godina gajila u Americi. Do 1910. godine najviše su se gajile sorte Bonny Best, Marglobe, Kralj Humbert, San Marcano, Mikado a kasnije je stvorena

sorta Marmande (**Takač, 2011**). Do 1920. godine genetske promene na paradajzu zavisile su od spontane selekcije u prirodi, slučajnih ukrštanja ili reasortmenta postojećih varijeteta. Nakon toga, oplemenjivači su počeli da koriste varijetete divljih i primitivnih formi pri ukrštanju što je doprinelo da se do 1930. godine prosečan prinos paradajza po hektaru poveća osam puta. Prvi hibridi namenjeni komercijalnom tržištu razvijeni su pedesetih godina, ali su njihove prednosti široko prihvaćene tek nakon dvadeset godina (**Jones et al., 2014**).

Proizvodnja paradajza u svetu (svež i industrijski) porasla je uposlednje četiri decenije dvadesetog veka za oko 300%. Godišnja proizvodnja paradajza 2003. godine procenjena je na 110 miliona tona, na površini od 4,2 miliona hektara (**Huevelink, 2005**). Trend povećanja površina koju paradajz zauzima u svetu se nastavio i danas iznosi oko 6 miliona hektara (**FAO, 2017**). Moguće je da ovi podaci ne predstavljaju realnu sliku kada se uzme u obzir da se paradajz gaji i na veoma malim parcelama i baštama u tropskom i subtropskom području gde zauzima značajno mesto u ishrani lokalnog stanovništva (**Huevelink, 2005**).

Trgovina paradajzom i njegovim proizvodima u svetu prelazi 4,2 milijardi \$ što predstavlja porast od 33% u odnosu na 1990. godinu (**FAS/USDA, 2003**). Tri vodeća proizvođača u svetu su Kina, Indija i SAD (**FAO, 2017**). Proizvodnja Kine čini 25% svetske proizvodnje, a ujedno je i najveći potrošač (**Wijnands, 2003**). U Kini se nalazi 55% svetske proizvodnje u zaštićenom prostoru što podrazumeva velike plastenike i plastenike tipa tunela (**Costa et al., 2004**). Svetski lideri u proizvodnji prerađevina od paradajza su SAD, Italija, Španija i Turska. U Holandiji se paradajz najintenzivnije gaji i to u staklenicima (**Huevelink, 2005**), gde je skoncentrisano više od četvrtine ovog tipa proizvodnje u svetu (**Pett and Wells, 2005**).

Industrija prerađevina paradajza jedna je od najnaprednijih u sektoru globalne poljoprivrede. Većina proizvodnje nalazi se u umerenim regionima gde su leta duga, a zime sa padavinama. Ipak, odnos između proizvodnje za svežu upotrebu i prerađevine, organizacija i struktura proizvodnje kao i tržište u velikoj meri se razlikuju od države do države (**Huevelink, 2005**).

2.1.5. Gajenje paradajza u Srbiji

U Srbiji se povrće gaji na oko 155 000 ha („Službeni glasnik RS“ br. 85/2014), a paradajz zauzima oko 7% setvenih površina (Takač i sar., 2007). U našoj zemlji paradajz se masovno gaji od sredine 19. veka. Pre drugog svetskog rata u Kraljevini Jugoslaviji paradajz se gajio na oko 7 000 ha, a u Srbiji na oko 4 000 ha (Takač, 2011).

Ostvareni prosečni prinosi po hektaru kreću se oko 16 t/ha (FAO, 2017). Razlog ovako niskih prinosa nije samo u neadekvatnoj tehnologiji gajenja, već i u prikupljanju statističkih podataka sa terena (koji su često neproverni ili se automatski prepisuju podaci iz ranijih godina). Dobri robni proizvođači na otvorenom polju setvom paradajza iz semena ostvaruju prosečne prinose od 40 do 50 t/ha što je daleko od prikazane statistike (Takač, 2011).

Klimatski faktori u kombinaciji sa drugim agroekološkim elementima, uz novo selekcionisane sorte i hibride, pružaju izvanredno dobre uslove za proizvodnju paradajza u našoj zemlji. Paradajz se može gajiti u svim poljoprivrednim rejonima Srbije. Najbolje uspeva tamo gde period sa prosečnom dnevnom temperaturom iznad 15°C traje najmanje 150 dana, i gde temperature u toku dana rastu i do 35°C (Takač i Gvozdenović, 1997).

Selekcijom (stvaranjem novih sorti i hibrida) paradajza u našoj zemlji bave se Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Institut za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci i privatna firma „Superior“ iz Velike Plane.

2.1.6. Upotreba paradajza i njegovih prerađevina

Paradajz predstavlja povrće koje se koristi širom sveta. Upotreba je zabeležena u 166 zemalja. Popularnost potiče od činjenice da se može jesti kao svež plod ili kao neka od prerađevina. Glavni proizvodi koji se dobijaju preradom ploda paradajza podeljeni su u tri grupe: (i) čuvani plodovi i njihove prerađevine (celi oljušteni paradajz, sok od paradajza, paradajz kaša, paradajz pire, paradajz pasta i zakišljeni paradajz); (ii) sušeni paradajz (paradajz prah, paradajz pahuljice, celi ili fragmentisani plodovi paradajza); (iii) hrana čija je osnova paradajz (paradajz supa, paradajz sos, kečap) (Heuvelink, 2005).

Na tržištu ekonomski razvijenih zemalja može se razlikovati pet tipova paradajza u odnosu na oblik ploda i namenu:

- klasičan okrugli paradajz-najpopularniji tip, okruglog oblika, sa dve do tri komore unutar ploda i prosečnom težinom 70-100g, prečnikom 4,6-6,7cm. Koristi se u salatama, za pečenje, roštiljanje, prženje ili kao dodatak supama i sosevima.
- cherry i koktel tip paradajza-manji su od klasičnog paradajza, težina varira između 10 i 20g, prečnika 1,6-2,5cm. Cherry paradajz je manji od koktel paradajza, ali su oba tipa izuzetno slatkog ukusa. Cherry paradajz je uglavnom crvene boje, mada postoje i zlatni, narandžasti ili žuti tip. Jede se ceo i sirov ili kuvan. Koktel paradajz se može seći na polutke za salatu ili se koristi za ražnjiće. Trenutno se svi koktel tipovi prodaju kao cela cvetna grana.
- šljivar-tipičnog ovalnog izgleda. Meso ploda je čvrsto i sa manje soka. Koristi se za pice i paste.
- biftek paradajz-veći od klasičnog paradajza, težine 180-250g sa pet ili više komora u plodu. Koristi se za punjenje ili kao ceo za pečenje; sečen se koristi za salate i sendviče. Oblik, boja, tekstura i ukus ploda variraju.
- ukrasni paradajz-može biti bilo koji od navedenih tipova, ali se plod ne koristi već se zbog specifičnog mirisa stabla i listova na tržištu može naći kao cela biljka (Heuvelink, 2005).

2.1.7. Značaj i perspektive gajenja i korišćenja paradajza

Očekuje se da će proizvodnja paradajza na svetskom nivou biti u porastu što se odnosi na paradajz za svežu upotrebu i preradu. Na osnovu investicija u sektoru prerade, unapređenja u procesu proizvodnje i novih kultuvara, Kina može biti glavni izvor pomenutog rasta. Porast u relativno jeftinim proizvodnim područjima, zajedno sa porastom troškova proizvodnje u više industrijalizovanim zemljama briga su mnogih proizvođača, posebno kada se radi o preradi (Heuvelink, 2005).

U našoj zemlji klimatski faktori u kombinaciji sa drugim agroekološkim elementima, uz novoselekcionisane sorte i hibride, pružaju izvanredno dobre uslove za proizvodnju paradajza. U AP Vojvodini i uz rečne doline centralne Srbije postoji dobra kombinacija zemljišta i obilja vode za navodnjavanje, kao i povoljnih klimatskih uslova.

Na ovim prostorima mogu se lako ostvariti prinosi od 50-80 t/ha. Istovremeno, to su i najrazvijenija poljoprivredna područja naše zemlje, sa velikom koncentracijom stanovništva i razvijenim urbanim centrima gde se mogu plasirati velike količine svežeg ploda na zelenoj pijaci ili predati fabrikama za preradu.

U savremenoj proizvodnji hrane paradajz zauzima značajno mesto. U ishrani, paradajz je veoma zastupljen tako da se njegova potrošnja evidentira u 164 zemlje sveta. U strukturi potrošnje povrća u našoj zemlji paradajz učestvuje sa 15% i nalazi se na trećem mestu. Zahvaljujući značajnim hranjivim, kulinarskim i dijetetskim osobinama predstavlja povrtarski proizvod za koji se očekuje da će imati porast proizvodnje u našoj zemlji (Takač, 2008).

2.2. Bolesti i štetočine paradajza

Paradajz predstavlja jedan od najzastupljenijih useva u svetu sa trendom povećanja proizvodnje u svetskim razmerama, što se odnosi i na našu zemlju. Paradajz se gaji zbog ploda pa je od velike važnosti postići dobar kvalitet i visok kvantitet istih. Praksa proizvodnje i prodaje plodova paradajza u razvijenim zemljama bazira se na klasiranju. Ova činjenica potkrepljuje tezu da je zaštita od štetnih organizama, uzročnika bolesti, štetočina i korova od izuzetne važnosti ako se za cilj ima vrhunski rezultat u proizvodnji.

Proizvodnju paradajza otežava više stotina štetnih organizama. Oni se mogu podeliti u šest osnovnih grupa: (i) fitopatogene pseudogljive i gljive, (ii) fitopatogeni virusi i viroidi, (iii) fitopatogene bakterije i fitoplazme, (iv) štetni insekti, grinje i nematode, (v) štetni korovi i (vi) štetočine (Krstić, 2015a; Jones et al., 2014).

Oboljenja koja prouzrokuju fitopatogene pseudogljive i gljive koje otežavaju proizvodnju paradajza su: crna pegavost lista i ploda (*Alternaria alternata* i *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*), antraknoza plodova paradajza (*Colletotrichum* spp.), crna trulež korena (*Thielaviopsis basicola*), trulež korena i prizemnog dela stabla (*Phytophthora* spp.), pegavost lišća (*Pseudocercospora fuligena*), ugljenasta trulež korena i stabla (*Macrophomina phaseolina*), plutasta trulež korena (*Pyrenochaeta lycopersici*), rak stabla paradajza (*Didymella lycopersici*), fuzariozna trulež vrha i korena (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*), fuzariozna trulež korena (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*), fuzariozno uvenuće (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), siva trulež

(*Botrytis cinerea*), plamenjača paradajza (*Phytophthora infestans*), plesnivost lista paradajza (*Passalora fulva*), pepelnica paradajza (*Leveillula taurica*), poleganje rasada, palež klijanaca i trulež semena (*Pythium* spp.), trulež biljaka ili „bela noga“ (*Rhizoctonia solani*), siva pegavost lista paradajza (*Septoria lycopersici*), zeleno (verticilozno) uvenuće paradajza (*Verticilium albo-atrum* i *Verticilium dahliae*), bela trulež (*Sclerotinia sclerotiorum*), crna pegavost paradajza (*Alternaria solani* i *A. tomatophila*), siva pegavost lista paradajza (*Septoria lycopersici*), *Phoma destructiva* var. *destructiva*, *Stemphylium* spp., *Corynespora cassiicola* i *Hinomyces moricola* (Jones et al., 2014; Krstić, 2015a; Mijatović i sar., 2007; Davis et al., 2012).

Od bakterioza javljaju se: crna pegavost lišća i krastavost plodova paradajza (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), bakteriozna krastavost plodova paradajza (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), bakteriozna uvelost i rak paradajza (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bakteriozni rak stabla (*Pectobacterium carotovorum*) i bakteriozno uvenuće (*Ralstonia solanacearum*) (Mijatović i sar., 2007; Jones et al., 2014). Stolbur fitoplazma uglavnom zaražava biljke iz familije Solanaceae i prouzrokuje žuto uvenuće paprike i paradajza (Mijatović i sar., 2007).

Štetni insekti u usevu paradajza su: biljne vaši (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii* i *Macrosiphum euphorbiae*), bela leptirasta vaš (*Trialeurodes vaporariorum*), duvanova leptirasta vaš (*Bemisia tabaci*), lukov trips (*Thrips tabaci*), kalifornijski trips (*Frankliniella occidentalis*), lisni mineri (*Lyriomiza bryoniae* i *Lyriomiza trifolii*), pamukova (kukuruzna) sovica (*Helicoverpa armigera*), gama sovica (*Autographa gamma*), sovica (*Agrotis* spp.), kukuruzni plamenac (*Ostrinia nubilalis*), cikada (*Hyalesthes obsoletus*), paradajzov moljac (*Tuta absoluta*), krompirova zlatica (*Leptinotarsa decemlineata*), rovac (*Gryllotalpa gryllotalpa*), gundelji (Scarabaeidae), stonoge (*Cylindroiulus teutonicus*, *Polydesmus angustus* i *Blaniulus guttulatus*), skočci (*Onychiuridae*, *Hypogastruridae*, *Poduridae*, *Sminthuridae*) i skočibube (Elateridae). U usevu paradajza kao štetne grinje pojavljuju se: običan paučinar (*Tetranychus urticae*), rđasta grinja (*Aculops lycopersici*) i atlanski pregalj (*Tetranychus atlanticus*) (Mijatović i sar., 2007; Krstić, 2015a; Sekulić i sar., 2008). Nematode korenovih gala (*Meloidogyne* spp.) i slobodno živeće nematode (*Pratylenchus* spp.) prouzrokuju štete zapažene pretežno u zaštićenom prostoru (Obradović i sar., 2017).

Korovi koji mogu otežati proizvodnju paradajza su: (i) višegodišnji širokolisni: bokvica uskolisna (*Plantago lanceolata*), gorčika poljska (*Sonchus arvensis*), renika obična (*Lepidium draba*), kopriva obična (*Urtica dioica*), palamida njivska (*Cirsium arvense*), poponac obični (*Convolvulus arvensis*), slez crni (*Malva silvestris*); (ii) višegodišnji uskolisni: zubača (*Cynodon dactylon*), pirevina (*Agropyrum repens*); (iii) jednogodišnji širokolisni: ambrozija pelenasta (*Ambrosia artemisifolia*), boca obična (*Xanthium strumarium*), broćika lepuša (*Galium aparine*), rotkva divlja (*Raphanus raphanistrum*), dvornik obični (*Polygonum persicaria*), gorčika obična (*Sonchus oleraceus*), gorušica poljska (*Sinapis arvensis*), kamilica (*Chamomilla recutita*), kopriva mala (*Urtica urens*), mišjakinja obična (*Stelaria media*), pepeljuga obična (*Chenopodium album*), pomoćnica obična (*Solanum nigrum*), prstenak poljski (*Anthemis arvensis*), strdelj čvorasti (*Galeopsis tetrahit*), štir (*Amaranthus* spp.), tarčužak obični (*Capssela bursa-pastoris*), tatula obična (*Datura stramonium*), lipica teofrastova (*Abutilon theophrasti*), tušt obični (*Portulaca oleracea*), veronika (*Veronica polita*), vijušac njivski (*Bilderdykia convolvulus*), loboda obična (*Atriplex patula*), dimnjača obična (*Fumaria officinalis*), bulka obična (*Papaver rhoeas*), mirunka obična (*Diploaxis miralis*), lubeničarka njivska (*Hibiscus trionum*); (iv) jednogodišnji uskolisni: ovas divlji (*Avena fatua*), sirak divlji (*Sorghum halepense*), livadarka jednogodišnja (*Poa annua*), ljulj (*Lolium perene*), muhar (*Setaria* spp.), mišiji repak (*Alopecurus myosuroides*), klasača (*Bromus* spp.), proso korovsko (*Panicum crus-galli*), svrčica crvena (*Digitaria sanguinalis*), vetruška (*Apera spici-venti*) (Krstić, 2015a; Mijatović i sar., 2007; Vrbničanin i Šinžar, 2003).

Štetočine paradajza su: puževi (*Limax* spp., *Arion* spp.), krtica (Talpidae), miševi (*Apodemus*, *Musculus* i *Rattus*), voluharica, hrčak, zec i ptice (vrapci, golub, crna vrana, siva vrana, gačac, fazan) (Krstić, 2015a; Mijatović i sar., 2007; Sekulić i sar., 2008).

2.3. Virusi paradajza i njihov značaj

Proizvodnju paradajza u zaštićenom prostoru ili na otvorenom polju mogu da ugroze virusna oboljenja i tada pričinjavaju značajne ekonomske štete. Gubici u proizvodnji paradajza variraju u zavisnosti od toga koji je virus ili njegov soj prouzrokovao oboljenja, od sorte paradajza, starosti biljke u vreme infekcije, temperature

u toku inkubacionog perioda (razvoja oboljenja), prisustva drugih patogena i od stepena zaraženosti useva i mogu se kretati od 5 do 90%. U zaštićenom prostoru pretežno se javljaju virusi koji se mehanički prenose, dok u polju zaraze često izazivaju virusi koji se prenose lisnim vašima ili drugim insektima **(Krstić i sar., 2005a)**.

U svetu je opisano 146 virusa infektivnih za paradajz koji su raspoređeni u 33 roda **(Ssekyewa, 2006)**. Veliki broj virusa paradajza se može objasniti osetljivošću paradajza na viruse roda *Begomovirus* koji čini veliki broj vrsta **(Hanssen et al., 2010)**. Najveći broj virusa paradajza pripada rodovima *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Curtovirus*, *Potyvirus*, *Tabamovirus* i *Tospovirus* **(Davis et al., 2012)**. Najznačajniji virusi paradajza u svetu su: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato yellow vein virus* (PYVV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Tomato mottle virus* (ToMoV), *Chino del tomate virus* (CdTV), *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV), *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato apex necrosis virus* (ToANV), *Tomato marchitez virus* (ToMarV), *Tomato chocolate spot virus* (ToCSV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) i *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV) **(Jones et al., 2014; Zeidan, 2016; Davis et al., 2012; Koike et al., 2007)**. Manje značajni virusi koji ostvaruju zaraze u usevima paradajza sporadično i na ograničenim geografskim područjima su: *Eggplant mosaic virus* (EMV), *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Tomato pseudo-curly top virus* (ToSCTV), *Tobacco streak virus* (TSV) i *Tomato necrotic dwarf virus* (ToNDV) **(Jones et al., 2014)**. Viroidi infektivni za paradajz su: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Columnnea latent viroid* (CLVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) i *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) **(Jones et al., 2014; Zeidan, 2016)**.

Ekonomski važni virusi infektivni za paradajz u Srbiji su: Y virus krompira-virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) i virus mozaika

paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV) (Krstić i sar., 2005a; Krstić, 2015a). Virusi koji inficiraju paradajz mogu indukovati jake zaraze, što za posledicu ima pad kvaliteta i kvantiteta proizvodnje (Delić, 2010).

Karantinski štetni virusi infektivni za paradajz, a koji se nalaze na listi IA deo I karantinski štetnih organizama Republike Srbije su: *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato mottle virus* (TMoV), dok se na listi IA deo II nalazi *Tomato spotted wild orthotospovirus* (TSWV) („Službeni glasnik RS“ br. 57/15).

Veliki problem u proizvodnji paradajza, što se tiče virusnih oboljenja, predstavlja i česta pojava dva ili više virusa u mešanim infekcijama (Krstić i sar., 2005a). Potvrda prisustva virusa na osnovu vizuelnih simptoma uglavnom predstavlja težak posao zbog sličnosti sa simptomima koje prouzrokuju nedostaci u ishrani i oštećenja usled dejstva herbicida (Jones et al., 2014). Paprika i plavi patlidžan, slični po mnogim osobinama i načinu gajenja sa paradajzom, zajednički su domaćini nekih ekonomski štetnih virusa paradajza, a pre svega TSWV, TMV, CMV, PVY i AMV. Kako bi se izbeglo masovno širenje virusa tokom vegetacije sa useva koji su zajednički domaćini pojedinih virusa, treba posebnu pažnju posvetiti izboru i udaljenosti površina za gajenje tih biljaka.

Da bi se uspešno kontrolisalo oboljenje koje virusi izazivaju, neophodna je prethodna tačna identifikacija prouzrokovača. Sa izuzetkom TMV, većina virusa paradajza preživljava jedino u živim delovima biljke ili veoma kratko u insektima vektorima. Vektorsku ulogu uglavnom imaju lisne vaši, tripsi i bele leptiraste vaši. Samo se mali broj virusa paradajza (TMV, ToMV) prenosi zaraženim semenom ili mehanički, odnosno kontaktom. Obično se širenje virusa u usevu i početni simptomi na zaraženim biljkama javljaju na pojedinačnim ili biljkama u manjim grupama i to, ako je u pitanju proizvodnja paradajza u polju, obično sa rubnih delova parcela.

2.4. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja paradajza u svetu

Virusi utiču na proizvodnju paradajza i pripisuju im se milionske štete koje nastaju usled gubitaka prinosa (Hanssen and Lapidot, 2012). Povećani obim međunarodnog transporta i trgovine biljnim materijalom povećava rizik od unošenja novih virusa i

njihovih vektora u proizvodnji paradajza. Klimatske promene mogu doprineti uspešnom širenju introdukovanih virusa ili vektora i njihovom odomaćivanju u novim oblastima. Pored mnogih virusa infektivnih za paradajz koji su opisani, ozbiljnu pretnju predstavljaju virusi označeni kao „emerging“ i virusi koji se definišu kao novi. Najčešće, „emerging“ virusi se definišu kao virusi čija se populacija povećava u određenom području i nastaju usled promena koje se odnose na životnu sredinu, vektora, biljku domaćina ili genom samog virusa. Grupu novih virusa čine virusi opisani u skorije vreme i koji brzo osvajaju geografska područja gde ranije nije zabeleženo njihovo prisustvo (**Hanssen et al., 2010**).

U današnje vreme TYLCV predstavlja virus koji nanosi najznačajnije štete u proizvodnji paradajza u Mediteranskom basenu kao i u mnogim tropskim i subtropskim regionima širom sveta (**Lapidot and Friedmann, 2002; Mariones and Navas-Castillo, 2000; Navas-Castillo et al., 2011; Pico et al., 1996**). Pripada grupi poznatih virusa koji se brzo šire (*emerging*) (**Hanssen et al., 2010**). TYLCV je prvi put zabeležen u Izraelu nakon epidemije u zasadima paradajza 1959. godine (**Cohen and Harpaz, 1964; Cohen and Lapidot, 2007**). Krajem prošlog veka TYLCV je bio prisutan u Egiptu, Izraelu, Libanu, Siriji, Turskoj i na Kipru (**Czosnek and Laterrot, 1997**). TYLCV se kontinuirano širio i danas je, pored zemalja Mediterana, prisutan u većini područja gde se paradajz gaji u svetu (**Hanssen and Lapidot, 2012**). Nakon dugogodišnjeg perioda proučavanja, posebno nakon otkrića tehnike sekvenciranja, došlo se do zaključka da je naziv TYLCV dodeljen heterogenoj grupi koju čini više od 10 vrsta virusa, koji prouzrokuju vrlo slične simptome na paradajzu (**Moriones and Navas-Castillo, 2000**).

Početak ovog veka zapažene su zaraze epidemijskih razmera na paradajzu sa simptomima u vidu nekrotičnih pega na listovima i plodovima u Španiji, Meksiku i Gvatemali (**Alfaro-Fernández et al., 2007a; Batuman et al., 2010; Verbeek et al., 2007, 2008, 2010**). U Španiji je novo oboljenje dobilo lokalni naziv „torrado“ (pečen), zbog simptoma nalik opekotinama na zaraženom lišću. Prouzrokovalac bolesti okarakterisan je kao nova vrsta virusa za koji je predložen naziv *Tomato torrado virus* (ToTV) (**Verbeek et al., 2007**). Slična epidemija se dogodila u Meksiku i dobila naziv „marchitez“ (uvenuće). Sumnjalo se na povezanost sa ToTV, ali su simptomi nekroze lista, stabla i ploda ukazivali da se radi o potpuno različitoj vrsti virusa koji je dobio naziv *Tomato marchitez virus* (ToMarV) (**Turina et al., 2007; Verbeek et al., 2008**). Kasnije, dve nove vrste virusa iz roda *Torradovirus* izolovane su iz zaraženih useva paradajza u

Gvatemali. Predloženi su nazivi *Tomato chocolate spot virus* (ToCSV) i *Tomato chocoláte virus* (ToChV) u skladu sa lokalnim nazivima koje su prethodno dobili (Batuman et al., 2010; Verbeek et al., 2010). Krug domaćina osjetljivih na viruse iz roda *Torradovirus* je uzak i uglavnom ograničen na Solanaceae (Batuman et al., 2010; Turina et al., 2007). Pojava ToTV zabeležena je u usevima paradajza u Mađarskoj, Francuskoj, Španiji, Kanarskim Ostrvima, Poljskoj, Panami i Australiji (Alfaro-Fernández et al., 2007a; Alfaro-Fernández et al., 2007b; Alfaro-Fernández et al., 2008; EPPO, 2009; Herrera-Vasquez et al., 2009; Pospieszny et al., 2007; Verdin et al., 2009). Zbog brzog širenja u poslednjoj deceniji, ovaj virus je označen kao nova vrsta virusa sa „emerging“ statusom (Hanssen et al., 2010).

U poslednjih par decenija, grupa virusa koja pripada rodu *Crinivirus* i familiji *Closteroviridae* proširila se širom sveta uz pomoć leptirastih vaši (Hansen et al., 2010; Navas-Castillo et al., 2011; Wintermantel, 2004; Wisler et al., 1998a). Probleme u proizvodnji paradajza mogu prouzrokovati *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) i *Tomato chlorosis virus* (ToCV). TICV je prvi put identifikovan u proizvodnji paradajza na otvorenom polju u Kaliforniji 1993. godine, gde je prouzrokovao milionske štete (Duffus et al., 1994; Wisler et al., 1996). Razlika između TICV i ToCV otkrivena je nakon zaraze u zaštićenom prostoru u Kaliforniji 1989. godine, što je potvrđeno na osnovu RNA sekvence, specifičnosti vektora i kruga domaćina (Wisler et al., 1998b). U oblasti Mediterana, TICV je prvi put detektovan u Italiji 1991. godine, a zatim u Grčkoj, Francuskoj, Španiji i Jordanu (Anfoka and Abhary, 2007; Dalmon et al., 2005; Dovas et al., 2002; Varia et al., 2002). ToCV je u Mediteranskom basenu prvi put detektovan u Španiji 1997. godine, a zatim u Portugalu, Italiji, Maroku, Grčkoj, Francuskoj, Izraelu, Kipru, Libanu i Turskoj (Abou-Jawdah et al., 2006; Accotto et al., 2001; Dovas et al., 2002; Louro et al., 2000; Navas-Castillo et al., 2000; Segev et al., 2004). U poslednjoj deceniji, TICV i ToCV se svrstavaju u grupu „emerging“ virusa (Hanssen et al., 2010).

Za samo nekoliko godina, nakon otkrića u usevima paradajza u Holandiji 1999. godine (van der Vlugt et al., 2000), PepMV je postao najznačajnija pretnja proizvodnji u zaštićenom prostoru u mnogim zemljama Evrope. Epidemije izazvane ovim virusom zabeležene su u Ujedinjenom Kraljevstvu, Francuskoj, Španiji, SAD-u, Poljskoj i Belgiji (Aguilar et al., 2002; Cotillon et al., 2002; French et al., 2001; Hanssen et al., 2008; Ling, 2007; Maroon-Lango et al., 2005; Mumford and Metcalfe, 2001; Pagán et al.,

2006). U poslednjoj deceniji PepMV je izazvao epidemije u Siriji, Grčkoj i na Kipru (Efthimiou et al., 2011; Fakhro et al., 2010; Papayaiannis, 2010). Prouzrokovao iznenadnog širenja PepMV na udaljenim distancama u usevima paradajza nije razjašnjen (Rojas and Gilbertson, 2008). Pripada grupi virusa koji su se od prve pojave u kratkom vremenskom periodu proširili na nova područja (Hanssen et al., 2010).

Značajne gubitke u proizvodnji paradajza, paprike i mnogih drugih povrtarskih kultura širom sveta prouzrokuje TSWV (Hanssen and Lapidot, 2012). TSWV je prvi put opisan u usevima paradajza u Australiji početkom 20. veka (Brittlebank, 1919). Ovaj virus je u Evropi detektovan 1929. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu i nije se širio zahvaljujući uspešnoj kontroli *Thrips tabaci* (Pappu et al., 2009). Nakon introdukcije *F. occidentalis* u Evropu, osamdesetih godina prošlog veka, došlo je do pojave epidemija koje je izazvao TSWV (Pappu et al., 2009; Roselló et al., 1996). U poslednjoj deceniji, TSWV je neizostavan problem proizvodnje paradajza u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju u zapadnim i severnim delovima Evrope i zemljama Mediterana (Italija, Španija, Portugal i Grčka) (Pappu et al., 2009). Visoka prisutnost novih *Orthospovirus* vrsta u tropskim delovima Azije ukazuje na genetički diverzitet ovih virusa u odnosu na domaćine sa kojih se mogu preneti putem vektora čija se populacija povećava (Rojas and Gilbertson, 2008). TSWV i ostali virusi iz roda *Orthospovirus* u poslednjoj deceniji se svrstavaju u „emerging“ grupu virusa paradajza (Hanssen and Lapidot, 2012).

CMV je prvi put identifikovan 1916. godine kao prouzrokovatelj oboljenja na krastavcu i dinji u SAD-u (Doolittle, 1916). Ovaj virus karakteriše ekstremno širok krug domaćina sa preko 1300 biljnih vrsta raspoređenih u 500 rodova i više od 100 familija (García-Arenal and Palukaitis, 2008). Epidemijske zaraze krajem 20. veka zabeležene su na paradajzu, banani, krastavcu, krompiru, dinji, mahunarkama i mnogim drugim gajenim kulturama širom sveta (Palukaitis et al., 1992). CMV prenosi više od 80 vrsta biljnih vaši na neperzistentan način (Gallitelli, 2000) i prisutan je u proizvodnji paradajza na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru širom sveta u regionima sa umerenom i tropskom klimom (García-Arenal and Palukaitis, 2008).

U oblasti Mediterana, kao „emerging“ virus paradajza označava se i *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) (Hanssen and Lapidot, 2012). Ovaj virus je prvi put izolovan iz biljke *Pelargonium zonale* (Quacquarelli and Gallitelli, 1979) i 1980. godine detektovan kao prouzrokovatelj zaraze na paradajzu u Italiji (Gallitelli, 1982). PZSV je

označen kao prouzrokovatelj mnogih epidemija u proizvodnji paradajza u različitim regionima. Dvadeset godina nakon prve detekcije, PZSV je krajem veka detektovan u proizvodnji paradajza u zaštićenom prostoru u Španiji (**Luis-Arteaga and Cambra, 2000**) i Francuskoj (**Gebre-Selassie et al., 2002**). Kasnije, ovaj virus je detektovan u proizvodnji paradajza na otvorenom polju u Kaliforniji (**Liu and Sears, 2007**) i Izraelu (**Lapidot et al., 2010**). Takođe, jaka epidemija koja se pripisuje PZSV-u zabeležena je u proizvodnji paradajza u zaštićenom prostoru na severoistoku Španije (**Escriu et al., 2009**).

Značajne štete u proizvodnji paradajza u Francuskoj, Italiji, Grčkoj, Španiji i Hrvatskoj poslednjih decenija izazvala je i pojava nekrogenih izolata CMV satRNA, odgovornih za pojavu sistemične nekroze biljaka paradajza (**Kaper et al., 1976; Gallitelli et al., 1988; Bem, 1989; Jorda et al., 1992; Škorić et al., 1996**). Osnovna razlika između pojave sistemične nekroze u Italiji i Španiji leži u podgrupi pomoćnog virusa. Za razliku od Španije, u Italiji pojava sistemične nekroze paradajza je bila prouzrokovana pojavom nekrogenih izolata CMV satRNA kao pratioca izolata II podgrupe CMV, koji su bili retko prisutni u istočnoj i centralnoj Španiji. Sistemičnu nekrozu paradajza u Španiji izazvali su nekrogeni izolati CMV satRNA kao pratioci izolata IB podgrupe CMV (**Bonnet et al., 2005**). Različiti izolati CMV satRNA, nekrogeni i nenekrogeni, otkriveni su kao pratioci izolata podgrupe I CMV tokom epidemijske pojave ovog virusa 90-ih godina XX veka u Grčkoj (**Varveri and Boutsika, 1999**). Takođe, epidemijska pojava sistemične nekroze u Hrvatskoj 1989. godine bila je povezana sa pojavom CMV izolata podgrupe I i CMV satRNA (**Škorić et al., 1996**). Dakle, CMV satRNA kao pratilac različitih izolata CMV bila je široko rasprostranjena u mediteranskom region proteklih 20 godina i izazvala je značajne štete u proizvodnji paradajza. Međutim, poslednjih godina značajno je smanjena zastupljenost CMV satRNA i postoje samo pojedinačni slučajevi prisustva CMV satRNA u usevu paradajza. Iako je detekcija i prisustvo CMV satRNA uobičajeno povezano sa epidemijama u usevu paradajza, prisustvo CMV satRNA otkriveno je u drugim usevima kao i korovima, iako sa niskom frekvencijom. CMV satRNA pokazuju veliku varijabilnost zbog, kako mutacija tako i često prisutnih rekombinacija, što dovodi do pojave heterogene populacije satRNA (**Alonso-Prados et al., 1998; Aranda et al., 1993, 1997; Grieco et al., 1997**), za razliku od metapopulacije karakteristične za pomoćni virus. Zbog svega ovoga, ali i zbog neobične biološke aktivnosti satRNA i njihovog nepoznatog

porekla, ponovna progresija i pojava epidemija prouzrokovanih CMV satRNA može se očekivati u usevu paradajza, posebno imajući u vidu klimatske promene i povećanje populacije biljnih vaši (Jacquemon, 2012).

2.5. Proučavanja najznačajnijih virusnih oboljenja paradajza u Srbiji

Virusi zauzimaju značajno mesto među prouzrokovateljima bolesti paradajza. O njihovoj pojavi i rasprostranjenosti postoje podaci u našoj zemlji, ali nije poznato da je poslednjih desetak godina izvršena detaljna inventarizacija virusa infektivnih za paradajz u Srbiji, kao ni njihova biološka, serološka i molekularna karakterizacija.

Prvi podaci o prisustvu TSWV u Srbiji potiču iz 1969. godine kada je detektovan na duvanu (Mickovski, 1969), a zatim je utvrđen na paprici i duvanu (Mijatović i sar., 1999; Dukić i sar., 2002; Jasnić i sar., 2000). Na većem broju područja u Srbiji prisustvo virusa dokazano je 2005. i 2006. godine na paradajzu, paprici, duvanu kao i na mnogim ukrasnim biljkama (Krstić i Bulajić, 2007). Tokom 2007. godine ustanovljeno je prisustvo TSWV na novim vrstama ukrasnih biljaka, a iste godine je utvrđena njegova ekspanzija na povrću i duvanu (Đekić i sar., 2007b; Krstić i sar., 2007; Krstić et al., 2007; Petković i sar., 2007; Simić i sar., 2007; Tomić i sar., 2007). Značajno prisustvo TSWV u proizvodnji duvana zabeleženo je u istraživanjima sprovedenim od 2005. do 2008. godine (Stanković i sar., 2010; Stanković et al., 2011a). Prvi put u Srbiji, TSWV je detektovan u proizvodnji *Gerbera hybrida*, gde je zabeleženo 30% zaraženih biljaka (Stanković et al., 2011b). Velika učestalost TSWV zabeležena je u usevima paprike u zaštićenom prostoru (Krstić i sar., 2011), dok je u usevima paradajza zabeležen u manjem procentu (Nikolić i sar., 2013). Prvi nalaz TSWV na crnom i belom luku u Srbiji ukazuje na proširenje kruga domaćina ovog virusa u Evropi (Stanković et al., 2012; Krstić i sar., 2012). Ispitivanja koja su ukazala na prisustvo TSWV kao novog patogena na tikvama u Srbiji i utvrdila *C. maxima* kao novog domaćina za ovaj virus u svetu, potvrđuju činjenicu da se krug domaćina ovog virusa širi (Vučurović i sar., 2012). Takođe, TSWV je u Srbiji prvi put zabeležen na hrizantemi (Stanković et al., 2013) i *Brugmansia* spp. (Nikolić et al., 2013). Višegodišnja istraživanja koja su obuhvatila 52 roda ukrasnih biljaka, gajenih u zaštićenom prostoru, potvrdila su stalno prisustvo i visoku učestalost TSWV u većini pregledanih lokaliteta (Stanković i sar., 2013).

Prema nekim podacima broj biljaka zaraženih sa TMV zabeležen je u staklenicama i do 60% (**Juretić, 1978**). Znatno manji broj zaraženih biljaka je kod sorti sa jednostavnijim načinom gajenja, gde se većina agrotehničkih mera ne sprovodi (**Šutić, 1995**). Virus mozaika paradajza je dugo smatran sojem virusa mozaika duvana. Javlja se u proizvodnji paradajza na otvorenom polju, a naročito u zaštićenom prostoru (**Krstić i sar., 2005a**). TMV je tokom ispitivanja sprovedenih u usevima paradajza 2011. godine zabeležen u manjem procentu (**Nikolić i sar., 2013**).

Prvi put u Srbiji, CMV je zabeležen na paprici 1956. godine (**Šutić, 1995**). Prema nekim zapažanjima retke su zaraze preko 10% biljaka u usevu paradajza (**Aleksić i sar., 1980**). CMV predstavlja najzastupljeniji virus u proizvodnji rasada paprike (**Petrović i sar., 2010**) i jedan od najrasprostranjenijih u proizvodnji paprike na otvorenom polju (**Krstić i sar., 2011**), što potvrđuju **Milošević i sar. (2013)** u kasnijim istraživanjima. U usevima tikava CMV je na mnogim lokalitetima bio prevalentan, a svuda prisutan sa visokom učestalošću u pojedinačnim i mešanim infekcijama (**Vučurović i sar., 2010, 2011**). Prvi nalaz CMV-a u usevima lubenice u Srbiji ukazuje da ovaj virus može biti pretnja komercijalnoj proizvodnji ove kulture (**Milojević et al., 2012**). Dalja proučavanja CMV u usevima lubenice ukazala su na njegovo pojačano prisustvo u mešanim infekcijama (**Milojević i sar., 2013**). Na pretnju u proizvodnji ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru ukazuju prvi nalazi CMV u Srbiji na *Peperomia tuisiana* (**Milojević et al., 2013**), *Tulipa* sp. (**Milojević et al., 2014**) i *Calendula officinalis* (**Milošević et al., 2015a**), a zatim i prvi nalaz ovog virusa u svetu na parkovskoj biljci *Wisteria sinensis* (**Milojević et al., 2016**). Istraživanje koja su sprovedli **Milošević et al. (2015b)** potvrdilo je prisustvo CMV u komercijalnim usevima *Calendula officinalis* što daje doprinos razjašnjenju epidemiološkog aspekta ovog virusa. CMV je visoko zastupljen virus paradajza u Srbiji u pojedinačnim i mešanim infekcijama (**Nikolić i sar., 2012; Nikolić i sar., 2013**). **Milojević i sar. (2013a)** ukazuju na izraženu genetičku varijabilnost populacije CMV poreklom sa različitih domaćina u Srbiji.

U zasadima paprike na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru PVY je najzastupljeniji virus (**Petrović i sar., 2010; Krstić i sar., 2011**), dok je u proizvodnji duvana zabeleženo njegovo dominantno prisustvo (**Stanković i sar., 2010; Stanković et al., 2011a**). U proizvodnji paradajza, PVY je jedan od zastupljenijih virusa u pojedinačnim i mešanim infekcijama (**Nikolić i sar., 2013**).

AMV je pokazao tendenciju lokalizovane pojave u usevima duvana, pri čemu se uglavnom javljao na manjem broju lokaliteta i sa različitom učestalošću (**Stanković i sar., 2011**). Prvi nalaz AMV na *Robinia pseudoacacia* u svetu zabeležen je u Srbiji što doprinosi boljem razumevanju epidemiologije i načinima širenja ovog virusa (**Delibašić et al., 2013**). Ovaj virus je u manjem procentu prisutan u usevu paradajza (**Nikolić i sar., 2013**). Prisustvo AMV, u komercijalnom usevu *Carthamus tinctorius*, prvi put u Srbiji zabeleženo je 2014. godine (**Milošević et al., 2015b**).

U toku poslednje decenije, broj virusa infektivnih za paradajz značajno se povećava, tako da je opšte mišljenje da problem sa simptomatološkog i epidemiološkog stanovišta postaje sve složeniji. Među virusima paradajza veliki je broj novih (virusi detektovani u poslednjih pet godina), „emerging“ (pojava virusa se povećava u poslednjih 20 godina) i „re-emerging“ virusa (virusi koji su držani pod kontrolom, ali usled rezistentnosti njihovih vektora prema pesticidima ili usled promene sortimenta i načina gajenja, postaju ponovo značajni). U kategoriji „emerging“ virusa, čija je populacija naglo povećana, su TIYV i ToCV, a u kategoriji virusa čiji značaj ponovo raste, koji se ponovo pojavljuju, je TSWV (**Krstić i sar., 2005b**).

2.6. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa paradajza

Širom sveta, kako u prirodnim, tako u laboratorijskim uslovima paradajz zaražava veliki broj virusa. Neki od njih izazivaju značajne ekonomske štete u kontinuitetu, ali se mnogi javljaju sporadično.

Najzastupljenije, a ujedno i najznačajnije viruse paradajza u svetu, ali i u Srbiji predstavljaju: CMV, PVY, AMV, TSWV, ToMV i TMV (**Krstić i sar., 2005b; Krstić, 2015a, 2015b; Nikolić et al., 2018**).

2.6.1. Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) i satelitna RNA (CMV satRNA)

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) predstavnik je roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* (**Murphy et al., 1995**). CMV je jedan od virusa sa najširim krugom domaćina. Od otkrića, broj prirodnih domaćina se stalno povećavao i

danas se smatra da je broj domaćina oko 1300 vrsta iz preko 500 rodova i više od 100 familija (**García-Arenal and Palukaitis, 2008**).

Prvi put je otkriven 1919. godine kao prouzročivač bolesti krastavca (**Francki et al., 1979**), na osnovu čega je i dobio naziv. Od tada, CMV se proširio u mnoge delove sveta kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama, identifikovan je kao uzročnik brojnih epidemija (**Palukaitis et al., 1992; Davis et al., 2012**). CMV se ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa, ali njegovo dominantno rasprostranjenje su umereno topli regioni gde su povoljni uslovi za razvoj njegovih vektora, biljnih vaši (**Gooding, 1991; Palukaitis et al., 1992**).

Virus mozaika krastavca prisutan je na paradajzu i u Srbiji. Prisustvo CMV u Srbiji zabeležili su prvi **Aleksić i sar. (1980)**. Na osnovu njihovih zapažanja CMV se pored paprike javio i na paradajzu, gde su zaraze useva bile preko 10%. Tokom 2007. godine, CMV je bio prevalentan virus u mnogim lokalitetima gajenja duvana (**Đekić i sar., 2008a, 2008b**). U Srbiji prisustvo CMV dokazano je na duvanu, paprici, paradajzu, običnoj tikvi, vrgu, dinji, lucerki i crvenoj detelini (**Šutić, 1995; Mijatović i sar., 1999; Đukić i sar., 2001, 2002a; Krstić i sar., 2002a, 2002b; Đukić, 2004; Đukić i sar., 2004a, 2004b; Đukić et al., 2006; Đukić et i sar., 2006**). Novija istraživanja ističu CMV kao najzastupljeniji virus u proizvodnji rasada paprike (**Petrović i sar., 2010**), kao i proizvodnji paprike na otvorenom polju (**Krstić i sar., 2011; Milošević i sar., 2013**). CMV je visoko prisutan i u mnogim usevima tikava je prevalentan virus (**Vučurović i sar., 2010, 2011**). Značajni su prvi nalazi ovog virusa u Srbiji na lubenici (**Milojević et al., 2012**), *Peperomia tuisiana* (**Milojević et al., 2013**), *Tulipa* sp. (**Milojević et al., 2014**) i *Calentula officinalis* (**Milošević et al., 2015a**). Prvi nalaz CMV u svetu na parkovskoj biljci *Wisteria sinensis* zabeležen je u Srbiji (**Milojević et al., 2016**). U usevima paradajza u Srbiji CMV je značajno zastupljen (**Nikolić i sar., 2012, 2013**).

CMV se sastoji od tri vrste čestica identične veličine, ali koje nose različite RNA (RNA1, RNA2 i RNA3). Za ostvarivanje infekcije neophodno je prisustvo sve tri RNA. Čestice su izometrijske, prečnika oko 30 nm izgrađene od nukleinske kiseline (18%) i proteina koji čini 82% ukupne težine (**Francki et al., 1979; Palukaitis et al., 1992**). Genom čine tri jednolančane infektivne genomne RNA (RNA1, RNA2 i RNA3) i dve subgenomne RNA4 i RNA4A (**Palukaitis et al., 1992**). RNA1 i RNA2 se nalaze u različitim česticama, dok se RNA3 i RNA4 nalaze zajedno u jednoj čestici (**Francki et**

al., 1979). RNA1 i RNA2 kodiraju 1a i 2a proteine koji su uključeni u replikaciju virusa, a RNA2 sadrži i region koji se prepisuje u subgenomnu RNA4A i kodira 2b protein, koji ima ulogu u širenju virusa i ispoljavanju virulentnosti. RNA3 je takođe bicistronska i kodira stvaranje 3a proteina, čija je funkcija u širenju virusa u biljci zbog čega se često označava i kao transportni protein (*movement protein*, MP). Takođe, RNA3 nosi i gen koji se prepisuje u subgenomnu RNA4 i kodira sintezu proteina omotača virusa (Palukaitis et al., 1992; Gallitelli, 2000).

CMV replikaza se sastoji od dva virusno kodirana proteina (1a i 2a) i proteina biljke domaćina koji je neophodan za aktivnost RNA zavisne RNA polimeraze (Gallitelli, 2000). Neki sojevi CMV imaju još jednu RNA, RNA5 koja predstavlja mešanu populaciju nukleotida konzerviranog 3' terminalnog regiona genomskih RNA1 i RNA2. Ova RNA5 je opisana i kao CMV-udružena RNA5 ili CARNA5. Smatra se da ova RNA ima ulogu u replikaciji CMV.

Neki sojevi virusa poseduju i satelitnu RNA (CMV satRNA) (Blanchard et al., 1996). To je mali RNA molekul dužine od 303 do 405 nukleotida (najčešće 332-342 nukleotida) koji u potpunosti zavisi od genoma CMV u pogledu svoje replikacije, enkapsidacije i širenja (Francki et al., 1979; Alonso-Prados et al., 1998; Gallitelli, 2000; Davino et al., 2012; García-Arenal and Palukaitis, 2008; Jacquemond, 2012). Prisustvo satRNA ima uticaj na ekspresiju simptoma, odnosno na ublažavanje ili pojačavanje simptoma na zaraženim biljkama (Grieco et al., 1997). Prisustvo CMV satRNA može uticati na smanjenje akumulacije ili virulentnosti CMV, dok neke CMV satRNA utiču na replikaciju i pojačanje ispoljenih simptoma u zavisnosti od soja CMV, satRNA i biljke domaćina (Palukaitis et al., 1992; Palukaitis and García-Arenal, 2003). Najčešće CMV satRNA ne izazivaju promene u ispoljavanju simptoma ili ublažavaju simptome, ali postoje i varijante CMV satRNA koje izazivaju pojavu sistemične nekroze i kržljivost biljaka ili jasno uočljivu svetložutu hlorozu (Collmer and Howell, 1992; García-Arenal and Palukaitis, 1999; Simon et al., 2004). Opisano je više od 100 varijanti CMV satRNA koje se javljaju kao pratioci izolata i podgrupe I i podgrupe II CMV (García-Arenal and Palukaitis, 2008) i na osnovu simptoma koje izazivaju mogu se podeliti u dve glavne grupe: nenekrogeni izolati (*nonnecrogenic*) i nekrogeni izolati (*necrogenic*) (Devic et al., 1990). U okviru nekrogenih izolata izdvajaju se dve grupe označene kao B i B1, a u okviru nenekrogenih izolata grupe A i C. Izolati

koji pripadaju nekrogenoj grupi i odgovorni su za pojavu sistemične nekroze poseduju karakterističnu „*necrogenic consensus*“ sekvencu GA-GCUAAGGCUUA...UGCUAUGCUGAU na 3' kraju CMV satRNA (Devic et al., 1990; Fisher, 2013). Izolati nenekrogene grupe ne poseduju ovu sekvencu i ne mogu da izazovu pojavu sistemične nekroze, ali neki od njih poseduju sekvencu nazvanu „*chlorosis-inducing domain*“, osnovni (GUUCUUCAG) ili produženi (GUUCUUCAGCACUACGCACUCAA) domen odgovoran za izazivanje izražene hloroze na paradajzu (Zhang et al., 1994; Fisher, 2013).

Proteinski omotač se sastoji od 180 identičnih proteinskih podjedinica, molekulske mase 24,5 kDa, a svaka proteinska podjedinica izgrađena je od 218-220 aminokiselina (Francki et al., 1979; Palukaitis et al., 1992).

CMV je vrlo varijabilan i opisan je veliki broj sojeva koji se međusobno razlikuju po krugu domaćina i simptomima koje izazivaju na različitim biljkama (Francki et al., 1979). Palukaitis et al. (1992) su u odnosu na biološke, serološke i molekularne osobine, sve sojeve CMV podelili u dve podgrupe: podgrupa I i podgrupa II. Najveći broj sojeva CMV pripada podgrupi I. Na osnovu homologije sekvenci nukleinskih kiselina sojeva podgrupe I, Palukaitis and Zaitlin (1997) predložili su izdvajanje podgrupe IB u koju bi bili svrstani sojevi poreklom iz Azije i podgrupe IA gde bi bili svrstani svi ostali sojevi. Filogenetske analize na osnovu drugih gena CMV (MP, 2a, 2b i 1a) ukazale su na isto svrstavanje izolata u podgrupe ovog virusa koje su izdvojene na osnovu CP gena (IA, IB i II) (Roossinck, 2002; Lin et al., 2004; Bonnet et al., 2005; Davino et al., 2012; Nouri et al., 2014).

Zaražene biljke paradajza ispoljavaju veoma izražene patološke promene. Na lišću zaraženih biljaka u početku se zapaža slabije mozaično šarenilo, koje sa razvojem bolesti postaje sve upadljivije. Promene su veoma izrazite u obrazovanju liski, koje se nenormalno sužavaju (nitavost, vrbolikost) i izdužuju u obliku končastih tvorevina. Skraćena i zbijena kolenca menjaju opšti izgled biljaka. Virulentni sojevi izazivaju nekrozu duž lisnih nerava, crtičaste nekrotične pege duž stabla i izumiranje vrhova izdanaka. Virus izaziva, naročito u združenoj zarazi sa TMV, sterilnost cvetova. Štetnost ovih promena u proizvodnji zavisi od broja zaraženih biljaka u usevu (Šutić, 1995). Broj zaraženih biljaka manji je nego što je to slučaj kod paprike (Aleksić, i sar., 1980).

Širenje CMV u prirodi omogućavaju njegovi vektori, biljne vaši. Opisan je veliki broj vrsta biljnih vaši koje prenose virus na neperzistentan način. Smatra se da više od 80 vrsta vaši prenosi CMV, a kao najčešći vektori navode se vrste *Myzus persicae* i *Aphis gossypii*. Većina sojeva virusa može se prenositi sa ove dve vrste vaši, jer je specifičnost prenošenja virusa u odnosu na vrstu vektora jako niska. Efikasnost prenošenja virusa zavisi od soja virusa, biljne vrste izvora zaraze i biljke na kojoj se vektor hrani, kao i od vrste i biotipa vektora (**Palukaitis et al., 1992**). Najveći broj sojeva ovog virusa prenosi se vašima, ali zabeleženi su i sojevi koji nemaju ovu sposobnost. Poređenjem sojeva koji se ne mogu prenositi vašima sa onima koji mogu, utvrđena je razlika u aminokiselinskom sastavu proteina omotača virusa. Smatra se da je glavna determinanta sposobnosti prenošenja CMV vašima upravo građa proteinskog omotača virusa (**Palukaitis et al., 1992; Ng and Perry, 2004; Ng et al., 2005**). Pored prenošenja vašima, CMV može da se prenese i semenom nekih gajenih i korovskih biljaka, kao i sa više od 10 vrsta *Cuscuta* sp. (**Francki et al., 1979; Šutić, 1995**). Mnogobrojni domaćini, jednogodišnji i višegodišnji, zeljasti i drvenasti, gajeni i spontani, omogućavaju održavanje virusa i predstavljaju značajne izvore zaraza (**Šutić, 1995**).

Teškoće u kontroli oboljenja koje CMV izaziva uslovljene su pre svega velikom varijabilnošću virusa, izraženom polifagnošću, kao i velikim brojem vektora-vaši koje virus prenose različitom efikasnošću. Kao najznačajnije mere kontrole **Krstić i Vico (2004)** navode proizvodnju zdravog rasada, odstranjivanje zaraženih i dosađivanje novih biljaka, uništavanje biljnih ostataka, primenu plodoreda, određivanje vremena rasađivanja, uništavanje korova i hemijsku kontrola vektora. Međutim, vaši mogu da obave svoju vektorsku ulogu i pre nego što primenjeni insekticidi deluju na njih, pa otporne sorte i unakrsna zaštita predstavljaju najbolji način kontrole virusnih oboljenja koje izazivaju neperzistentni virusi, kakav je i CMV. Izolovanje useva paradajza visokim, otpornim usevima kao što je kukuruz može odložiti period prve infekcije. Pored primene insekticida preporučuje se i primena mineralnih ulja u kontroli ovog i drugih virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način. Ključni faktor u smanjenju gubitaka u proizvodnji je odlaganje infekcije do što kasnijeg stadijuma razvoja biljke. Na ovaj način biljke postaju otporne ili tolerantne, što smanjuje negativan uticaj na prinos (**Jones et al., 2014**).

Konvencionalnim metodama oplemenjivanja i selekcije, dobijeni su CMV-rezistentni genotipovi spanaća, paprike i nekih tikava. Kako navode Sanford and Johnston (1985), CMV-rezistentni genotipovi dobijeni na ovaj način još uvek nisu komercijalno dostupni, pa su razvijeni novi prilazi koji se zasnivaju na rezistentnosti koja potiče od patogena (**loc. cit. Krstić i Vico, 2004**). Ugrađivanjem CP gena CMV podgrupe I u genom biljke dobijene su biljke paradajza koje pokazuju široku otpornost na sojeve podgrupe I, ali i na sojeve podgrupe II (**Gielen et al., 1996**). Unakrsna zaštita zasniva se na postizanju zaštite od virulentnijih sojeva preinokulacijom biljaka blagim sojem virusa sa ili bez satRNA. Upotreba blagih sojeva bez satRNA ograničena je na regione gajenja osetljivih biljaka gde nema rizika od pojave CMV sojeva sa satRNA. Unakrsna zaštita u regionima gde su prisutni sojevi koji nose satRNA postiže se korišćenjem blagih sojeva sa satRNA (**Gallitelli, 2000**).

2.6.2. Y virus krompira (*Potato virus Y*, PVY)

PVY pripada familiji *Potyviridae* i rodu *Potyvirus* koji je najbrojniji i ekonomski najznačajniji rod biljnih virusa (**Krstić, 2015b; Koike et al., 2007**). Ne nalazi se na karantinskim listama EPPO i Republike Srbije (**OEPP/EPPO, 2016; „Službeni glasnik RS“ br. 57/15**).

Y virus krompira je patogen karakterističan za biljke iz familije *Solanaceae* širom sveta i jedan od ekonomski najznačajnijih virusa (**Koike et al., 2007**). Kao rezervoari PVY u prirodi služe brojne korovske vrste koje su domaćini ovog virusa (**Krstić, 2015b**). U regionima sa umerenom klimom, višegodišnje biljke su retko rezervoar ovog virusa. Krompir predstavlja značajnog domaćina PVY u regionima sa umerenom klimom gde se gaje paradajz i paprika. U subtropskim oblastima Južne Floride krompir služi kao glavni izvor PVY za papriku i paradajz. Bez obzira što je široko rasprostranjen, ima uzak krug domaćina. Kao eksperimentalni domaćini ovog virusa označene su biljke iz familija *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Asteraceae* i *Fabaceae* (**Jones et al., 2014**).

Ubraja se u grupu opšte rasprostranjenih virusa i jedan je od ekonomski značajnijih virusa za paradajz, a jedan od najznačajnijih virusa paradajza u SAD, Argentini, Australiji, Kanadi, Tajvanu, kao i u zemljama mediteranskog basena (Izrael, Maroko i Tunis). Takođe, značajne štete u proizvodnji paradajza i epidemijska pojava

ovog virusa zabeležena je u Francuskoj i centralnim i severnim delovima Italije (**loc. cit. Krstić, 2015b**).

U Srbiji PVY je u zasadima paprike na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru najzastupljeniji virus (**Petrović i sar., 2010; Krstić i sar., 2011**). U usevima duvana zabeleženo je dominantno prisustvo PVY (**Stanković i sar., 2010; Stanković et al., 2011a**). U proizvodnji paradajza, PVY je jedan od zastupljenijih virusa u pojedinačnim i mešanim infekcijama (**Nikolić i sar., 2013**).

Dužina virusnih čestica PVY je 730 x 11 nm, štapičaste su i sadrže jednolančanu RNA (**Koike et al., 2007**). Većina sojeva PVY su bliski po serološkim karakteristikama. PVY izolati se klasifikuju u tri osnovne grupe: PVY^O, PVY^N i PVY^C (**Jones et al., 2014**). Genom PVY, kao i kod ostalih članova roda *Potyvirus*, čini jednolančana infektivna ribonukleinska kiselina, (+) ss RNA, veličine oko 9,7 kb koji se translacijom prevodi u jedan poliprotein koji je izgrađen od 3062 aminokiseline. Za 5' kraj nukleinske kiseline, 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. Poliprotein se dejstvom virusno kodiranih proteaza (P1, HC-pro i Nia proteini) deli na 10 manjih funkcionalnih proteina. Genom sadrži još jedan kratki ORF (otvoreni okvir čitanja), P3N-PIPO. Protein 1 (P1) je virusno kodiranih proteaza i najvarijabilniji deo genoma kod virusa roda *Potyvirus*. Protein HC-Pro (*helper-component proteinase*) je još jedna virusno kodirana proteaza koja, pored toga, ima mnogo funkcija: protein koji vrši supresiju RNA utišavanja (*RNA silencing*), učestvuje u replikaciji, sistemskom širenju virusa u biljci, prenošenju vašima i kretanju virusa od ćelije do ćelije. Protein 3 (P3) je uključen u patogenost, sistemsku infekciju, replikaciju i kretanje virusa u biljci. Funkcija 6K1 proteina nije poznata. CI protein je uključen u formiranje inkluzija tipa vodeničnog vitla (*pinwheel*), a 6K2 protein je uključen u replikaciju. VPg protein ima brojne funkcije, a najbitnija je uloga u replikaciji i translaciji. NIa protein (*nuclear inclusion protein*) predstavlja glavnu proteazu za cepanje poliproteina. NIB protein je virusna RNA zavisna RNA polimeraza. CP protein (*coat protein*, protein omotača) je neophodan za samosakupljanje viriona, prenošenje vašima, kretanje od ćelije do ćelije i sistemsku infekciju (**Quenouille et al., 2013**).

PVY je jedan od najvarijabilnijih biljnih virusa i od njegovog otkrića 30-ih godina 20. veka do danas, ustanovljeno je postojanje većeg broja sojeva, kao i bioloških tipova

u okviru samih sojeva (Kerlan et al., 2011; Youssef, 2017). Izolati PVY su prvo klasifikovani na osnovu glavnih domaćina ovog virusa, na sojeve poreklom sa duvana, krompira, paprike i paradajza. Zatim su izolati grupisani u definisane sojeve na osnovu njihovih bioloških (simptomatologija i različiti tipovi reakcija otpornosti) i seroloških karakteristika u tri osnovne grupe: PVY^O (obični soj), PVY^N (nekrotični soj) i PVY^C (crtičasti soj) prema simptomima koje prouzrokuju na nekim sortama krompira i duvana, kao i na biljci *Physalis floridana*. Međutim, velika varijabilnost virusa uslovljena različitim mehanizmima izmene genetičkog materijala prilično je uobičajena za viruse roda *Potyvirus*, pa i za PVY, tako da se opisuje sve veći broj novih sojeva koji nastaju kao posledica rekombinacija i čiji genom predstavlja mozaik izgrađen od segmenata genoma izolata najčešće običnog i nekrotičnog soja. Razvojem molekularne biologije i razvijanjem molekularnih tehnika detekcije, identifikacije i karakterizacije omogućeno je izdvajanje podgrupa u okviru osnovnih grupa sojeva. Tako je utvrđeno postojanje šest različitih filogenetskih podgrupa u okviru običnog soja, dok se u okviru crtičastog soja izdvajaju dve filogenetske podgrupe: (i) podgrupa C1 gde su svrstani izolati poreklom sa paprike, duvana i paradajza i (ii) podgrupa C2 koju čine izolati poreklom sa krompira. Sredinom 80-ih godina XX veka u Evropi su detektovane dve grupe izolata označane kao NTN i Wilga izolati, koje su se međusobno razlikovali po virulentnosti, a izazivali su prstenastu nekrozu krtola krompira (*Potato tuber necrotic ringspot disease*, PTNRD). Kasnija ispitivanja genoma, dokazala su da se radi o rekombinantnim izolatima između izolata nekrotičnog i običnog soja. Izolati NTN soja svrstani su u dva tipa: tip A sa 3 mesta rekombinacije (HC-Pro/P3, VPg/NIa i C terminus CP gena) i tip B sa četiri mesta rekombinacije (HC-Pro/P3, VPg/NIa, C terminus CP gena i P1 gen), a izolati Wilga soja razdvojeni su u dve grupe: (i) PVY^{N:O} izolati, ranije označeni kao PVY^N-Wi (A) tip, sa jednim mestom rekombinacije u delu HC-Pro/P3 gena i (ii) koju čine PVY^{N-Wi} izolati, ranije označeni PVY^N-Wi (B) tip, sa dva mesta rekombinacije u region P1 i HC-Pro/P3 gena. Broj sojeva i podgrupa u okviru sojeva nije konačan imajući u vidu da se poslednjih godina značajna pažnja poklanja istraživanju i karakterizaciji izolata PVY poreklom ne samo sa krompira, već i drugih biljaka domaćina i da se otkrivaju nove varijante i pojava rekombinacija ne samo između opisanih sojeva već i između samih rekombinanata.

Simptomi koje PVY izaziva na paradajzu veoma su raznovrsni i zavise pre svega od soja virusa, genotipa paradajza, vremena infekcije i uslova spoljašnje sredine. Najčešći

tip simptoma koje ovaj virus izaziva na paradajzu je blago šarenilo i slabo izražene deformacije lista, koji su praćeni zadržavanjem zelene boje duž lisnih nerava. Osim toga, česti simptomi na paradajzu gajenom na otvorenom polju su i pojava tamnobraon, nekrotičnih zona i pega naročito uz ivicu starijeg lišća. Mlađe lišće biva u potpunosti zahvaćeno nekrozom i propada, a na lišću pri kraju porasta uočava se blago šarenilo, deformacije i naboranost. U nekim slučajevima lišće zaraženih biljaka se uvija i visi niz peteljku dajući biljci uveo izgled. Nekrotični sojevi ovog virusa izazivaju mozaik i deformacije lišća, nekrozu cvetova i neravnomerno sazrevanje plodova (**Krstić, 2015b**). Na plodovima najčešće nema simptoma (**Koike et al., 2007**). Nekrotični sojevi PVY zabeleženi u Italiji prouzrokuju deformaciju lista, nekrozu cveta i neravnomerno sazrevanje ploda. U slučajevima kada se otkrije rana infekcija, koju prati brojna populacija biljnih vaši, može se očekivati totalna šteta u usevima (**Jones et al., 2014**).

Širenje tokom vegetacije omogućava veliki broj vrsta biljnih vaši (najmanje 25 vrsta biljnih vaši). Vaši prenose virus na neperzistentan način što znači da je za usvajanje, odnosno prenošenje virusa dovoljno veoma kratko vreme ishrane, čak i sama probna ishrana vaši. Kao najefikasniji vektor navodi se *Myzus persicae*, ali lista efikasnih vektora uključuje i *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus certus*, *Phorodon humuli* i *Rhopalosiphum insertum*. Prenosjenje ovog virusa pomoću vaši uslovljeno je građom i strukturom HC protein (*heleper component*) i protein omotača virusa (*coat protein*). Virus se prenosi i mehanički, sokom zaraženih biljaka što je od značaja u proizvodnji biljaka u gustom sklopu naročito u rasadu, ali ne i semenom paradajza (**Krstić, 2015b**). Prenosjenje PVY putem semena nije zabeleženo (**Jones et al., 2014**).

Osnova kontrole oboljenja koje ovaj virus izaziva čine preventivne mere, pre svega: prostorna izolacija gajenih biljaka domaćina, uklanjanje i uništavanje zaraženih biljaka i biljnih ostataka, uništavanje korova i primena mineralnih ulja da bi se smanjila efikasnost prenošenja vektorima. Zbog lakog mehaničkog prenošenja u proizvodnji biljaka u zaštićenom prostoru preporučuje se i dezinfekcija alata, oruđa i svog ostalog pribora. Izvori otpornosti prema ovom virusu pronađeni su u biljkama *Lycopersicum hirsutum* i iskorišćeni za stvaranje otpornih sorti, ali u poslednje vreme zabeleženi su izolati koji prevazilaze ovu otpornost (**loc. cit. Krstić, 2015b**).

2.6.3. Virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthospovirus*, TSWV)

Virus pegavog uvenuća paradajza, kod nas poznatiji pod imenom virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthospovirus*, TSWV), tipičan je predstavnik reda *Bunyavirales*, familije *Tospoviridae*, roda *Orthospovirus*, i dugo je bio klasifikovan kao jedini član „Tomato spotted wilt“ grupe (Matthews, 1979; ICTV, 2017). TSWV se nalazi na EPPO A2 listi (OEPP/EPPO, 2016) i na IA deo II listi karantinski štetnih organizama Republike Srbije („Službeni glasnik RS“ br. 57/15).

TSWV je virus sa izraženom polifagnom prirodom i jedan od virusa sa najširim krugom domaćina među biljnim virusima. Kao prirodni domaćini ovog virusa navodi se veliki broj vrsta, oko 1090 biljnih vrsta iz 15 familija monokotiledonih, 69 familija dikotiledonih biljaka i jedne familije razdela Pteridiophyta, fam. Pteridaceae. Većina biljaka domaćina pripada familijama Asteraceae (247 vrsta), Solanaceae (172 vrste) i Fabaceae (60 vrsta) (Parrella et al., 2003).

Oboljenje prouzrokovano ovim virusom otkriveno je u Australiji kao pegavo uvenuće paradajza (Brittlebank, 1919), a već godinu dana kasnije pronađeno je u svim regionima gajenja paradajza u Australiji (Parrella et al., 2003). Međutim, virusna priroda oboljenja utvrđena je tek 1930. godine (Samuel et al., 1930). Od tada se TSWV proširio u mnoge delove sveta i prouzrokovao je brojne epidemije na različitim usevima. Prema OEPP/EPPO (1999), TSWV je opšte rasprostranjen i njegovo prisustvo potvrđeno je u umerenim, subtropskim i tropskim područjima sveta, a u hladnijim područjima nalazi se u staklenicama i drugim zaštićenim prostorima. Prisutan je u zemljama EPPO regiona i EU, Azije, Afrike, Severne, Centralne i Južne Amerike, Karibima, kao i u zemljama Okeanije (OEPP/EPPO, 2004; Kajić i Milanović, 2013).

Prvi podaci o prisustvu ovog virusa na duvanu u Srbiji potiču iz 1969. godine (Mickovski, 1969), a nakon toga je utvrđen na paprici (Mijatović i sar., 1999; Dukić i sar., 2002). Jasnić i sar. (2000) su, prateći zaraženost useva duvana, utvrdili dominantno prisustvo TSWV 1995. i 1999. godine. Prisustvo TSWV u našoj zemlji utvrđeno je, pored paradajza, i na paprici, duvanu, tikvama, crnom i belom luku i mnogobrojnim vrstama ukrasnih biljaka (Mijatović i sar., 1999; Dukić i sar., 2002; Đekić i sar., 2007a, 2007b; Krstić i Bulajić, 2007; Krstić i sar., 2007, Krstić et al., 2007; Petković i sar., 2007; Simić i sar., 2007; Tomić i sar., 2007; Stanković i sar., 2010; Stanković et al., 2011a;

Stanković et al., 2011b; Krstić i sar., 2011; Nikolić i sar., 2013; Stanković et al., 2012; Krstić i sar., 2012; Vučurović i sar., 2012; Stanković et al., 2013; Nikolić et al., 2013; Stanković i sar., 2013).

Iako za sada TSWV nije detektovan na krompiru u našoj zemlji, poslednjih godina u svetu sve češće ugrožava usev krompira visokim intenzitetom zaraze. U Evropi TSWV se na krompiru javlja sporadično i retko, ali pojava ovog virusa može često da bude i podcenjena, jer simptomi mogu da budu pripisani drugim patogenima (**Wilson, 2001; Rodoni and Henderson, 2004**).

Virioni TSWV su kvazisferični (po nekim istraživačima izometrijski), prečnika od 70-120 nm i okruženi sa dvostrukom lipoproteinskom membranom (**Brunt et al., 1996; Anonymous, 2002**). Genom se sastoji od tri linearne (–) ssRNA neinfektivne, ili (+/–) ssRNA „ambisense” (ambiinformaciona) označene kao S (short), M (middle) i L (large). Najveća RNA (L RNA) je (–) i monocistronska, a ostale dve su (+/–) i kodiraju po dva proteina. Virusni genom kodira ukupno pet proteina: (i) RNA-zavisna RNA polimeraza koju kodira L RNA; (ii) NSm protein koji je uključen u kretanje virusa od ćelije do ćelije (*movement*, transportni protein), koji kodira M RNA; (iii) glikoproteini G1 (Gn) i G2 (Gc), koje kodira virusno-komplementarni lanac M RNA; (iv) NSs nestrukturani protein koji izaziva formiranje agregata ili filamenata u ćelijama zaraženim TSWV i ima funkciju utišavanja gena (*gene silencing*), koji kodira S RNA; (v) N strukturani protein koji je kodiran virusno-komplementarnim lancem S RNA. Tri genomne RNA su tesno 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., 1996b; Soellick et al., 2000; Silva et al., 2001; Prins and Kormelink, 2004; Pappu, 2008; Tsompana and Moyer, 2008; Pappu et al., 2009**). S i M segmenti genoma TSWV poseduju međugenske regione (*intergenic region*, IGR) za koje je utvrđeno da su kod različitih izolata različite dužine i smatraju se hipervarijabilnim regionima genoma TSWV (**Heinze et al., 2003**). Njihova funkcija nije poznata, a pretpostavlja se da imaju ulogu signala za završetak transkripcije (**Goldbach and Peters, 1996**).

Izolati virusa koji pripadaju *Orthotospovirus* rodu prvo su identifikovani na osnovu antigenih osobina i uspostavljena je klasifikacija na serogrupe (**de Avila et al., 1990**) u kojoj je TSWV bio jedini predstavnik serogrupe I. Sadašnja taksonomija i

klasifikacija *Tospovirus*-a, odnosno *Orthotospovirus*-a zasniva se na proučavanju molekularnih osobina i na osnovu homologije sekvenci različitih delova genoma (**de Avila et al., 1993; Goldbach and Kuo, 1996; Pappu et al., 2000; Silva et al., 2001**). Na osnovu geografske rasprostranjenosti i filogenetske analize, svi *Tospovirus*-i podeljeni su u američku i evroazijsku grupu, pri čemu TSWV pripada američkoj grupi. TSWV ispoljava izuzetnu varijabilnost i u prirodi i postoji kao kompleks sojeva (**de Avila et al., 1990; Chatzivassiliou et al., 2000; Mandal et al., 2006**). Filogenetske analize na osnovu kodirajućih (NC, NSm i NSs) i nekodirajućih (IGR na S i M RNA) sekvenci, otkrivaju sličnosti i razlike na molekularnom nivou između različitih izolata TSWV, koje su u korelaciji sa geografskim poreklom virusa (**Pappu et al., 1998; Bhat et al., 1999; Heinze et al., 2003; Tsompana et al., 2005**). Ovu tvrdnju potkrepljuje istraživanje gde su se TSWV izolati poreklom iz useva duvana u Srbiji, na osnovu sličnosti sekvenci NC gena, grupisali sa izolatima iz Bugarske i Crne Gore, dok su drugi Evropski izolati formirali različitu geografsku subpopulaciju. Visoka sličnost sekvenci TSWV izolata iz Srbije, Bugarske i Crne Gore ukazuje na protok gena koji se desio na teritorijama ovih država (**Đekić, 2009**).

TSWV izaziva veoma raznovrsne simptome na svojim domaćinima koji mogu da variraju na istoj biljnoj vrsti u zavisnosti od sorte, starosti biljke, vremena infekcije i uslova spoljašnje sredine. Temperatura ima veoma važnu ulogu u jačini ispoljavanja simptoma (**Allen et al., 1991**). Simptomi se ispoljavaju 3-14 dana posle infekcije, mada ponekad inkubacioni period traje mnogo duže (**Kucharek et al., 2000**).

Simptomi na paradajzu ispoljavaju se na lišću, peteljkama, stablu i plodovima. Variranje simptoma je izraženo i zavisi od faze razvoja biljke u vreme infekcije. Mlado lišće reaguje pojavom malih, svetlosmeđih fleka ili pega koje kasnije postaju tamnosmeđe, a zatim dolazi do opšteg tamnjenja lišća koje izumire i klonulo visi sa lisne drške. Često je i zadebljanje nerava, uvijanje i naboranost lista. Tipičan simptom je bronzavost lišća (**Krstić i Bulajić, 2007**). Simptomi sistemskih zaraza potvrđeni su nakon mehaničkih inokulacija rasada različitih sorti paradajza. Pojava prvih simptoma u vidu hlorotičnih i nekrotičnih koncentričnih pega uočena je 11 dana po inokulaciji, dok je pojava sistemskog hlorotičnog šarenila, nekroze i bronzavosti uočena 21-24 dana po inokulaciji (**Đekić, 2009**). Na peteljkama i stablu javlja se nekroza u vidu tamnosmeđih traka i takve biljke kasnije uginjavaju. Vršni meristem obično zahvata sistemski nekroza,

što se odražava na smanjen porast biljke (Krstić i Bulajić, 2007). Zaraza u ranim fazama razvoja biljke može da prouzrokuje izostanak plodova, dok se kod biljaka zaraženih neposredno nakon formiranja plodova lako mogu uočiti prstenaste hlorotične pege (Jones et al., 2014). Na jako zaraženim biljkama, plodovi paradajza imaju veoma karakteristične simptome: na nedozrelim plodovima javljaju se svetlozeleni prstenovi nepravilnog ili koncentričnog oblika i ceo plod može biti prošaran. Na mladim, zelenim plodovima javljaju se koncentrične prstenaste pege, odnosno bledocrvena, bela ili narandžasta polja oivičena koncentričnim prstenovima. Takvi plodovi nemaju tržišnu vrednost. Simptomi se na nekim biljkama javljaju samo na plodovima (Krstić i Bulajić, 2007). Zaražene biljke mogu formirati porast samo jedne strane stabla. Takođe, cele biljke mogu biti zakržljale sa osušenim lišćem, što odaje utisak uvenuća (Jones et al., 2014).

Dva osnovna načina širenja TSWV u prirodi su prenošenje vektorima i prenošenje zaraženim propagativnim biljnim materijalom. TSWV se prenosi većim brojem vrsta tripsa (Thysanoptera: Thripidae), a najznačajniji vektori su vrste: *Frankliniella occidentalis* (zapadni cvetni 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). Manje značajne vrste tripsa koje prenose TSWV su: *F. intosa*, *F. bispinosa* i *Thrips setosus* (Jones et al., 2014). TSWV se prenosi tripsima na cirkulativan (perzistentan) i propagativni način. 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, 2004). Tripsi usvajaju virus intenzivnom ishranom, a zaražavanje biljaka (inokulacija) može da bude postignuto „plitkom“ ishranom u epidermalnim ćelijama. Izvesno vreme smatralo se da najznačajniju ulogu u širenju TSWV ima imago tripsa, jer u uslovima bez vetra ili sa slabim vetrom lete na malim rastojanjima, dok ih jaki vetrovi prenose na veću udaljenost. Međutim, postoje rezultati koji ukazuju da su larve drugog stupnja potencijalno efikasnije u širenju virusa nego imaga, pogotovo u zaštićenom prostoru i ako se biljke međusobno dodiruju. U godinama sa toplim i suvim vremenom dolazi do naglog porasta brojnosti populacije tripsa, pa se tada bronzavost paradajza, kao i hloroza i kržljivost duvana, javlja u štetnim razmerama (Prins and Kormelink, 2004). Takođe, TSWV se širi i putem međunarodne trgovine biljnim materijalom. Posebno su značajni rasad i reznice, koji mogu da budu zaraženi virusom ili infestirani zaraženim tripsima (Hausbeck et al., 1992). Iako je prenošenje lukovicama i

krtolama ukrasnih biljaka moguće, smatra se da je ono retko i manje značajno (**Robb et al., 1998; Kucharek et al., 2000**). Naročito značajan kao domaćin je krompir, jer se TSWV prenosi zaraženim krtolama. U zavisnosti od sorte, prenosivost krtolama se kreće od 5 do 84%. Krtole formirane na zaraženim biljkama mogu da budu deformisane sa pukotinama i tamnim nekrotičnim pegama u unutrašnjosti krtole ili se na peridermu krtola javljaju nekrotične pege u vidu koncentričnih pega i šara, ali moguće je i da zaražene krtole ne ispoljavaju vidljive simptome. U Evropi TSWV se javlja sporadično na krompiru. Pojava ovog virusa u određenom broju slučajeva može biti i podcenjena, jer se simptomi mogu pripisati drugim patogenima (**Wilson, 2001; Rodoni and Henderson, 2004**). TSWV nije zabeležen u usevima krompira u Srbiji. Primenom mehaničkih inokulacija i kalemljenjem, kao načinima prenošenja TSWV, dokazana je visoka osetljivost sotri krompira dostupnih na tržištu Srbije. Inokulisane biljke ispoljile su: sistemične zaraze, brojne nekrotične pege na listovima i stablu, nekrozu i propadanje vrha izdanka, udubljene nekrotične prstenove, koncentrične prstenaste pege i pukotine na peridermu krtola, sistemične nekrotične pege na listovima, nekrotične prstenove na naličju lišća i krupne nekrotične koncentrične pege na lišću (**Đekić, 2009**).

Zaražene korovske vrste predstavljaju najvažniji izvor inokuluma, jer omogućavaju održavanje TSWV u zimskom periodu i predstavljaju reproduktivnog domaćina za vektore. Sa zaraženih korova virus se prenosi na osetljive biljke (**Groves et al., 2001**). Umnožavanje TSWV na korovskim biljkama u proleće predstavlja alternativu i omogućava prelazak sa prezimljujućeg domaćina na osetljive gajene biljke koje se tada seju ili sade. TSWV se, kao i drugi *Tospovirus*-i, ne prenosi semenom biljaka domaćina (**Reddy and Wightman, 1988; Jones et al., 2014**).

Raznovrsnost sojeva ovog virusa uslovljena je ne samo mutacijama i rekombinacijama već i pseudorekombinacijama, zbog postojanja trodelnog genoma. Na taj način omogućena je i preraspodela između samih genomnih segmenata (**Qiu et al., 1999**). Razlike između izolata naročito se odnose na ekspresiju simptoma na različitim domaćinima, serološke osobine i adaptibilnost TSWV na nove domaćine i nova geografska područja. Pored toga, velika varijabilnost virusa omogućava brzo prevazilaženje konvencionalne i transgenetske rezistentnosti (**Vaira et al., 1995; Cho et al., 1996; Mandal et al., 2006; Davis et al., 2012**), što dodatno otežava kontrolu oboljenja.

Teškoće u kontroli TSWV koje su izazvane velikom varijabilnošću i izraženom polifagnom prirodom virusa odražavaju se negativno na proizvodnju paradajza. Takođe, biološke karakteristike tripsa, brzo razvijanje rezistentnosti, kao i specifičnost proizvodnje paradajza koja uključuje proizvodnju kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju, čine kontrolu TSWV na paradajzu izuzetno teškom. Kontrola je uglavnom usmerena na tripse kao vektore i primenu ostalih sanitarnih mera: proizvodnja zdravog rasada, fizičko razdvajanje proizvodnje rasada paradajza i proizvodnje cveća, određivanje vremena rasađivanja, uništavanje korova u polju, hemijska kontrola tripsa u polju i zaštićenom prostoru u kombinaciji sa upotrebom UV-reflektujućih malč folija, odstranjivanje zaraženih i dosađivanje novih biljaka, plodored, izbor otpornih hibrida i upotreba aktivatora otpornosti biljaka (OEPP/EPPO, 1999; Anonymous, 2002; Krstić i sar., 2006b; Krstić i Bulajić, 2007; Jones et al., 2014; Davis et al., 2012). Primenom kombinacije aktivatora otpornosti (acibenzolar-S-metil) i insekticida na bazi imidakloprida ili tiametoksana, uz preduslov da sekoristi bezvirusni sadni materijal, može se obezbediti uspešna kontrola TSWV u komercijalnim zasadima paradajza (Csinos et al., 2001; Davis et al., 2012).

Izučavanja u okviru molekularne populacione genetike TSWV, odnosno genetičke strukture populacije i njene varijabilnosti postavljaju osnove razvoja novih strategija kontrole ovog virusa i omogućava dijagnostičarima ne samo detekciju i identifikaciju virusa, već i predviđanje izvora infekcije za određeni usev (Tsompana et al., 2005). Činjenica da se TSWV pokazao kao visoko adaptibilan virus, koji se brzo širi, daje mu važnu ulogu u komercijalnoj poljoprivredi. Razumevanje dinamike populacije ovog virusa, vektora i njihovih domaćina može dovesti do bolje kontrole ili prevencije epidemija kao i smanjenja efekta neefikasne rezistentnosti biljaka, a sve ukupno do ublažavanja ekonomskih posledica po proizvodnju (Kaye et al., 2011).

2.6.4. Virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)

AMV je tipičan predstavnik roda *Alfavirus* u okviru familije *Bromoviridae*. Evolutivna srodnost AMV, CMV i virusa mozaika bromusa (*Brome mosaic virus*, BMV) odavno je eksperimentalno potvrđena (Savithri and Murthy, 1983). Ne nalazi se na

karantinskim listama EPPO i Republike Srbije (**OEPP/EPPO, 2016**; „**Službeni glasnik RS**“ br. 57/15).

Virus mozaika lucerke prvi put je otkriven 1931. godine u SAD (**Bos and Jaspars, 1971**) kao prouzročivač ekonomski značajne bolesti lucerke i od tada je utvrđeno da je infektivan za veliki broj domaćina (**Bol, 1999**). Uspešno prečišćavanje AMV, obavljeno je 1960. godine, pokazalo je da se virusni preparat sastoji od baciliformnih čestica različite dužine, koje su potom razdvojene u frakcije i ustanovljeno je da postoje četiri osnovne veličine virusnih čestica i da svaka sadrži specifičnu vrstu RNA koje se označavaju kao RNA1, RNA2, RNA3 i RNA4. Ispitivanja bioloških karakteristika odvojenih komponenti rezultirala su time što je 1971. godine potpuno rasvetljena njihova uloga. Ustanovljeno je da se genom AMV sastoji od RNA1, 2 i 3 i da smeša sve tri genomne RNA postaje infektivna tek kada se dodaju proteinske podjedinice proteina omotača (*coat protein*, CP) ili njegova subgenomna informaciona RNA4 (**Bol, 2010**).

Krug domaćina AMV uključuje biljne vrste iz familija Asteraceae, Fabaceae, Solanaceae i Apiaceae (**Jaspars and Bos, 1980**). Prirodne zaraze koje prouzrokuje AMV otkrivene su na 150 vrsta biljaka iz 22 familije, dok eksperimentalni i prirodni krug domaćina uključuje preko 600 vrsta biljaka iz 70 familija (**Hull, 2009; Bol, 2010**). Po drugim podacima, krug domaćina obuhvata više od 400 vrsta uključujući više vrsta povrća i drvenastih biljaka (**Jaspars and Bos, 1980; Hajimorad and Francki, 1988; Parrella et al., 2000**).

AMV je jedan od virusa koji je rasprostranjen širom sveta (**Jaspars and Bos, 1980**), svuda gde se gaje njegovi mnogobrojni domaćini (**Hull, 2009; Bol, 2010**). Rasprostranjenost i ekonomski značaj AMV u nekom području veoma su promenljivi i značajno zavise od brojnih faktora. Ovakva situacija objašnjava se promenama u populaciji vektora i brojnim introdukcijama virusa putem zaraženog semena lucerke (**Hajimorad and Francki, 1988**). Bez obzira što je virus mozaika lucerke prisutan širom sveta, probleme u proizvodnji paradajza pravi samo u određenim regionima (**Koike et al., 2007**) i ne smatra se za ozbiljniju pretnju. Izuzetak su situacije kada su usevi paradajza locirani blizu useva lucerke. Ozbiljnije štete u proizvodnji paradajza, koje su se kretale 10-15%, zabeležene su u SAD-u (Kalifornija), a zaraza je zahvatala usev uniformno. Krajem prošlog veka AMV je kao štetan virus za useve paradajza zabeležen u Italiji i Francuskoj (**Jones et al., 2014**).

Iako je zaraza lucerke virusom mozaika lucerke u Srbiji bila detektovana (Babović, 1965; 1968) i prenošenje ovog virusa semenom paprike potvrđeno (Šutić, 1959), prvi podaci o prenošenju AMV semenom lucerke vezuju se za negativne rezultate (Šutić i sar., 1972, 1973). Tek Tošić and Pešić (1975) su dokazali da se AMV prenosi semenom različitih sorti lucerke u proseku sa 12,2%. Noviji podaci o AMV u Srbiji, pre svega o prisustvu i rasprostranjenosti, ali i prvi podaci o molekularno identifikovanim i okarakterisanim izolatima, potiču iz proučavanja ovog virusa na duvanu (Dukić sar., 2006; Đekić, 2009), paradajzu (Krstić i sar., 2007a; Nikolić i sar., 2013), paprici (Tomić i sar., 2007; Krstić i Bulajić, 2008; Petrović i sar., 2010), kao i lucerki (Bulajić i sar., 2010).

Baciliformne čestice AMV su veličine 30-56 x 18 nm (Koike et al., 2007). Virusne čestice AMV imaju višedelni genom koji se sastoji od tri genomne RNA. RNA1 i RNA2 kodiraju protein replikaza, P1 i P2. Protein P1 sadrži deo sličan metiltransferazi na N kraju, dok na C kraju ima deo koji odgovara helikazama. Protein P2 sadrži delove koji odgovaraju polimerazi. RNA3 je dicistronska i sa 5'-kraja kodira protein koji učestvuje u kretanju (*movement protein*, MP), dok je na 3'-kraju gen za CP. Proteini MP i CP su neophodni za kretanje virusa od ćelije do ćelije. CP se translacijom dobija iz subgenomne RNA4 koja je identična sa sekvencom od 881 nukleotida (nt) sa 3'-kraja RNA3. Dužina intercistranskog, međugenskog regiona na RNA3 je 52 nt i ona uključuje i početnu sekvencu RNA4 u dužini od 36 nt. U uslovima *in vitro*, 3'-neprepisujući region (*untranslated region*, UTR) svih RNA AMV može da veže nekoliko dimera CP. Minimalna dužina mesta koje vezuje CP sastoji se od 39 nt na 3'-kraju genomnih RNA. Tako su dobijeni kristali od 39 nt sa 3'-kraja fragmenta RNA i 26 aminokiselina sa N-kraja CP i njihova struktura je eksperimentalno određena (Bol, 2010). U svetu su opisani brojni sojevi i varijante virusa sa malim razlikama, a kao najčešće za razlikovanje sojeva korišćene su razlike u simptomima ispoljenim nakon mehaničkih inokulacija na *Phaseolus vulgaris* i *Vigna sinensis* (Jaspars and Bos, 1980).

Najznačajnije bolesti koje se vezuju za AMV su mozaik lucerke, kaliko mozaik i nekroza krtola krompira, raznoliki simptomi na duvanu, mozaik na paprici, izražena nekroza na paradajzu, mozaik crvene i bele deteline, mozaik i kaliko na celeru i salati, nekrotična prugavost graška i druge (Jaspars and Bos, 1980). Simptomi koje AMV prouzrokuje na paradajzu zavise od soja virusa, hibrida paradajza, faze razvoja biljke i

uslova spoljašnje sredine. Rane zaraze dovode do žutila i bronzavosti vrha biljke i do nekroze nervature lista (**Jones et al., 2014**). Takođe, biljke paradajza koje su zaražene u ranoj fazi razvoja mogu uginuti. Lišće koje se razvija dok je biljka zaražena obično je nepravilnog oblika sa svetlo-žutim do bronzanim flekama. Kod jače zaraženih biljaka lišće se uvija na dole. Sprovodno tkivo donjeg dela stabla može dobiti crvenu do crvenobraon boju, gde je primetno pucanje epidermisa prizemnog delu stabla. Ova promena boje često zahvati koren i vršne izdanke biljke. Simptomi na plodovima su uglavnom prisutni i jačina njihovog ispoljavanja zavisi od faze razvoja biljke u vreme ostvarivanja infekcije. Plodovi zaraženih biljaka mogu biti nepravilnog oblika, obezbojeni, tamnobraon boje, sa nekrotičnim prstenovima ili pegama različitog intenziteta koje mogu zahvatiti i unutrašnjost (**Koike et al., 2007; Jones et al., 2014**). Zaraza je obično jačeg intenziteta kada je zasad paradajza u blizini leguminoza (**Koike et al., 2007**).

Veliki broj biljnih vaši prenosi AMV (**Koike et al., 2007**). U prirodi, AMV se prenosi najmanje sa 22 vrsta biljnih vaši na neperzistentan način. U grupu značajnijih vektora spadaju *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae* i *A. kondoi*. Prenosenje AMV semenom paradajza nije zabeleženo. Prenosenje semenom značajno je u usevima lucerke, a zabeleženi su slučajevi prenošenja semenom paprike i peruanske jabuke (**Jones et al., 2014**). Primarne zaraze u usevu lucerke potiču od zaraza semena (**Bailiss and Ollennu, 1986**) i prenošenje semenom jedan je od najznačajnijih puteva širenja ovog virusa u prirodi (**Hajimorad and Francki, 1988**).

Kontrolom biljnih vaši ne može se sprečiti širenje AMV. Infekcije u usevu paradajza je moguće izbeći pomeranjem proizvodnje od useva leguminoza na najmanje nekoliko stotina metara udaljenosti. Otporni ili tolerantni kultivari paradajza su za sada nedostupni. Izvor rezistentnosti na većinu sojeva AMV identifikovan je u divljem paradajzu (*Lycopersicon hirsutum*) (**Jones et al., 2014**).

2.6.5. Virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV)

Virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV) su predstavnici roda *Tobamovirus* (**Davis et al., 2012**). Mnogi članovi roda *Tobamovirus* dugo su smatrani sojevima TMV, iako se međusobno

razlikuju u pogledu sekvenci i domaćina. Smatra se da TMV ima relativno uzak krug prirodnih domaćina, ali se odlikuje širokim krugom eksperimentalnih domaćina. Smatra se da zaražava oko 199 biljnih vrsta iz 30 familija (**Knapp and Lewandowski, 2001**). U najznačajnije prirodne domaćine ovog virusa ubrajaju se biljke familije Solanaceae: duvan, paprika, paradajz i krompir (**Gooding, 1991**). ToMV odlikuje uži krug domaćina u odnosu na TMV. Ukrasne biljke iz familije Solanaceae, posebno one koje se razmnožavaju vegetativnim putem (petunija), takođe su osjetljive i mogu služiti kao rezervoar za oba virusa (**Davis et al., 2012**).

Oboljenje koje TMV izaziva, mozaik duvana, opisao je Mayer 1886. godine i jedno je od najranije zapaženih viroznih oboljenja (**loc. cit. Knapp and Lewandowski, 2001**). Međutim, prouzročivač oboljenja otkriven je tek krajem 19. veka i nazvan je *Contagium vivum fluidum* (živa zarazna tečnost) (**Harrison and Wilson, 1999**). Ovim otkrićem počeo je razvoj biljne virologije kao posebne naučne discipline, a TMV je postao objekat mnogobrojnih istraživanja.

Oba virusa rasprostranjena su širom sveta i prouzrokuju jake zaraze na mnogim komercijalnim usevima (**Cui et al., 2004**). TMV je prisutan i u Srbiji i jedan je od najraširenijih i najranije otkrivenih virusa paradajza kod nas (**Šutić, 1995**). Znatno manji broj zaraženih biljaka je kod sorti sa jednostavnijim načinom gajenja, gde se većina agrotehničkih mera ne sprovodi (**Šutić, 1995**). **Tomić i sar., (2007)** beleže TMV u zasadu paprike. Javlja se u proizvodnji paradajza na otvorenom polju i naročito u zaštićenom prostoru (**Krstić i sar., 2005b**). Tokom ispitivanja sprovedenih u usevima paradajza 2011. godine, TMV je zabeležen u manjem procentu (**Nikolić i sar., 2013**).

Čestice virusa su štapičaste, veličine 300 x 18 nm sa centralnom šupljinom prečnika 4 nm, izgrađene od nukleinske kiseline (5% ukupne težine) i proteina koji čine 95% ukupne težine čestice. Genom TMV i ToMV čini jednolančana infektivna ribonukleinska kiselina ((+)ssRNA), molekulske mase $2,0 \times 10^6$ Da (**Zaitlin and Israel, 1975; Gibbs, 1977; Cui et al., 2004**). Za 5' kraj nukleinske kiseline vezan je 7-metilguanozin, a 3' kraj je aminoacetiliran, nosi histidin i gradi strukturu sličnu transportnoj RNA (**Knapp and Lewandowski, 2001**). Virusni genom kodira sintezu ukupno četiri proteina: (i) CP protein (protein omotača virusa), molekulske mase 17,5 kDa; (ii) MP protein (*movement protein*) molekulske mase 30 kDa koji omogućava širenje virusa u biljci i (iii) dva nestrukturna proteina molekulske mase 126 i 183 kDa koji

se javljaju u zaraženim biljnim ćelijama i imaju ulogu u replikaciji virusa-proteini virusne polimeraze (**Zaitlin, 1999; Knapp and Lewandowski, 2001**). Proteinski omotač se sastoji od 2130 identičnih proteinskih podjedinica, raspoređenih u vidu heliksa oko centralne šupljine (**Zaitlin and Israel, 1975**).

Virus mozaika duvana opšte je rasprostranjen na biljkama paradajza i zato je skoro teško, naročito krajem vegetacije, pronaći nezaražene biljke. Opšta rasprostranjenost virusa je karakteristična za sorte paradajza sa visokim sistemom gajenja. Kod ovih sorti vrši se, kao obavezna mera nege presađivanje, pinciranje, zakidanje vrha stabla i sukcesivna berba plodova. U toku ovih radova virus se lako prenosi sokom zaraženih biljaka, a zaraze se obavljaju i dodiranjem ruku radnika koji puše za vreme rada. Širenje virusa na ovaj način je naročito karakteristično za proizvodnju paradajza u zaštićenom prostoru. Prema nekim podacima zabeležen broj biljaka u staklenicima zaraženih TMV bio je i do 60% (**Juretić, 1978**). Znatno manji broj zaraženih biljaka je kod sorti sa jednostavnijim načinom gajenja, gde se većina pomenutih agrotehničkih mera ne sprovodi.

Virus mozaika duvana izaziva mozaik različite jačine na lišću paradajza, što zavisi od osetljivosti pojedinih sorti, virulentnosti sojeva, faze razvoja biljke i spoljnih uslova. Simptomi mozaika su naročito izraženi na lišću mladih biljaka koje dobija kopljasti oblik (**Šutić, 1995**). TMV i ToMV zaražavaju paradajz i prouzrokuju svetle i tamnozelene šare ili mozak. Listovi mogu biti deformisani ili suženi (nitavost). Prinos može biti smanjen, a plodovi neravnomerno sazreli (**Koike et al., 2007**). Sa razvojem oboljenja biljke se, po pravilu, oporavljaju i dalje razvijaju bez većih promena. Veće štete, sa pojavom nekroze i izumiranja tkiva i delova biljaka, izazivaju nekrotični sojevi i mešovite zaraze sa drugim virusima, kao što je virus mozaika krompira, virus crtičastog mozaika krompira i dr. Zaražene biljke nekih sorti paradajza su manje osetljive ili tolerantne prema virusu. One se odlikuju time što se simptomi povlače u toku vegetacije, pa se njihove zaraze ne odražavaju vidno na prinos. Selekcionisane su i forme paradajza potpuno otporne prema virusu. Virus mozaika duvana se u pojedinim godinama širi u epidemijским razmerama na paprici i paradajzu, što je, svakako, posledica njegovog lakog mehaničkog prenošenja, zatim prenošenja zaraženim semenom i zaraženim ostacima ovih biljaka u zemljištu. Sok zaraženih biljaka veoma je infektivan, jer se virus nalazi u visokoj koncentraciji u biljnim ćelijama. Po pravilu, veliki broj zaraženih biljaka potiče još od zaraženog rasada.

Zapaženo je da je znatno veći broj zaraženih biljaka kada se proizvode iz rasada, nego iz semena na stalnom mestu. Zaraze semena paradajza su pretežno površinske (egzogene). Zaraze nastaju prilikom izdvajanja semena iz pulpe paradajza, pri čemu se oslobođene virusne čestice iz zaraženih plodova zadržavaju na površini semena i tu veoma dugo održavaju svoju infektivnost. Zbog ovakvog načina prenošenja virusa seme paradajza je, po pravilu, zaraženo u visokom procentu (i do 94%) (**Šutić, 1995**). Karakteristični simptomi koje ToMV izaziva odlikuju se šarenim zonama na lišću gde se smenjuju svetla i tamna zelena boja. Neki sojevi mogu prouzrokovati izraženo žuto šarenilo. Biljke zaražene u ranim fazama porasta su patuljaste sa žutim vrhom. Takođe, može doći do uvijanja, redukcije površine i malformacija zaraženog lišća, koje su manjeg intenziteta od simptoma koje prouzrokuje CMV. U ranim fazama porasta može doći do izraženog uvijanja lišća na gore. Uopšte, intenzitet ToMV simptoma varira u odnosu na soj virusa, sortu ili hibrid paradajza, vreme infekcije (doba godine ili faza razvoja biljke) i temperaturu. Visoke temperature obično dovode do maskiranja simptoma na lišću. Ipak, biljke paradajza koje su nosioci gena za otpornost (TM-2² i Tm-2) pri izlaganju visokim temperaturama mogu ispoljiti nekrotične simptome. Plodovi biljaka zaraženih sa ToMV nisu izrazito deformisani, ali mogu ispoljiti iznenadno sazrevanje praćeno smanjenjem broja plodova i njihovom manjom masom. Žuti prstenovi na plodovima pojavljuju se usled sazrevanja plodova pri visokim temperaturama. Opisano je mnoštvo ToMV sojeva koji su imenovani na osnovu simptoma koje izazivaju na plodovima (corky ring, cristi fruit, yellow, Aucuba). Povremeno, simptomi se mogu uočiti na unutrašnjoj strani zida ploda u vidu braon zatamnjenja. Ovakvi simptomi su najčešći na formiranim plodovima neposredno pre sazrevanja i zahvataju parenhim ploda što se pripisuje stresnim uslovima koji su uticali na biljku istovremeno kada je došlo do zaraze. Dodatni faktori, kao što su visoka vlažnost zemljišta, nizak nivo azota i bora i osetljivost biljke, takođe utiču na intenzitet ispoljavanja simptoma. Proizvođači obično primete pomenute simptome u toku porasta prve dve cvetne grane, ali ih ne pripisuju ToMV infekciji sve do pojave folijarnih simptoma koji mogu nastupiti nakon nekoliko dana (**Jones et al., 2014; Davis et al., 2012**).

Osnovni način širenja TMV i ToMV u prirodi je mehaničko prenošenje. Zbog izražene stabilnosti virus se u polju lako prenosi kontaminiranim rukama radnika prilikom obavljanja različitih agrotehničkih mera (plevljenje, čupanje rasada, rasađivanje,

okopavanje, zalamanje cvasti i berba). Iako insekti vektori ovog virusa nisu utvrđeni, insekti koji žvaću (skakavci, gusenice leptira) su mogući prenosioci virusa zbog mehaničkog dodira sa biljkom **(Zaitlin and Israel, 1975; Gooding, 1991)**.

Zaraženi biljni ostaci omogućavaju održavanje virusa tokom zimskog perioda i predstavljaju najvažniji izvor inokuluma u narednoj vegetaciji. Značajan izvor inokuluma predstavlja i fermentisani duvan u kome virus može zadržati infektivnost duži vremenski period.

TMV je vrlo varijabilan i od prvog opisa virusa do danas utvrđeno je postojanje većeg broja sojeva. Prvi soj ovog virusa opisan je 1926. godine i odlikuje se time što na duvanu izaziva žute, umesto zelene mozaične pege. Danas je poznato više sojeva ovog virusa, a najčešće su izdvajani na osnovu virulentnosti ili po raznim simptomima na duvanu. Tako su po virulentnosti opisani jaki i blagi soj; po promenama u boji na zaraženom lišću duvana neki sojevi su okarakterisani kao žuti, zlatnožuti, beli, tamnozeleni i svetlozeleni soj. Po citološkim i histološkim promenama zaraženih biljaka neki sojevi su identifikovani kao prstenasti, mramorni, nekrotični i enacijski soj **(Zaitlin and Israel, 1975; Šutić, 1995)**.

Zbog izražene stabilnosti i lakog mehaničkog prenošenja, osnovu kontrole oboljenja koje izaziva TMV, čine preventivne sanitarne mere. Sanitarne mere treba primenjivati ne samo u toku proizvodnje i nege rasada, nego i pri izvođenju agrotehničkih mera u usevu. Prilikom odstranjivanja zaraženih biljaka u polju, treba ukloniti i susedne biljke **(Nelson et al., 1993)**. Ruke i oruđe u toku izvođenja raznih agrotehničkih operacija (rasađivanje, zalamanje biljaka, zakidanje zaperaka, berba i dr.) treba što češće prati sapunom, rastvorom natrijum fosfatom (Na_3PO_4) ili 70% alkoholom u cilju inaktivacije virusa. Treba voditi računa o upotrebi duvanskih proizvoda u toku rada sa biljkama, bez obzira što ne predstavljaju značajan izvor ToMV kao što se ranije mislilo. Tretiranje semena sa 10% rastvorom natrijum fosfata u periodu od najmanje 15 min ili tretman suvog semena u periodu od 2-4 dana na temperaturi od 70°C eliminiše virus na površini i u unutrašnjosti semena bez negativnog uticaja na klijanje **(Rana i sar., 1988)**. Preporuka je da se koristi zdrav rasad i da na mestu stalne sadnje biljaka ne bude ostataka korena iz predhodnih proizvodnih ciklusa. Najzastupljeniji sojevi ToMV i TMV u paradajzu se mogu kontrolisati upotrebom otpornih hibrida, koji sadrže dominantni gen za otpornost. Inokulacija klijanaca paradajza slabijim sojevima ToMV praktikuje se u zaštićenom

prostoru, uz rizik da se izaberu virulentni sojevi. Ovaj način unakrsne zaštite primenjuje se u Japanu poslednjih 30 godina. Tri gena za rezistentnost (Tm-1, Tm-2, Tm-2²) identifikovana su prilikom ukrštanja divljeg i gajenog paradajza. Gen TM-2² se najčešće koristi kod komercijalnih hibrida paradajza. Ipak, sojevi virusa koji mogu da prevaziđu rezistentnost biljaka koje nose gen TM-2², zabeleženi su u Italiji, Japanu i Španiji. Rezultati ukazuju da rezistentnost na ToMV, koja je određena ovim genom, zavisi od specifičnosti interakcije između domaćina i patogena, pre nego povezivanje sa osnovnim funkcijama 30-kDa transportnim proteinom. U slučaju kada je infekcija već ostvarena, rad sa biljkama treba svesti na najmanju moguću meru kako bi se sprečila sekundarna zaraza. Sa biljkama koje su označene kao zaražene treba raditi na kraju sa ciljem da se izbegne prenošenje virusa na zdrave biljke (Jones et al., 2014; Davis et al., 2012).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Virusi kao prouzrokovaci bolesti paradajza zauzimaju značajno mesto. U svetu je opisan veliki broj virusa, preko 140, infektivnih za paradajz. Mnogi od ovih opisanih virusa svake godine smanjuju prinos i kvalitet paradajza, a pojedinih godina se javljaju u epidemijским razmerama. Iako su virusi paradajza brojni, različite epidemiologije i prouzrokuju značajne ekonomske štete u proizvodnji paradajza, postoji malo podataka o njihovoj pojavi i raširenosti u Srbiji. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom imaju za cilj da daju kompletnu studiju o virozama paradajza u našoj zemlji, koja će pored inventarizacije virusa u proizvodnji na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru, dati odgovore o njihovoj prevalentnosti po godinama i regionima gajenja paradajza, kao i omogućiti razvijanje strategija kontrole i pravovremeno sprovođenje adekvatnih mera kontrole. Takođe, dobijeni podaci o virusima paradajza u našoj zemlji, naročito informacije o strukturi populacije prevalentnih vrsta, biće od koristi u oplemenjivačkom radu na selekciji genotipova paradajza sa povišenim nivoom otpornosti.

Naučna i stručna pitanja vezana za značaj virusa paradajza u Srbiji, njihova brojnost i raznolikost epidemiologije doveli su do definisanja osnovnih ciljeva ove doktorske disertacije:

- utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti ekonomski značajnih virusa paradajza za našu zemlju;
- utvrđivanje prisustva virusa koji su prisutni u zemljama u okruženju od kojih se neki nalaze na karantinskim listama štetnih organizama Srbije;
- utvrđivanje prisustva nekih virusa infektivnih za paradajz za koje je utvrđeno da su prisutni na drugim gajenim biljkama domaćinima i koji su u ekspanziji u našoj zemlji;
- utvrđivanje prisustva CMV satRNA kao mogućeg prouzrokovaca naglog i letalnog propadanja biljaka paradajza;
- utvrđivanje prisustva virusa u semenu različitih sorti i hibrida paradajza, komercijalno dostupnih na našem tržištu;

- molekularna detekcija i identifikacija virusa paradajza prisutnih u Srbiji primenom RT-PCR metode, u cilju razvijanja brzih molekularnih dijagnostičkih protokola i kao potvrda serološke identifikacije virusa;
- molekularna karakterizacija rekonstrukcijom filogenetskih stabala najrasprostranjenijih virusa paradajza u Srbiji u cilju poređenja izolata poreklom iz Srbije sa odgovarajućim izolatima virusa iz drugih delova sveta i utvrđivanja genetičke varijabilnosti izolata poreklom iz naše zemlje.

Detaljnija ispitivanja prisutnih virusa paradajza u Srbiji, kao i primena najsavremenijih molekularnih tehnika, unaprediće metode detekcije i identifikacije ovih virusa, doprineće inventarizaciji virusa paradajza u našoj zemlji i razumevanju njihovog porekla i evolutivne povezanosti sa drugim izolatima širom sveta, kao i potencijalnom širenju kod nas. Rezultati dobijeni izradom ove doktorske disertacije doprineće razvijanju pravilnih strategija kontrole i sprovođenju adekvatnih mera suzbijanja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka

Ispitivanje prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti virusa paradajza u Srbiji obavljeno je u periodu od 2011. do 2015. godine. Različiti lokaliteti gajenja paradajza pregledani su na teritoriji AP Vojvodine, centralne i južne Srbije i AP Kosovo i Metohija. Od 29 okruga, utvrđenih administrativnom podelom Republike Srbije, pregledom je obuhvaćeno ukupno 22 okruga. Najveći broj ispitanih lokaliteta i polja nalazio se u Jablaničkom okrugu kao najznačajnijem području gajenja paradajza u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju u našoj zemlji.

Prilikom pregleda sakupljeni su uzorci lišća, stabla i plodova paradajza sa simptomima koji su ukazivali na prisustvo virusa. Uočeni simptomi su dokumentovani i zabeleženi fotografijom, pakovani u plastične kese sa etiketama na kojima su upisivani podaci o biljci i lokalitetu uzorkovanja, a zatim transportovani u laboratoriju i gde su čuvani na temperaturi 4°C do analize. Veličina useva ili parcele, broj biljaka sa simptomima virusnih zaraza, kao i intenzitet zaraze određivali su metodu sakupljanja uzoraka. Na parcelama manjih dimenzija sakupljen je manji broj uzoraka. Sakupljanje uzoraka na većim parcelama, ili parcelama sa visokim procentom simptomatičnih biljaka, obavljeno je kretanjem po „X“ modelu u cilju najboljeg pokrivanja celog polja. Procena učestalosti simptoma koji podsećaju na simptome virusnih zaraza, sprovedena je na osnovu vizuelnog pregleda useva, odnosno brojanjem biljaka sa simptomima i izračunavanjem procenta biljaka sa simptomima u odnosu na ukupan broj biljaka.

Ispitivanje prisustva virusnih zaraza na paradajzu 2011. godine obavljeno u okruzima: Severnobački, Zapadnobački, Južnobački, Sremski, Mačvanski, Grad Beograd, Podunavski, Raški, Rasinski i Jablanički. Pregledom je obuhvaćen 21 lokalitet i prikupljeno 1380 uzoraka.

Tokom 2012. godine u svrhu ispitivanja prisustva virusa u usevima paradajza pregledano je 36 lokaliteta i prikupljeno 1840 uzoraka u okruzima: Severnobanatski, Srednjobanatski, Južnobanatski, Zapadnobački, Južnobački, Grad Beograd, Mačvanski, Podunavski, Braničevski, Pomoravski, Moravički, Raški, Rasinski, Nišavski, Pirotski i Jablanički.

Tokom 2013. godine sakupljeno je 139 uzoraka paradajza sa simptomima virusnih infekcija na 44 lokaliteta u okruzima: Severnobački, Zapadnobački, Sremski, Mačvanski, Grad Beograd, Kolubarski, Podunavski, Šumadijski, Moravički, Pomoravski, Rasinski, Raški, Jablanički, Pčinjski i Kosovskomitrovički.

U toku 2014. godine u okruzima Severnobački, Zapadnobački, Braničevski, Rasinski i Jablanički prikupljeno je 66 uzoraka paradajza sa virusnim simptomima u okviru 19 lokaliteta.

Pregled prisustva virusnih zaraza u proizvodnji paradajza tokom 2015. godine obavljen je na 16 lokaliteta u okruzima: Srednjobanatski, Grad Beograd, Mačvanski, Podunavski, Rasinski, Jablanički i Pčinjski. Za dalju analizu sakupljen je 61 uzorak paradajza.

4.2. Serološka ispitivanja

Serološke analize prikupljenih uzoraka lišća, stabla i ploda paradajza obavljene su primenom imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) uz upotrebu komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju deset ekonomski najznačajnijih i karantinskih virusa paradajza: virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Y virus krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV), virus mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*, PepMV), X virus krompira (*Potato virus X*, PVX), virus žute uvijenosti lista paradajza (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) i virus prstenaste pegavosti paradajza (*Tomato ringspot virus*, ToRSV). Serološke analize su sprovedene u cilju utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza po okruzima i lokalitetima u pojedinačnim godinama.

4.2.1. Imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) primenom poliklonalnih antitela

DAS-ELISA upotrebljena je za utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji testiranjem uzoraka prikupljenih u svim regionima značajnim za

proizvodnju ove biljke u periodu od pet godina. Uzorci biljaka sa simptomima koji su ukazivali na virusne zaraze testirani su primenom komercijalnih antiseruma specifičnih za detekciju CMV, AMV, PepMV, TMV, ToMV, PVY, TSWV, PVX, TYLCV i ToRSV (Bioreba AG, Švajcarska). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Priprema uzoraka izvršena je homogenizacijom biljnog materijala u odgovarajućem puferu, u razređenju 1:6.

DAS-ELISA izvedena je po postupku opisanom od strane **Clark and Adams (1977)**, a po preporuci proizvođača komercijalnih kitova. Prvo su polistirenske ploče obložene unošenjem po 200 μ l razređenja IgG u puferu za prekrivanje ploča u svaki bunarčić. Obložene ploče su inkubirane 4 h na 37°C, a zatim isprane 4 puta puferom za ispiranje. Nakon ispiranja u bunarčiće je dodato po 200 μ l pripremljenog ekstrakta ispitivanih uzoraka razređenja 1:20 u ekstrakcionom puferu, kao i komercijalno dostupne pozitivne i negativne kontrole. Ploče su inkubirane na temperaturi od 4°C tokom noći, a nakon toga isprane 5 puta puferom za ispiranje. U sledećem koraku, u bunarčiće je dodato 200 μ l antitela konjugovanih sa enzimom alkalnom fosfatazom u konjugatnom puferu razređenja preporučenog od strane proizvođača komercijalnog kita. Zatim su ploče inkubirane na temperaturi od 37°C u trajanju od 4 h. Nakon inkubacije, ploče su isprane 4 puta puferom za ispiranje, a potom je u svaki bunarčić dodato po 200 μ l supstrata (p-nitrofenilfosfat) razređenja 20 μ l/20 ml u supstratnom puferu.

Hidroliza supstrata proverena je posle inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h merenjem apsorpcije svetlosti talasne dužine 405 nm, upotrebom spektrofotometra (Microplate reader-DAS s.r.l, Italy). Pozitivnim su smatrani oni uzorci čija je vrednost apsorpcije na 405 nm bila dva i više puta veća od srednje vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Za izvođenje ove metode korišćeni su sledeći puferi:

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

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
dH ₂ O	1 l

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

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	2,5 ml
dH ₂ O	5 l

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

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

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

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

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

diethanolamine	97 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
dH ₂ O	125 ml

4.2.2. Prenosanje virusa semenom paradajza

Ispitivanje zaraženosti semena paradajza na tržištu u Srbiji izvedeno je 2012. godine na 10 komercijalno dostupnih sorti i hibrida paradajza: Saint Pierre, Novosadski jabučar, Lova VF, Volovsko srce, Marglobe, Marmande, Heinz 1370, Narvik, Marko F1 i Sef F1. Testiranje semena izvedeno je (DAS)-ELISA metodom, opisanom u prethodnom poglavlju, na prisustvo četiri virusa koji se prenose semenom: AMV, ToMV, TMV i PepMV. Testiranje pojedinačne sorte ili hibrida podrazumevalo je četiri uzorka od po 25 poduzoraka u skladu sa metodom višestrukog prenošenja (*multiple-transfer method*), koju su opisali **Gibbs and Gower (1960)**.

4.3. Molekularna detekcija

Molekularna detekcija i potvrda rezultata dobijenih serološkim analizama o prisustvu šest virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV i ToMV u usevu paradajza u Srbiji obavljena je primenom metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) uz korišćenje prajmera specifičnih za detekciju svakog pojedinačnog virusa. RT-PCR metoda je korišćena i za dokazivanje i proveru prisustva satRNA kod uzoraka u kojima je prethodno dokazano prisustvo CMV.

4.3.1. Ekstrakcija ukupnih RNA

RT-PCR metodi prethodilo je ekstrahovanje ukupnih RNA iz zaraženih listova ili plodova paradajza korišćenjem cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) metode po protokolu koji su opisali **Bekesiova et al. (1999)**. 100 mg zaraženog lišća ili plodova paradajza usitnjeno je u avanu sa tučkom u prisustvu tečnog azota. Usitnjen biljni materijal i tečni azot prebačeni su u RNase-free tube od 2 ml i dodato je 700 µl ekstrakcionog pufera (2% CTAB, 2% PVP K 25, 100 mM Tris-HCl, 25 mM Na-EDTA i 2 M NaCl, pH 8,0) zagrejanog na 65°C u koji je prethodno dodato 20 µl β-merkaptetanola na 1 ml pufera. U cilju što efikasnije razgradnje biljnog tkiva, tubice su inkubirane u vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od 10 min uz povremeno mešanje snažnim protresanjem mikrotube. Po isteku inkubacije u uzorak je dodato 700 µl smeše

hloroforma i izoamil alkohola u odnosu 24:1, a zatim je uzorak centrifugiran 10 min na 10 000 rpm pri temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja formirale su se tri faze. Gornja faza, u kojoj se nalazi RNA, prebačena je u novu mikrotubu od 2 ml i dodato novih 700 µl smeše hloroforma i izoamil alkohola u odnosu 24:1, a uzorak je ponovo centrifugiran 10 min na 10 000 rpm pri temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja gornja faza je prebačena u novu mikrotubu od 2 ml, dodato je 175 µl 10 M LiCl i uzorak je inkubiran na 4°C preko noći. Taloženje RNA obavljeno je centrifugiranjem uzorka 20 min na 10 000 rpm pri temperaturi od 4°C. Supernatant je odbačen, a talog rastvoren dodavanjem 50 µl DEPC vode. Ponovno taloženje RNA obavljeno je dodavanjem 70 µl 3 M natrijum acetata (pH 5,2), 1750 µl 96% etanola i inkubacijom u trajanju od 30 min na -70°C. Nakon inkubacije, uzorak je centrifugiran 20 min na 10 000 rpm pri temperaturi od 4°C, supernatant je odbačen, a talog ispran dodavanjem 1 ml 75% etanola uz mešanje okretanjem tubice. U cilju koncentrovanja RNA, uzorak je centrifugiran 5 min na 10 000 rpm na 4°C, nakon čega je ponovo uklonjen supernatant, a talog prosušen na vazduhu. Nakon isparavanja etanola, RNA je rastvorena u 30 µl RNase free vode, pipetiranjem sadržaja mikrotube više puta i čuvana na -80°C.

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

Ukupne izolovane RNA korišćene su kao matrica za reverznu transkripciju (RT) i lančanu reakciju polimeraze (PCR) primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) uz korišćenje specifičnih prajmera koji omogućavaju umnožavanje odgovarajućeg dela genoma za svaki od serološki detektovanih virusa.

Sve RT-PCR reakcije obavljene su u 25 µl zapremine, a reakciona smeša sadržala je: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera, 400 µM svakog dNTP, 0,6-1,2 µM forward (uzvodni) i reverse (nizvodni) prajmera, 1 µl Qiagen OneStep RT-PCR enzimskog miksa, 1 µl izolovanih ukupnih RNA i RNase-free vode do finalne zapremine od 25 µl.

Reakcija je izvedena u Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C, denaturacija, hibridizacija prajmera (annealing) i elongacija (veći broj ciklusa) određeni vremenski period na određenoj

temperaturi preporučenoj za svaki od korišćenih prajmera i finalna elongacija 10 min na 72°C.

Vizuelizacija dobijenih produkata RT-PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem u 1% agaroznom gelu, bojenjem u rastvoru etidijumbromida i posmatranjem na UV transiluminatoru. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine u zavisnosti od korišćenih parova prajmera.

4.3.2.1. Molekularna detekcija CMV

Molekularna detekcija CMV kod 10 odabranih izolata (Tabela 1) obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera CMVCPfwd (5'-TGC TTC TCC RCG ARW TTG CGT-3') i CMVCPrev (5'-CGT AGC TGG ATG GAC AAC CCG-3') koji umnožavaju celi CP gena kao i delove 5' i 3' UTR (*untranslated region*, netranslirajući region) veličine 871 bp (Milojević et al., 2012). Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat CMV 115-08 poreklom iz *Cucurbita pepo* 'Olinka' (GenBank Acc. No. HM065510), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2., s tim što je prajmer CMVCPfwd korišćen u koncentraciji 1,8 µM, zbog postojanja degenerativnih mesta, a prajmer CMVCPrev, u koncentraciji 0,6 µM. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 1 min na 52°C i ekstenzija 1 min na 72°C (35 ciklusa).

Tabela 1. Izolati *Cucumber mosaic virus* poreklom iz paradajza iz Srbije odabrani za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Lokalitet
533-1-11	2011	Kupusina
AR2-12	2012	Aradac
137-13	2013	Ub
367-14	2014	Porodin
169-2p-15	2015	Veliko Vojlovce
170-2p-15	2015	Veliko Vojlovce
174p-15	2015	Cekavica
177p-15	2015	Veliko Vojlovce
180p-15	2015	Veliko Vojlovce
190-15	2015	Togočevce

4.3.2.2. Molekularna detekcija PVY

Molekularna detekcija PVY kod devet odabranih izolata (Tabela 2) obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera PVYc (5'-AAT TAA AAC AAC TCA ATA CA-3') i PVYd (5'-TGY GAH CCA CGC ACT ATG AA-3'), koji omogućavaju umnožavanje dela 5' UTR (*untranslated region*, netranslirajući region) i P1 gena veličine 975 bp (Glais et al., 2002). Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat PVY poreklom iz duvana (GenBank Acc. No. GQ290476), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2., s tim što je prajmer PVYc korišćen u koncentraciji 0,6 µM, a prajmer PVYd, zbog postojanja degenerativnih mesta, u koncentraciji 1,2 µM. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 1 min na 57°C i ekstenzija 1 min na 72°C (30 ciklusa).

Tabela 2. Izolati *Potato virus Y* poreklom iz paradajza iz Srbije odabrani za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Lokalitet
258-11	2011	Mačkovac
573-11	2011	Ratari
598-11	2011	Togočevce
95-12	2012	Trbušani
102-12	2012	Carevac
179-12	2012	Nozrina
237-13	2013	Kupusina
197-14	2014	Brestovac
219-14	2014	Togočevce

4.3.2.3. Molekularna detekcija TSWV

Molekularna detekcija TSWV kod osam odabranih izolata (Tabela 3) obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem 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'), koji omogućavaju umnožavanje dela gena za nukleokapsid (N gena) veličine 738 bp (Vučurović et al., 2012). Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski

izolat TSWV poreklom iz duvana (GenBank Acc. No. GQ373173), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju *Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR)*, s tim što je prajmer TSWVCP-f korišćen u koncentraciji 0,6 µM, a prajmer TSWVCP-r zbog postojanja degenerativnih mesta u koncentraciji 1,2 µM. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 1 min na 53°C i ekstenzija 1 min na 72°C (40 ciklusa).

Tabela 3. Izolati *Tomato spotted wilt orthotospovirus* poreklom iz paradajza iz Srbije odabrani za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Lokalitet
533-2-11	2011	Kupusina
646-11	2011	Navalin
792-11	2011	Smederevska Palanka
45-12	2012	Novi Kneževac
552-12	2012	Ljutovo
555-12	2012	Subotica
174p-15	2015	Cekavica
180p-15	2015	Veliko Vojlovce

4.3.2.4. Molekularna detekcija AMV

Molekularna detekcija AMV kod dva odabrana izolata obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera CP AMV1 (5'-TCC ATC ATG AGT TCT TCA-3') i CP AMV2 (5'-CAG GAC TTC ATA CTT GAC C-3'), koji omogućavaju umnožavanje dela CP gena i 3' UTR veličine 751 bp (**Finetti-Sialer et al., 1997**). Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat AMV poreklom iz duvana (GenBank Acc. No. FJ527749), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 95°C, elongacija 1 min na 46°C i ekstenzija 2 min na 72°C (35 ciklusa).

Za ova istraživanja odabrana su dva izolata: izolat 258-11 dobijen iz uzorka koji je sakupljen 2011. godine na lokalitetu Mačkovac i izolat 219-14 iz uzorka koji je sakupljen 2014. godine na lokalitetu Togočevce.

4.3.2.5. Molekularna detekcija TMV

Molekularna detekcija TMV kod dva odabrana izolata obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera TobUni1 (5'-ATT TAA GTG GAS GGA AAA VCA CT-3') i TMVspec (5'-CGG TCA GTG CCG AAC AAG AA-3'), koji omogućavaju umnožavanje kompletnog CP gena, kao i dela 5' i 3' UTR veličine 694 bp (**Letschert et al., 2002**). Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat TMV poreklom iz duvana (GenBank Acc. No. GQ340671), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2., s tim što je prajmer TobUni1, zbog postojanja degenerativnih mesta, korišćen u koncentraciji 1,2 µM, a prajmer TMVspec u koncentraciji 0,6 µM. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 45 s na 55°C i ekstenzija 1 min na 72°C (35 ciklusa).

Za ova istraživanja odabrana su dva izolata: izolat 40-11 dobijen iz uzorka koji je sakupljen 2011. godine na lokalitetu Irmovo i izolat 268-13 iz uzorka koji je sakupljen 2013. godine na lokalitetu Vladičin Han.

4.3.2.6. Molekularna detekcija ToMV

Molekularna detekcija ToMV kod dva odabrana izolata obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem prajmera TobUni1 (5'-ATT TAA GTG GAS GGA AAA VCA CT-3') i ToMVspec (5'-CGG AAG GCC TAA ACC AAA AAG-3'), koji omogućavaju umnožavanje kompletnog CP gena kao i delimičnog 5' i 3' UTR veličine 676 bp (**Letschert et al., 2002**). Kao negativna kontrola korišćene su ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 µl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2., s tim što je prajmer TobUni1 zbog postojanja degenerativnih

mesta korišćen u koncentraciji 1,2 μM , a prajmer ToMVspec u koncentraciji 0,6 μM . Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 45 s na 55°C i ekstenzija 1 min na 72°C (35 ciklusa).

Za ova istraživanja odabrana su dva izolata: izolat 105-12 dobijen iz uzorka koji je sakupljen 2012. godine na lokalitetu Carevac i izolat 283-13 iz uzorka koji je sakupljen 2013. godine na lokalitetu Kamenica.

4.3.2.7. Molekularna detekcija CMV satRNA

Molekularna detekcija CMV satRNA kod sedam odabranih izolata CMV (Tabela 4) obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen) i korišćenjem CMVsat-fwd (5'-AAG GAT CCG GGT CCT GBD DDG GAA TG-3') i CMVsat-rev (5'-AAG GAT CCG TTT TGT TTG WTR GAG AAT TGC GYR GAG-3') (Škorić et al., 1996) koji umnožavaju fragment veličine od 334 do 390 bp, a koji obuhvata celu satRNA. Kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat CMV satelitne RNA 1-12-sat RNA poreklom iz *Peperomia tuisana* (GenBank Acc. No. KT270485), a kao negativna kontrola ukupne RNA izolovane iz zdravog lišća paradajza.

RT-PCR reakcije obavljene su u reakcionoj smeši zapremine 25 μl čiji je sadržaj opisan u poglavlju 4.3.2., s tim što su oba prajmera korišćena u koncentraciji 2,4 μM , zbog postojanja degenerativnih mesta. Uslovi PCR reakcije za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 1 min na 42°C i ekstenzija 1 min na 72°C (2 ciklusa), denaturacija 1 min na 94°C, elongacija 1 min na 55°C i ekstenzija 1 min na 72°C (35 ciklusa).

Tabela 4. Izolati *Cucumber mosaic virus* satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije odabrani za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Lokalitet
AR2-12-satRNA	2012	Aradac
367-14 -satRNA	2014	Porodin
253-15-satRNA	2015	Togočevce
169-2p-15	2015	Veliko Vojlovce
170-2p-15	2015	Veliko Vojlovce
174p-15	2015	Cekavica
180p-15	2015	Veliko Vojlovce

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 etidijumbromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem 0,4 g agaroze u 40 ml 1x TBE pufera (90 mM Tris, 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA) i zagrevanjem do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature od 60°C, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu sa postavljenim češljevima i ostavljen je da se ohladi i očvrsne. Nakon polimerizacije gela, češljevi su uklonjeni, a gel je uronjen u 1xTBE pufer u kadici za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Nakon mešanja 5 µl produkta RT-PCR reakcije sa 1 µl 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, gel je prebačen u rastvor etidijumbromida koncentracije od 0,5 µg/ml i inkubiran u trajanju od 15 min. Amplifikovani fragmenti posmatrani su na transiluminatoru (Biometra, UK) pod UV svetlošću i pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka odgovarajuće veličine za svaki od korišćenih parova prajmera. Veličina dobijenih traka određena je pomoću MassRuler™DNA ladder, Mix markera (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), a dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela korišćenjem žutog filtera.

4.4. Molekularna identifikacija virusa paradajza

Nakon molekularne detekcije i uspešne amplifikacije određenih, ciljanih delova genoma karakterističnih za pojedine viruse, a u cilju dalje karakterizacije izolata najznačajnijih virusa prisutnih u usevu paradajza u našoj zemlji, odabrani izolati poslani su na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje (Macrogen Europe, Holandija) u oba smera korišćenjem istih prajmera kao u RT-PCR reakciji.

Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0 i međusobno upoređene pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994) integrisanog unutar MEGA5 softvera (Tamura et al., 2011) nakon čega je dobijena konsenzus sekvencen za

svaki odabrani izolat. Sve dobijene sekvence su zatim, sa relevantnim podacima vezanim za ispitivani izolat, deponovana u GenBank bazu podataka gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number). Tako dobijene konsenzus sekvence prvo su analizirane upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritma, a zatim je izvršen i proračun nukleotidne (nt) i aminokiselinske (aa) sličnosti odabranih izolata sa izolatima iz drugih delova sveta dostupnim u GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) koji su pokazali najveću sličnost sa izolatima iz Srbije primenom BLAST analize. Za poređenje sekvence odabranog izolata sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa, kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA5.

4.5. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa paradajza

Molekularna karakterizacija, dva najrasprostranjenija virusa paradajza u Srbiji CMV i PVY, kao i izolata CMV satRNA i TSWV obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci dobijenih u toku ovih istraživanja i sekvenci izolata odgovarajućeg virusa dostupnih u GenBank bazi podataka. Filogenetska stabla rekonstruisana su korišćenjem maximum parsimony ili neighbour-joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja integrisanih unutar MEGA5 softvera. Izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između grupa koje su se izdvojile u filogenetskim stablima, obavljeno je primenom parametra određenog na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije.

4.5.1. Filogenetske analize izolata CMV

Filogenetsko stablo CMV rekonstruisano je na osnovu deset sekvenci CP gena ovog virusa dobijenih tokom ovih istraživanja (Tabela 20) i 39 sekvenci ovog virusa iz drugih delova sveta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 5), dužine 558 bp, korišćenjem maximum parsimony metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgroup“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Peanut stunt virus* (PSV; Acc. No. EU570238). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije za izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu,

korišćen je Tamura 3-parametar sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru softvera MEGA5.

Tabela 5. Sekvence CP gena izolata *Cucumber mosaic virus* preuzete iz GenBank baze podataka koje su korišćene za filogenetske analize

Izolot	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	GenBank Acc. No.
415-07 ^a	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	KC847072
270-09	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	JX262137
500-10	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i>	JX262138
201-11	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	KC847070
674-11	Srbija	<i>Lagenaria siceraria</i>	JX127305
581-11	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC414926
101-08	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KC414925
670-08	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KC847077
650-07	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	EU921757
RS	Mađarska	<i>Raphanus sativus</i>	AJ517802
P1-1	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AM183116
Ri-8	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AM183119
NS	Mađarska	<i>Nicotiana glutinosa</i>	AJ511990
Trk7	Mađarska	<i>Trifolium repens</i>	L15336
I17F	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y18137
R	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	X16386
TFN	Italija	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y16926
Vir	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	HE962480
TN	Japan	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB176847
PF	Japan	/	AB368501
D8	Japan	<i>Raphanus sativus</i>	AB004781
Y	Japan	<i>Nicotiana tabacum</i>	D12499
Ixora	Filipini	<i>Solanum lycopersicum</i>	U20219
NT9	Tajvan	<i>Solanum lycopersicum</i>	D28780
ND1	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414785
LW	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EU414784
Ca	Kina	<i>Arachis hypogaea</i>	AY429432
CTL	Kina	<i>Brassica chinensis</i>	EF213025
Phy	Kina	/	DQ412732
Cah1	Kina	<i>Canna</i> sp.	FJ268746
Cb7	Kina	<i>Solanum lycopersicum</i>	EF216867
RZ	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EF159146
Ly2	Koreja	<i>Lilium longiflorum</i>	AJ296154
Li	Koreja	<i>Lilium tsingtauense</i>	AB506797
FNY	SAD	<i>Cucumis melo</i>	D10538
LS	SAD	<i>Lactuca sativa</i>	AF127976
Q	Australija	<i>Capsicum annuum</i>	M21464
LY	Australija	<i>Lupinus angustifolius</i>	AF198103
S	Južna Afrika	<i>Cucurbita pepo</i>	AF063610

^aPodaci preuzeti iz GenBank; /-Podaci nisu dostupni.

4.5.2. Filogenetske analize izolata PVY

Filogenetsko stablo PVY rekonstruisano je na osnovu devet sekvenci dela P1 gena ovog virusa dobijenih tokom ovih istraživanja (Tabela 20) i 38 sekvenci ovog virusa iz drugih delova sveta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 6), dužine 696 bp, korišćenjem neighbour-joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgroup“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Pepper mottle virus* (PepMoV; Acc. No. M96425). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne susstitucije za izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Tamura 3-parametar sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru softvera MEGA5.

Tabela 6. Sekvence P1 gena *Potato virus Y* izolata preuzete iz GenBank baze podataka koje su korišćene za filogenetske analize

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	GenBank Acc. No.
D7-06 ^a	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ290476
D35-06	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ290475
PL-28-09	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC288142
PL-15-09	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC288143
PL-3-10	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC288144
PL-108-10	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC288145
Slovenia1	Slovenija	/	AJ315739
SI 44	Slovenija	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401602
SI 50	Slovenija	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401603
SI 64	Slovenija	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401604
PVYN-N242	Francuska	<i>Solanum tuberosum</i>	AF248499
605	Švajcarska	/	X97895
Tu 648	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401610
v942490	Velika Britanija	/	EF016294
Linda	Nemačka	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ890345
Satina	Nemačka	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ890347
423-3	USA	<i>Solanum tuberosum</i>	AY884982
N 5Yt	Kanada	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF401605
Rusia	Velika Britanija	/	AJ315746
California	Kalifornija	/	AJ315744
English	Velika Britanija	/	AJ315747
Tu 619	USA	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401608
Tu 660	USA	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401609
N 27	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401606

N Jg	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401607
N266	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401600
N394	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	AF401601
Canada	Kanada	/	AJ315745
USA	USA	/	AJ315742
Ukraine	Ukrajina	/	AJ315740
803	Finska	<i>Solanum tuberosum</i>	AJ245555
Viikki	Finska	<i>Solanum tuberosum</i>	AJ245556
Hungarian	Mađarska	/	M95491
Ditta	Poljska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ890344
Scotland	Velika Britanija	/	AJ315743
Adgen	Francuska	<i>Solanum tuberosum</i>	AJ890348
LYE84.2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AJ439545
SON41	Francuska	<i>Solanum nigrum</i>	AJ439544

^aPodaci preuzeti iz GenBank; /-Podaci nisu dostupni.

4.5.3. Filogenetske analize izolata TSWV

Filogenetsko stablo TSWV rekonstruisano je na osnovu osam sekvenci dela N gena ovog virusa dobijenih tokom ovih istraživanja (Tabela 20) i 44 sekvence iz drugih delova sveta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 7), dužine 652 bp, korišćenjem maximum parsimony metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgroup“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV; Acc. No. S54325). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne susstitucije za izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura 2-parametar sa Gamma distribucijom (K2+G) u okviru softvera MEGA5.

Tabela 7. Sekvence N gena *Tomato spotted wilt orthotospovirus* izolata preuzete iz GenBank baze podataka koje su korišćene za filogenetske analize

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	GenBank Acc. No.
Is-56 ^a	Crna Gora	<i>Nicotiana tabacum</i>	GU369729
L3	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	D13926
20 Da96/1	Bugarska	<i>Dahlia</i> sp.	AJ296602
GD98	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ297609
BS97	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ297610
97	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ296598
T992	Italija	<i>Nicotiana tabacum</i>	AY848922
P267	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ376180
P105/2006RB	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ915946

C27084	Češka	<i>Calla</i> sp.	AJ296599
LE98/527	Nemačka	<i>Lysimachia</i> sp.	AJ297611
D	Holandija	<i>Dahlia</i> sp.	AF020660
SPAIN-1	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744479
SPAIN-2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744480
LC	Španija	^a	X94550
VE430	Španija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ376184
France81	Francuska	<i>Capsicum annuum</i>	FR693053
SO46	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	FR693255
MP	Južna Afrika	<i>Arachis hypogaea</i>	EF059706
GP	Južna Afrika a	<i>Arachis hypogaea</i>	EF059705
NC-1	Severna Karolina, SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744476
10	Severna Karolina, SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AF020659
NC-3	Severna Karolina, SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744478
NC-2	Severna Karolina, SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AY744477
BL	Havaji	<i>Lactuca sativa</i>	L20953
H	Havaji	/	AF306490
L	Havaji	<i>Lactuca sativa</i>	X61799
AC	Džordžija, SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064469
MC	Džordžija, SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064472
CA-1	Kalifornija, SAD	<i>Aster</i> sp.	AY744468
CA-4	Džordžija, SAD	<i>Chrysanthemum</i> sp.	AY744471
Br20	Brazil	/	DQ915948
Iw	Japan	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB277581
O	Japan	<i>Capsicum annuum</i>	AB277582
Japan	Japan	/	AB010997
KAIxe	Južna Koreja	<i>Ixeris chinensis</i>	EF195227
KAPo	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	EF195228
53-05	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ373173
33-06	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ355467
39-06	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ373172
PL-60-09	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC182566
PL-14-10	Srbija	<i>Capsicum annuum</i>	KC182564
240-09	Srbija	<i>Cucurbita pepo</i>	JF303081
		'Beogradska'	
236-09	Srbija	<i>Cucurbita maxima</i>	JF303080

^aPodaci preuzeti iz GenBank; /-Podaci nisu dostupni.

4.5.4. Filogenetske analize izolata CMV satRNA

Filogenetsko stablo CMV satRNA rekonstruisano je na osnovu sedam sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja (Tabela 20) i 41 sekvence iz drugih delova sveta preuzetih iz GenBank baze podataka (Tabela 8), dužine 258 bp, korišćenjem neighbour-joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne suspsitucije za izračunavanje prosečne vrednosti

genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura 2-parametar sa Gamma distribucijom (K2+G) u okviru softvera MEGA5.

Tabela 8. Sekvence *Cucumber mosaic virus* satRNA izolata preuzete iz GenBank baze podataka koje su korišćene za filogenetske analize

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	GenBank Acc. No.
T8A, T1, T2, T7, T22, T16, T6, T4, T12	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X86408-16
To79	Italy	<i>Nicotiana tabacum</i>	X86417
T57, T27, T8	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X86418-20
TO80, TO77	Italy	<i>Nicotiana tabacum</i>	X86421-22
T59	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X86423
NG71	Italy	<i>Nicotiana glauca</i>	X86424
CE	Italy	<i>Apium graveolens</i>	X86425
PG	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X86426
T18	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X86708
TTS	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X69136
TFN	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	X65455
F2, FG	Croatia	<i>Solanum lycopersicum</i>	X89003-04
/	Croatia	<i>Solanum lycopersicum</i>	DQ839133
AR1-12-satRNA	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KM358138
To/1989/19.1	Spain	<i>Solanum lycopersicum</i>	Z75872
To/1990/21.1	Spain	<i>Solanum lycopersicum</i>	Z75880
D27-CARNA-5	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>	U31661
Sb-WI	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KC415034
IR-WI	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	JF834526
N1-02-satRNA-389large	USA	<i>Vinca minor</i>	JF918972
PoSA4	Syria	<i>Solanum tuberosum</i>	AB448702
E-satRNA, satRNA	OY2- Japan	/	M20844-45
Y-satRNA	Japan	<i>Nicotiana tabacum</i>	D10037
SD	China	<i>Nicotiana tabacum</i>	D89673
FFQT1-3	China	<i>Solanum lycopersicum</i>	HQ283395
XJs2	China	<i>Beta vulgaris</i>	DQ070747
CA8	Brazil	<i>Capsicum annuum</i>	AF172648
CMV satRNA 43	Greece	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KT382261

^aPodaci preuzeti iz GenBank; /-Podaci nisu dostupni.

5. REZULTATI

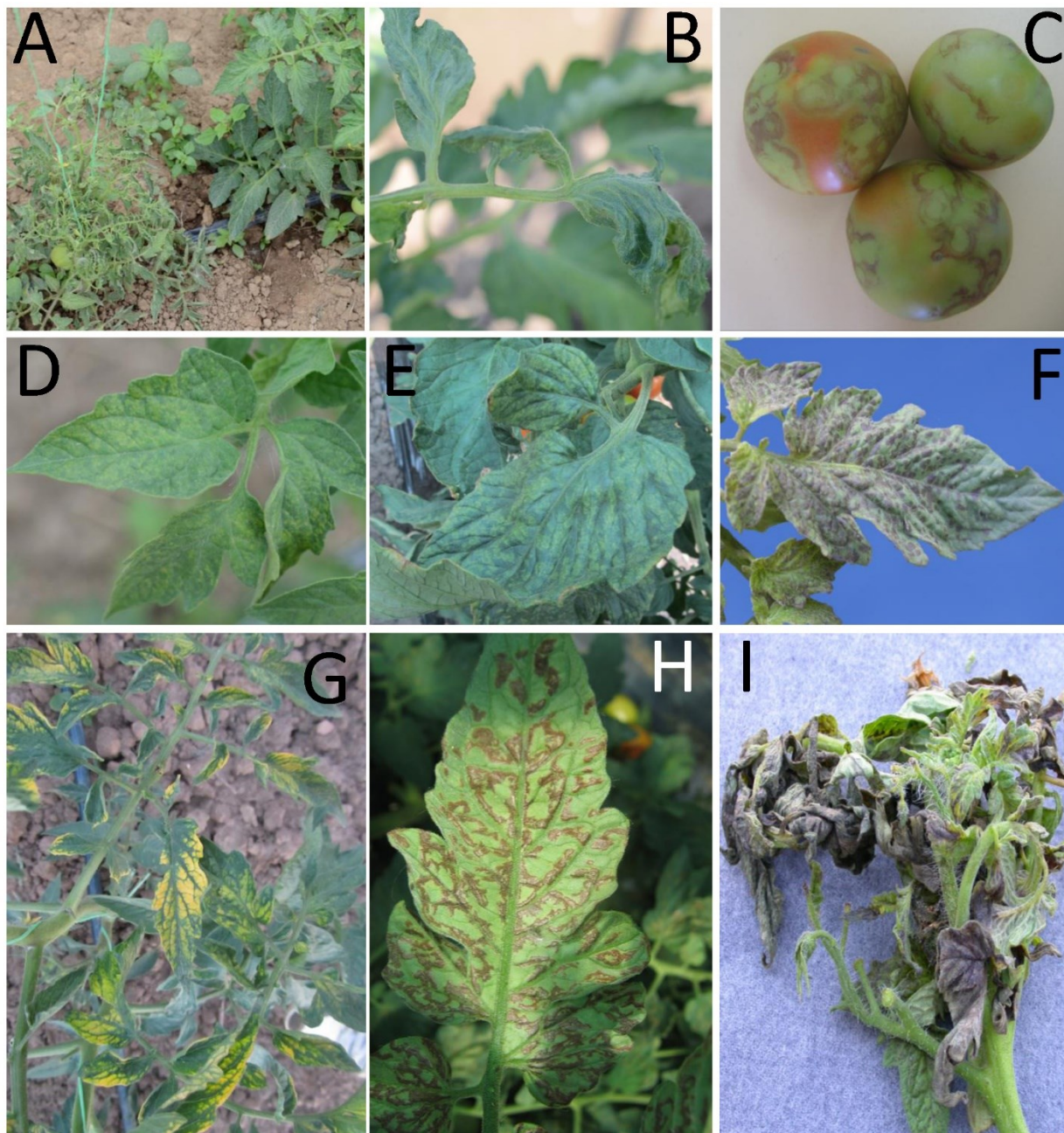
5.1. Simptomi zabeleženi u polju i učestalost oboljenja

Pregledom useva paradajza, na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru, u periodu od 2011. do 2015. godine u Srbiji, uočena je pojava brojnih simptoma koji su ukazivali na virusne infekcije. Najčešće uočeni tipovi simptoma bili su različiti vidovi mozaika (Slika 1-D i E), nekroza na lišću, deformacije listova (Slika 1-B), izražena nekroza (Slika 1-I), šarenilo i deformacije plodova (Slika 1-C), kao i promene opšteg izgleda biljke. Pored ovih simptoma u petogišnjem periodu su se javljali još i: zakržljatost biljaka, uvijenost, deformacije u vidu klobučavost i kovrdžavost lišća, nitavost, bronzavost (Slika 1-F), žutilo (Slika 1-G), nekrotične pege ili nekrotična prošaranja na lišću (Slika 1-H), nekroza stabla i cvetnih grana. Simptomi uočeni na paradajzu bili su veoma raznovrsni, a zavisili su od vremena ostvarene infekcije, sorte/hibrida paradajza, soja virusa, kao i uslova spoljne sredine.

U toku 2011. godine uočeni su raznoliki sumptomi kao što su: mozaična prošaranja, bronzavost, žutilo, deformacija lista, nitavost, kovrdžavost, nekroza unutrašnjeg i spoljašnjeg dela ploda i patuljavost. Simptomi su najčešće bili uočljivi na listovima, a često i na plodovima gde je dolazilo do izostanka formiranja uobičajenog broja plodova na cvetnim granama. Formirani plodovi su, usled poremećenog razvoja, bili sitni. Najizraženiji simptomi bili su patuljavost i neravnomerno sazrevanje plodova. Simptomi uočeni tokom 2011. godine bili su veoma izraženi, a procenjena zaraženost pregledanih useva kretala se od 40 do 80%. Pregledom useva paradajza tokom 2012. godine ponovo su uočeni raznovrsni simptomi tipa: izražena nekroza vrha, prošaranost i uvijanje lišća, tamnobraon crtičavost lišća, izražena bronzavost praćena nekrozom i sušenjem lišća, različiti vidovi mozaika i prošaranja na lišću i plodovima. Na lokalitetu Aradac, uočeni su veoma izraženi simptomi sistemične nekroze na biljkama, usled čega su biljke propadale, dolazilo je do nekroze cvetnih grana, a plodovi su bili sa izraženom klobučavošću i nekrozama. Iako je procenjena učestalost zaraze bila od 30 do 50%, na nekim lokalitetima je dostizala u 100%. Tokom pregleda useva paradajza 2013. godine uočeni su sledeći simptomi: patuljavost, hloroza, deformacije, mozaik uvijenost, klobučavost i bronzavost lišća, kao i deformacije, nekroza i prstenavost plodova. Na određenim lokalitetima zabeleženo je i pucanje epidermisa plodova paradajza. Usled jake

zaraze došlo je i do izostanka formiranja plodova, dok su formirani plodovi bili izraženo deformisani sa karakterističnim prstenastim prošaravanjem. Procenjena učestalost zaraze kretala se od 40 do 70%. U 2014. godini pregledom useva paradajza zabeleženi su simptomi kao što su: mozaik na lišću, hloroza, bronzavost, deformacije lišća i nekroza plodova. Uočeni simptomi bili su manje izraženi u odnosu na prethodne godine, a procenjena učestalost zaraze kretala se od 10 do 30%. Simptomi uočeni u toku 2015. godine bili su veoma izraženi. Na većem broju lokaliteta zabeleženi su raznoliki simptomi: hloroza i nekroza lista i lisne drške, praćena nekrotičnim pegama i nekrozom nervature. Pored toga bili su izraženi simptomi u vidu deformacija, uvijenosti i nitavosti lišća. Karakteristični simptomi na plodovima bili su izraženi u vidu deformacija, nekroze i pucanja plodova. Na manjem broju lokaliteta zabeležena je zakržljalogost biljaka paradajza. Procenjena zaraženost pregledanih useva kretala se od 30 do 80%.

Simptomi uočeni u toku petogodišnjih ispitivanja, javljali su se na svim nadzemnim delovima biljke, najčešće na lišću i plodovima, ali i na stablu i cvetnim granama. Često se javljalo više tipova simptoma na istom organu, nekada su cele biljke ispoljavale simptome, dok su nekada simptomi bili ograničeni na delove biljke, dok su ostali delovi biljke bili bez promena. Najučestaliji tip simptoma na lišću, bile su različite vrste mozaika i mozaične hloroze (Slike 2 i 3). Takođe, često su uočavani simptomi tipa bronzavosti lišća (Slika 4), nekrotični pega i šara i crtičaste nekroze (Slika 5). Od hromatskih promena na lišću, često se javljala hloroza (Slika 6), koja je često praćena i deformacijama liske (Slika 7). Na lišću paradajza, često su se javljali i različiti vidovi deformacija, pre svega u vidu klobučavosti ili redukcije lisne površine do nitavosti (Slika 8), koje su najčešće bile praćene mozaikom. Simptomi na plodovima su se, takođe, često javljali. Najčešći simptomi na plodovima su bili deformacije i nekroza, a takvi plodovi su u potpunosti gubili komercijalnu vrednost (Slika 9). Ukoliko se infekcija ostvari u ranoj fazi formiranja plodova može doći do zaostajanje u porastu i nekroze manjih plodova, kao i do izostanka formiranja plodova u potpunosti (Slika 10). Često su se javljali i simptomi hlorotičnih i nekrotičnih pega i šara, koje su podsećale na infekcije virusima roda *Orthospovirus* (Slike 11 i 12). Nekada je dolazilo i do pucanja pokožice ploda (Slika 13), a nekada su se pored deformacija u vidu klobučavosti, na plodu javljala i nekrotična prošaravanja (Slika 14). Na stablu paradajza uočeni su simptomi sistemske nekroze (Slika 15), kada je dolazilo do brzog propadanja biljaka.



Slika 1. Simptomi virusnih infekcija na paradajzu: (A) Zaostajanje u porastu i nitavost (CMV); (B) Mozaik i deformacije lišća (CMV+PVY+AMV); (C) Nekrotične šare i neravnomerno sazrevanje plodova (CMV); (D) Blagi mozaik (ToMV); (E) Izražen mozaik (TMV); (F) Bronzavost (TSWV); (G) Žutilo (PVY+AMV); (H) Nekrotične linijske šare (PVY) i (I) Izražena nekroza (TSWV)



Slika 2. ToMV: Mozaična hloroza lista



Slika 3. TMV: Mozaična hloroza



Slika 4. TSWV: Bronzavost lišća



Slika 5. PVY: Crtičasta nekroza lišća



Slika 6. CMV: Hloroza lista



Slika 7. PVY: Uvijenost i hloroza lišća



Slika 8. CMV: Nitavost



Slika 9. CMV: Deformacija i nekroza ploda



Slika 10. CMV: Zaostajanje plodova u porastu



Slika 11. TSWV: Koncentrični prstenovi na plodu



Slika 12. TSWV: Šarenilo ploda



Slika 13. TSWV: Pucanje pokožice ploda



Slika 14. ToMV: Klobučavost i nekrotične šare na plodu



Slika 15. CMV satRNA: Nekroza stabla

5.2. Serološko dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima paradajza

U periodu od 2011. do 2015. godine, sa ciljem identifikacije i utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza na različitim lokalitetima gajenja u AP Vojvodini, Centralnoj i Južnoj Srbiji i AP Kosovo i Metohija, izvedene su serološke analize primenom poliklonalnih antiseruma specifičnih za deset ekonomski najznačajnijih i karantinskih virusa paradajza: CMV, AMV, PepMV, TMV, ToMV, PVY, TSWV, PVX, TYLCV i ToRSV.

U toku 2011. godine utvrđeno je prisustvo pet virusa: CMV, PVY, AMV, TSWV i TMV (Tabela 9). U okruzima Severnobački, Zapadnobački, Južnobački, Sremski, Mačvanski, Grad Beograd, Podunavski, Raški, Raskinski i Jablanički pregledom je obuhvaćen 21 lokalitet: Ljutovo, Subotica, Kupusina, Prigrevica, Irmovo, Kraljevci, Debrč, Slanci, Surčin, Ratari, Mladenovac, Smederevska Palanka, Staro Selo, Cerje, Počekovina, Mačkovac, Togočevce, Cekavica, Vlase, Stajkovce i Navalin (Slika 16). Tokom 2011. godine prisustvo bar jednog od virusa dokazano je u 97,3% testiranih uzoraka. Kao najzastupljeniji, CMV je detektovan u 61,7% ispitivanih uzoraka, dok je na drugom mestu bio PVY u dokazan u 48% uzoraka. Treći po zastupljenosti bio je AMV prisutan u 17,2% uzoraka, dok su četvrti i peti bili TSWV i TMV, prisutni u 14%, odnosno 2,3% ispitivanih uzoraka. Najzastupljenija je bila pojedinačna zaraza, detektovana je u 57,5% uzoraka. Od pojedinačnih zaraza najčešće je detektovana zaraza sa CMV (29,9%), a zatim PVY (16,7%), TSWV (6,5%), AMV (2,8%) i TMV (1,6%) (Grafikon 1). Mešane infekcije bile su zastupljene u 39,8% testiranih uzoraka gde su najzastupljenije bile dvostruke infekcija (33,7%) od kojih je najzastupljenija infekcija sa CMV i PVY (17,2%). Dvostruke infekcije zabeležene u manjem procentu su PVY i AMV (8%), CMV i TSWV (6,3%), CMV i AMV (1,5%) i CMV i TMV (0,7%). Trostruke infekcije dokazane su 6,1% testiranih uzoraka i to: CMV, PVY i AMV (4,9%) i CMV, PVY i TSWV (1,2%) (Tabela 10). Prisustvo PepMV, ToMV, PVX, TYLCV i ToRSV nije potvrđeno u ispitivanim uzorcima 2011. godine.

Najrasprostranjeni virus 2011. godine bio je CMV, čije je prisustvo dokazano u pojedinačnim ili mešanim infekcijama u osam od 10 pregledanih okruga (Slika 16, Tabela 9). Drugi po zastupljenosti je PVY, dokazan u pet pregledanih distrikta. Prisustvo TSWV i AMV je dokazano u po četiri okruga, dok je TMV dokazan u tri okruga.

Tabela 9. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u pojedinačnim i ukupnim infekcijama 2011. godine

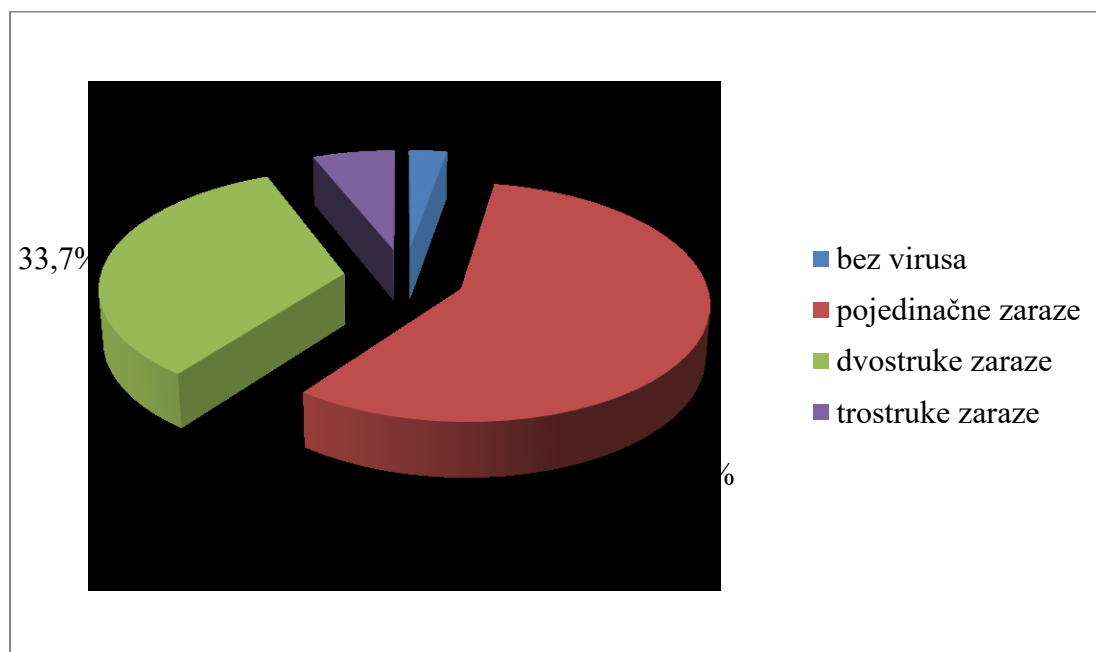
Okrug	Broj lokaliteta	Broj testiranih uzoraka	Pojedinačne/ukupne infekcije (%)				
			CMV	PVY	AMV	TSWV	TMV
Severnobački	2	22	0/63,6	0/31,8	0/0	31,8/100	0/0
Začadnobački	2	326	6,4/71,2	14,7/57,7	0/15	5,8/33,1	0/0
Južnobački	1	14	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100
Sremski	1	23	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Mačvanski	1	10	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Grad Beograd	4	141	55,3/63,1	7,9/39,1	7,8/14,9	0/0	0/0
Podunavski	2	85	36,5/36,5	0/0	0/0	61,2/61,2	0/0
Raški	1	8	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100
Rasinski	2	151	37,1/86,1	6/39,1	9,9/45,7	0/0	0/6
Jablanički	5	600	32,2/53,8	26,3/62,3	1,7/16,8	1,8/1,8	0/0
Ukupno	21	1380	29,9/61,7	16,7/48	2,8/17,2	6,5/14	1,6/2,3

Tabela 10 Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u mešanim infekcijama 2011. godine

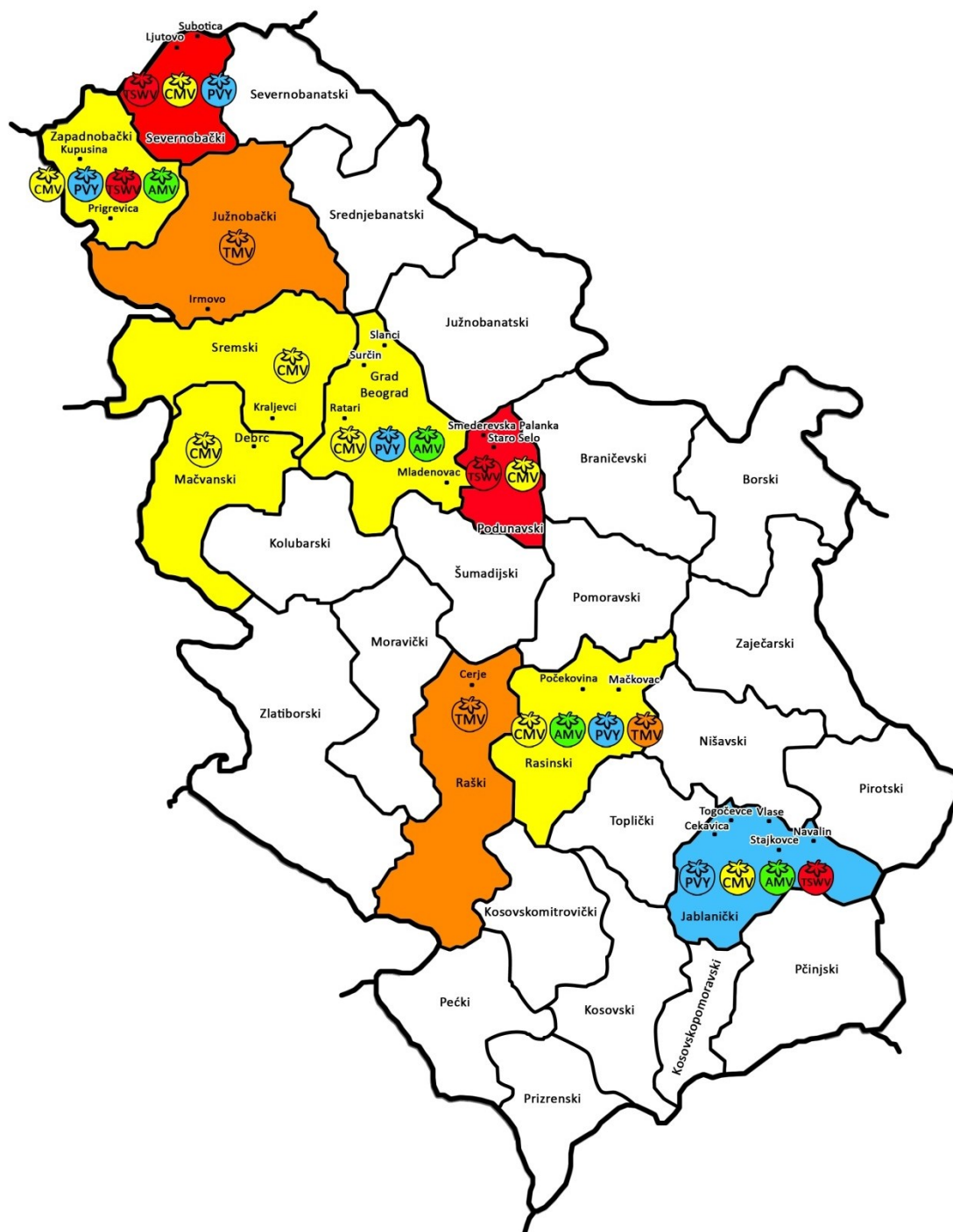
Dvostruke infekcije		Trostruke infekcije	
CMV+PVY	237/17,2 ^a	CMV+PVY+ AMV	67/4,9
CMV+TSWV	87/6,3	CMV+PVY+ TSWV	17/1,2
PVY+AMV	110/8	Ukupno	84/6,1
CMV+AMV	21/1,5		
CMV+TMV	9/0,7		
Ukupno	464/33,6		

^abroj zaraženih uzoraka/procentualna zastupljenost. Procenat infekcija je izračunat na osnovu ukupanog broj testiranih uzoraka.

Grafikon 1. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paradajza 2011. godine



Slika 16. Rasprostranjenost i prevalentnost virusa paradajza po okruzima detektovanih u 2011. godini. Boja okruga pokazuje koji je virus prevalentan, a različite boje plodova paradajza pokazuju koji su virusi detektovani u tom okrugu.



U toku 2012. godine utvrđeno je prisustvo šest virusa: CMV, PVY, AMV, TSWV, TMV i ToMV (Tabela 11). U okruzima: Severnobański, Srednjobański, Južnobański,

Zapadnobački, Južnobački, Grad Beograd, Mačvanski, Podunavski, Braničevski, Pomoravski, Moravički, Raški, Rasinski, Nišavski, Pirotski i Jablanički pregledom je obuhvaćeno 36 lokaliteta: Novi Kneževac, Aradac, Mihajlovo, Lukino Selo, Dolovo, Sombor, Vrbas, Mošorin, Novi Sad, Padinska Skela, Resnik, Debrce, Velika Plana, Porodin, Požarevac, Sirakovo, Beranje, Carevac, Šuvajić, Jagodina, Prijedor, Trbušani, Adrani, Počakovina, Medveđa, Globoder, Mačkovac, Koševi, Selo Varvarin, Nozrina, Batušinci, Balajnac, Pirot, Cekavica, Togočevce i Priboj (Slika 17). Prisustvo virusa u toku 2012. godine dokazano je 56,6% testiranih uzoraka. Kao najzastupljeniji, PVY je bio detektovan u 34% testiranih uzoraka, dok je na drugom mestu bio CMV dokazan u 27,4% testiranih uzoraka. Treći i četvrti po zastupljenosti bili su AMV i TSWV prisutni u 6,3%, odnosno 4,5% testiranih uzoraka, dok su peti i šesti po zastupljenosti bili ToMV i TMV prisutni u 4%, odnosno 0,6% testiranih uzoraka. Najzastupljenija je bila pojedinačna zaraza detektovana je u 39,6% testiranih uzoraka. Od pojedinačnih zaraza najčešće je detektovana zaraza sa PVY (18,1%), a zatim CMV (13,3%), AMV (2,5%), TSWV (4%), ToMV (1,1%) i TMV (0,6%) (Grafikon 2). Mešane infekcije bile su zastupljene u 17% testiranih uzoraka. Od mešanih infekcija najzastupljenije su bile dvostruke infekcije detektovane u 14,2% testiranih uzoraka, a najčešće infekcija su bile sa PVY i CMV (10,8%). U manjem procentu zabeležene su dvostruke infekcije: PVY i AMV (1,6%), PVY i ToMV (0,7%), CMV i AMV (0,5%) i AMV i TSWV (0,5%). Trostruke infekcije dokazane su u 2,2% testiranih uzoraka, i to PVY, CMV i ToMV (1,6%) i PVY, CMV i AMV (0,6%). Jedina četvorostuka infekciju detektovanu tokom 2012. god bila je mešana infekcija PVY, CMV, AMV i ToMV, detektovana u 0,6% testiranih uzoraka (Tabela 12). Prisustvo PepMV, PVX, TYLCV i ToRSV nije potvrđeno u ispitivanim uzorcima 2012. godine.

Tokom 2012. godine, najrasprostranjeniji virus bio je PVY čije je prisustvo detektovano u 13 od 16 ispitivanih okruga. Sledeći po zastupljenosti bio je CMV detektovan u devet testiranih okruga. Ostali virusi detektovani su u znatno manjem broju okruga i to AMV u šest, TSWV u četiri, ToMV u dva, a prisustvo TMV detektovano je u samo jednom okrugu.

Tabela 11. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u pojedinačnim i ukupnim infekcijama 2012. godine

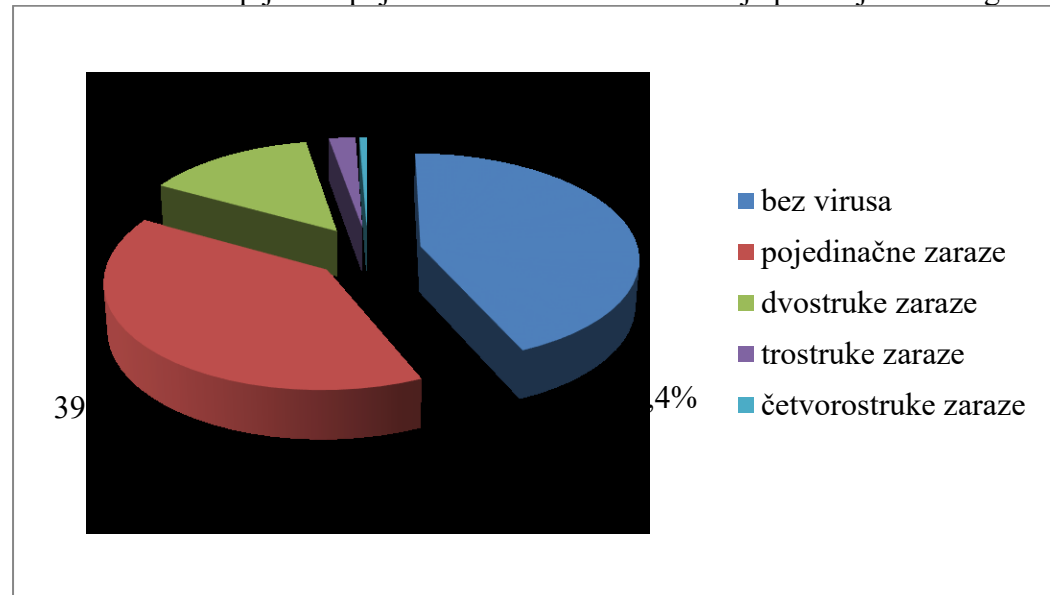
Okrug	Broj lokaliteta	Broj testiranih uzoraka	Pojedinačne/ukupne infekcije (%)					
			PVY	CMV	AMV	TSWV	ToMV	TMV
Zapadnbački	1	12	100/100	0/0 ¹	0/0	0/0	0/0	0/0
Južnobački	3	54	16,7/16,7	40,7/40,7	0/0	44, 4/44,4	0/0	0/0
Severnobanatski	1	26	0/0	0/0	0/0	100/100	0/0	0/0
Srednjobanatski	3	212	4,2/33	19,8/48,6	0/0	0/0	0/0	0/0
Južnobanatski	1	11	0/0	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Mačvanski	1	114	9,6/9,6	0/0	0/0	0/0	0/0	9,6/9,6
Grad Beograd	2	41	0/100	0/100	0/26,9	0/0	0/53,7	0/0
Podunavski	1	7	0/0	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Braničevski	6	189	27/65,1	4,8/27	0/4,8	0/0	11,1/27,5	0/0
Pomoravski	1	10	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Moravički	2	99	21,2/21,2	8,1/8,1	0/0	0/0	0/0	0/0
Raški	1	7	100/100	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Rasinski	6	580	13,6/30	20,9/38,7	1,6/3,4	1,9/1,9	0/0	0/0
Nišavski	3	270	28,9/36,3	7,8/14,8	0/3,3	4,1/4,1	0/0	0/0
Pirotski	1	22	50/100	0/0	0/50	0/0	0/0	0/0
Jablanički	3	186	12,4/12,4	0/0	19,4/19,4	0/0	0/0	0/0
Ukupno	36	1840	18,1/34	13,3/27,4	2,5/6,3	4/4,5	1,1/4	0,6/0,6

Tabela 12. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u mešanim infekcijama 2012. godine

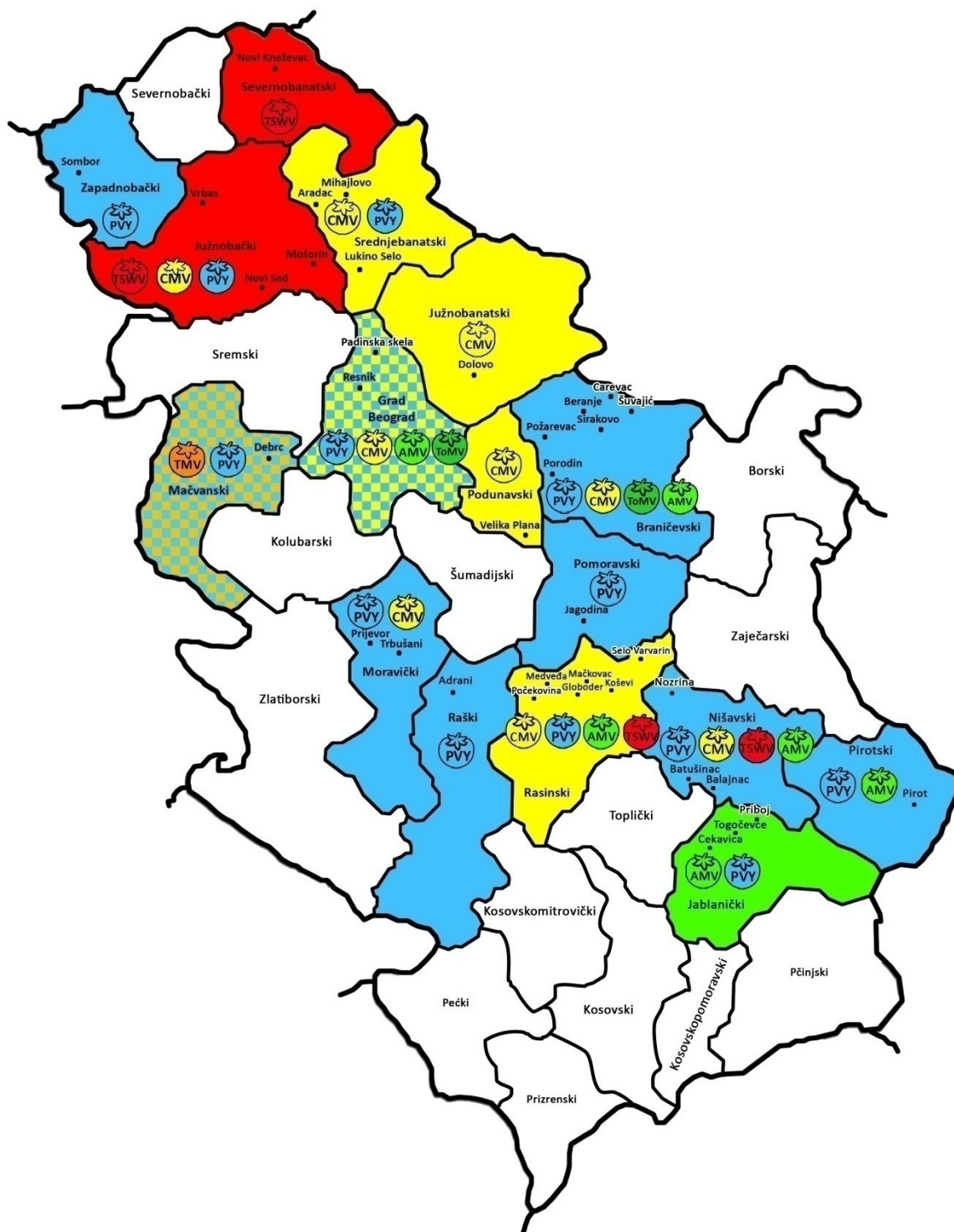
Dvostruke infekcije		Trostruke infekcije		Četvorostruke infekcije	
PVY+CMV	199/10,8 ^a	PVY+CMV+ToMV	30/1,6	PVY+ CMV+ AMV+ToMV	11/0,6
PVY+AMV	29/1,6	PVY+CMV+ AMV	11/0,6	Ukupno	11/0,6
PVY+ToMV	12/0,7	Ukupno	42/2,2		
CMV+AMV	10/0,5				
AMV+TSWV	10/0,5				
Ukupno	260/14,2				

^abroj zaraženih uzoraka/procentualna zastupljenost. Procenat infekcija je izračunat na osnovu ukupanog broj testiranih uzoraka.

Grafikon 2. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paradajza 2012. godine



Slika 17. Rasprostranjenost i prevalentnost virusa paradajza po okruzima detektovanih u 2012. godini. Boja okruga pokazuje koji je virus prevalentan, a različite boje plodova paradajza pokazuju koji su virusi detektovani u tom okrugu.



U toku 2013. godine utvrđeno je prisustvo šest virusa: CMV, PVY, AMV, TSWV, TMV i ToMV (Tabela 13). U okruzima: Severnobački, Zapadnobački, Sremski, Grad Beograd, Mačvanski, Kolubarski, Podunavski, Šumadijski, Moravički, Pomoravski, Raški, Rasinski,

Jablanički, Pčinjski i Kosovskomitrovički pregledom je obuhvaćeno 46 lokaliteta: Donji Tavankut, Hajdukovo, Ljutovo, Bački Vinogradi, Šupljak, Kupusina, Popinci, Surčin Mladenovac, Brestovik, Međulužje, Zvečka, Stubline, Grabovac, Družetić, Ub, Gvozdrenović, Smederevska Palanka, Pridvorica, Bašin, Natalinci, Banja, Orašac, Zabrega, Striža, Kotraž, Medveđa, Mačkovac, Biljanovac, Varevo, Kaznoviće, Popovce, Dobrava, Slatina, Sočanica, Kamenica, Grabovac, Togočevce, Priboj i Vladičin Han (Slika 18). Prisustvo virusa tokom 2013. godine, dokazano je u 77,6% testiranih uzoraka. Kao najzastupljeniji, PVY je detektovan u 46,8% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio ToMV prisutan u 38,1% testiranih uzoraka. Treći po zastupljenosti bio je CMV u 18,7% testiranih uzoraka, a četvrti TMV prisutan u 15,8% testiranih uzoraka. Peti i šesti, po procentualnoj zastupljenosti, bili su TSWV i AMV čije je prisustvo dokazano u 12,2%, odnosno 2,9% testiranih uzoraka. Za razliku od prethodne dve godine, tokom 2013. godine najčešći tip infekcija bile su mešane infekcije detektovane u 40,2% testiranih uzoraka. Od mešanih infekcija najzastupljenije su bile dvostruke infekcije sa 27,2% od kojih je najzastupljenija infekcija sa PVY i ToMV dokazana u 11,5% testiranih uzoraka (Tabela 14). U manjem procentu dokazane su dvostruke infekcije sa CMV i PVY (5,8%), TMV i ToMV (3,6%), PVY i TMV (1,4%), PVY i AMV (1,4%), CMV i ToMV (1,4%), TSWV i PVY (0,7%), TSWV i TMV (0,7%) i TSWV i ToMV (0,7%). Trostruke infekcije činile su 9,4% ukupnih zaraza, i to PVY, TMV i ToMV (5,8%), CMV, PVY i ToMV (2,9%) i CMV, TMV i ToMV (0,7%). Jedina četvorostruka infekcija sa CMV, PVY, TMV i ToMV detektovana je u 3,6% testiranih uzoraka. Pojedinačne infekcije su detektovane u 37,4% uzoraka. Najzastupljenija pojedinačna infekcija bila je sa PVY (13,7%), a zatim TSWV (10,1%), ToMV (7,9%), CMV (4,3%) i AMV (1,4%) (Grafikon 3). TMV nije detektovan u pojedinačnoj zarazi. Prisustvo PepMV, PVX, TYLCV i ToRSV nije potvrđeno u ispitivanim uzorcima 2013. godine.

Najrasprostranjeniji virus tokom 2013. godine bio je ToMV, dokazan u 13 od 15 pregledanih okruga, dok je drugi po rasprostranjenosti PVY dokazan u 12 okruga. Ostali virusi detektovani su u manjem broju distrikta i to TMV u devet, CMV u sedam, TSWV u četiri i AMV u tri okruga.

Tabela 13. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u pojedinačnim i ukupnim infekcijama 2013. godine

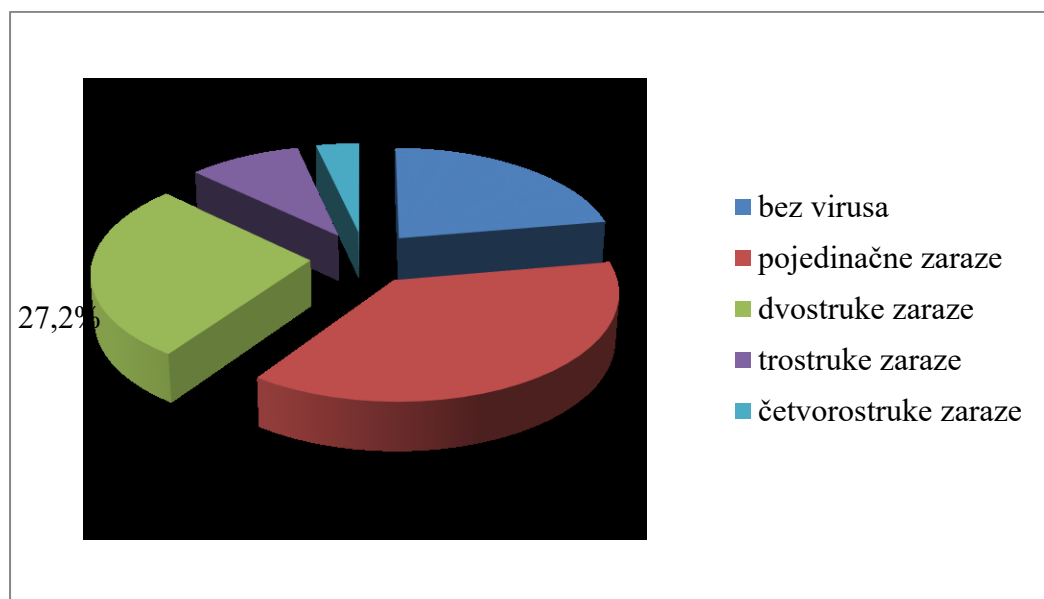
Okrug	Broj lokaliteta	Broj testiranih uzoraka	Pojedinačne/ukupne infekcije (%)					
			PVY	ToMV	CMV	TMV	TSWV	AMV
Severnobački	5	30	10,0/20,0	0/0	0/0	0/3,3	33,3/40,0	3,3/6,7
Zapadnobački	1	14	28,6/28,6	7,1/7,1	0/0	0/0	14,3/14,3	0/0
Mačvanski	1	2	0/100	0/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Sremski	1	1	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100	0/0
Grad Beograd	7	22	13,6/54,5	9,1/45,5	13,6/22,7	0/27,3	4,5/9,1	0/4,5
Kolubarski	2	10	10,0/50,0	10,0/10,0	20,0/70,0	0/0	0/0	0/0
Podunavski	4	6	0/50,0	50,0/100	0/16,7	0/16,7	0/0	0/0
Pomoravski	2	2	0/50,0	50,0/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Šumadijski	3	8	0/100	0/100	0/37,5	0/25,0	0/0	0/0
Moravički	1	1	0/100	0/100	0/0	0/0	0/0	0/0
Raški	3	6	0/66,7	0/100	0/50,0	0/50,0	0/0	0/0
Rasinski	3	16	12,5/50,0	12,5/31,3	0/25,0	0/12,5	0/0	0/6,3
Kosovskomitrovački	6	15	26,7/60,0	0/46,7	0/20,0	0/20,0	0/0	0/0
Jablanički	2	3	0/0	0/33,3	0/0	0/33,3	0/0	0/0
Pčinjski	3	3	0/0	100/100	0/0	100,100	0/0	0/0
Ukupno	44	139	13,7/46,8	7,9/38,1	4,3/18,7	0/15,8	10,1/12,2	1,4/2,9

Tabela 14 Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u mešanim infekcijama 2013. godine

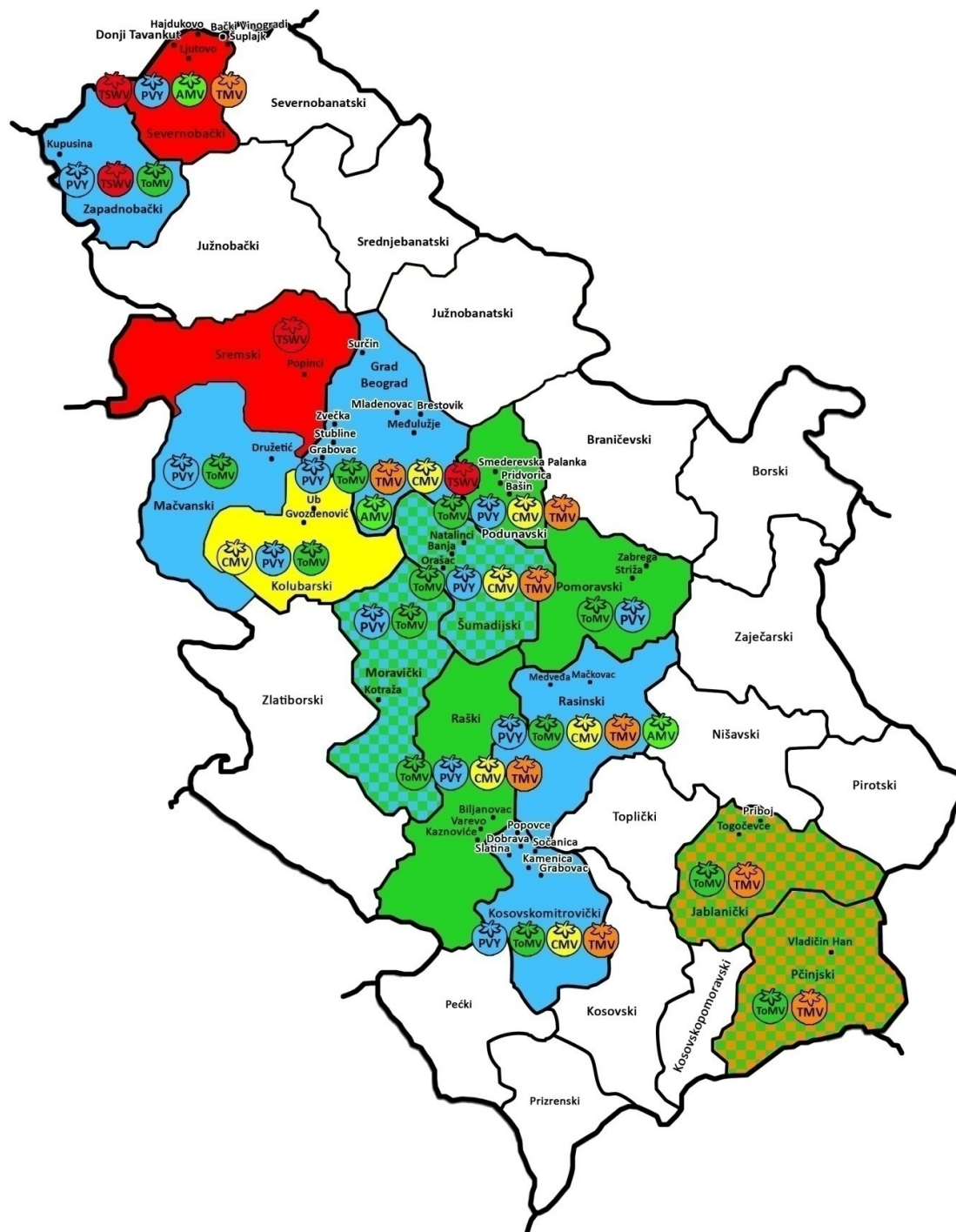
Dvostruke infekcije		Trostruke infekcije		Četvorostruke infekcije	
PVY+ToMV	16/11,5 ^a	PVY+TMV+ToMV	8/5,8	CMV+PVY+TMV+ToMV	5/3,6
CMV+PVY	8/5,8	CMV+PVY+ ToMV	4/2,9	Ukupno	5/3,6
TMV+ToMV	5/3,6	CMV+TMV+ToMV	1/0,7		
PVY+TMV	2/1,4	Ukupno	13/9,4		
PVY+AMV	2/1,4				
CMV+ToMV	2/1,4				
TSWV+PVY	1/0,7				
TSWV+TMV	1/0,7				
TSWV+ToMV	1/0,7				
Ukupno	38/27,2				

^abroj zaraženih uzoraka/procentualna zastupljenost. Procenat infekcija je izračunat na osnovu ukupanog broj testiranih uzoraka.

Grafikon 3. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paradajza 2013. godine



Slika 18. Rasprostranjenost i prevalentnost virusa paradajza po okruzima detektovanih u 2013. godini. Boja okruga pokazuje koji je virus prevalentan, a različite boje plodova paradajza pokazuju koji su virusi detektovani u tom okrugu.



Tokom 2014. godine utvrđeno je prisustvo četiri virusa: PVY, CMV, AMV i TSWV (Tabela 15). U okruzima: Severnobački, Zapadnobački, Braničevski, Rasinski i Jablanički pregledom je obuhvaćeno 14 lokaliteta: Subotica, Ljutovo, Donji Tavankut, Gornji Tavankut,

Kupusina, Porodin, Medveđa, Mačkovac, Brestovac, Togočevce, Cekavica, Vinarce, Razgojna i Stajkovce (Slika 18). Prisustvo virusa tokom 2014. godine dokazano je u 30,2% testiranih uzoraka. Kao najzastupljeniji, PVY je detektovan u 25,8% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio TSWV, dokazan u 3% testiranih uzoraka. CMV i AMV detektovani su u po 1,5% testiranih uzoraka. Najzastupljenija je bila pojedinačna zaraza detektovana u 27,2% testiranih uzoraka. Od pojedinačnih zaraza najčešće je detektovana zaraza sa PVY (22,7%), a zatim TSWV (3%) i CMV (1,5%) (Grafikon 4). Prisustvo AMV nije detektovano u pojedinačnim infekcijama. Mešane infekcije bile su zastupljene u 3% testiranih uzoraka. Od mešanih infekcija najzastupljenije su bile dvostruke infekcije, i to PVY i AMV i PVY i TSWV, detektovane u po 1,5% testiranih uzoraka (Tabela 16). Prisustvo PepMV, PVX, TYLCV i ToRSV, kao i ToMV i TMV nije potvrđeno u ispitivanim uzorcima 2014. godine.

Tokom 2014. godine, najrasprostranjeniji virus bio je PVY čije je prisustvo detektovano u četiri od osam ispitivanih okruga. Dok su ostali virusi detektovani u samo po jednom okrugu.

Tabela 15. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u pojedinačnim i ukupnim infekcijama 2014. godine

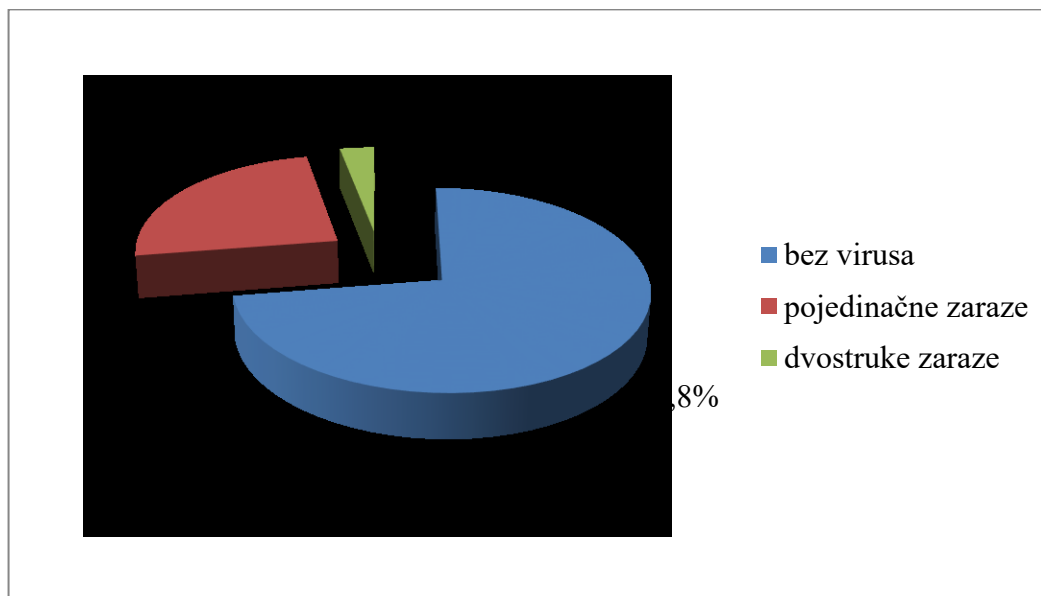
Okrug	Broj lokaliteta	Broj testiranih uzoraka	Pojedinačne/ukupne infekcije (%)			
			PVY	TSWV	CMV	AMV
Severnobački	4	9	11,1/11,1	0/0	0/0	0/0
Zapadnobački	1	9	33,3/44,4	11,1/11,1	0/0	0/0
Grad Beograd	2	5	0/0	0/0	0/0	0/0
Kolubarski	2	10	0/0	0/0	0/0	0/0
Podunavski	1	1	0/0	0/0	0/0	0/0
Braničevski	1	1	0/0	0/0	100/100	0/0
Rasinski	2	8	37,5/37,5	0/0	0/0	0/0
Jablanički	6	23	34,8/39,1	0/0	0/0	4,3/4,3
Ukupno	19	66	22,7/25,8	3,0/3,0	1,5/1,5	0/1,5

Tabela 16. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u mešanim infekcijama 2014. godine

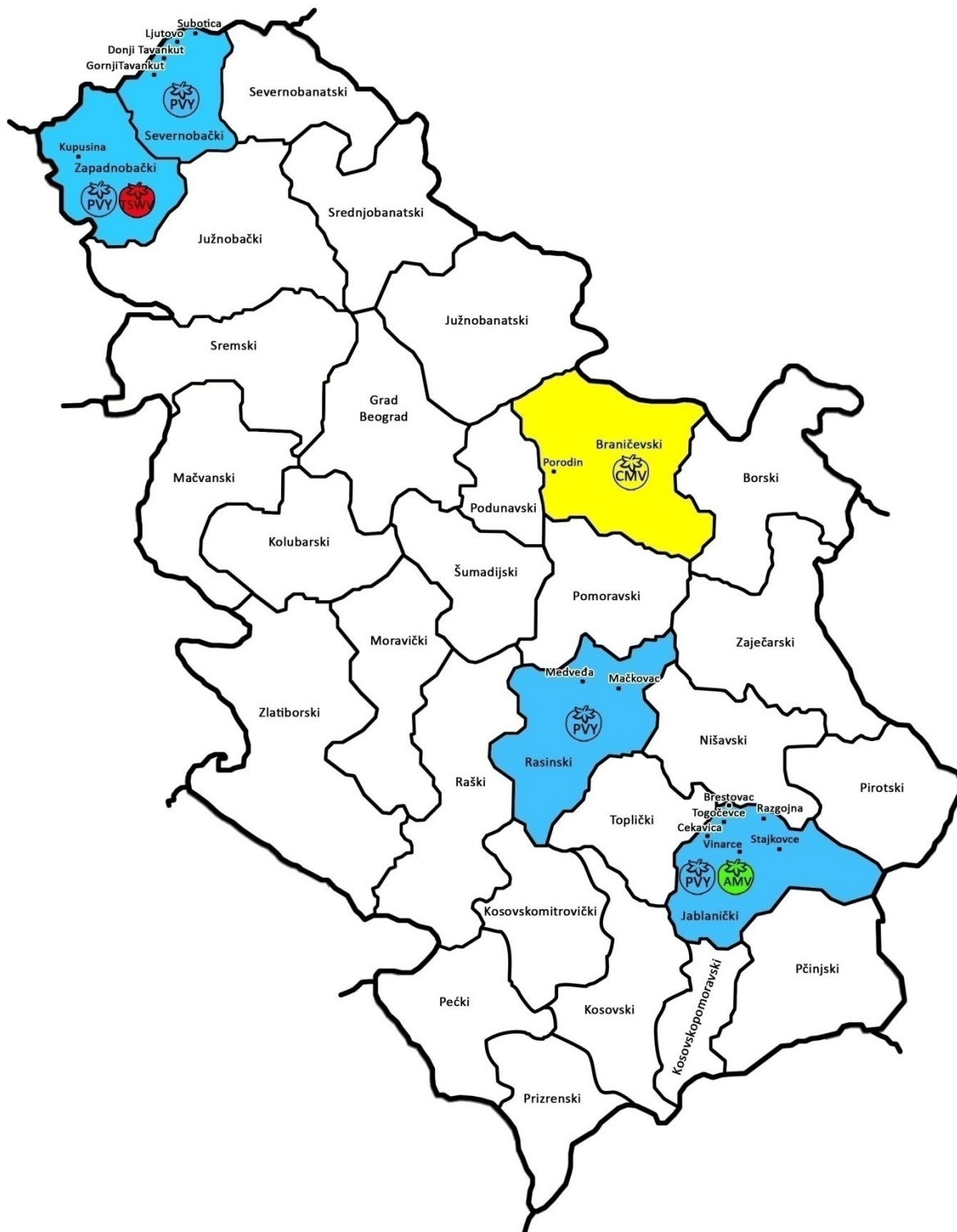
Dvostruke infekcije	
PVY+AMV	1/1,5 ^a
PVY +TSWV	1/1,5
Ukupno	2/3,0

^abroj zaraženih uzoraka/procentualna zastupljenost. Procenat infekcija je izračunat na osnovu ukupanog broj testiranih uzoraka.

Grafikon 4. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paradajza 2014. godine



Slika 19. Rasprostranjenost i prevalentnost virusa paradajza po okruzima detektovanih u 2014. godini. Boja okruga pokazuje koji je virus prevalentan, a različite boje plodova paradajza pokazuju koji su virusi detektovani u tom okrugu.



U toku 2015. godine utvrđeno je prisustvo pet virusa: CMV, PVY, TSWV, TMV i ToMV (Tabela 17). U okruzima: Srednjobanatski, Grad Beograd, Mačvanski, Podunavski, Rasinski, Jablanički i Pčinjski pregledom je obuhvaćeno 12 lokaliteta: Mužlja, Lozničko Polje, Zemun, Vinča, Smederevska Palanka, Mačkovac, Čitluk, Togočevce, Cekavica, Veliko Vojlovce, Stajkovce i Vladičin Han (Slika 20). Prisustvo virusa tokom 2015. godine dokazano je u 90,1% testiranih uzoraka. Kao najzastupljeniji, CMV je detektovan u 39,3% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio TSWV dokazan u 31,3% uzoraka. Treći po zastupljenosti bio je PVY detektovan u 31,1% testiranih uzoraka, dok su TMV i ToMV bili četvrti i peti po zastupljenosti detektovani u 18%, odnosno 9,8% testiranih uzoraka. Najzastupljenija je bila pojedinačna zaraza, detektovana u 60,7% testiranih uzoraka. Od pojedinačnih zaraza najčešće je detektovana zaraza sa CMV (21,3%), a zatim PVY (16,4%), TSWV (13,1%), TMV (6,6%) i ToMV (3,3%) (Grafikon 5). Mešane infekcije bile su zastupljene u 29,4% testiranih uzoraka gde su najzastupljenije bile dvostruke infekcije (24,6%) od kojih je najzastupljenija infekcija sa CMV i TSWV (13,1%). Dvostruke infekcije zabeležene u manjem procentu su sa PVY i TMV (4,9%), PVY i TSWV (3,3%) i TMV i ToMV (3,3%). Trostruke infekcije su dokazane 4,8% testiranih uzoraka i to: CMV, PVY i TMV (1,6%), CMV, PVY i ToMV (1,6%) i PVY, TMV i ToMV (1,6) (Tabela 18). Prisustvo PepMV, AMV, PVX, TYLCV i ToRSV nije potvrđeno u ispitivanim uzorcima 2015. godine.

Najrasprostranjeni virus 2015. godine bio je PVY, čije je prisustvo dokazano u šest od osam pregledanih okruga (Slika 20, Tabela 17). Drugi po zastupljenosti bio je TMV, dokazan u pet pregledanih okruga. Prisustvo CMV detektovano je u četiri okruga, dok su ToMV i TSWV detektovani u tri, odnosno dva okruga.

Tabela 17. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u pojedinačnim i ukupnim infekcijama 2015. godine

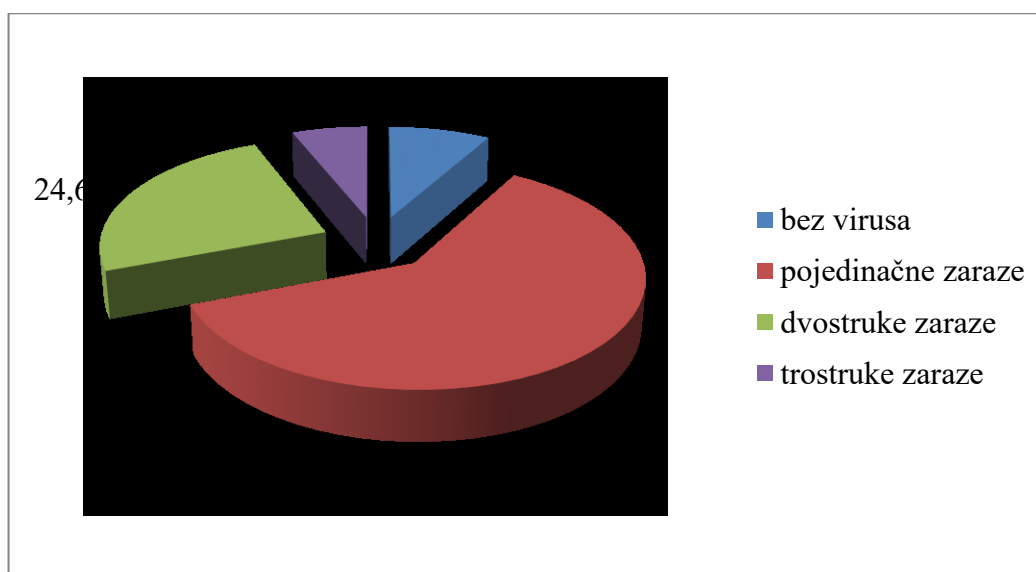
Okруг	Broj lokaliteta	Broj testiranih uzoraka	Pojedinačne/ukupne infekcije (%)				
			CMV	TSWV	PVY	TMV	ToMV
Srednjobanatski	1	1	0/0	100/100	0/0	0/0	0/0
Grad Beograd	2	3	0/0	0/0	33,3/66,7	0/33,3	33,3/66,7
Mačvanski	1	1	0/0	0/0	100/100	0/0	0/0
Podunavski	1	5	0/20,0	0/0	0/20,0	40,0/60,0	20,0/60,0
Šumadijski	1	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Rasinski	3	8	12,5/12,5	0/0	50,0/87,5	37,5/37,5	0/0
Jablanički	6	41	29,3/51,2	17,1/44,0	9,8/17,0	4,9/7,3	0/2,4
Pčinjski	1	1	0/100	0/0	0/100	0/100	0/0
Ukupno	16	61	21,3/39,3	13,1/31,3	16,4/31,1	6,6/18	3,3/9,8

Tabela 18. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paradajza u mešanim infekcijama 2015. godine

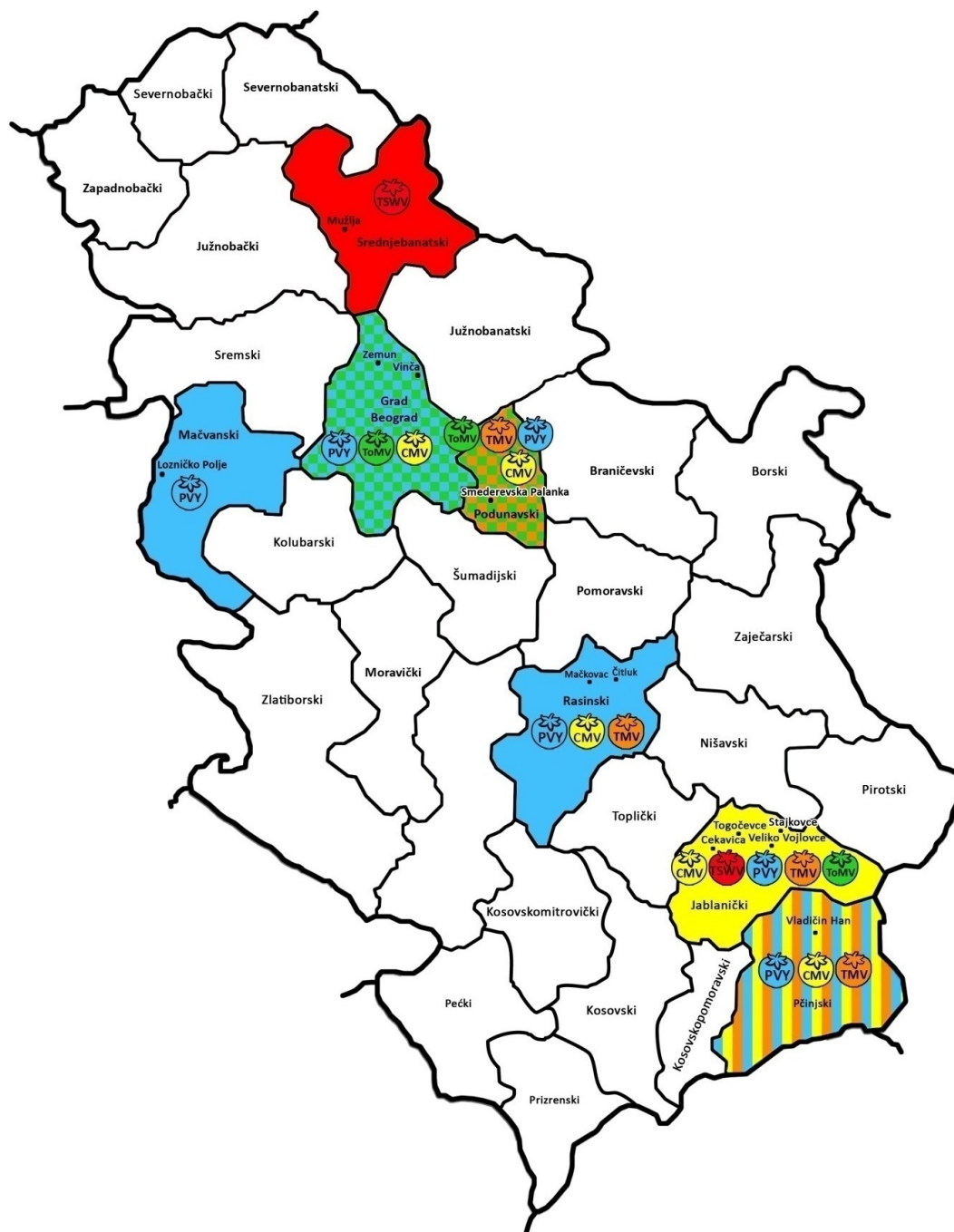
Dvostruke infekcije		Trostruke infekcije	
TSWV+CMV	8/13,1	CMV+PVY+TMV	1/1,6
PVY+TMV	3/4,9	CMV+PVY+ToMV	1/1,6
TSWV+PVY	2/3,3	PVY+TMV+ToMV	1/1,6
TMV+ToMV	2/3,3	Ukupno	3/4,8
Ukupno	15/24,6		

^abroj zaraženih uzoraka/procentualna zastupljenost. Procenat infekcija je izračunat na osnovu ukupnog broj testiranih uzoraka.

Grafikon 5. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paradajza 2015. godine



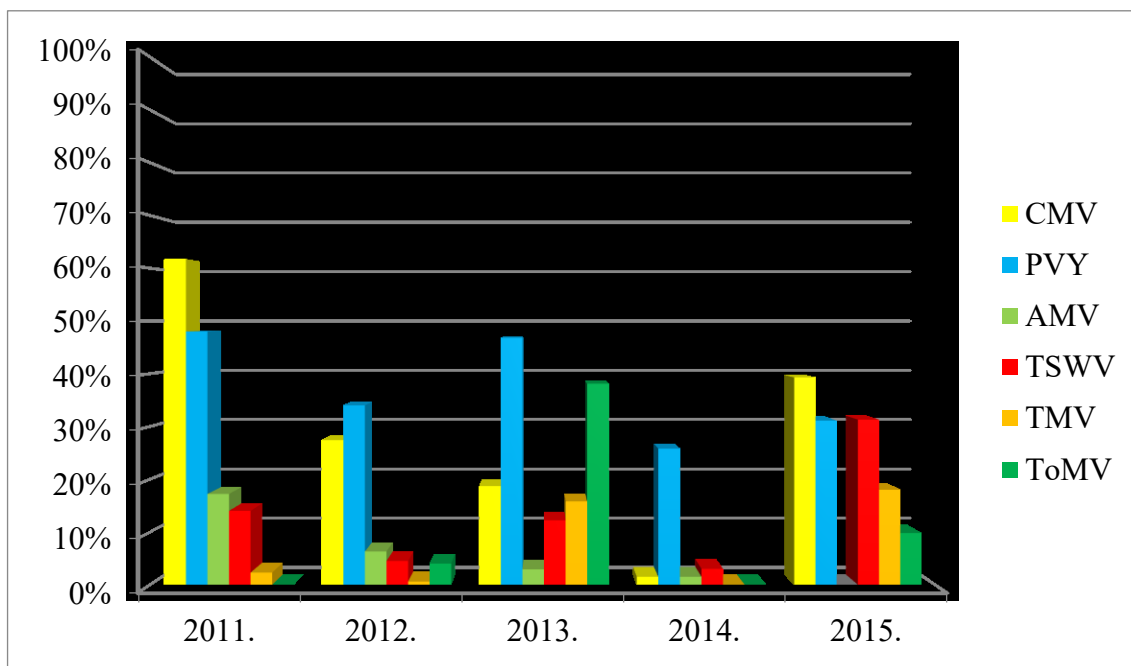
Slika 20. Rasprostranjenost i prevalentnost virusa paradajza po okruzima detektovanih u 2015. godini. Boja okruga pokazuje koji je virus prevalentan, a različite boje plodova paradajza pokazuju koji su virusi detektovani u tom okrugu.



Petogodišnjim istraživanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji detektovano je prisustvo 6 virusa: PVY, CMV, TSWV, AMV, TMV i ToMV (Tabela 19). PVY je bio najzastupljeniji tokom istraživanja sprovedenih 2012., 2013. i

2014. godine, a značajno prisutan 2011. i 2015. godine. CMV je tokom 2014. i 2015. bio treći po zastupljenosti, dok je u ostalim godinama istraživanja bio jedan od dva dominantna virusa. TSWV je kao manje značajan virus detektovan u svih pet godina istraživanja, a tokom 2011., 2012., 2013. i 2015 godine zabeleženo je dominantno prisustvo TSWV u manjem broju okruga. Dominantno prisustvo ToMV detektovano je 2013. godine, kada je ovaj virus bio na drugom mestu po zastupljenosti i prisutan u većem broju ispitivanih okruga. ToMV nije detektovan u uzorcima koji su ispitivani 2011. i 2014. godine. TMV je, kao manje značajan virus, detektovan 2011., 2012, 2013. i 2015. godine i u manjem broju okruga bio prevalentan. Kao procentualno manje zastupljen virus AMV je detektovan u prve četiri godine istraživanja, dok njegovo prisustvo nije dokazano u 2015. godini. Tokom svih pet godina istraživanja AMV je u samo jednom okrugu bio prevalentan virus. Pojava detektovanih virusa, kao i poređenje njihove učestalosti ukazuje da su se virusi, tokom svih pet godina istraživanja, u većem procentu pojavljivali kao pojedinačne zaraze, osim u 2013. godini kada je procentualna zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija bila približno ista. Dvostruke zaraze su se takođe pojavljivale u značajnom procentu u svim godinama, a najviše 2011. kada su detektovane u 33,7% ispitanih uzoraka. Trostruke i četvorostruke zaraze su se uglavnom pojavljivale u manjem procentu, a 2014. godine ovi tipovi mešanih zaraza nisu detektovani. Trostruke i četvorostruke zaraze najzastupljenije su bile 2013. godine sa 9,4%, odnosno 3,6%.

Grafikon 6. Zastupljenost virusa paradajza po godinama



Grafikon 7. Zastupljenost mešanih infekcija po godinama

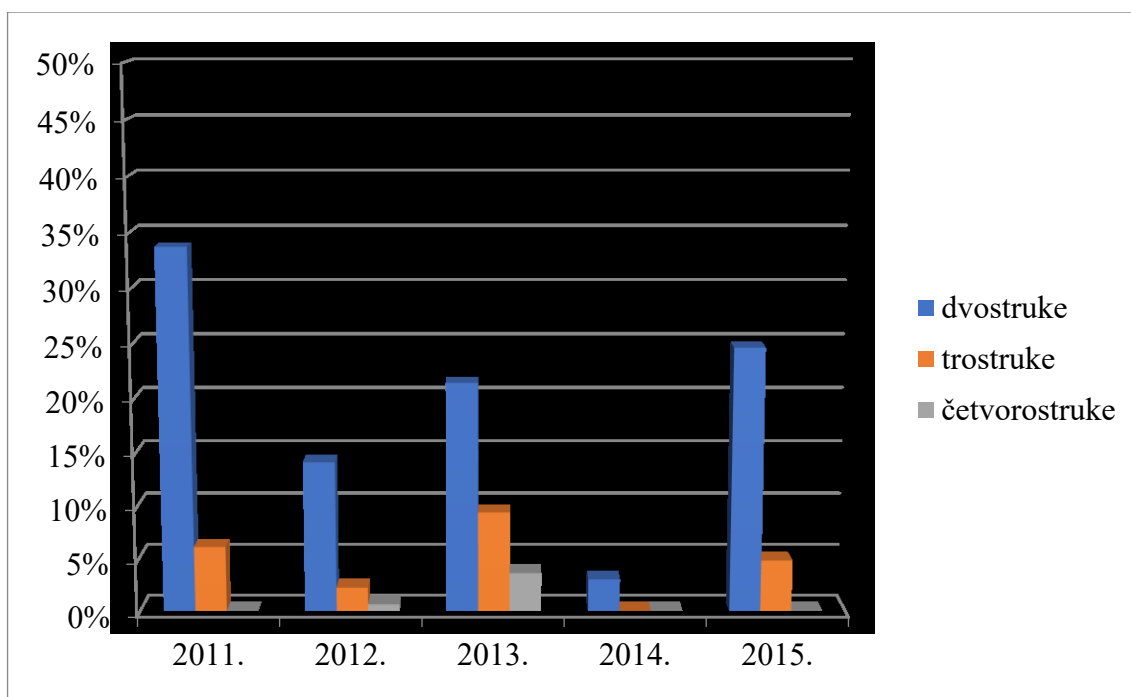


Tabela 19. Procenat uzoraka različitih tipova infekcija detektovanih od 2011. do 2015 godine

Virus	Detektovane infekcije					Ukupno
	2011	2012	2013	2014	2015	
Pojedinačne infekcije						
CMV	29,9	13,3	4,3	1,5	21,3	22,0
PVY	16,7	18,1	13,7	22,7	16,4	15,0
AMV	2,8	2,5	1,4	/	/	2,5
TSWV	6,5	4	10,1	3,0	13,1	5,4
TMV	1,6	0,6	/	/	6,6	1,1
ToMV	/	1,1	7,9	/	3,3	0,6
Ukupno pojedinačne	57,5	39,6	37,4	27,2	60,7	46,8
Dvostruke infekcije						
CMV+PVY	17,2	10,8	5,8	/	/	12,7
CMV+TSWV	6,3	/	/	/	13,1	2,7
CMV+AMV	1,5	0,5	/	/	/	0,9
CMV+TMV	0,7	/	/	/	/	0,3
CMV+ToMV	/	/	1,4	/	/	0,1
PVY+AMV	8	1,6	1,4	1,5	/	4,1
PVY+ToMV	/	0,7	11,5	/	/	0,8
PVY+TMV	/	/	1,4	/	4,9	0,1
PVY+TSWV	/	/	0,7	1,5	3,3	0,1
AMV+TSWV	/	0,5	/	/	/	0,3
TMV+ToMV	/	/	3,6	/	3,3	0,2
TSWV+TMV	/	/	0,7	/	/	0,03
TSWV+ToMV	/	/	0,7	/	/	0,03
Ukupno dvostruke	33,7	14,2	27,2	3,0	24,6	22,3
Trostruke infekcije						
CMV+PVY+AMV	4,9	0,6	/	/	/	2,2
CMV+PVY+TSWV	1,2	/	/	/	/	0,5
CMV+PVY+TMV	/	/	/	/	1,6	0,03
CMV+PVY+ToMV	/	1,6	2,9	/	1,6	1,0
CMV+TMV+ToMV	/	/	0,7	/	/	0,03
PVY+TMV+ToMV	/	/	5,8	/	1,6	0,3
Ukupno trostruke	6,1	2,2	9,4	0	4,8	4,0
Četvorostruke infekcije						
CMV+PVY+AMV+ToMV	/	0,6	/	/	/	0,3
CMV+PVY+TMV+ToMV	/	/	3,6	/	/	0,1
Ukupno četvorostruke	/	0,6	3,6	/	/	0,5
Ukupno mešanih	39,8	17,0	40,2	3,0	29,4	26,8
Ukupno	97,3	56,6	77,6	30,2	90,1	73,6

5.3. Serološka detekcija TMV, ToMV, AMV i PepMV u semenu paradajza

Ispitivanjem zaraženosti semena paradajza 10 komercijalno dostupnih sorti i hibrida paradajza na tržištu u Srbiji tokom 2012. godine nije utvrđeno prisustvo četiri

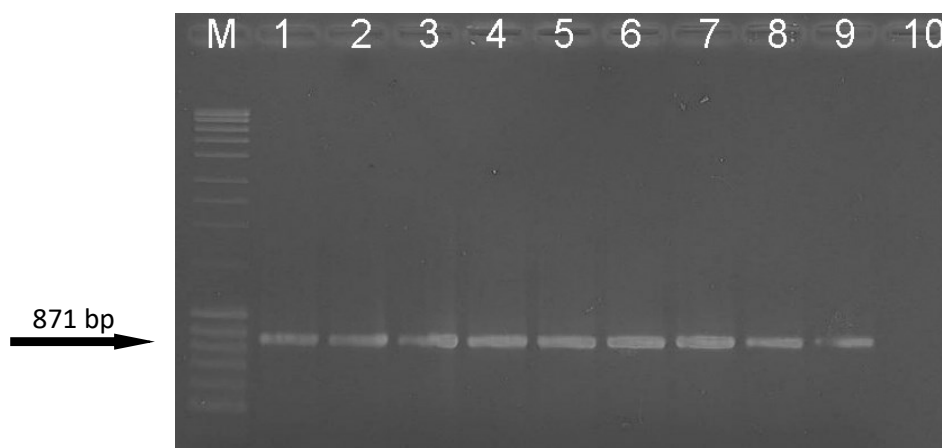
virusa koji se prenose semenom: AMV, ToMV, TMV i PepMV. Ispitivanja prenošenja virusa semenom obuhvatila su testiranje sledećih sorti i hibrida paradajza: Saint Pierre, Novosadski jabučar, Lova VF, Volovsko srce, Marglobe, Marmande, Heinz 1370, Narvik, Marko F1 i Sef F1.

5.4. Detekcija virusa paradajza primenom RT-PCR metode

Primenom RT-PCR metode obavljena je molekularna detekcija svih šest virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV i ToMV čije je prisustvo u usevu paradajza u Srbiji dokazano primenom seroloških metoda, kao i provera prisustva satRNA u uzorcima pozitivnim na CMV.

5.4.1. Detekcija CMV primenom RT-PCR metode

Prisustvo CMV u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera CMVCPfwd i CMVCPrev koji omogućavaju umnožavanje celog CP gena, kao i delova 5' i 3' UTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 871 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije, kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli. Deo amplifikovanih fragmenata prikazan je na slici 21.

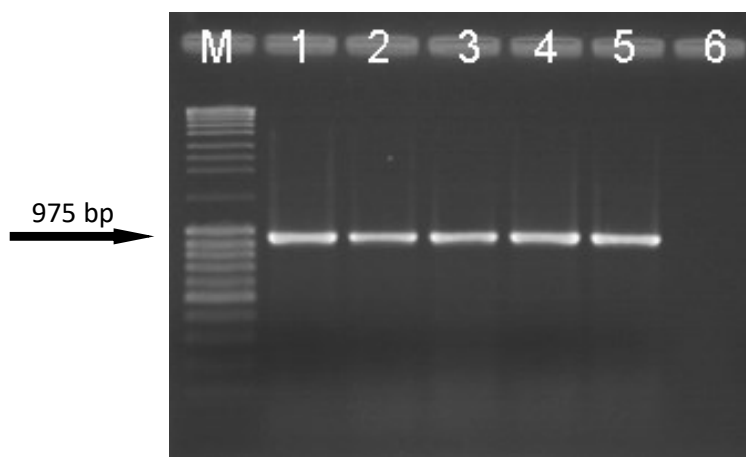


Slika 21. Detekcija odabranih izolata CMV iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem CMVCPfwd/CMVCPrev prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder,

Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 533-1-11 iz paradajza, 2-izolat AR2-12 iz paradajza, 3-izolat 137-13 iz paradajza, 4-izolat 367-14 iz paradajza, 5-izolat 169-2p-15 iz paradajza, 6-izolat 170-2p-15 iz paradajza, 7-izolat 174p-15 iz paradajza, 8-izolat 177p-15 iz paradajza, 9-pozitivna kontrola (izolat 115-08 iz tikve), 10-negativna kontrola.

5.4.2. Detekcija PVY primenom RT-PCR metode

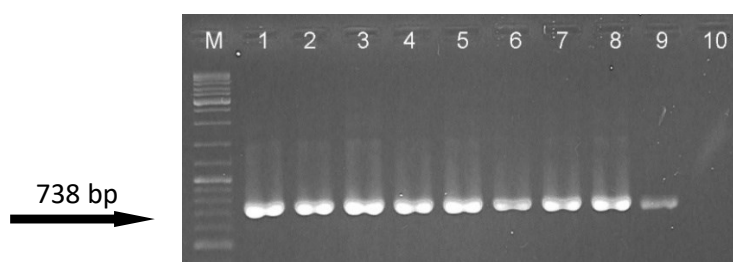
Prisustvo PVY u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera PVYc i PVYd koji omogućavaju umnožavanje dela P1 gena i 5'UTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 975 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije, kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli. Deo amplifikovanih fragmenata prikazan je na slici 22.



Slika 22. Detekcija odabranih izolata PVY iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem PVYc/PVYd prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 258-11 iz paradajza, 2-izolat 573-11 iz paradajza, 3-izolat 598-11 iz paradajza, 4-izolat 95-12 iz paradajza, 5-pozitivna kontrola (izolat D7-06 iz duvana), 6-negativna kontrola.

5.4.3. Detekcija TSWV primenom RT-PCR metode

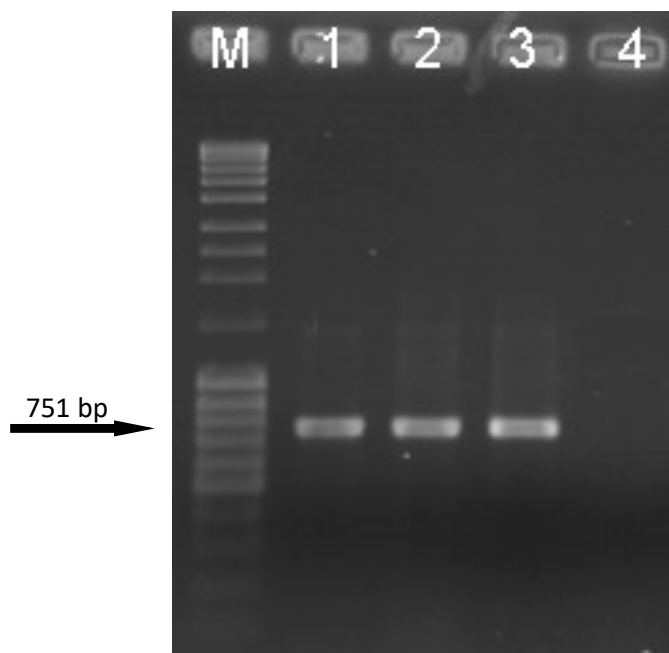
Prisustvo TSWV u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera TSWVCP-f i TSWVCP-r koji omogućavaju umnožavanje fragmenata RNA S koji obuhvata deo N gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 738 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije (Slika 23), kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli.



Slika 23. Detekcija odabranih izolata TSWV iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem TSWVCP-f/TSWVCP-r prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 533-2-11 iz paradajza, 2-izolat 646-11 iz paradajza, 3-izolat 792-11 iz paradajza, 4-izolat 45-12 iz paradajza, 5-izolat 552-12 iz paradajza, 6-izolat 555-12 iz paradajza, 7-izolat 174p-15 iz paradajza, 8-izolat 180p-15 iz paradajza, 9-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz duvana), 10-negativna kontrola.

5.4.4. Detekcija AMV primenom RT-PCR metode

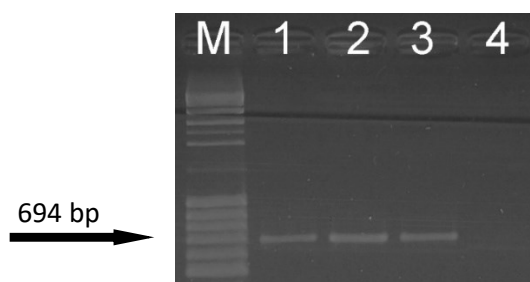
Prisustvo AMV u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera CP AMV1 i CP AMV2 koji omogućavaju umnožavanje dela CP gena i 3' UTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 751 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije (Slika 24), kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli.



Slika 24. Detekcija odabranih izolata AMV iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem CP AMV1/CP AMV2 prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 258-11 iz paradajza, 2-izolat 219-14 iz paradajza, 3-pozitivna kontrola (izolat 196-08 iz duvana), 4-negativna kontrola.

5.4.5. Detekcija TMV primenom RT-PCR metode

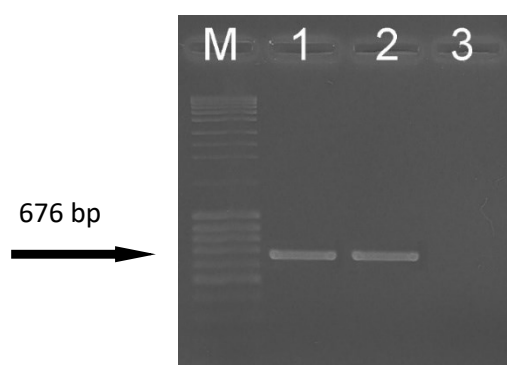
Prisustvo TMV u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera TobUni1 i TMVspec koji omogućavaju umnožavanje kompletnog CP gena, kao i dela 5' i 3' UTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 694 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije (Slika 25), kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli.



Slika 25. Detekcija odabranih izolata TMV iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem TobUni1/TMVspec prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 40-11 iz paradajza, 2-izolat 268-13 iz paradajza, 3-pozitivna kontrola (izolat 699-07 iz duvana), 4-negativna kontrola.

5.4.6. Detekcija ToMV primenom RT-PCR metode

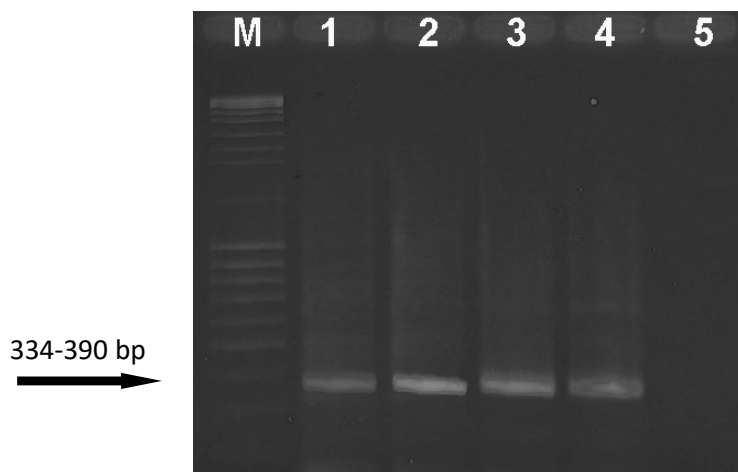
Prisustvo ToMV u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera TobUni1 i ToMVspec koji omogućavaju umnožavanje kompletnog CP gena, kao i dela 5' i 3' UTR. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine 676 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije (Slika 26). Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli.



Slika 26. Detekcija odabranih izolata ToMV iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem TobUni1/ToMVspec prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat 105-12 iz paradajza, 2-izolat 283-13 iz paradajza, 3- negativna kontrola.

5.4.7. Detekcija CMV satRNA primenom RT-PCR metode

Prisustvo CMV satRNA u usevu paradajza potvrđeno je RT-PCR metodom uz korišćenje para prajmera CMVsat-fwd i CMVsat-rev koji omogućavaju umnožavanje kompletne sekvence satRNA CMV. Poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine od 334 do 390 bp utvrđeno je kod svih ispitivanih uzorka poreklom iz paradajza iz Srbije (Slika 27), kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća paradajza, odnosno negativnoj kontroli.



Slika 27. Detekcija odabranih izolata CMV satRNA iz paradajza primenom „One-step“ RT-PCR korišćenjem CMVsat-fwd/CMVsat-rev prajmera. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1-izolat AR2-12-satRNA iz paradajza, 2-izolat 367-14 -satRNA iz paradajza, 3-izolat 253-15-satRNA iz paradajza, 4-izolat 169-2p-15-satRNA iz paradajza, 5-negativna kontrola.

5.5. Molekularna identifikacija izolata virusa paradajza prisutnih u Srbiji

Nakon sekvenciranja i obrade sekvenci dobijene su konsenzus sekvence izolata svih šest virusa prisutnih u usevu paradajza u našoj zemlji: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV i ToMV, kao i izolata CMV satRNA čije je prisustvo dokazano primenom seroloških i/ili molekularnih metoda. Dobijene sekvence su najpre identifikovane primenom BLAST analize, a kasnije i okarakterisane višestrukim uparivanjem sa sekvencama koje su pokazivale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi i proračunom genetičke sličnosti korišćenjem MEGA5 softvera. Sve sekvence dobijene tokom ovih istraživanja prijavljene su u GenBank bazu podataka gde im je dodeljen pristupni broj (Tabela 20).

Tabela 20. Pregled izolata najznačajnijih virusa paradajza u Srbiji sekvenciranih tokom ovih istraživanja

Virus	Izolat	Godina izolacije	Lokalitet	GenBank Acc. No.
CMV	533-1-11	2011	Kupusina	KF147806
CMV	AR2-12	2012	Aradac	MH032569
CMV	137-13	2013	Ub	MH032570
CMV	367-14	2014	Porodin	MH032571
CMV	169-2p-15	2015	Veliko Vojlovce	MH032572
CMV	170-2p-15	2015	Veliko Vojlovce	MH032573
CMV	174p-15	2015	Cekavica	MH032574
CMV	177p-15	2015	Veliko Vojlovce	MH032575

CMV	180p-15	2015	Veliko Vojlovce	MH032576
CMV	190-15	2015	Togočevce	MH032577
PVY	258-11	2011	Mačkovac	MG922832
PVY	573-11	2011	Ratari	MG922831
PVY	598-11	2011	Togočevce	KF184653
PVY	95-12	2012	Trbušani	MG922830
PVY	102-12	2012	Carevac	MG922834
PVY	179-12	2012	Nozrina	MG922833
PVY	237-13	2013	Kupusina	MG922829
PVY	197-14	2014	Brestovac	MG922827
PVY	219-14	2014	Togočevce	MG922828
TSWV	533-2-11	2011	Kupusina	MG922820
TSWV	646-11	2011	Navalin	KF184652
TSWV	792-11	2011	Smederevska Palanka	MG922826
TSWV	45-12	2012	Novi Kneževac	MG922823
TSWV	552-12	2012	Ljutovo	MG922825
TSWV	555-12	2012	Subotica	MG922824
TSWV	174p-15	2015	Cekavica	MG922821
TSWV	180p-15	2015	Veliko Vojlovce	MG922822
AMV	258-11	2011	Mačkovac	KF147805
AMV	219-14	2014	Togočevce	MG922819
TMV	40-11	2011	Irmovo	KF184654
TMV	268-13	2013	Vladičin Han	MG922818
ToMV	105-12	2012	Carevac	MG018614
ToMV	283-13	2013	Kamenica	MG922817
satCMV	AR2-12-satRNA	2012	Aradac	KM358139
satCMV	367-14 -satRNA	2014	Porodin	KP719209
satCMV	253-15-satRNA	2015	Togočevce	MF964233
satCMV	169-2p-15-satRNA	2015	Veliko Vojlovce	MH032565
satCMV	170-2p-15-satRNA	2015	Veliko Vojlovce	MH032566
satCMV	174p-15-satRNA	2015	Cekavica	MH032567
satCMV	180p-15-satRNA	2015	Veliko Vojlovce	MH032568

5.5.1. Molekularna identifikacija izolata CMV

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem CMVCPfwd i CMVCPrev prajmera, dobijene su konsenzus sekvence CP gena i delova 5' i 3' UTR deset odabranih izolata CMV poreklom iz paradajza iz Srbije. Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci CP gena dužine 657 bp, pokazalo je da odabrani izolati dele 76,3-100% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 0-128 nukleotida. Aminokiselinska sličnost odabranih izolata kretala se od 81,3% do 100%, odnosno odabrani izolati se nisu razlikovali ili su se razlikovali u maksimalno 34 aminokiseline.

BLAST analiza je pokazala 96-100% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama CMV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 669 bp. Izolat 533-1-11 najveću nt sličnost 98,4% (98,4% aa sličnosti) deli sa izolatom poreklom iz Nemačke (KP165582), dok izolat AR2-12 najveću nt sličnost 99,4% (99,5% aa sličnosti) deli sa izolatom poreklom iz paradajza iz Srbije (KC847077). Izolati 137-13 i 367-14 najveću nt sličnost 99,6% i 99,3% (100% i 100% aa sličnosti) dele sa izolatom poreklom iz nevena iz Srbije (KP034963). Izolati 169-2p-15, 174p-15 i 177p-15 najviši stepen nt sličnosti 99,2%, 99% i 99% (99,5%, 100% i 100% aa sličnosti) dele sa izolatom poreklom iz tikve iz Srbije (JX262140). Izolat 170-2p-15 najveću nt sličnost 99% (100% aa sličnosti) deli sa izolatom poreklom iz paprike iz Srbije (KC847074). Najviši stepen nukleotidne sličnosti 98,5% (98,9% aa sličnosti) izolat 180p-15 deli sa izolatom poreklom iz paprike iz Srbije (KT270570). Izolat 190-15 najviši stepen nt sličnosti 97,9% (96,7% aa sličnosti) pokazao je sa dva izolata iz paprike poreklom iz Srbije (KC847074 i KT270565) i jednim izolatom, poreklom iz tikve iz Srbije (JX262140).

5.5.2. Molekularna identifikacija izolata PVY

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem PVYc i PVYd prajmera dobijene su konsenzus sekvence dela P1 gena i 5' UTR devet odabranih izolata PVY poreklom iz Srbije iz paradajza. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dela P1 gena dužine 669 bp pokazalo je da odabrani izolati dele 99,0-99,9% nt sličnosti, odnosno da se razlikuju u 1-7 nukleotida. Aminokiselinska sličnost odabranih izolata kretala se od 99,1% do 100%, odnosno odabrani izolati se nisu razlikovali ili su se razlikovali u maksimalno dve aminokiseline.

BLAST analiza je pokazala 98-100% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama PVY iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 669 bp. Najveću nt sličnost 100%

(100% aa sličnosti) izolat 95-12 pokazao je sa četiri izolata iz krompira poreklom iz SAD (KY847964), Izraela (KX184817), Kolumbije (KR149260) i Slovenije (AF401604), dva izolata iz duvana poreklom iz Hrvatske (JF927749) i Nemačke (JF927756), kao i sa jednim izolatom iz paprike poreklom iz Srbije (KC288143). Izolat 197-14 najveću nt sličnost 99,4% (99,6% aa sličnosti) deli sa dva izolata iz krompira poreklom iz Slovenije (KM396648) i Kolumbije (HQ335258) i dva izolata iz Srbije poreklom iz paprike (KC288145) i duvana (GQ290475), dok izolat 179-12 najveću nt sličnost 99,6% (100% aa sličnosti) deli sa izolatom poreklom iz krompira iz Kolumbije (KX756672). Najviši stepen nt sličnosti 99,7% (99,6% aa sličnosti) sekvence izolata 237-13 i 219-14, odnosno 99,9% (100% aa sličnosti) sekvenca izolata 573-11 i 99,7% (100% aa sličnosti) sekvenca izolata 102-12 pokazale su sa dva izolata iz duvana poreklom iz Hrvatske (JF927749) i Nemačke (JF927756), kao i dva izolata iz krompira poreklom iz Kolumbije (KR149260) i Izraela (KX184817). Izolat 258-11 najviši stepen nt sličnosti 99,9% (100% aa sličnosti) pokazao je sa dva izolata iz krompira poreklom iz Slovenije (KM396648 i KX856986), dok je izolat 598-11 najveću nt sličnost 99,4% (100% aa sličnosti) pokazao sa 10 izolata iz krompira (KY847946, 64, 69 i 71, KX856986, KX184817, KR149260, KJ946936, KM396648 i AF401604) poreklom iz različitih zemalja, kao i sa jednim izolatom iz duvana poreklom iz Hrvatske (JF927749).

5.5.3. Molekularna identifikacija izolata TSWV

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem TSWVCP-f i TSWVCP-r prajmera dobijene su konsenzus sekvence dela N gena osam odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije iz paradajza. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dela N gena dužine 652 bp pokazalo je da odabrani izolati dele 98,8-100% nt sličnosti, odnosno da se ne razlikuju ili se razlikuju u maksimalno 8 nukleotida. Aminokiselinska sličnost odabranih izolata kretala se od 98,2% do 100%, odnosno odabrani izolati razlikovali su se u maksimalno četiri aminokiseline.

BLAST analiza pokazala je 97-100% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama TSWV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 652 bp. Sekvence izolata 174p-15 i 180p-15 pokazale su najviši stepen nt sličnosti 99,5% (99,5% aa sličnosti) sa izolatom Sr603 (GU369723) poreklom iz paradajza iz Srbije, a sekvenca izolata 45-12 je sa pokazala najviši stepen sličnosti od 99,7% (100% aa) sa istim izolatom. Izolati 533-2-11, 646-11, 792-11, 552-12 i 555-12 najveću nt i aa sličnost dele sa pet izolata iz Italije poreklom iz paprike (HQ830186-87, DQ431237-38, DQ398945), dva izolata iz Crne Gore (GU355939 i GU339506) poreklom iz duvana, odnosno *Calceolaria* sp., kao i sa po jednim izolatom iz Francuske (FR693055) i Holandije (AF020660) poreklom iz *Lactuca* sp., odnosno *Dahlia x hybrid* i to: izolat 646-11 100% nt (100% aa), izolat 533-2-11 99,8% nt (99,5% aa), izolat 792-11 99,7% nt (99,5% aa), izolat 555-12 99,5% nt (100% aa) i izolat 552-12 99,5% nt (98,6% aa).

5.5.4. Molekularna identifikacija izolata AMV

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem CP AMV1 i CP AMV2 prajmera dobijene su konsenzus sekvence dela CP gena i 3' UTR dva odabrana izolata AMV poreklom iz Srbije iz paradajza. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dela CP gena dužine 639 bp pokazalo je da odabrani izolati dele 98,4% nt sličnosti. Razlika od 10 nukleotida između ove dve sekvence nije izazvala promenu ni jedne aminokiseline, tako da je njihova aa sličnost iznosila 100%.

BLAST analiza pokazala je 94-99% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama AMV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 639 bp. Najviši stepen nt sličnosti 99,5% (100% aa) sekvenca dela izolata 258-11 pokazala je sa izolatom TBN (KM655878) poreklom iz *Vigna unguiculata* iz Irana, dok je sekvenca izolata 219-14 najviši stepen nt sličnosti 99,5% (100% aa) sličnosti pokazala sa izolatom Joe Davis (HQ185569) iz soje iz SAD.

5.5.5. Molekularna identifikacija izolata TMV

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem TobUni1 i TMVspec prajmera dobijene su konsenzus sekvence kompletnog CP gena, kao i dela 5' i 3' UTR kod izolata 40-11, odnosno dela 5' UTR i CP gena za izolat 268-13. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dela CP gena dužine 442 bp pokazalo je da odabrani izolati dele 98,6% nt sličnosti. Razlika od 6 nukleotida između ove dve sekvence izazvala je promenu četiri aminokiseline tako da je njihova aa sličnost iznosila 97,3%.

BLAST analiza pokazala je 94-99% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama TMV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 442 bp. Najviši stepen sličnosti odabrane sekvence pokazale su sa tri izolata TMV poreklom iz Kine (AF395127-29) i to: 99,5% nt sličnosti (100% aa sličnosti) izolat 268-13, a 99,2% nt sličnosti (100% aa sličnosti) izolat 40-11.

5.5.6. Molekularna identifikacija izolata ToMV

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenta umnoženog korišćenjem TobUni1 i ToMVspec prajmera dobijene su konsenzus sekvence kompletnog CP gena, kao i dela 5' i 3' UTR dva odabrana izolata ToMV poreklom iz Srbije iz paradajza. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci kompletnog CP gena dužine 480 bp pokazalo je da odabrani izolati dele 100% nt i aa sličnosti.

BLAST analiza pokazala je 95-99% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama ToMV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 480 bp. Najviši stepen nt sličnosti 99,8% (99,4% aa) sekvence iz Srbije pokazale su sa izolatom ToMV poreklom iz krompira (AF260730) iz Koreje.

5.5.7. Molekularna identifikacija izolata CMV satRNA

Obradom sekvenci dobijenih sekvenciranjem satelitne RNA korišćenjem CMVsat-fwd i CMVsat-rev prajmera dobijene su konsenzus sekvence sedam odabranih izolata CMV satRNA poreklom iz Srbije iz paradajza. Međusobno poređenje dobijenih sekvenci dužine 317 bp pokazalo je da odabrani izolati dele od 84,7 do 99,7% nt, odnosno da se razlikuju u 1 do 47 nukleotida.

BLAST analiza pokazala je 86-99% nt sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama CMV satRNA iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske 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 317 bp. Najviši stepen nt sličnosti izolati 253-15-satRNA, 169-2p-15-satRNA, 170-2p-15-satRNA, 174p-15-satRNA i 180-p-15-satRNA od 99,6%, 93,9%, 93,6%, 94,4% i 95,4% dele sa izolatom poreklom iz duvana iz Italije (X86424). Izolat AR2-12-satRNA najveću nukleotidnu sličnost od 99.2% imao je sa dva kineska CMV satRNA izolata (HQ283395, DQ070747). Sekvenca izolata 367-14-satRNA pokazala je 100% nukleotidne sličnosti sa italijanskim (X86420) i kineskim (D89673) CMV satRNA izolatima.

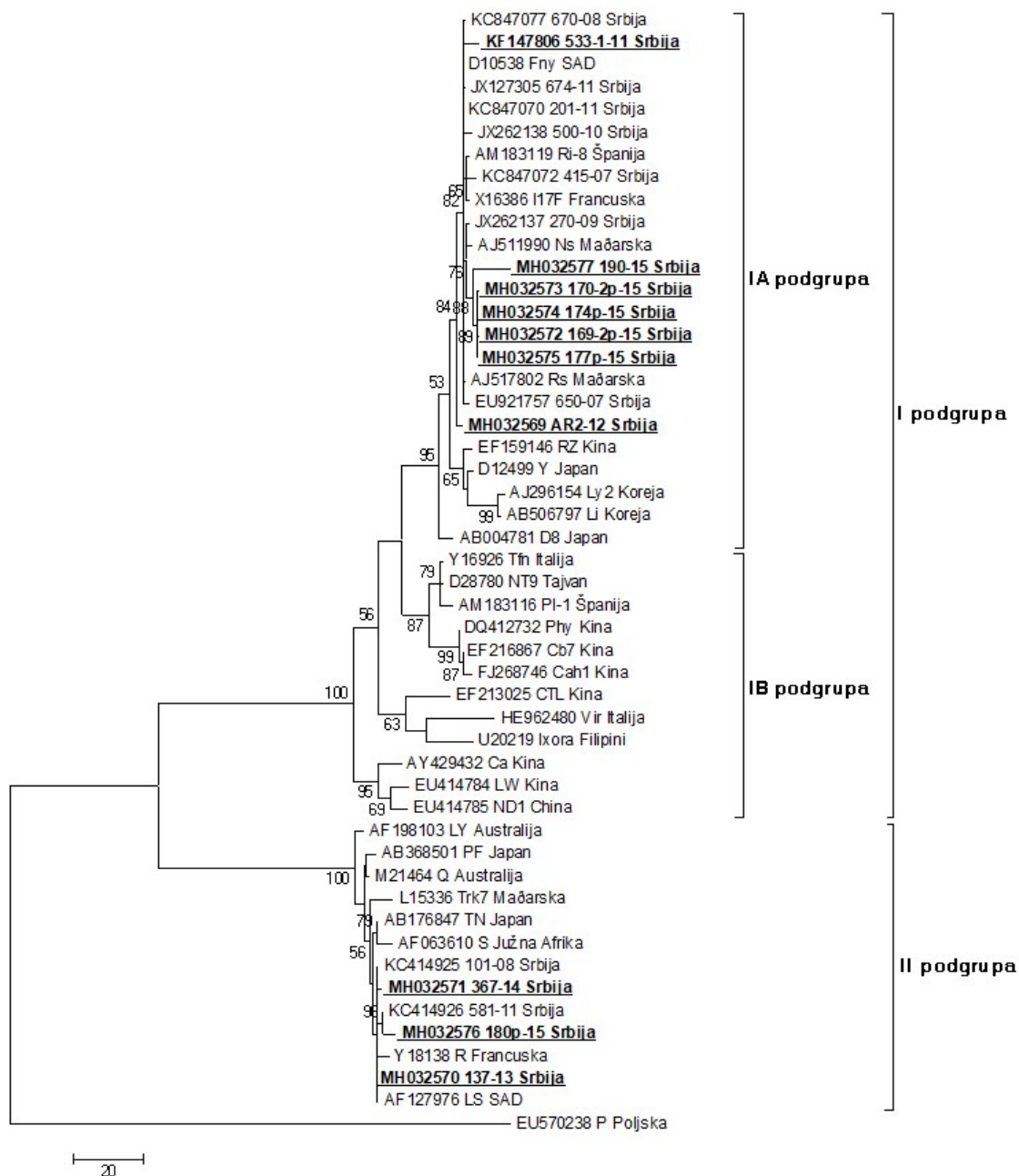
5.6. Filogenetske analize

Molekularna karakterizacija dva najrasprostranjenija virusa paradajza CMV i PVY, kao i TSWV i CMV satRNA obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala i proučavanjem evolutivne povezanosti sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja sa sekvencama odgovarajućeg virusa preuzetih iz GenBank baze podataka.

5.6.1. Filogenetske analize CMV

Sekvence dela CP gena dužine 558 bp deset izolata CMV poreklom iz paradajza iz Srbije i 39 CMV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano filogenetsko stablo korišćenjem maximum-parsimony metode integrisane unutar MEGA5 softvera. Filogenetsko stablo

prikazano na slici 28, ukazalo je na grupisanje izolata u dve glavne podgrupe I (unutargrupna sličnost $0,041\pm 0,004$) i II (unutargrupna sličnost $0,013\pm 0,002$), dok je međugrupna varijabilnost bila $0,218\pm 0,015$. Podgrupa I se dalje deli na dve podgrupe IA (unutargrupna sličnost $0,017\pm 0,002$) i IB (unutargrupna sličnost $0,054\pm 0,006$) sa međugrupnom varijabilnošću $0,063\pm 0,015$. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,109\pm 0,007$. Izolati iz CMV poreklom iz paradajza iz Srbije svrstali su se u okviru dve podgrupe IA, gde se svrstalo sedam ispitivanih izolata iz Srbije, zajedno sa nekim drugim izolatima poreklom iz Srbije, Mađarske, SAD, Španije, Francuske, Kine, Japana i Koreje, dok su se preostala tri ispitivana izolata svrstala u II podgrupu, sa nekim drugim izolatima poreklom iz Srbije, SAD, Australije, Japana, Južne Afrike, Francuske i Mađarske.

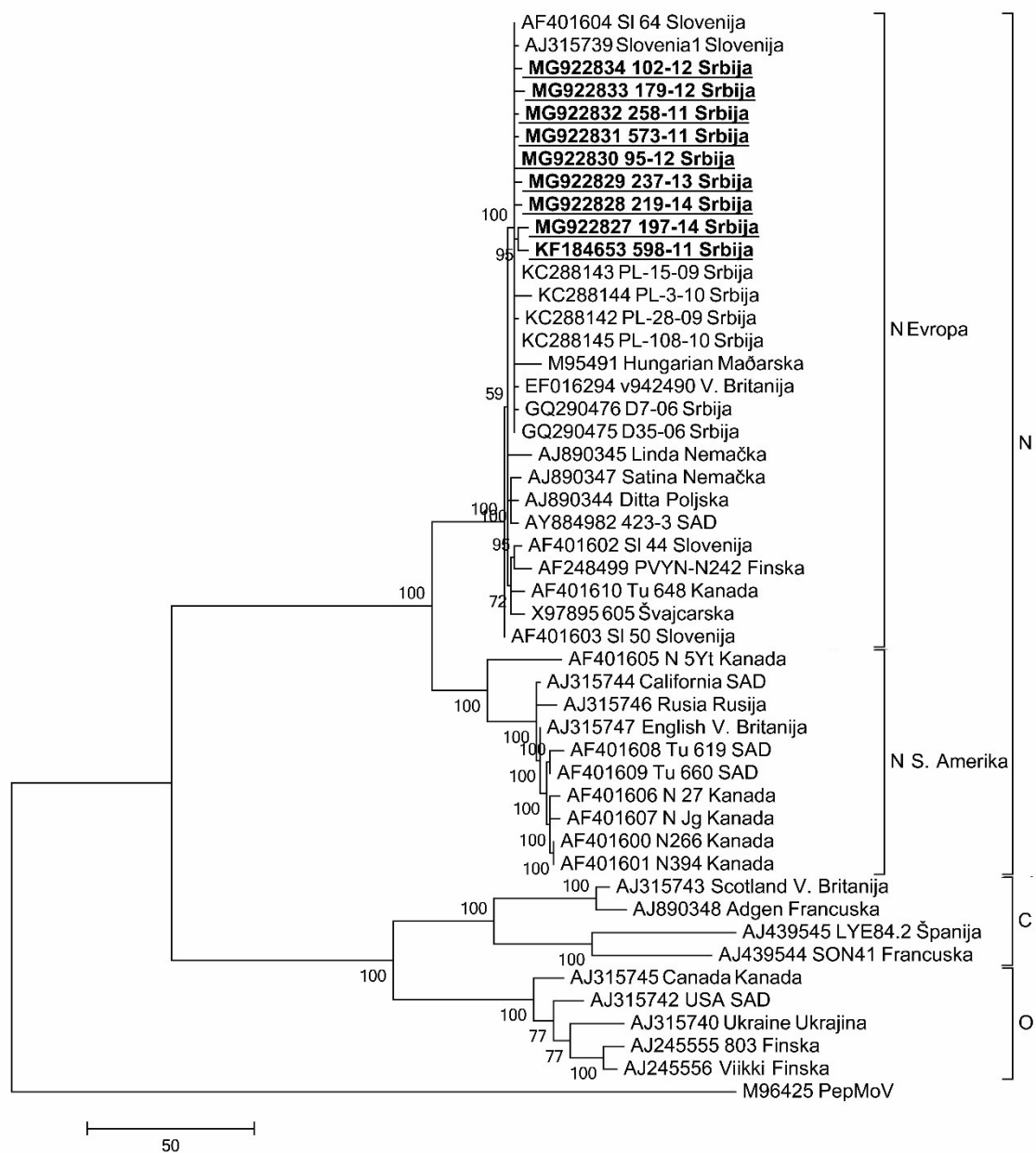


Slika 28. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci CP gena 49 izolata *Cucurbit Mosaic Virus* korišćenjem neighbor-joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije iz paradajza su naglašeni i podvučeni.

5.6.2. Filogenetske analize PVY

Sekvence dela P1 gena dužine 696 bp devet izolata PVY poreklom iz paradajza iz Srbije i 38 PVY izolata dostupnih u GenBank bazi podataka međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano filogenetsko stablo korišćenjem

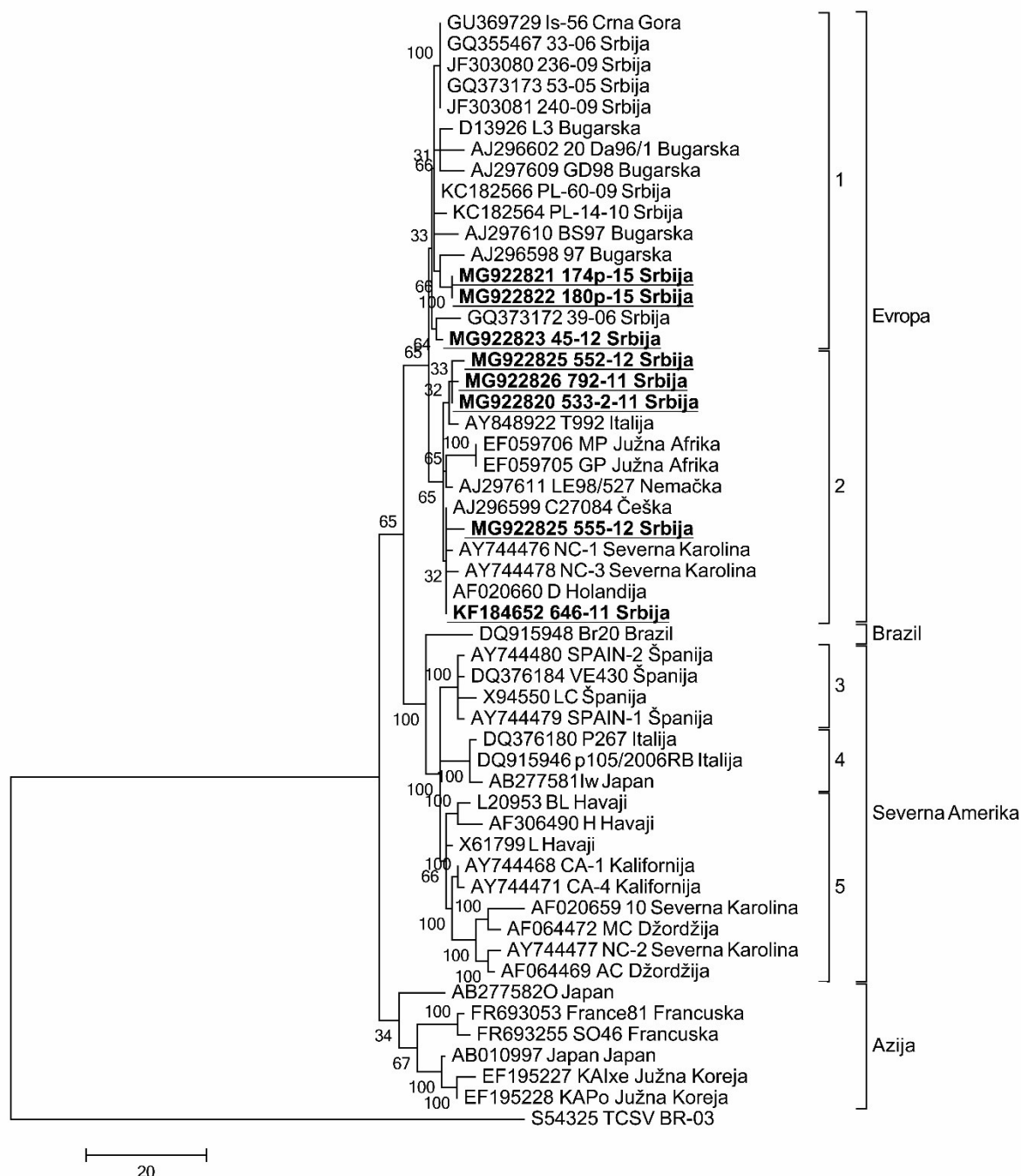
neighbour-joining metode integrisane unutar MEGA5 softvera. Filogenetsko stablo prikazano na slici 29, ukazalo je na grupisanje izolata u tri glavna klastera na osnovu njihove pripadnosti odgovarajućem soju: N-nekrotični sojevi (unutargrupna sličnost $0,047 \pm 0,006$), C-crtičasti soj (unutargrupna sličnost $0,154 \pm 0,015$) i O-obični soj (unutargrupna sličnost $0,047 \pm 0,006$) sa međugrupnom varijabilnošću koja se kretala od $0,238 \pm 0,023$ do $0,508 \pm 0,049$. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,257 \pm 0,020$. Klaster nekrotičnih sojeva se dalje može podeliti na dva subklastera na osnovu geografskog porekla izolata: prvi subklaster (N Evropa) čine izolati nekrotičnih sojeva poreklom iz Evrope sa unutargrupnom sličnošću $0,009 \pm 0,001$, a drugi subklaster (N S. Amerika) izolati nekrotičnih sojeva poreklom iz Severne Amerike sa unutargrupnom sličnošću $0,021 \pm 0,003$. Genetički diverzitet između ove dve podgrupe iznosio je $0,103 \pm 0,014$. U klaster nekrotičnih sojeva poreklom iz Evrope svrstali su se i ispitivani izolati PVY poreklom iz paradajza zajedno sa prethodno okarakterisanim izolatima PVY iz duvana i paprike poreklom iz Srbije. Ovaj klaster čine izolati uglavnom poreklom iz Evrope (Slovenija, Mađarska, Velika Britanija, Nemačka, Poljska, Finska, Švajcarska i Srbija), ali i po jedan izolat poreklom iz SAD i Kanade. Takođe, i u klasteru nekrotičnih sojeva poreklom iz Severne Amerike osim izolata poreklom iz SAD i Kanade, grupiše se i po jedan izolat iz Velike Britanije i Rusije.



Slika 29. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci P1 gena 47 izolata *Potato virus Y* korišćenjem neighbor-joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PepMoV je korišćena kao „outgroup“. Izolati PVY iz Srbije iz paradajza su naglašeni i podvučeni.

5.6.3. Filogenetske analize TSWV

Sekvence dela N gena dužine 652 bp osam izolata TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije i 44 TSWV izolata dostupnih u GenBank bazi podataka međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano filogenetsko stablo korišćenjem maximum parsimony metode integrisane unutar MEGA5 softvera. Konsenzus stablo prikazano na slici 30, ukazalo je na grupisanje izolata na osnovu geografskog porekla i jasno izdvajanje četiri glavna klastera: Evropski (unutargrupna sličnost $0,009\pm 0,002$), Brazilski, Severno Američki (unutargrupna sličnost $0,017\pm 0,003$) i Azijski (unutargrupna sličnost $0,025\pm 0,004$) sa međugrupnom varijabilnošću koja se kretala od $0,028\pm 0,005$ do $0,033\pm 0,005$. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,036\pm 0,003$. Evropski klaster se dalje može podeliti na dve geografske subpopulacije: podgrupu 1 čine izolati iz Bugarske i Crne Gore, kao i sedam prethodno okarakterisanih izolata iz Srbije poreklom iz duvana, paprike i tikava sa unutargrupnom sličnošću $0,008\pm 0,002$, a podgrupu 2 izolati iz Italije, Češke, Nemačke i Holandije, kao i po dva izolata iz Severne Karoline i Južne Afrike sa unutargrupnom sličnošću $0,006\pm 0,002$. Genetički diverzitet između ove dve podgrupe iznosio je $0,011\pm 0,003$. U klaster sa izolatima poreklom iz Evrope svrstali su se i ispitivani izolati TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije, ali u dve odvojene subpopulacije unutar ovog klastera. U okviru podgrupe 1 grupisala su se tri izolata (45-12, 174p-15 i 180p-15), a u okviru podgrupe 2 preostalih pet izolata (533-2-11, 646-11, 792-11, 552-12 i 555-12). Američki klaster se može dalje podeliti na tri geografske subpopulacije: podgrupu 3 čine izolati iz Španije (unutargrupna sličnost $0,005\pm 0,002$), podgrupu 4 izolati iz Italije i Japana (unutargrupna sličnost $0,003\pm 0,002$), a podgrupu 5 izolati iz Kalifornije, Severne Karoline, Džordžije i sa Havaja (unutargrupna sličnost $0,015\pm 0,003$). Intergrupni diverzitet između ovih podgrupa bio je od $0,016\pm 0,005$ do $0,031\pm 0,007$. Brazilski klaster čini samo jedan izolat, a u azijski klaster grupisali su se izolati iz Japana i Južne Koreje, sa izuzetkom dva izolata iz Francuske (unutargrupna sličnost $0,025\pm 0,004$).

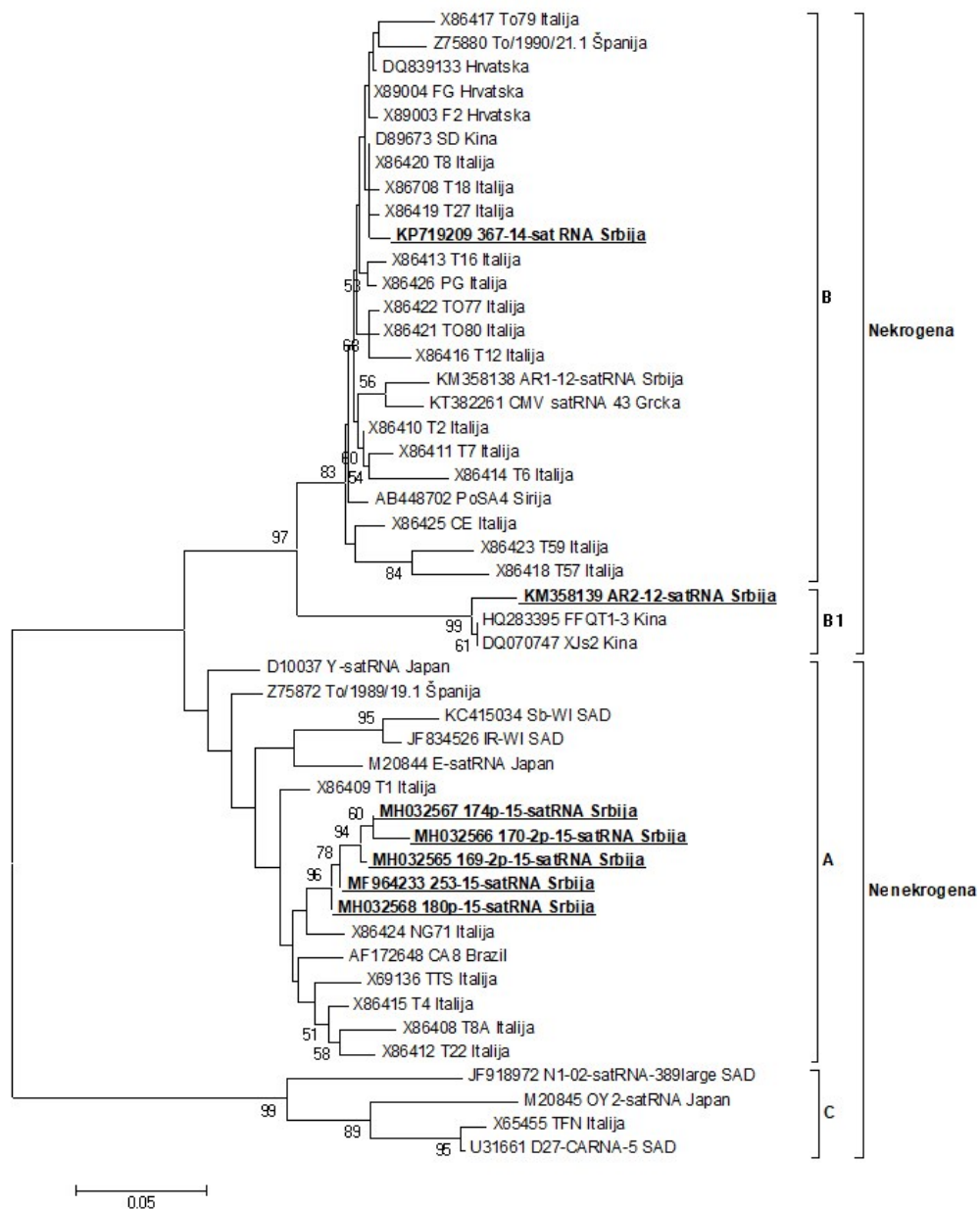


Slika 30. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci N gena 52 izolata *Tomato spotted wilt orthotospovirus* korišćenjem maximum parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca TCSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati TSWV iz Srbije iz paradajza su naglašeni i podvučeni.

5.6.4. Filogenetske analize CMV satRNA

Sekvence sedam izolata CMV satRNA, dužine 258 bp, poreklom iz paradajza iz Srbije i 41 CMV satRNA izolata dostupnih u GenBank bazi podataka međusobno su

uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano filogenetsko stablo korišćenjem neighbour-joining metode integrisane unutar MEGA5 softvera, na osnovu Kimura-2 parametar modela s agama distribucijom. Konsenzus stablo prikazano na slici 31, ukazalo je na podelu satRNA izolata u dve glavne grupe nekrogene i nenekrogene. Diverzitet između ove dve grupe iznosio je $0,188 \pm 0,026$. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,136 \pm 0,016$. Grupa nekrogenih izolata, dalje se deli na grupe B i B1 ($0,117 \pm 0,022$), a nenekrogenih na grupe A i C ($0,304 \pm 0,046$). Genetički diverzitet između četiri grupe satRNA kretao se od $0,117 \pm 0,022$ do $0,334 \pm 0,051$, dok je unutar grupa bio: $0,036 \pm 0,005$ (B), $0,013 \pm 0,006$ (B1), $0,059 \pm 0,009$ (A) i $0,105 \pm 0,017$ (C). Grupisanje 48 izolata satRNA u četiri grupe podržano je i visokim bootstrap vrednostima, kao i visokom nukleotidnom sličnošću između sekvenci izolata koji pripadaju istoj grupi. Dva srpska izolata svrstala su se u nekrogene izolate, ali u različite grupe. Izolat 367-14-satRNA svrstao se u grupu B, dok se izolat AR2-12-satRNA grupisao u okviru grupe B1. Ostali izolati satRNA poreklom iz Srbije, 253-15-satRNA, 169-2p-15-satRNA, 170p-15-satRNA, 174p-15-satRNA i 180p-15-satRNA grupisali su se u okviru nenekrogene A grupe.



Slika 31. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci CMV satRNA 48 izolata korišćenjem Kimura-2 parametar modela sa Gama distribucijom sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati CMV satRNA iz Srbije iz paradajza su naglašeni i podvučeni.

Dodatne analize sekvenci satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije pokazale su da pojava satelitnih RNA nije bila zabeležena samo kod izolata koji su izazivali sistemsku nekrozu, već i kod izolata sa hlorozom i deformacijama lišća. Sekvence izolata AR2-12-satRNA i 367-14-satRNA imale su karakterističnu “nekrogenu konsenzus” sekvencu GA-GCUAAGGCUUA...UGCUAUGCUGAU (Devic et al., 1990; Fisher, 2013). Sekvenca izolata 367-14-satRNA bila je identična “nekrogenoj konsenzus” sekvenci, dok se sekvenca izolata AR2-12-satRNA razlikovala na pozicijama 309 (promena G u A) i 319

(C u G) (Slika 32). Ova „nekrogena konsenzus” sekvenca nije nađena kod pet izolata satRNA svrstanih u nenekrogenu grupu, kao ni osnovni, a ni produženi domen odgovoran za izazivanje hloroze na paradajzu, koji se nalazi na 3’ kraju satRNA (Zhang et al., 1994; Fisher, 2013).

Izolat/Pristupni broj	309	319	323	328	334
XJs2/DQ070747	G a g g c u a a	G g C u u A . . .	u g c u a u g c u g a u		
PoSA4/AB448702	G a g g c u a a	A g C u u U . . .	u g c u a u g c u g a u		
T27/X86419	G a g g c u a a	G g C u u A . . .	u g c u a u g c u g a u		
F2/X89003	G a g g c u a a	G g C u u A . . .	u g c u a u g c u g a u		
AR2-12-satRNA/KM358139	A a g g c u a a	G g G u u A . . .	u g c u a u g c u g a u		
367-14-satRNA/KP719209	G a g g c u a a	G g C u u A . . .	u g c u a u g c u g a u		
Nekrogeni konsenzus	G A - G C U A A	G G C U U A . . .	U G C U A U G C U G A U		

Slika 32. Višestruko poređenje nukleotidnih sekvenci satRNA između pozicija 309 i 334 nt nekrogenih izolata CMV satRNA iz Srbije sa izolatima satRNA za koje je prethodno utvrđeno da poseduju sekvencu koja izaziva sistemsku nekrozu. Sekvence izolata XJs2, PoSA4, T27 i F2 satRNA preuzete su iz GenBank baze podataka. Mala slova predstavljaju identične nukleotidne pozicije, a velika slova pozicije koje se razlikuju od „nekrogene konsezus” sekvence.

6. DISKUSIJA

Opisan je veliki broj virusa koji mogu da zaraze paradajz, a njihova pojava je zabeležena širom sveta (**Ssekyewa, 2006; Hanssen et al., 2010**). Virusi predstavljaju patogene koji izazivaju ekonomski najvažnije gubitke u proizvodnji paradajza, što se ogleda u milionskim štetama usled gubitka kvantiteta i kvaliteta plodova (**Hanssen and Lapidot, 2012**). Zbog toga se smatra da virusi predstavljaju jedno od najvažnijih ograničenja koja ugrožavaju globalnu proizvodnju paradajza (**Ben Mousa et al., 2000; Valizadeh et al., 2011; Abu-Shirbi et al., 2012; Jones et al., 2014**). U Evropi, posebno u zemljama Mediteranskog basena, intenzitet proizvodnje paradajza se smanjio, a kao glavni razlog se navode virusna oboljenja (**Crescenzi, 2009; Soler et al. 2010; Hanssen and Lapidot, 2012**). Gubici u proizvodnji paradajza usled virusnih zaraza su varijabilni i zavise od vrste i soja virusa koji prouzrokuje oboljenje, od sorte (hibrida) paradajza, starosti biljke u vreme infekcije, temperature u toku inkubacionog perioda (razvoja oboljenja), prisustva drugih patogena i od stepena zaraženosti useva (**Krstić i sar., 2005a**). Najčešće opisani virusi, koji izazivaju ekonomski najznačajnije štete u svetu, su virusi koji se na neperzistentan način prenose biljnim vašima: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Y virus krompira (*Potato virus Y*, PVY), i virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), zatim virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) koji se prenosi tripsima i virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV) i virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV) koji se prenose mehaničkim putem (**Ben Mousa et al., 2000; Dovas et al., 2002; Parrella and Crescenzi, 2005; Massumi et al., 2009; Hanssen et al., 2010; Abu-Shirbi et al., 2012; Jones et al., 2014**). Poslednjih godina, u usevu paradajza u svetu, a posebno u Evropi, pojavili su se neki novi virusi koji postaju ozbiljna pretnja proizvodnji paradajza (**Hanssen et al., 2010; Jones et al., 2014**). Među njima, kao novi virusi navode se: virus hloroze paradajza (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), virus infektivne hloroze paradajza (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) i torado virus paradajza (*Tomato torrado virus*, ToTV). Kao virus infektivan za druge gajene biljke koji se prilagodio paradajzu kao novom domaćinu, navodi se virus mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*, PepMV), a za viruse čija učestalost pojave naglo raste, navode se virusi iz kompleksa žute uvijenosti lista paradajza (*Tomato yellow leaf curl diseases*, TYLCD).

Iako u našoj zemlji postoji tradicija u gajenju paradajza i iako se ova kultura gaji na značajnim površinama, proučavanja viroza paradajza su malobrojna i predstavljaju uglavnom lokalne informacije o prisustvu pojedinih virusa (**Krstić i sar., 2007**). Poslednja inventarizacija virusa paradajza obavljena je pre oko 20 godina (**Mijatović et al., 2000**). Međutim, od 2011. godine virusna oboljenja paradajza skreću na sebe pažnju pojavom učestale pojave veoma izraženih simptoma na lišću i plodovima paradajza koji su imali posledicu u značajnom smanjenju prinosa (**Nikolić i sar., 2012, 2013**). Zbog toga su istraživanja obavljena u toku izrade ove doktorske disertacije imala cilj da daju prostornu i vremensku sliku o prisustvu i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji za period od 2011. do 2015. godine. Osim uobičajenih simptoma koji su podsećali na virusnu zarazu, 2012. godine uočeni su i simptomi letalne nekroze koja se javila na jednom lokalitetu. Slični simptomi nekroze, koja zahvata celu biljku, primećeni su i 2014. godine, opet na samo jednom lokalitetu. Imajući u vidu da je u uzorcima koji su ispoljavali simptome sistemичne nekroze, serološkim i molekularnim metodama dokazano prisustvo CMV, dalja istraživanja su usmerena u pravcu detekcije CMV satRNA. Prisustvo CMV satRNA može da ima za posledicu modifikaciju simptoma koje izaziva CMV. Ta modifikacija zavisi od soja virusa, tipa CMV satRNA i biljke domaćina (**Palukaitis and García-Arenal, 2003**). Neke CMV satRNAs ne izazivaju modifikaciju simptoma. Većina onih CMV sat RNA koje su označene kao nenekrogene ublažavaju simptome infekcije sa CMV, dok nekrogeni tipovi CMV sat RNAs izazivaju letalnu nekrozu ili zakržljavanje biljaka i svetložutu hlorozu celih biljaka (**Devic et al., 1990; Collmer and Howell, 1992; García-Arenal and Palukaitis, 1999; Simon et al., 2004**). Iz navedenog razloga, u toku 2015. godine neki uzorci u kojima je dokazano prisustvo CMV, a koji su ispoljavali simptome u vidu deformacije lišća, izražene hloroze i šarenila plodova, takođe, su testirani na prisustvo CMV satRNA. Da bi se odredilo koji su tipovi satRNA, nekrogeni ili nenekrogeni, pristupilo detaljnijoj molekularnoj analizi u cilju njihove karakterizacije. Kako populacija CMV satRNA na paradajzu do sada nije detaljno ispitana, ova istraživanja su omogućila prvi uvid u genetičku strukturu populacije CMV satRNA u Srbiji.

6.1. Simptomi u polju zabeleženi na biljkama paradajza

Ispoljavanje simptoma na biljkama paradajza varira u zavisnosti od toga koji je virus ili njegov soj prouzrokovatelj oboljenja, od sorte ili hibrida paradajza, starosti biljke u vreme infekcije, temperature u vreme ostvarene infekcije i u toku inkubacionog perioda, kao i od prisustva drugih patogenih. Tokom ovih istraživanja nije se mogla uočiti povezanost između tipa simptoma i virusa kad je virus detektovan u pojedinačnoj infekciji. Takođe, na vezu između simptoma i detektovanog virusa nije uticao ni hibrid, odnosno sorta paradajza. Na osnovu simptoma na paradajzu, moguće je samo doneti preliminarni zaključak da se radi o virusnoj infekciji, ne i o tome koji virus je prouzrokovatelj, što ukazuje na to da simptomi nemaju dijagnostički značaj.

Prisustvo simptoma zabeleženo je kako na biljkama na otvorenom polju, tako i u zaštićenom prostoru. Zaražene biljke ispoljavale su veoma raznovrsne simptome, koji su uočavani na listu, stablu i plodu paradajza u svim stadijumima razvoja biljke. U svim pregledanim usevima paradajza mogle su se uočiti biljke sa simptomima koji su podsećali na virusne infekcije. Broj simptomatičnih biljaka varirao je od godine do godine i od useva do useva. Često su virusni simptomi bili neupadljivi ili pripisani nekom drugom uzroku (Nikolić i sar., 2012).

Izraženost simptoma je značajno zavisila od starosti biljke u vreme ostvarene infekcije. Ukoliko su biljke bile zaražene u ranim stadijumima razvoja, simptomi su bili izraženiji i često su se ogledali u promenama opšteg izgleda biljke, zaostajanju u porastu, izostanku ili smanjenom cvetanju i zametanju plodova. Kod biljaka zaraženih u kasnijim fazama razvoja, simptomi su bili slabije izraženi i najčešće su se ispoljavali u vidu blagog mozaika ili šarenila na lišću, dok prinos, kvalitet i tržišna vrednost plodova nije bila ugrožena, kao što je i ranije uočeno (Krstić, 2015b).

U toku svih godina ispitivanja, zaražene biljke su ispoljavale uobičajene, ali veoma varijabilne simptome karakteristične za virusne zaraze. Simptomi uočeni na lišću paradajza najčešće su se ogledali u različitim hromatskim promenama (mozaik, hloroza, prošaravanje), morfološkim promenama lišća (različiti vidovi deformacije tipa klobučavosti, naboranosti, nitavosti) i promenama odumiranja pojedinih delova lista ili celog lista koji su praćeni pojavom nekrotičnih pega ili nekroze cele liske ili delova biljke. U toku 2011. godine na zaraženim biljkama ispoljavali su se izraženiji simptomi u odnosu

na ostale godine ispitivanja i uglavnom su se ispoljavali na lišću, ali često i na malom broju formiranih i nedovoljno razvijenim plodovima. Karakteristični simptomi na lišću u 2011. godini su bili mozaik, šarenilo, bronzavost i žutilo, a veoma često se javljala i deformacija lišća u vidu nitavosti (vrbolikosti). Na plodovima se javljala kako spoljašnja, tako i unutrašnja nekroza. U mnogim usevima, najkarakterističniji simptom je bio izražena zakržljaloš biljaka. Pojavu raznolikih simptoma virusnih oboljenja na biljkama paradajza beleže mnogi autori **(Krstić i Bulajić, 2007; Jones et al., 2014; Šutić, 1995; Koike et al., 2007; Davis et al., 2012; Krstić, 2015b)**.

Ovakve simptome nije bilo moguće povezati sa nekim od virusa prouzrokovala, jer simptomi tipa mozaika ili prošaravanja mogu biti povezani sa infekcijom CMV, PVY, AMV, TMV ili ToMV **(Šutić, 1995; Koike et al., 2007; Jones et al., 2014; Krstić, 2015b)**, dok pojavu nekrotičnih pega i nekroze dela biljke mogu izazvati TSWV i PVY **(Krstić i Bulajić, 2007; Krstić, 2015b)**. Deformacije lišća i promene opšteg izgleda biljke mogu se povezati sa zarazom CMV, TMV, ToMV, PVY ili TSWV **(Šutić, 1995; Koike et al., 2007; Krstić i Bulajić, 2007; Jones et al., 2014; Krstić, 2015b)**.

Na plodovima su se često javljali simptomi u vidu neravnomernog sazrevanja, prstenastih pega i šara, deformacija, pucanja, nekroze i prošaravanja, kao i prevremenog opadanja. Pojava simptoma na plodovima imala je veoma veliki uticaj na prinos, kao i na tržišnu vrednost ploda. Iz literature je poznato da veći broj virusa koji se javlja na paradajzu može prouzrokovati pojavu manje ili više izraženih simptoma na plodovima **(Šutić, 1995; Koike et al., 2007; Krstić i Bulajić, 2007; Jones et al., 2014; Krstić, 2015b)**.

U toku ovih istraživanja uočeni su i simptomi i na stablu, najčešće u vidu nekroze. Ovakve simptome na stablu paradajza može da prouzrokuje više virusa, kao što su CMV, PVY, TSWV **(Gallitelli et al., 1988; Krstić i Bulajić, 2007; Krstić, 2015b)**.

Pored prethodno opisanih simptoma, na dva lokaliteta u toku 2012. i 2014. godine uočena je pojava neobično izraženih simptoma sistemične nekroze, koja je najčešće rezultirala brzim propadanjem zaraženih biljaka. Osim simptoma nekroze na lišću, nekroza se javila i na glavnom stablu i granama. Plodovi su bili izraženo deformisani i bez ikakve upotrebne vrednosti. Većina biljaka u usevu ispoljavala je opisane simptome. Uočeni simptomi su bili veoma slični onima koji su opisani prilikom razarajućih epidemija na paradajzu u Francuskoj, Mediteranskom basenu i Japanu koje su bile

izazvane prisustvom nekrogenih satelitnih RNA u izolatima CMV (**Kaper et al., 1976; Gallitelli et al., 1988; Kosaka et al., 1989; Jorda et al., 1992**). Tokom ovih istraživanja, u biljkama sa opisanim simptomima potvrđeno je prisustvo nekrogenih satRNA.

Pojava jako izraženih simptoma često se mogla dovesti u vezu sa mešanim infekcijama u kojim su učestvovali ili CMV ili PVY, ili oba virusa zajedno. Najizraženiji simptomi su bili 2011. godine kad su mešane infekcije dokazane u visokom procentu, pri čemu su mešane infekcije sa CMV i PVY bile najčešće. U Italiji je, takođe, utvrđeno da je visok procenat mešanih infekcija sa CMV i PVY povezan sa velikim ekonomskim gubicima u usevima paradajza (**Gallitelli et al., 1988**). Jedan od razloga pojave veoma izraženih simptoma na zaraženim biljkama, može se pripisati sinergističkom efektu između CMV i PVY (**Mascia et al., 2010**).

Iako je u većini simptomatičnih biljaka dokazano prisustvo bar jednog od 10 testiranih virusa, u određenom broju sakupljenih uzoraka nije dokazan ni jedan virus. Tako je 2011. godine, prisustvo nekog od testiranih virusa dokazano u 97,2% sakupljenih uzoraka, dok je u 2012. godini prisustvo virusa dokazano u znatno manjem broju testiranih uzoraka (56,6%). Prema tome, u ove dve godine ispitivanja od 3220 ukupno prikupljenih uzoraka, u 836 (24%) nije dokazano prisustvo ni jednog virusa na osnovu seroloških analiza. Uzorci su ispoljavali simptome, kao što su: međunervalna hloroza, žutilo, crvenilo i bronzavost lišća, nekrotične pege, izražene deformacije, ljubičasti nervi, nitavost lišća, zatim neravnomerno sazrevanja pladova i zaostajanje u porastu. Simptomi na uzorcima u kojima nije dokazano prisustvo virusa verovatno je povezano sa drugim uzrocima, kao što su fiziološki, poremećaji u ishrani biljke, fitotoksičnost ili starenje biljke (**Jacquemond et al., 2009; Jones et al., 2014**).

6.2. Učestalost oboljenja

Procena učestalosti biljaka sa simptomima koji podsećaju na simptome izazvane virusima obavljena je vizuelno, brojanjem biljaka sa simptomima i izračunavanjem procenta biljaka sa simptomima u odnosu na ukupan broj biljaka. Prosečana učestalost (incidenca) biljaka se menjala po godinama ispitivanja. U 2011. godini procenjena učestalost se kretala od 40 do 80%. U pojedinim usevima, učestalost zaraženih biljaka je bila izuzetno visoka. U 97,2% sakupljenih uzoraka biljaka sa simptomima dokazano je

prisustvo bar jednog od testiranih virusa. I u 2012. godini, prosečna učestalost biljaka sa simptomima je bila visoka i kretala se od 30 do 50%, a u pojedinim usevima je bila i 100%. Međutim, prisustvo bar jednog od virusa dokazano je u 56,6% testiranih uzoraka. Prema tome, učestalost oboljenja u ovoj godini bila je znatno niža od one koja je utvrđena na osnovu ispoljenih simptoma. U toku 2013. godine prosečna učestalost se kretala od 40 do 70%, a u pojedinim usevima dostizala je i 100%. Prisustvo bar jednog od ispitivanih virusa dokazano je u 71,8% testiranih uzoraka. Tokom 2014. godine prosečna učestalost biljaka sa simptomima virusnih infekcija bila je od 10 do 30%. U tri okruga gajenja nije dokazano prisustvo ni jednog od testiranih virusa. Ukupno posmatrano, u toku 2014. godine prisustvo bar jednog od testiranih virusa dokazano je tek u 30,2% testiranih virusa. Može se zaključiti da je 2014. godine zabeležena najniža učestalost oboljenja u toku ovih ispitivanja. Prosečna učestalost simptomatičnih biljaka u toku 2015. godine kretala se od 30 do 80%, a u pojedinačnim usevima i više. Prisustvo bar jednog od testiranih virusa dokazano je 90,1% uzoraka, što je najveća učestalost virusnih infekcija u usevima paradajza u Srbiji posle 2011. godine.

Prosečna vrednost učestalosti oboljenja za period od 2011. do 2015. godine se menjala i kretala se od 10% (2014. godine) do 80% (2011. i 2015. godine). Ovakve razlike u pojedinim godinama istraživanja, pored dostupnih izvora inokuluma, odnosno zaraze i različite efikasnosti prenošenja pojedinih vektora, najverovatnije su posledica različitih meteorološko-klimatoloških uslova koji su karakterisali pojedine godine ispitivanja. Ovakve promene u učestalosti i zastupljenosti virusa su česta pojava u različitim usevima. Takođe, karakteristika virusa je da se javljaju u epidemijским razmerama, koje se često u nepravilnim vremenskim razmacima, na svake tri do četiri godine, kada mogu dovesti do potpunog propadanja useva i 100% gubitaka (Pitrat, 2012).

6.3. Identifikacija virusa paradajza primenom DAS-ELISA testa

Identifikacija i utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza na različitim lokalitetima gajenja u Srbiji izvedeno je primenom poliklonalnih antiseruma specifičnih za deset ekonomski najznačajnijih i karantinskih virusa paradajza (CMV, AMV, PepMV, TMV, ToMV, PVY, TSWV, PVX, TYLCV i ToRSV).

Praćenjem pojave i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji, u periodu od 2011. do 2015. godine, dokazano je prisustvo PVY, CMV, TSWV, AMV, TMV i ToMV. Učestalost detektovanih virusa se menjala po okruzima, lokalitetima i godinama istraživanja. Prisustvo PepMV, PVX, TYLCV i ToRSV nije detektovano, kao što je navedeno u istraživanjima **Nikolić i sar. (2013)** i **Nikolić et al. (2018)**.

Generalno posmatrano, u toku pet godina ispitivanja zabeležen je veoma visok, preko 70%, procenat biljaka sa virusnim simptomima u kojima je dokazano prisustvo bar jednog od ispitivanih virusa. Incidenca virusa se značajno menjala u toku istraživanja, od oko 30% 2014. godine, kada su uočeni simptomi bili mnogo blaži, do preko 90% prve i poslednje godine ispitivanja, kada su zabeleženi i veoma izraženi simptomi na biljkama. U ostalim ispitivanim godinama, 2012. i 2013. incidenca je bila preko 50, odnosno 70%, što je bilo praćeno umereno do izraženim simptomima na biljkama.

Pojava, rasprostranjenost i relativna zastupljenost, za svih šest detektovanih virusa, značajno je varirala, a zavisila je od godine ispitivanja, okruga, lokaliteta, kao i tipa infekcije.

Istraživanja sprovedena 2011. godine dokazuju dominantno prisustvo CMV u usevima paradajza. CMV je dokazan u 61,7% testiranih uzoraka, što je bio najveći procenat njegove zastupljenosti tokom petogodišnjeg ispitivanja. Najniži procenat zastupljenosti CMV zabeležen je tokom 2014. godine, tokom koje je učestalost pojave virusa bila veoma niska i kada je bio zastupljen u samo jednom od ispitivanih okruga sa 1,5%. Tokom ostalih godina ispitivanja, CMV je zauzimao značajno mesto po učestalosti, pa je 2015. ponovo bio najzastupljeniji virus sa incidencom od skoro 40%, 2012. drugi, kad je dokazan u neznatno manjem procentu uzoraka u odnosu na najfrekventniji PVY, a 2013. je bio treći po zastupljenosti posle PVY i ToMV. Epidemijske zaraze koje ostvaruje CMV potvrđene su krajem prošlog veka na paradajzu i mnogim gajenim kulturama u svetu (**Palukaitis et al., 1992**). U Srbiji je CMV jedan od najčešćih virusa na značajnom broju povrtarskih biljaka, a njegovo stalno prisustvo uočeno je u usevima duvana (**Stanković et al., 2011a**), različitih vrsta tikava (**Vučurović et al., 2012**), kao i na paprici (**Petrović et al., 2010**). PVY je tokom celog perioda istraživanja zauzimao visok procenat zaraza koje su se kretale od 25,8 do 46,8% i bio najzastupljeniji virus tokom 2012. 2013. i 2014. godine što je navedeno u istraživanjima **Nikolić i sar. (2013)**, gde je označen kao jedan od najznačajnijih virusa paradajza u Srbiji. Međutim, i kada je bio drugi (2011.

godine), odnosno treći po zastupljenosti (2015. godine), njegovo prisustvo detektovano je u gotovo polovini, odnosno trećini testiranih uzoraka. TSWV nije zabeležen u većem procentu 2011., 2012., 2013. i 2014. godine, a njegova zastupljenost je 2015. godine bila 31,3%, kada je bio drugi po zastupljenosti. Ova činjenica potvrđuje navode **Krstić i sar. (2005b)** gde se TSWV svrstava u grupu virusa čiji značaj ponovo raste. S obzirom da TSWV ima različitu epidemiologiju u odnosu na ostale viruse prisutne na paradajzu kod nas, a takođe ga odlikuje veoma širok krug domaćina koji uključuje mnoge povrtarske, ali i ukrasne biljke, posebnu pažnju treba obratiti na kontrolu i sprečavanje širenja ovog virusa na paradajzu. Veliku opasnost za proizvodnju paradajza kod nas predstavlja praksa gajenja različitih domaćina TSWV bez prostorne izolacije, kao i gajenje u zaštićenom prostoru, koji pogoduje razvoju tripsa-vektora ovog virusa i gde se mere suzbijanja teže sprovode, naročito posle prenamnoženja insekta. Da opasnost od TSWV za proizvodnju paradajza nije mala, potvrđuju i ova istraživanja jer je na pojedinim lokalitetima prisustvo ovog virusa dokazano u svim testiranim uzorcima. Na lokalitetu Kupusina 2011. godine i Veliko Vojlovce 2015. godine simptomi su bili veoma izraženi, a štete od ovog virusa skoro potpune. Procentualna zastupljenost AMV se kretala od 1,5% u 2014. godini do 17,2% tokom 2011. godine. AMV nije detektovan u ispitivanim uzorcima 2015. godine što potvrđuje raniji status manje zastupljenog virusa paradajza (**Nikolić i sar., 2013; Nikolić et al., 2018**). Zastupljenost TMV se kretala od 0,6% tokom 2012. godine do 18% zabeleženih u 2015. godini, dok 2014. godine nije detektovan. ToMV je bio drugi po zastupljenosti 2013. godine kada je detektovan u 38,1% uzoraka. Najmanja zastupljenost ovog virusa zabeležena je 2012. godine kada je bio zastupljen sa 1,4% ispitanih uzoraka. Prisustvo ToMV nije zabeleženo 2011. i 2014. godine. Ranija istraživanja prisustva i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji (**Mijatović et al., 2000**), pokazala su da su ova dva virusa, zajedno sa PVY bila najprevalentnija. Smanjenje incidence TMV i ToMV zabeleženo u ovim istraživanjima, u odnosu na istraživanja sprovedena 2000. godine ukazuje na uspešnu promenu proizvođačke prakse, gde se proizvodnja započinje kvalitetnim semenom i rasadom, za razliku od perioda kada se proizvodnja počinjala sopstvenim semenom, ostavljenim ih prethodne vegetacije. Takvo seme je najčešće bilo izvor inokuluma za ove viruse. Prisustvo najmanje jednog od ova dva virusa tokom pet godina istraživanja ide u prilog tvrdnji da su TMV i ToMV rasprostranjeni širom sveta i da prouzrokuju jake zaraze na mnogim komercijalnim usevima (**Cui et al., 2004**).

U najvećem procentu virusi su ostvarivali pojedinačne zaraze koje su se kretale od 27,2% tokom 2014. godine do 60,7% u 2015. godini. Ukupan procenat pojedinačnih zaraza tokom istraživanja iznosio je 46,8%, dok su mešane infekcije detektovane u značajno nižem procentu (26,8%). Takođe, treba istaći da su mešane infekcije u godinama sa veoma visokom incidencom virusa i izraženim simptomima, kao što su bile 2011. i 2015., detektovane u osetno većem broju uzoraka. U takvim godinama, naročito je rastao broj dvostrukih infekcija sa CMV i PVY, pored pojedinačnih infekcija, što ukazuje na presudan uticaj ova dva virusa na ispoljavanje simptoma i značajne gubitke u prinosu. Progresija u intenzitetu simptoma može biti objašnjena ranije opisanim sinergističkim efektom između ova dva virusa (**Mascia et al., 2010**). Od mešanih infekcija u toku svih pet godina ispitivanja najznačajnije su bile dvostruke infekcije od kojih je najzastupljenija bila infekcija koju čine PVY i CMV, koja je bila prisutna u 12,7% ispitanih uzoraka. Prirodna mešana infekcija sa ova dva virusa, praćena izuzetnim gubicima u prinosu zabeležena je i u Italiji (**Gallitelli et al., 1988**). Dvostruke infekcije činile su 22,3% ukupnih infekcija tokom petogodišnjeg perioda. Trostruke i četverostruke infekcije su bile zastupljene sa 4,5% ukupnih uzoraka i njihovo pojavu je bila sporadična.

Jedini virusi koji su detektovani u svih pet godina istraživanja i u pojedinačnim i u mešanim infekcijama bili su CMV i PVY. Ova dva virusa smatraju se široko rasprostranjenim na paradajzu u Evropi (**Parrella and Crescenzi, 2005; Horváth et al., 2007; Soler et al., 2010**).

Prisustvo ni jednog od testiranih virusa nije dokazano u oko četvrtini testiranih uzoraka iako su ispoljavali simptome koji su podsećali na virusne infekcije. Ovakvi rezultati ukazuju da je uzročnik pojave takvih simptoma najverovatnije neki dugi faktor biotske ili verovatnije abiotske prirode, koji je pre svega vezan sa poremećajem nekih fizioloških procesa u biljci ili viškom, odnosno nedostatkom nutrienata (**Jacquemond et al., 2009; Jones et al., 2014**).

6.4. Rasprostranjenost virusa

Tokom 2011. godine kada je CMV bio prevalentan virus, njegovo prisustvo je dokazano u pojedinačnim i/ili mešanim infekcijama u 80% pregledanih distrikta, dok je PVY, kao drugi po zastupljenosti, dokazan u polovini pregledanih distrikta. Naredne,

2012. godine istraživanja bila je slična situacija, s tim što je prevalentan bio PVY, a njegovo prisustvo je dokazano u više od 80% pregledanih distrikta, dok je zastupljenost CMV detektovana u više od 50% pregledanih distrikta. Tokom 2013. godine situacija je bila donekle različita u odnosu na prethodne dve godine, jer iako je PVY bio najčešće detektovan najrasprostranjeniji je bio ToMV, čije je prisustvo detektovano u preko 86% testiranih distrikta. Drugi po rasprostranjenosti bio je PVY koji je takođe detektovan u velikom broju distrikta, čak 80%. Četvrta godina istraživanja (2014. godina) karakterisala se relativno niskom incidencom virusa u usevu paradajza, a prevalentan je bio PVY, koji je detektovan u polovini testiranih distrikta, što je značajno manje nego u prethodnim godinama. Ostala 3 virusa su detektovana samo u po jednom distriktu (12,5%). Karakteristično za 2014. godinu u odnosu na ostale je da čak u skoro 40% pregledanih distrikta nije dokazano prisustvo nijednog od testiranih virusa. Tokom 2015. godine virusi su dokazani u veoma velikom broju testiranih uzoraka, a najučestaliji su bili CMV i TSWV. Međutim, najrasprostranjeniji je bio PVY dokazan u 75% distrikta, koji je bio tek treći po učestalosti. Drugi po rasprostranjenosti je bio TMV, četvrti najučestaliji virus, dokazan u preko 60% testiranih distrikta. Za razliku od 2014., tokom 2015. samo u jednom distriktu nije dokazano prisustva bar jednog virusa. U većini distrikta je dokazano prisustvo bar tri virusa, a u jednom i svih pet koji su dokazani te godine.

Generalno posmatrano za svih pet godina ispitivanja, pregledano je ukupno 57 okruga, a PVY i CMV su bili najrasprostranjeniji virusi. Prisustvo PVY je dokazano u više od 70%, a CMV u 50% testiranih okruga. Ovakvi rezultati ne iznenađuju, jer su upravo PVY i CMV najčešći virusi na paradajzu u Evropi (**Parrella and Crescenzi, 2005; Horváth et al., 2007; Soler et al., 2010**). Oba virusa odlikuje širok krug domaćina, kao i neperzistentno prenošenje velikim brojem vrsta vaši. Značajna razlika je u tome što je krug domaćina PVY uglavnom ograničen na predstavnike familije Solanaceae, dok je krug domaćina CMV veoma širok i obuhvata predstavnike velikog broja biljnih familija (**Blancard, 2012**). Takođe, važno je istaći da je CMV veoma čest i rasprostranjen virus u Srbiji na duvanu (**Stanković et al., 2011a**), različitim vrstama tikava (**Vučurović et al., 2012**), paprici (**Petrović et al., 2010**), ali na brojnim drugim domaćinima koji mogu da posluže kao rezervoar infekcije, što je verovatno doprinelo, visokoj učestalosti i zastupljenosti CMV na paradajzu u Srbiji.

U toku ovih istraživanja nisu uočene značajne razlike u distribuciji virusa između različitih distrikta, najverovatnije zbog tradicionalnog načina gajenja paradajza u Srbiji, gde gazdinstva nisu specijalizovana, već uglavnom manja i heterogena, na kojima se pored paradajza gaji bar još nekoliko kultura. Ovakav način proizvodnje omogućava da širom zemlje imamo stalni izvor inokuluma virusa, ali i njihovih vektora, zbog čega se virusi na paradajzu javljaju manje ili više uniformno po celoj teritoriji Srbije gdje se paradajz gaji.

Istraživanja sprovedena u toku ove doktorske disertacije pokazala su da se CMV i PVY redovno sreću u usevima paradajza u Srbiji. Prisustvo ostala četiri virusa dokazano je u značajno manjem broju uzoraka u poređenju sa CMV i PVY. Dobijene rezultate potrebno je iskoristiti u cilju kontrole virusa u paradajzu koju treba pre svega usmeriti na kontrolu ova dva virusa. S obzirom da se oba najzastupljenija i najprevalentnija virusa prenose na neprezistentan način biljnim vašima, buduća ispitivanja je neophodno usmeriti na utvrđivanje uloge vaši kao vektora ovih virusa, kao i na efikasnost pojedinih vrsta u prenošenju ovih, ali i drugih virusa paradajza koji prenose na ovaj način.

6.5. Prenošnje TMV, ToMV, AMV i PepMV semenom paradajza

Utvrđivanje prisustva virusa u semenu komercijalno dostupnih sorti i hibrida paradajza, sprovedeno u ovim istraživanjima, pokazalo je da su svi testirani uzorci bili negativni na četiri virusa koji se prenose semenom, ToMV, TMV, AMV i PepMV. Ranija ispitivanja **Mijatović et al. (2000)** su pokazala visoku zastupljenost ToMV u usevu paradajza u Srbiji, dok su serološka ispitivanja sprovedena u toku ovog rada pokazala smanjenje učestalosti pojave ToMV, osim u 2013-oj godini kada je detektovan u velikom broju testiranih uzoraka. Promena prakse korišćenja sopstvenog semena za proizvodnju rasada paradajza i prelazak na korišćenje komercijalno dostupnog semena je najverovatnije razlog manje zastupljenosti, nekada učestalih, ToMV i TMV. Rezultatima dobijenim u okviru ovih istraživanja je potvrđen značaj upotrebe kvalitetnog i zdravog semena, poznatog porekla u kontroli virusa paradajza koji se prenose semenom na šta je posebno ukazao **Soler et al. (2010)**.

6.6. Molekularne analize

Molekularne analize šest virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV, TMV i ToMV prisutnih u usevu paradajza u Srbiji, kao i CMV satRNA primenom reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) obavljene su u cilju unapređenja metoda detekcije virusa paradajza u našoj zemlji, ali i kao preduslov za dalju identifikaciju i karaktrizaciju izolata virusa paradajza prisutnih u Srbiji.

6.6.1. Molekularne analize CMV

Primenom para prajmera CMVCPfwd i CMVCPrev koji umnožavaju celi CP gen, kao i delove 5' i 3' UTR, došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine od 871 bp kod svih ispitivanih izolata poreklom iz paradajza iz Srbije. Primenjeni prajmeri su se pokazali veoma uspešnim za detekciju veoma varijabilnih izolata CMV, što omogućava brzu i pouzdanu detekciju ovog virusa, a time doprinosi i uspešnoj kontroli. Prajmeri CMVCPfwd i CMVCPrev dizajnirani od strane (**Milojević et al., 2012**) pokazali su se veoma uspešnim za detekciju CMV i rutinski se koriste u laboratorijama za detekciju ovog virusa (**Milojević et al., 2013; Milošević et al., 2015b**).

Genetička sličnost odbranih izolata CMV poreklom iz paradajza iz Srbije, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence CP gena odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza deset sekvenci CMV dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 96 do 100% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima CMV iz drugih delova sveta, čime je potvrđena pripadnost izolata iz Srbije ovom virusu. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranih sekvenci sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi ukazalo je da odabrane sekvence pokazuju od 97,9% do 100% nt, odnosno od 96,7% do 100% aa sličnosti sa sekvencama CMV iz drugih delova sveta. Odabrani izolati poreklom iz Srbije iz paradajza pokazuju izvestan stepen diverziteta sekvence CP gena, pri čemu se njihova međusobna sličnost kretala od 76,3 do 100% na nukleotidnom, odnosno od 81,3% do 100%, na aminokiselinskom nivou, što je ukazalo na postojanje dve grupe izolata CMV na

paradajzu u Srbiji, jer stepen nukleotidne sličnosti manji od 88% ukazuje na varijabilnost prirodne populacije CMV (**Palukaitis and García-Arenal, 2003; Yu et al., 2005**).

Filogenetskom analizom i rekonstrukcijom filogenetskog stabla utvrđeno je grupisanje izolata CMV poreklom iz paradajza iz Srbije u dve podgrupe na osnovu sekvenci CP gena. CP gen predstavlja visokokonzervativni deo genoma (**Jacquemond, 2012**) i kao takav se smatra informativnim za identifikaciju i karakterizaciju (**Moury et al., 2004**). Pripadnost izolata određenoj podgrupi CMV do nedavno je određivana na osnovu sekvenci CP gena koji predstavlja visoko konzervativan region i kodira strukturni protein (**Roossinck, 2002; Jacquemond, 2012**) zbog čega se smatra najinformativnijim regionom za identifikaciju i karakterizaciju ovog virusa (**Moury et al., 2004**). Podela izolata CMV iz Srbije u dve podgrupe, potvrdila je prethodno uočene razlike u nukleotidnoj sličnosti ispitivanih izolata CMV iz Srbije. Većina izolata iz Srbije svrstala se u okviru podgrupe IA, koja se smatra najvećom podgrupom i u koju je svrstana većina poznatih izolata ovog virusa (**Bonnet et al., 2005**). Ostali izolati iz Srbije svrstali su se u podgrupu II, za koju se smatra da se u njoj nalaze izolati koji izazivaju pojavu blažih simptoma na gajenim biljkama, i da se zbog toga teže uočavaju i detektuju, zbog čega im je i brojnost znatno niža u odnosu na izolate podgrupe I (**Xu et al., 1999; Tian et al., 2009**). Podela izolata iz Srbije u dve podgrupe u skladu je sa prethodnim istraživanjima genetičke strukture prirodne populacije CMV u Srbiji (**Milojević, 2016**). Populacija CMV na paradajzu u Srbiji pokzala se varijabilnijom u odnosu na populaciju ovog virusa na tikvama, gde se javljaju samo izolati IA podgrupe (**Vučurović, 2013**).

U poslednje vreme, kao jedan od najčešćih izvora varijabilnosti u okviru populacije CMV javlja se pojava rekombinacija i pseudorekombinacija (**García-Arenal et al., 2001; Lin et al., 2003; Tamarzizt et al., 2013; Kim et al., 2014; Nouri et al., 2014; Milojević, 2016**), što ukazuju na potrebu detaljnijeg ispitivanja većeg broja izolata CMV iz paradajza i sekvenciranja celog genoma, kako bi se detaljno opisala populacija ovog veoma značajnog virusa na paradajzu u Srbiji u cilju pronalaženja efikasnih mera kontrole.

6.6.2. Molekularne analize PVY

Primenom para prajmera PVYc i PVYd koji omogućavaju umnožavanje fragmenata 5' UTR i P1 gena došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine (975 bp) kod svih ispitivanih izolata poreklom iz paradajza iz Srbije. Univerzalni prajmeri PVYc/PVYd omogućavaju detekciju svih do sada poznatih izolata PVY, nerekombinantnih i rekombinantnih. Unutar ovog regiona zabeležena je velika varijabilnost između različitih izolata PVY, i upravo degenerativnost PVYd prajmera omogućava prepoznavanje svih do sada testiranih PVY izolata (**Marie-Jeanne Tordo et al., 1995**). Tako je, **Glais et al. (2002)** primenom ovih prajmera detektovao 18 izolata različitih sojeva. I rezultati ovih istraživanja pokazali su da su odabrani prajmeri pogodni za uspešnu detekciju izolata PVY poreklom iz paradajza iz Srbije, što će poboljšati dijagnozu oboljenja koja ovaj virus izaziva, a time i mogućnost brzog i pouzdanog rutinskog testiranja. Osim toga, ovaj region, zajedno sa CP genom, je jedan od najčešće korišćenih delova genoma radi dalje identifikacije i karakterizacije izolata ovog virusa (**Moury et al., 2002; Glais et al., 2002, 2005; Fanigliulo et al., 2005; Lorenzen et al., 2006; Ogawa et al., 2008, 2012**). Kako populacija PVY poreklom iz paradajza iz Srbije do sada nije ispitivana, dalja molekularna ispitivanja obuhvatila su sekvenciranje, proračun genetičke sličnosti i filogenetske analize. Genetička sličnost odbranih izolata PVY poreklom iz paradajza iz Srbije, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence P1 gena odbranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza devet sekvenci PVY dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 98 do 100% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima PVY iz drugih delova sveta. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odbranih sekvenci sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi ukazalo je da odabrane sekvence pokazuju od 99,4% do 100% nt, odnosno od 99,6% do 100% aa sličnosti sa sekvencama PVY iz drugih delova sveta. Odabrani izolati poreklom iz Srbije iz paradajza pokazuju i međusobno izuzetno visok stepen homologije dela sekvence P1 gena, pri čemu se njihova međusobna sličnost kretala od 99% do 99,9% na nukleotidnom, odnosno od 99,1% do 100% na aminokiselinskom nivou. Imajući u vidu da je deo koji sadrži sekvence 5' UTR i gena za P1 protein, najvarijabilniji deo genoma PVY i da se nukleotidna sličnost sekvenci

različitih sojeva u 5' UTR kreće od 66 do 100%, odnosno 70–100% (77% aa sličnosti) u delu gena za P1 protein (Shukla et al., 1991; Thole et al., 1993; Marie-Jeanne Tordo et al., 1995) može se reći da na osnovu visokog stepena sličnosti svi ispitivani izolati PVY poreklom iz paradajza pripadaju istom soju. Filogenetskom analizom i rekonstrukcijom stabla utvrđeno je grupisanje izolata u tri klastera koja odgovaraju ranije opisanim sojevima ovog virusa: nekrotični, obični i crtičasti (Moury et al., 2002; Glais et al., 2002, 2005; Fanigliulo et al., 2005; Lorenzen et al., 2006; Ogawa et al., 2008, 2012). Osim toga, u okviru klastera nekrotičnih sojeva došlo je do jasnog izdvajanja, podržanog visokim “bootstrap” vrednostima, dva subklastera na osnovu geografskog porekla izolata: nekrotični izolati poreklom iz Evrope i nekrotični izolati poreklom iz Severne Amerike. Svi ispitivani izolati PVY poreklom iz paradajza grupisali su se u subklaster nekrotičnih izolata poreklom iz Evrope, kao i prethodno okarakterisani PVY izolati iz Srbije poreklom iz duvana (Stanković et al., 2011) i paprike (Milošević, 2013). PVY je jedan od najvarijabilnijih biljnih virusa i od njegovog otkrića 30-ih godina XX veka opisan je veći broj grupa sojeva na osnovu reakcije indikator biljaka, njihovih seroloških osobina i strukture genoma. Na osnovu reakcije i simptoma koji se javljaju na sortama krompira nosiocima različitih gena otpornosti i duvana, izolati PVY se mogu razvrstati u pet grupa (Singh et al., 2008; Gray et al., 2010), ali su obični (PVY^O), nekrotični (PVY^N) i crtičasti (PVY^C) sojevi detaljno okarakterisani. Obični soj izaziva pojavu hipersenzitivne reakcije na sortama krompira nosiocima Ny gena otpornosti i mozaik na duvanu, grupa crtičastih sojeva izaziva hipersenzitivne reakcije na sortama krompira nosiocima Nc gena otpornosti i mozaik na duvanu, dok nekrotični sojevi izazivaju blagi mozaik na krompiru i nekrozu nerava duvana. Izolati koji su bili u stanju da prevaziđu otpornost na nekim sortama krompira sa genima otpornosti svrstani su u sojeve PVY^Z (Jones, 1990) i PVY^E (Kerlan et al., 1999). Molekularnim metodama omogućeno je izdvajanje podgrupa u okviru osnovnih grupa sojeva, ali i otkrića novih sojeva, kao što su PVY^{NTN} i PVY^N-Wi (Wilga) koji izazivaju pojavu nekroze nerava na duvanu slično nekrotičnim sojevima, ali i prstenastu nekrozu krtola krompira ili su serološki slični običnom soju (Beczner et al., 1984; Chrzanowska, 1991). Kasnije je utvrđeno da su ovi sojevi nastali rekombinacijom i da njihov genom predstavlja mozaik izgrađen iz delova genoma izolata običnog i nekrotičnog soja. PVY^{NTN} sojevi imaju 3-4 mesta rekombinacije, a PVY^N-Wi 1-2 mesta rekombinacije sa različitim brojem mesta

rekombinacije pri čemu se rekombinacije dešavaju u regionu HC-Pro/P3, VPg/NlA, P1 i C kraju CP gena (Glais et al., 2002; Nie et al., 2004; Lorenzen et al., 2006; Schubert et al., 2007). Međutim, novija istraživanja ukazala su na postojanje rekombinacija ne samo između sojeva već i različitih filogenetskih grupa u okviru istog soja, ali i između samih rekombinanata (Chikh Ali et al., 2010; Kerlan et al., 2011). Zbog toga, dalja ispitivanja izolata PVY iz paradajza, ali i iz drugih biljaka domaćina, treba usmeriti na sekvenciranje celog genoma kako bi smo dobili jasniju sliku o varijabilnosti i sastavu populacije ovog virusa u našoj zemlji, ali i uvid u osnovne izvore zaraze odakle se virus širi na osetljive useve.

6.6.3. Molekularne analize TSWV

Primenom para prajmera TSWVCP-f i TSWVCP-r koji omogućavaju umnožavanje fragmenata N gena došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine (738 bp) kod svih ispitivanih izolata poreklom iz paradajza iz Srbije. Za detekciju, identifikaciju i karakterizaciju ovog virusa postoji veći broj modifikacija molekularnih tehnika zasnovanih na PCR ili hibridizaciji nukleinskih kiselina koje podrazumevaju primenu prajmera specifičnih za različite segmente sve tri genomne RNA (L, M i S RNA) ili međugenske regione M i S RNA. Protokol za RT-PCR detekciju TSWV korišćenjem prajmera koji omogućavaju umnožavanje dela RdRp gena kao visoko konzervativnog regiona i koji se preporučuju u dijagnostičkim protokolima, razvili su Mumford et al. (1994), a zatim poboljšali Mumford et al. (1996). Weekes et al. (1996a) su razvili kombinaciju „immunocapture“ RT-PCR, a Weekes et al. (1996b) metode za dijagnozu TSWV i INSV, primenom prajmera specifičnih za L ili S RNA, u pojedinačnim reakcijama ili u višestrukim reakcionim mešavinama dobijajući amplikone karakteristične za određeni virus. Koriste se i univerzalni prajmeri na različite delove S RNA koji omogućavaju detekciju svih vrsta u okviru *Tospovirus* roda (Weekes et al., 1996b). Zbog veće osetljivosti u odnosu na ELISA, RT-PCR je pogodna metoda za detekciju TSWV u biljkama u kojima se nalazi u veoma niskoj koncentraciji (Krstić i sar., 2008). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da su odabrani prajmeri pogodni za uspešnu detekciju izolata TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije, što će poboljšati dijagnozu oboljenja koja ovaj virus izaziva, a time i mogućnost brzog i pouzdanog

rutinskog testiranja. Osim toga, primena ovih prajmera je pogodna i za dalja ispitivanja genetičke strukture populacije TSWV i sagledavanje diverziteta ovog virusa u našoj zemlji (Stanković et al., 2011a; Vučurović et al., 2012).

Kako populacija TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, nije poznata genetička struktura, kao ni variranje izolata u odnosu na izolate TSWV poreklom iz drugih domaćina iz Srbije, ali i u odnosu na izolate poreklom iz Evrope i drugih delova sveta, molekularna ispitivanja, osim detekcije, bila su usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju. Genetička sličnost odbranih izolata TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence N gena odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza osam sekvenci TSWV dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 97% do 100% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima TSWV iz drugih delova sveta. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranih sekvenci sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi ukazalo je da odabrane sekvence pokazuju od 99,5% do 100% nt, odnosno od 98,6% do 100% aa sličnosti sa sekvencama iz drugih delova sveta. Na osnovu visokog stepena homologije sekvenci ispitivanih izolata, a poštujući međunarodno usaglašeno pravilo da se neki izolat može izdvojiti u posebnu vrstu virusa ukoliko njegova aminokiselinska sekvence N proteina u poređenju sa drugim *Tospovirus*-ima pokazuje manje od 90% homologije (Goldbach and Kuo, 1996), potvrđeno je da odabrani izolati iz paradajza pripadaju virusu bronzavosti paradajza.

Na osnovu sekvenci N gena, odabrani izolati poreklom iz Srbije iz paradajza pokazuju izuzetno visok stepen homologije, pri čemu se njihova međusobna sličnost kretala od 98,8% do 100% na nukleotidnom, odnosno od 98,2% do 100% na aminokiselinskom nivou. Visok stepen nukleotidne sličnosti N gena utvrđen je kod izolata TSWV poreklom iz različitih delova sveta (de Avila et al., 1993; Pappu et al., 1998). Osim toga, Tsompana et al. (2005) su ispitujući populacije TSWV na osnovu analize većeg broja izolata ovog virusa različitog geografskog porekla utvrdili da je, u većini slučajeva, diverzitet nukleotidnih sekvenci izolata jako nizak, dok su vrednosti parametara koji određuju diverzitet haplotipa visoke.

I pored visokog stepena nukleotidne sličnosti izolata TSWV na osnovu N gena, filogenetska proučavanja su pokazala da je ovaj deo genoma dovoljno varijabilan i informativan, jer u rekonstruisanim filogenetskim stablima dolazi do grupisanja i izdvajanja izolata u odvojene klastere na osnovu njihovog geografskog porekla (**Pappu et al., 1998; Tsompana et al., 2005; Dietzgen et al., 2005; Persley et al., 2006; Sivparsad and Gubba, 2008; Tentchev et al., 2011**). Izolati TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije nalaze se u klasteru koji čini većina izolata iz Evrope (Bugarska, Srbija, Crna Gora, Nemačka, Češka, Holandija), ali u dve odvojene geografske subpopulacije. Tri ispitivana izolata (45-12, 174p-15 i 180p-15) grupisala su se u okviru podgrupe 1 zajedno sa ostalim izolatima iz Srbije, Crne Gore i Bugarske, dok se preostalih pet izolata (533-2-11, 646-11, 792-11, 552-12 i 555-12) grupiše u blisku, ali odvojenu subpopulaciju u okviru evropskog klastera (podgrupa 2). Ovakvo grupisanje srpskih izolata poreklom iz paradajza u dve geografske subpopulacije posledica je dvostruke introdukcije ovog virusa u našu zemlju i paralelne evolucije dve različite grupe sekvenci u okviru prirodne populacije TSWV. Osim toga, na osnovu rezultata dobijenih filogenetskim analizama može se zaključiti da je populacija TSWV definisana uglavnom na osnovu geografskom porekla, uz izvesna odstupanja kao što su grupisanje dva izolata iz Severne Karoline i dva izolata iz Južne Afrike u Evropski klaster ili grupisanje izolata iz Italije i Španije u Severno-Američki klaster. Ovakva odstupanja mogu se objasniti intenzivnom razmenom zaraženog biljnog materijala koja omogućava „gen flow“ iz jedne države u drugu ili sa jednog kontinenta na drugi kontinent (**Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008; Tentchev et al., 2011**). Takođe, izdvajanje francuskih izolata TSWV i grupisanje u Azijski klaster, može se pripisati postojanju tri nezavisne introdukcije TSWV u Evropu, kako su naveli i **Tentchev et al. (2011)**.

6.6.4. Molekularne analize AMV

Primenom para prajmera CP AMV1 i CP AMV2 koji omogućavaju umnožavanje fragmenata CP gena i 3' UTR došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine (751 bp) kod svih ispitivanih izolata poreklom iz paradajza iz Srbije. Za detekciju i identifikaciju različitih izolata AMV razvijen je veći broj metoda zasnovanih na različitim osobinama virusa: (i) biotest zasnovan na korišćenju indikator biljaka uključujući

Phaseolus vulgaris, *Chenopodium amaranticolor* i *C. quinoa*; (ii) ELISA test; (iii) elektronska mikroskopija i (iv) hibridizacija nukleinskih kiselina (**Ahoonmanesh et al., 1990**). Osim toga, **Xu and Nie (2006)** razvili su protokol za molekularnu detekciju AMV kombinacijom RT-PCR sa prajmerima dizajniranim na osnovu sekvence CP gena, koji omogućavaju detekciju virusa u ispitivanim uzorcima krompira i kada je koncentracija virusa jako niska. Takođe, PCR je mnogo pogodniji za dobijanje informacija o virusnom genomu i za proučavanja varijabilnosti izolata u okviru populacije AMV u prirodi (**Parrella et al., 2000; Stanković et al., 2014**). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da su odabrani prajmeri pogodni za uspešnu detekciju izolata AMV poreklom iz paradajza iz Srbije, što će poboljšati dijagnozu oboljenja koja ovaj virus izaziva, a time i mogućnost brzog i pouzdanog rutinskog testiranja.

Kako populacija AMV poreklom iz paradajza iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, dalja istraživanja bila su usmerena i na njihovu identifikaciju u cilju utvrđivanja genetičke strukture, kao i variranje izolata poreklom iz Srbije u odnosu na izolate poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Genetička sličnost odbranih izolata AMV poreklom iz paradajza iz Srbije, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence CP gena odbranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza sekvenci AMV dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 94% do 99% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima AMV iz drugih delova sveta. **Parrella et al. (2000)**, su takođe ustanovili da izolati AMV iz različitih domaćina poreklom iz Italije i Francuske pokazuju od 93 do 99% nukleotidne sličnosti sekvenci CP gena sa sekvencama AMV dostupnim u GenBank bazi podataka. Isti autori su filogenetskim analizama utvrdili i pojavu grupisanja ispitivanih izolata u dve odvojene grupe na osnovu geografskog porekla. Jednu grupu čine izolati poreklom iz Italije, a drugu grupu izolati poreklom iz Francuske. Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci dela CP gena, utvrđen je visok stepen nt sličnosti 98,4% (100% aa) odbranih izolata AMV poreklom iz Srbije iz paradajza. Visok stepen nukleotidne sličnosti CP gena utvrđen je i kod populacije AMV poreklom iz krompira iz Kanade (**Xu and Nie, 2006**).

6.6.5. Molekularne analize TMV i ToMV

Primenom para prajmera TobUni1/TMVspec i TobUni1/ToMVspec koji omogućavaju umnožavanje kompletnog CP gena i dela 5' i 3' UTR izolata TMV, odnosno ToMV došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine (694 bp, odnosno 676 bp) kod svih ispitivanih izolata poreklom iz paradajza iz Srbije. Upotreba seroloških metoda za detekciju i identifikaciju virusa roda *Tobamovirus* je ograničena usled česte pojave unakrsne reakcije što dovodi do lažno pozitivnih rezultata (**Jacobi and Castello, 1991**). Zbog toga je, u cilju pouzdane detekcije, identifikacije i karakterizacije ovih virusa, razvijen veći broj metoda zasnovanih na osobinama samog genoma. Postoji više molekularnih metoda zasnovanih na korišćenju virus specifičnih prajmera čime je omogućena pouzdana detekcija. Tako su **Letscher et al. (2002)** razvili RT-PCR metodu sa specifičnim prajmerima za detekciju i identifikaciju šest virusa unutar podgrupe 1 roda *Tobamovirus*. Primenom „*Immuno capture*“ RT-PCR omogućena je detekcija i razlikovanje TMV i ToMV, (**Jacobi et al., 1998**), dok primena RT-PCR-RFLP omogućava razlikovanje patotipova jednog virusa (**Tenllado et al., 1994**). Takođe, molekularne metode zasnovane na PCR-u, su osetljivije i preciznije od seroloških (**Jacobi et al., 1998**) i imaju prednost pri detekciji virusa kada se nalaze u biljci u niskoj koncentraciji. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da su odabrani prajmeri pogodni za uspešnu detekciju izolata TMV i ToMV poreklom iz paradajza iz Srbije, što će poboljšati dijagnozu oboljenja koje ovi virusi izazivaju, a time i mogućnost brzog i pouzdanog rutinskog testiranja.

Kako populacija TMV i ToMV poreklom iz paradajza iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, dalja istraživanja bila su usmerena i na njihovu identifikaciju u cilju utvrđivanja genetičke strukture, kao i variranje izolata poreklom iz Srbije u odnosu na izolate poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Genetička sličnost odbranih izolata TMV i ToMV poreklom iz paradajza iz Srbije, ispitana je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti poređenjem sekvence CP gena odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata odgovarajućeg virusa dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza sekvenci TMV dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 94 do 99% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima TMV iz drugih delova sveta. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranih sekvenci sa

sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da odabrane sekvence pokazuju najveću nt sličnost 99,5% (100% aa) odnosno 99,2% sa izolatom iz Kine. Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci kompletnog CP gena, utvrđen je visok stepen nt sličnosti 98,6% (97,3% aa) odabranih izolata TMV poreklom iz Srbije iz paradajza.

BLAST analiza sekvenci ToMV dobijenih u ovim istraživanjima pokazala je 95 do 99% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima ToMV iz drugih delova sveta. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranih sekvenci sa sekvencama koje su pokazale najviši stepen sličnosti u BLAST analizi pokazalo je da odabrane sekvence pokazuju najveću nt sličnost 99,8% (99,4% aa) sa izolatom iz krompira iz Koreje. Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci kompletnog CP gena, utvrđen je potpuna identičnost sekvenci ToMV poreklom iz Srbije iz paradajza, 100% nt i 100% aa sličnosti. **Aguilar et al. (1996)** navode da je stepen sličnosti aminokiselinske sekvence između izolata jednog virusa preko 94%, dok je stepen aminokiselinske sekvence srodnih virusa u okviru roda *Tobamovirus* 80-90%.

6.6.6. Molekularne analize CMV satRNA

Primenom para prajmera CMVsat-fwd i CMVsat-rev koji omogućavaju umnožavanje sekvence satRNA CMV kod svih sedam ispitivanih izolata iz Srbije došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine od 334 do 390 bp. SatRNA detektovane su u preko 100 izolata CMV u različitim delovima sveta i na različitim biljnim vrstama (**Kouadio et al., 2013**). Bez obzira što satRNA ne kodira ni jedan funkcionalni protein, smatra se da njeno prisustvo u većini slučajeva ima katastrofalne posledice po proizvodnju povrtarskih biljaka, pre svega paradajza (**Škorić et al., 1996; García-Arenal and Palukaitis, 1999**). Upotreba specifičnih prajmera za detekciju satRNA dizajniranih od strane **Škorić et al. (1996)** i RT-PCR metode pokazala se pouzdanom za uspešnu detekciju CMV satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije, što će omogućiti pouzdana rutinska testiranja na prisustvo CMV satRNA i doprineti uspešnjoj kontroli ovog virusa na paradajzu u Srbiji.

Kako populacija CMV satRNA na paradajzu do sada nije detaljno ispitana, ova istraživanja su omogućila prvi uvid u genetičku strukturu populacije CMV satRNA u

Srbiji. Međusobna poređenja sekvenci satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije pokazala su 84,7 do 99,7% nt sličnosti ispitivanih izolata. BLAST analiza je pokazala da izolati CMV satRNA iz Srbije dele 86-99% nt sličnosti sa sekvencama izolata iz drugih delova sveta iz GenBank baze podataka čime je potvrđena pripadnost ispitivanih izolata CMV satRNA.

Iako je CMV jedan od najčešćih virusa na paradajzu u Srbiji i simptomi koji podsećaju na zaraze ovim virusom se relativno često javljaju, iznenadna pojava izraženih simptoma nekroze na biljkama zaraženim ovim virusom skrenula je na sebe pažnju tokom 2012. godine. Slični simptomi zabeleženi su i tokom devastirajućih epidemija nekrotičnog propadanja paradajza u Francuskoj, Mediteranskom basenu i Japanu, za koje je utvrđeno da su povezani sa pojavom nekrogenih sojeva CMV satRNA (**Kaper et al., 1976; Gallitelli et al., 1988; Kosaka et al., 1989; Jorda et al., 1992**). Kao i u prethodnim slučajevima, potvrđeno je da se nekrogeni soj CMV satRNA povezan sa pojavom izražene nekroze. Dodatne analize pokazale su prisustvo nenekrogenih izolata CMV satRNA na različitim lokalitetima tokom 2015. godine, gde su simptomi takođe bili izraženi.

Filogenetske analize CMV satRNA sprovedene poređenjem 48 izolata, pokazale su da na grupisanje izolata ne utiču ni geografsko poreklo, ni biljka domaćin, kao ni godina sakupljanja. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima do kojih su došli **Alonso-Prados et al. (1998)**. Izolati CMV satRNA poreklom iz Srbije su se podelili u dve grupe, u zavisnosti od toga da li izazivaju nekrozu na paradajzu. Nekrogeni izolati se dalje dele u grupe B i B1, a nenekrogeni u grupe A i C. Diverzitet sekvenci i filogenetske analize izolata satRNA iz Srbije pokazala su velike razlike između izolata satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije. Kod sedam ispitivanih izolata analiziranih u ovim istraživanjima ustanovljen je visok nivo genetičkog diverziteta. Filogenetsko stablo je pokazalo da se dve nekrogene satRNA iz Srbije grupišu u okviru različitih nekrogenih grupa B i B1, dok se nenekrogeni izolati iz različitih lokaliteta grupišu u okviru iste nenekrogene grupe. Slično ovim rezultatima, **Aranda et al. (1993)** su pokazali da izolati sakupljeni iste godine nisu sličniji međusobno u poređenju sa izolatima poreklom iz različitih godina. Dva izolata iz Srbije, koja su se svrstala u grupu nekrogenih, imaju karakterističnu „nekrogenu konsenzus” sekvencu na 3' kraju, kao što imaju sekvence satRNA koje izazivaju izraženu nekrozu (**Devic et al., 1990**). Ostalih pet satRNA izolata iz Srbije su

se svrstali u okviru A grupe nenekrogenih izolata. Ni kod jednog od pet ispitivanih izolata koji su se svrstali u okviru grupe nenekrogenih nije utvrđeno postojanje dela koji indukuje hlorozu (*chlorosis inducing*), osnovnog, a ni produženog, za koji je utvrđeno da se nalazi na 3' kraju satRNA (Zhang et al., 1994; Fisher, 2013).

Visoki genetički diverzitet CMV satRNA ima za posledicu veoma heterogenu prirodnu populaciju (Grieco et al., 1997; Alonso-Prados et al., 1998; García-Arenal et al., 2000). Satelitne RNA CMV mogu da variraju i u eksperimentalnim (Kurath and Palukaitis, 1990; Alvarez et al., 2003) i u poljskim uslovima (Kurath and Palukaitis, 1989; Aranda et al., 1993). Dobro okarakterisane populacije CMV satRNA iz Španije i Italije, pored veoma velikog diverziteta, karakteriše mogućnost brzih promena tokom epidemija na paradajzu (Aranda et al., 1993; Grieco et al., 1997). Satelitne RNA CMV se brzo šire u populaciji ovog virusa (Alonso-Prados et al., 1998). CMV izolati koji ne poseduju satRNA, mogu da usvoje satRNA ukoliko zaraze biljku koja je već zaražena sa izolatom koji ima satRNA (Ohki et al., 1989). Uzimajući u obzir sve činjenice, pojava CMV satRNA na pojedinačnim lokalitetima, može da predstavlja veliki rizik za eventualnu pojavu epidemije satRNA u usevima paradajza ili drugih osetljivih domaćina u Srbiji.

7. ZAKLJUČAK

Virusi predstavljaju stalnu pretnju proizvodnji paradajza gajenom kako na otvorenom polju, tako i u zaštićenom prostoru u Srbiji. Procenjeni intenzitet zaraze u petogodišnjem periodu istraživanja (2011-2015) varirao je, od niskog koji je zabeležen 2014. godine, do izrazito visokog koji je zabeležen tokom 2011. i 2015. godine.

Pregledom useva paradajza na 136 lokaliteta gajenja u okviru 22 administrativna okruga Srbije zabeležena je pojava raznolikih simptoma koji su upućivali na virusna oboljenja. Simptomi su se najčešće ispoljavali u vidu mozaika, prošaravanja, hloroze i nekroze na lišću, nitavosti liske, nekroze stabla i grana, kržljivosti biljaka, kao i deformacija, nekroze i neravnomernog sazrevanja plodova.

Serološkim analizama 3486 uzoraka sakupljenih tokom pregleda useva paradajza u Srbiji utvrđeno je prisustvo ukupno šest virusa: CMV, PVY, TSWV, TMV, ToMV i AMV. Prisustvo PVX i virusa koji se nalaze na IA deo I karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije: PepMV, TYLCV i ToRSV, nije potvrđeno.

Pojaва i zastupljenost virusa paradajza u Srbiji varirala je u zavisnosti od godine istraživanja, kao i okruga i lokaliteta gajenja. Najzastupljeniji virus tokom 2011. i 2015. bio je CMV, a 2012., 2013. i 2014. godine PVY. Iako su bili najzastupljeniji, nisu u svim godinama bili i najrasprostranjeniji virusi. Najrasprostranjeniji virus u 2011. godini, dokazan u najvećem broju okruga, je bio CMV, dok je u 2012., 2014. i 2015. godini najrasprostranjeniji bio PVY. U 2013. godini, najrasprostranjeniji virus je bio ToMV, iako je bio tek drugi po zastupljenosti. Ukupno posmatrano, prevalentni virusi u ovim ispitivanjima bili su CMV i PVY koji su dokazani u velikom broju uzoraka i okruga obuhvaćenih ispitivanjima.

Virusi su se svake godine javljali u pojedinačnim i mešanim infekcijama. U svim godinama istraživanja najviše su bile zastupljene pojedinačne infekcije. U godinama kada je učestalost oboljenja bila visoka i kada su simptomi na zaraženim biljkama bili najizraženiji, zastupljenost mešanih infekcija je, takođe, bila visoka. Od mešanih infekcija najzastupljenije su bile dvostruke infekcije. Od dvostrukih infekcija, najbrojnije su bile infekcije sa CMV i PVY. U odnosu na broj testiranih uzoraka, kao i broj lokaliteta i okruga uzetih u obzir prilikom istraživanja, CMV i PVY predstavljaju najrasprostranjenije viruse.

Testiranjem semena paradajza komercijalno dostupnih sorti i hibrida serološkim metodama nije utvrđeno prenošenje AMV, ToMV, TMV i PepMV semenom.

Svih šest virusa paradajza prisutnih u Srbiji detektovani su do nivoa vrste korišćenjem odgovarajućih specifičnih prajmera i RT-PCR metode čime su unapređene metode detekcije ovih virusa. Osim toga, uspostavljeni protokoli za molekularnu detekciju svih šest virusa predstavljaju osnov za dalju karakterizaciju pomenutih virusa u Srbiji.

Molekularna identifikacija svih šest virusa paradajza prisutnih u Srbiji obavljena je nakon sekvenciranja odgovarajućeg regiona karakterističnog za svaki virus i proračuna genetičke sličnosti odabranih izolata sa izolatima odgovarajućeg virusa poreklom iz drugih delova sveta. Sve sekvence odabranih izolata dobijene tokom ovih istraživanja deponovane su u GenBank bazu podataka.

Analizom sekvenci CP gena 10 odabranih izolata CMV i određivanjem stope genetičkog diverziteta između ispitivanih izolata utvrđena je heterogenost populacije, odnosno visoka varijabilnost u okviru populacije ovog virusa poreklom sa paradajza u Srbiji. Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazalo je grupisanje izolata u dve podgrupe I i II, od kojih se podgrupa I dalje deli na IA i IB podgrupu. Sedam izolata CMV poreklom iz paradajza iz Srbije grupisali su se u podgrupu IA, dok su se preostala tri izolata grupisala u okviru veoma udaljene podgrupe II. Molekularna karakterizacija ovog virusa ukazala je na više nezavisnih introdukcije ovog virusa i uspešno širenje izolata koji pripadaju II podgrupi u našoj zemlji.

Sekvence devet izolata P1 gena PVY poreklom iz paradajza iz Srbije pokazale su visok stepen sličnosti. Filogenetsko stablo je ukazalo na grupisanje izolata PVY u tri glavna klastera na osnovu njihove pripadnosti odgovarajućem soju: N-nekrotični sojevi, C-crtičasti soj i O-obični soj. U okviru nekrotičnih sojeva izdvajaju se dva subklastera od kojih prvi čine izolati nekrotičnih sojeva poreklom iz Evrope, dok drugi subklaster čine nekrotični izolati poreklom iz Severne Amerike. Svi ispitivani izolati PVY poreklom iz paradajza iz Srbije svrstali su se u klaster nekrotičnih sojeva koji vode poreklo iz Evrope.

Konsenzus stablo rekonstruisano na osnovu sekvence N gena izolata TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije i izolata iz drugih delova sveta, ukazalo je na grupisanje izolata na osnovu geografskog porekla u četiri glavna klastera: Evropski, Brazilski, Severno Američki i Azijski. Evropski klaster se dalje deli na dve geografske

subpopulacije: podgrupu 1 čine izolati iz Bugarske i Crne Gore i prethodno okarakterisani izolati ovog virusa iz Srbije poreklom iz duvana, paprike i tikava, a podgrupu 2 izolati iz drugih evropskih zemalja, kao i po dva izolata iz Severne Amerike i Južne Afrike. U klaster sa izolatima poreklom iz Evrope svrstali su se i ispitivani izolati TSWV poreklom iz paradajza iz Srbije, ali u dve odvojene geografske subpopulacije. Tri izolata grupisala su se u okviru podgrupe 1, a preostalih pet izolata u okviru podgrupe 2 evropskih izolata, ukazujući na dve nezavisne introdukcije ovog virusa u našu zemlju.

U uzorcima koji su ispoljavali simptome sistemичne nekroze sakupljenih tokom 2012. godine na lokalitetu Aradac, dokazano je prisustvo CMV satRNA. Takođe, prisustvo CMV satRNA dokazano je i u uzorcima sakupljenim tokom 2014. godine na lokalitetu Porodin koji su ispoljavali simptome letalne nekroze koji su ličili na simptome primećene 2012. godine. Osim toga, prisustvo CMV satRNA dokazano je i 2015. godine na lokalitetima Togočevce, Veliko Vojlovce i Cekavica, u uzorcima koji nisu ispoljavali ovako izražene simptome, već simptome u vidu hloroze i deformacije lista, kao i šarenila ploda. Prvi put je ispitana populacija CMV satRNA poreklom iz paradajza iz Srbije i utvrđena je njena heterogenost. Filigenetske analize sedam odabranih izolata CMV satRNA ukazale su na grupisanje u dve glavne grupe, nekrogena i nenekrogena grupa. Dva izolata CMV satRNA grupisala su se u okviru nekrogene grupe, dok se preostalih pet grupisalo u okviru nenekrogene grupe.

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova saznanja o prisustvu, prevalentnosti i rasprostranjenosti virusa paradajza u Srbiji. Takođe, predstavljaju prvo izučavanje diverziteta populacije virusa infektivnih za paradajz u našoj zemlji na molekularnom nivou i omogućavaju dalja detaljnija epidemiološka istraživanja viroza paradajza. Pored doprinosa u inventarizaciji virusa paradajza kroz petogodišnja istraživanja, ova doktorska disertacija omogućava razvoj strategija i implementaciji mera suzbijanja prevalentnih virusa paradajza u Srbiji.

8. LITERATURA

- Abou-Jawdah, Y., El Mohtar, C., Atamian, H. and Sobh, H. (2006): First report of *Tomato chlorosis virus* in Lebanon. *Plant Disease* 90: 378.
- Abu-Shirbi, A., Monsour, A., Salem, N. and Al-Tamimi, N. (2012). Viral Diseases Affecting Open Field Tomato in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 1: 15-21.
- Accotto, G. P., Varia, A. M., Vecchiati, M., Finetti-Sialer, M. M., Gallitelli, D. and Davino, M. (2001): First report of Tomato chlorosis virus in Italy. *Plant Disease* 85: 1208.
- Aguilar, I., Sfinchez, F., Martin Martin, A., Martinez-Herrera, D. and Ponz, F. (1996): Nucleotide sequence of *Chinese rape mosaic virus* (*Oilseed rape mosaic virus*), a crucifer *Tobamovirus* infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 30: 191-197.
- Aguilar, J. M., Hernandez-Gallardo, M. D., Cenis, J. L., Lacasa, A. and Aranda, M. A. (2002): Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology* 147: 2009-2015.
- Ahooonmanesh, A., Hajimorad, M. R., Ingham, B. J. and Francki, R. I. B. (1990): Indirect double antibody sandwich ELISA for detecting *Alfalfa mosaic virus* in aphids after short probes on infected plants. *Journal of Virological Methods* 30: 271-282.
- Aleksić, Ž., Aleksić, D. i Šutić, D. (1980): Bolesti povrća i njihovo suzbijanje. Nolit, Beograd.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, C., Cebrián, M. C., Herrera-Vásquez, J. A., Sánchez-Navarro, J. A., Juárez, M., Espino, A., Martín, R. and Jordá, C. (2008): First report of tomato torrado virus on weed hosts in Spain. *Plant Disease* 92: 831.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, C., Cebrián, M. C., Sánchez-Navarro, J. A., Espino, A., Martín, R. and Jordá, C. (2007b): First report of tomato torrado virus in tomato in the Canary Islands, Spain. *Plant Disease* 91: 1060.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, C., Cebrián-Micó, M. C., Font, M., Juárez, V., Median, A., Lacasa, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallas, V. and Jordá-Gutiérrez, C. (2007a): Advances in the study of Tomato “Torrao” or “Cribado” syndrome. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 33: 99-109.

- 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.
- Alonso-Prados, J. L., Aranda, M. A., Malpica, J. M., García-Arenal, F. and Fraile, A. (1998): Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology* 88: 520-524.
- Alvarez, S. P., Xue, C. -Y. and Zhou, X. -P. (2003). Emergence of new satellite RNA from cucumber mosaic virus isolate P1. *Journal of Zhejiang University Science* 4: 336-339.
- 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.
- Anfoka, G. H., and Abhary, M. K. (2007): Occurrence of Tomato infectious chlorosis virus (TICV) in Jordan. *EPPO Bulletin* 37:186-190.
- Anonymous (2002): *Plant Protection Compendium*. CAB International, Wallingford, UK.
- Aranda, M. A., Fraile, A. and García-Arenal, F. (1993): Genetic Variability and Evolution of the Satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus during Natural Epidemics. *Journal of Virology* 67: 5896-5901.
- Aranda, M. A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J. M. and García-Arenal F. (1997): Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *Journal of Molecular Evolution* 44: 81-88.
- Babović, M. (1965): Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Agrohemija* 12: 701-707.
- Babović, M. (1968): Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 102: 335-410.
- Bailiss, K. W. and Ollennu, I. A. A. (1986): Effect of alfalfa mosaic virus on forage yield of Lucerne (*Medicago sativa*) in Britain. *Plant Pathology* 35: 162-168.
- Batuman, O., Kuo, Y. -W., Palmieri, M., Rojas, M. R. and Gilbertson, R. L. (2010): Tomato chocolate spot virus, a member of a new torradovirus species that causes a necrosis associated disease of tomato in Guatemala. *Archives of Virology* 155: 857-869.

- Bauchet, G. and Causse, M. (2012): Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives, Genetic Diversity in Plants. <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-plants/genetic-diversity-in-tomatosolanum-lycopersicum-and-its-wild-relatives>
- Beczner, L., Horvath, H., Romhanyi, L. and Forster, H. (1984): Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27: 339-352.
- Bekesiova, I., Nap, J. P. and Mlynarova, L. (1999): Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology* 17: 269-277.
- Bem, F. (1989): Tomato necrosis: a serious lethal necrotic disease of field tomato crop in Argolida county. Abstract Book of 5th National Phytopathological Congress, Thessaloniki, Greece: HPS, pp. 29.
- Ben Mousa, A., Makni, M. and Marrakchi, M. (2000): Identification of the principal viruses infecting tomato crops in Tunisia. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 293-296.
- Bhat, A. I., Pappu, S. S., Pappu, H. R., Deom, C. M. and Culbreath, A. K. (1999): Analysis of the intergenic region of Tomato spotted wilt virus medium RNA segment. *Virus Research* 61: 161-170.
- Blancard, D. (2012). *Tomato Diseases: Identification, Biology and Control: a Colour Handbook* (2nd ed.). Manson Publishing Ltd., London, UK.
- Blanchard, C. L., Boyce, P. M. and Anderson, B. J. (1996): *Cucumber mosaic virus* RNA5 is mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. *Virology* 217: 598-601.
- Bol, J. F. (1999): Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology* 80: 1089-1102.
- Bol, J. F. (2010): Alfalfa mosaic virus. In Mahy, B. W. J. and Van Regenmortel, M. H. V. (eds.), *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier and Academic Press, Oxford, UK.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, S., Malpica, J. M. and García-Arenal, F. (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology* 332: 359-368.

- Bos, L. and Jaspars, E. M. J. (1971): CMI/AAB Descriptions of plant viruses. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, 46: 1-4.
- 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: 20th August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Bulajić A., Vučurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Ivanović, M. i Krstić B. (2010): Razvijanje metode za određivanje učestalosti zaraze virusom mozaika lucerke u usevu semenske lucerke. Zbornik rezimea X Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 77-78.
- Chatzivassiliou, E. K., Weekes, R., Morris, J., Wood, K. R., Barker, I. and Katis, N. I. (2000): *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Greece: its incidence following the expansion of *Frankliniella occidentalis* and characterisation of isolates collected from various hosts. *Annals of Applied Biology* 137: 127-134.
- Chikh Ali, M., Maoka, T., Natsuaki, T. and Natsuaki, K. T. (2010): PVYNTN-NW, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathology* 59: 31-41.
- Cho, J. J., Custer, D. M., Brommonschenkel, S. H. and Tanksley, S. D. (1996): Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to the *Tomato spotted wilt virus*. *Acta Horticulturae* 431: 367-378.
- Chrzanowska, M. (1991): New isolates of the necrotic strain of Potato virus Y (PVYN) found recently in Poland. *Potato Research* 34: 179-182.
- 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.
- Cohen, S. and Harpaz, I. (1964): Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 7: 155-166.

- Cohen, S. and Lapidot, M. (2007): Appearance and expansion of TYLCV: A historical point of view. In: Czosnek, H. (ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Springer, The Netherlands, pp. 3-12.
- Collmer, C. W. and Howell, S. H. (1992): Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 30: 419-442.
- Costa, J.M., Heuvelink, E. and Botden, N. (2004): *Greenhouse Horticulture in China: Situation and Prospects*. Ponsen & Looijen BV, Wageningen, The Netherlands.
- Cotillon, A. C., Girard, M. and Ducouret, S. (2002): Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of Pepino mosaic virus (PepMV). *Archives of Virology* 147: 2231-2238.
- Crescenzi, A. (2009): Tomato viruses in Italy: evolution in the past few decades and present status. *Acta Horticulture* 808: 140-150.
- Csinos, A. S., Pappu, H. R., McPherson, R. M. and Stephenson, M. G. (2001): Management of *Tomato spotted wilt virus* in flue-cured tobacco with acibenzlar-S-methyl and imidacloprid. *Plant Disease* 85: 292-296.
- Cui, Y., Dongwei, H., Jiahong, D., Xiaofeng, C., Junjie, W., Jialin, Y. and Xueping, Z. (2004): The symptom difference induced by *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in tobacco plants containing the *N* gene is determinate by movement protein gene. *Science in China Ser. C Life Sciences* 47: 503-509.
- Czosnek, H. and Laterrot, H. (1997): A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142: 1391-1406.
- Dalmon, A., Bouyer, S., Cailly, M., Girard, M., Lecoq, H., Desbiez, C. and Jacquemond, M. (2005): First report of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in tomato crops in France. *Plant Disease* 89:1243.
- Davino, S., Panno, S., Rangel, E.A., Davino, M., Bellardi, M.G. and Rubio, L. (2012): Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology* 157: 739-745.
- Davis, R. M., Pernezny, K. and Broome, J. C. (2012): *Tomato Health Management*, Plant Health Management Series. APS, St. Paul, Minnesota, USA.

- de Avila, A. C., de Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1993): Classification of *Topoviruses* based on phylogeny of nucleoprotein. *Journal of General Virology* 74: 153-159.
- de Avila, A. C., Huguenot, C., Resende, R. de O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1990): Serological differentiation of 20 isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 71: 2801-2807.
- Delibašić, G., Tanović, B., Hrustić, J., Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A. and Krstić, B. (2013): First Report of the Natural Infection of *Robinia pseudoacacia* with *Alfalfa mosaic virus*. *Plant Disease* 97: 851.
- Delić, D. (2010): Improvement of methods for diagnosis of tomato viruses. Doctoral dissertation, Biochemical Faculty, Slovenia.
- Devic, M., Jaegle, M. and Baulcombe, D. (1990). Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato. *Journal of General Virology* 71: 1443-1449.
- Dietzgen, R. G., Twin, J., Taltz, J., Selladurai, S., Carroll, M. L., Coutts, B. A., Berryman, D. I. and Jones, R. A. (2005): Genetic variability of *Tomato spotted wilt virus* in Australia and validation of real time RT-PCR for its detection in single and bulked leaf samples. *Annals of Applied Biology* 146: 517-530.
- Doolittle, S. P. (1916): A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* 6:145-147.
- Dovas, C. I., Katis, N. I. and Avgelis, A. D. (2002). Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease* 86: 1345-1349.
- Duffus, J. E., Liu, H. -Y. and Wisler, G. C. (1994): Tomato infectious chlorosis virus - A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 219-226.
- Dukić, N. (2004): Karakterizacija i molekularna detekcija virusa obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Srbiji. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet.
- Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I. i Bulajić, A. (2004a): Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 35/36: 71-79.

- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B. (2006): Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 21: 205-214.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I. 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.
- Dukić, N., Krstić, B., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Vico, I. i Berenji, J. (2004b): Metoda dot-blot hibridizacije nukleinskih kiselina u detekciji virusa paprike, paradajza i obične tikve. Zbornik rezimea V kongresa o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, Srbija, str. 104.
- Dukić, N., Krstić, B., Katis, N. I., Papavassiliou, C., Berenji, J. i Vico, I. (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 85.
- Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Berenji, J. and Duduk, B. (2006): First Report of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* i *Cucumber mosaic virus* in Bottlegourd (*Lagenaria siceraria*) in Serbia. *Plant Disease* 90: 380.
- Đekić, I. (2009): Prisustvo, rasprostranjenost i molekularna karakterizacija virusa duvana u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2007a): Neravnomerna distribucija *Tomato spotted wilt virus* u duvanu, paradajzu i paprici. Zbornik rezimea XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 117-118.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J., Duduk, B., Antonijević, D. i Krstić, B. (2007b): Identifikacija sojeva virusa crtičastog mozaika krompira na duvanu. *Pesticidi i fitomedicina* 22: 155-163.
- Đekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2008a): Molekularna proučavanja *Cucumber mosaic virus*-a iz duvana. Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 72-73.
- Đekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2008b): Zastupljenost i molekularna detekcija virusa mozaika krastavca u usevu duvana. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 40: 70-82.

- Efthimiou, K. E., Gatsios, A. P., Aretakis, K. C., Papayiannis, L. C. and Katis, N. I. (2011): First report of Pepino mosaic virus infecting greenhouse cherry tomatoes in Greece. *Plant Disease* 95:78.
- EPPO (2009): First record of tomato torrado virus in Australia. EPPO Reporting Service No. 2, Paris, February 01, 2009. <http://archives.eppo.org/EPPOReporting/2009/Rse-0902.pdf>
- 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.
- Escriu, F., Cambra, M. A. and Luis-Artega, M. (2009): First report of pepper as a natural host for *Pelargonium zonate spot virus* in Spain. *Plant Disease* 93:1346.
- Fakhro, A., Von Barga, S., Bandte, M. and Büttner, C. (2010): Pepino mosaic virus, a first report of a virus infecting tomato in Syria. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 99-101.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Pacella, R., Harrach, B., Martin, D. P. and Crescenzi, A. (2005): Characterisation of Potato virus Y nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. *Archives of Virology* 150: 709-720.
- FAS/USDA (2003): Processed Tomato Products Outlook and Situation in Selected Countries. <http://www.fas.usda.gov/http>
- Finetti-Sialer, M. M., Di Franco, A., Papanice, M. A. and Gallitelli, D. (1997): Tomato necrotic yellows induced by a novel strain of *Alfalfa mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology* 79: 115-120.
- Fisher, J. R. (2013): Identification of a previously undescribed satellite RNA associated with a *Cucumber mosaic virus* subgroup II strain from *Pratia pedunculata* in Ohio. Online. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2013-0901-01-BR
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017): FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 22 November 2017
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Shkula, D. D. (1979): *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213.

- French, C. J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, M., Johnson, R. C., Masters, C., Godkin, S. and Mumford, R. (2001): First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* 85:1121.
- Gallitelli, D. (1982). Properties of the tomato isolate of Pelargonium zonate spot virus. *Annals of Applied Biology* 100: 457-466.
- Gallitelli, D. (2000): The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.
- Gallitelli, D., Di Franco, A., Vovlas, C. and Kaper, J. M. (1988): Infezioni miste del virus del mosaico del centriolo (CMV) e di potyvirus in colture ortive di Puglia e Basilicata. *Informatore fitopatologico* 38: 57-64.
- García-Arenal, F. and Palukaitis, P. (2008): Cucumber mosaic virus. In: Mahy, B. W. J. and van Regenmortel, M. H. V. (eds.), *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171-176.
- García-Arenal, F. and Palukaitis, P. (1999): Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. In: Vogt, P. K. and Jackson, A. O. (eds.), *Current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 37-63.
- García-Arenal, F., Escribe F, Aranda, M. A., Alonso-Prados, J. L., Malpica, J. M. and Fraile, A. (2000): Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research* 71: 1-8.
- García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2001): Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 156-186.
- García-Arenal, F. and Palukaitis, P. (1999): Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 239: 37-63.
- Gebre-Selassie, K., Dellecolle, B., Gognalons, P., Dufour, O., Gros, C., Cotillon, A. C., Parrella, G. and Marchoux, G. (2002): First report of an isolate of Pelargonium zonate spot virus in commercial glasshouse tomato crop in Southeastern France. *Plant Disease* 86:1052.
- Gibbs, A. J. (1977): *Tobamovirus* group. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 184.

- Gibbs, A. J. and Gower, J. C. (1960). The use of a multiple transfer method in plant virus transmission studies-some statistical points arising from the analysis of results. *Annals of Applied Biology* 48: 75-83.
- Gielen, J., Ultzen, T., Bontems, S., Loots, W., Vanschepen, A., Dehaan, P. and Vangrinsven, M. (1996): Coat protein-mediated protection to *Cucumber mosaic virus* infections in cultivated tomato. *Euphytica* 88: 139-149.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. (2002): Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Archives of Virology* 147: 363-378.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. (2005): Specific detection of the PVY^N-W variant of *Potato virus Y*. *Journal of General Virology Methodes* 125: 83-93.
- Goldbach, R. and Kuo, G. (1996): Biodiversity and taxonomy of *Tospoviruses*. Proceedings of the International Symposium on *Tospoviruses* and *Thrips* of Floral and Vegetable Crops, Taiwan, 1995. *Acta Horticulturae* 431: 21-26.
- Goldbach, R. and Peters, D. (1996): Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: Elliot, R. M. (eds.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York. pp. 129-157.
- Goldbach, R. and Peters, D. (1996): Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: Elliot, R. M. (eds.): *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York.
- Goldbach, R., and Kuo, G. (1996). Introduction (tospoviruses and thrips). *Acta Horticulturae* 431: 21-28.
- Gooding, G. V. (1991): Disease caused by viruses. In: Shew, H. D. and Lucas, G. B. (eds.), *Compendium of tobacco diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 41-47.
- Gray, S. M., De Boer, S. H., Lorenzen, J., Karasev, A. V., Whitworth, J., Nolte, P., Singh, R. P., Boucher, A. and Xu, H. (2010): Potato virus Y: a significant and evolving treat to potato crops in the United States and Canada. *Plant Disease* 94:1384-1397.
- Grieco, F., Lanave, C. and Gallitelli, D. (1997): Evolutionary dynamics of *Cucumber mosaic virus* satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 229: 166-174.
- Groves, R. L., Sorenson, C. E., Walgenbach, J. F. and Kennedy, G. G. (2001): Effects of imidacloprid on transmission of *Tomato spotted wilt tospovirus* to pepper, tomato,

- and tobacco by *Frankliniella fusca* Hinds (*Thysanoptera*: Thripidae). *Crop Protection* 20: 439-445.
- Hajimorad, M. R. and Francki, R. I. B. (1988): Alfalfa mosaic virus isolates from lucerne in South Australia: biological variability and antigenic similarity. *Annals of Applied Biology* 113: 45-54.
- Hanssen, I. M. and Lapidot, M. (2012): Major tomato viruses in the Mediterranean basin. *Advances in Virus Research* 84: 31-66.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. and Thomma, B. P. H. J. (2010): Emerging Viral Diseases of Tomato Crops, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 539-48.
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., Vanachter, A. C. R. C. and Thomma, B. P. H. J. (2008). Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* 121:131-146.
- Harison, B. D. and Wilson, T. M. A. (1999): Milestones in the researche on *Tobacco mosaic virus*. *Philosophical Transactions of the Royal Sociey London B* 354: 521-529.
- Harvey, M., Quilley, S. and Beynon, H. (2002): *Exploring the Tomato. Transformations of Nature, Society and Economy*. Edgar Publishing, Cheltenham.
- 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.
- Heinze, C., Willingmann, P., Schwach, F. and Adam, G. (2003): An unusual large intergenic region in the S-RNA of a Bulgarian *Tomato spotted wilt virus* isolate. *Archives of Virology* 148: 199-205.
- Herrera-Vasquez, J. A., Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Selles, M. C., Cebrian, M. C., Font, M. I. and Jorda, C. (2009): First report of tomato torrado virus infecting tomato in single and mixed infections with *Cucumber mosaic virus* in Panama. *Plant Disease* 93:198.
- Heuvelink, E. (2005): *Tomatoes*. CAB International, Wallingford, UK.
- Horváth, J., Takács, A., Farkas, R., Kazinczi, G. and Gáborjányi, R. (2007): Epidemiology of tomato pathogen viruses in Hungary. *Cereal Research Communications* 35: 489-492.

- Hull, R. (2009): Comparative comparative plant virology. Second edition, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA.
- 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/
- Jacobi, V. and Castello, J. D. (1991): Isolation of *Tomato mosaic virus* from waters draining forest stands in New York State. *Phytopathology* 81: 1112-1117.
- Jacobi, V., Bachand, G. D., Hamelin, R. C. and Castello, J. D. (1998): Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for the detection and differentiation of *Tomato* and *Tobacco mosaic tobamovirus*. *Journal of Virological Methods* 74: 167-178.
- Jacquemond, E. Verdin, E., Dalmon, A., Guilbaud, L. and Gognalons, P. (2009): Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato. *Plant Pathology* 58: 210-220.
- Jacquemond, M. (2012): Cucumber Mosaic Virus. *Advances in Virus Research* 84: 439-504.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J. (2000): Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 34: 67-76.
- Jaspars, E. M. J. and Bos, L. (1980): Alfalfa mosaic virus. *CMV/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No 229.
- Jones, J. B, Thomas, A. Z., Timur, M. M. and Miller, S. A. (2014): *Compendium of Tomato Diseases and Pests*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Jones, R. A. C. (1990): Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology* 117: 93-105.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M.A., Moriones, E. and García-Arenal, F. (1992): Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Disease* 76: 363-366.
- Juretić, N. (1978): Tomato mosaic virus infection of glasshouse tomato crops in Yugoslavia. *Acta Botanica Croatica* 37: 21-26.

- Kajić, V. i Milanović, J. (2013): Virus pjegavosti i venuća rajčice (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV) i virus nekrotične pjegavosti vodenike (*Impatiens necrotic spot virus* - INSV) - biljni virusi koji prijete proizvodnji povrća, ukrasnog i industrijskog bilja. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb.
- Kaper, J. M., Tousignant, M. E. and Lot, H. (1976). A low molecular weight RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72: 1237-1243.
- Kaye, A. C., Moyer, J. W., Parks, E. J., Carbone, I. and Cubeta, M. A. (2011): Population Genetic Analysis of *Tomato spotted wilt virus* on Peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101: 147-153.
- Kerlan C., Nikolaeva O. V., Hu X., Meacham T., Gray S. M. and Karasev A. V. (2011): Identification of the molecular make-up of the Potato virus Y strain PVYZ: Genetic typing of PVYZ-NTN. *Phytopathology* 101: 1052-1060.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. and Guillet, M. (1999): Variability of potato virus Y in potato crops in France. *Journal of Phytopathology* 147: 643-651.
- Kim, M. K., Seo, J. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Kim, K. H., Cha, B. J. and Choi, H. S. (2014): Molecular genetic analysis of *Cucumber mosaic virus* populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology* 104: 993-1000.
- Knap, S. and Peralta, I. E. (2016): *The Tomato (Solanum lycopersicum L. Solanaceae) and Its Botanical Relatives*. Springer, Berlin, Germany.
- Knapp, E. and Lewandowski, D. J. (2001): *Tobacco mosaic virus*, not just a single component virus anymore. *Molecular Plant Pathology* 2: 117-123.
- Koike, S. T., Gladders, P. and Paulus, A. O. (2007): *Vegetable Diseases, A Colour Handbook*, Manson Publishing.
- Kosaka, Y., Hanada, K., Fukunishi, T. and Tochiara, H. (1989): Cucumber mosaic virus isolate causing tomato necrotic disease in Kyoto Prefecture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 229-232.
- Kouadio, K. T., Clerck, C. D., Agneroh, T. A., Parisi, O., Lepoivre, P. and Jijakli, H. (2013): Role of satellite RNAs in cucumber mosaic virus-host plant interactions. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 17: 644-650.

- Krstić, B i Vico, I. (2004): Kontrola virusa mozaika krastavca u okvirima održive poljoprivrede. Biljni lekar 5: 359-363.
- Krstić, B. (2015a): Virusi infektivni za paradajz - I deo. Savremeni povrtar 55: 30-37.
- Krstić, B. (2015b): Virusi infektivni za paradajz - II deo. Savremeni povrtar 56: 22-31.
- Krstić, B. i Bulajić, A. (2007): Karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Beograd.
- Krstić, B. i Bulajić, A. (2008): Ekonomski značajni i karantinski virusi paprika u Srbiji. Zbornik IX savetovanja „Savremena proizvodnja povrća“, Novi Sad, Srbija, str. 24-28.
- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I. (2007): Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea IV simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 13.
- Krstić, B., Bulajić, A. and Đekić, I. (2007): The Tospoviruses in greenhouse tomato and ornamental crops in Serbia. Abstracts book 5th Balkan Congress for Microbiology, Budva, Montenegro, pp. 133 (P4. 21).
- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I. (2008): Virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) - Standardna operativna procedura za fitopatološke dijagnostičke laboratorije. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Beograd.
- Krstić, B., Bulajić, A. Dukić, N. i Berenji, J. (2005a): Virus bronzavosti paradajza na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama na području Republike Srbije. Zbornik rezimea II Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 15-16.
- Krstić, B., Dukić, N., Bulajić, A. i Duduk, B. (2005b): Utvrđivanje statusa nekih karantinski štetnih virusa na području Republike Srbije. Zbornik rezimea VII Savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, Srbija, str. 78-79.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N., Duduk, B. i Berenji, J. (2006): Integralna zaštita duvana od virusa bronzavosti paradajza. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje 79: 49-60.
- Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N. I. and Papavassilious, C. (2002a): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad, 103: 57-65.

- Krstić, B., Bulajić, A., Petrović, D., Stanković, I., Vučurović, A. i Ristić, D. (2011): Epidemiologija virusa paprika i mere kontrole. Zbornik rezimea VIII Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 38-39.
- Krstić, B., Bulajić, A., Trkulja, V., Stanković, I., Vučurović, A., Mihić Salapura, J. i Kovačić, D. (2012): Virusi lukovičastog povrća-značaj i mere kontrole. Zbornik rezimea IX Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 7-8.
- Krstić, B., Vico, I., Dovas, C. I., Eythimiou, C., Katis, N. I. i Berenji, J. (2002b): Molekularna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, Srbija, str. 74.
- 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>
- Kurath, G. and Palukaitis, P. (1990). Serial passage of infectious transcripts of a cucumber mosaic virus satellite RNA clone results in sequence heterogeneity. *Virology* 176: 8-15.
- Lapidot, M. and Friedmann, M. (2002): Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140: 109-127.
- Lapidot, M., Guenoune-Gelbart, D., Leibman, D., Holdengreber, V., Davidovitz, M., Machbash, Z., Klieman-Shoval, S., Cohen, S. and Gal-On, A. (2010): Pelargonium zonate spot virus is transmitted vertically via seed and pollen in tomato. *Phytopathology* 100: 798-804.
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D. E., Willingmann, P. and Heinze, C. (2002): Detection and differentiation of serologically cross-reacting Tobamoviruses of economical importance by RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods* 106: 1-10.
- Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A. B., Falk, B. W. (2004): Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology* 78: 6666-6675.

- Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A. B., Jiminez, M., Falk, B. W. (2003): Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology* 84: 249-258.
- Ling, K. S. (2007): Molecular characterization of two Pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34:1-8.
- Liu, H. Y. and Sears, J. L. (2007): First report of Pelargonium zonate spot virus from tomato in the United States. *Plant Disease* 91: 633.
- Lorenzen, J. H., Meacham, T., Berger, P. H., Shiel, P. J., Crosslin, J. M., Hamm, P. B. and Kopp, H. (2006): Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology* 151: 1055-1074.
- Louro, D., Accotto, G. P. and Vaira, A. M. (2000): Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 106: 589-592.
- Luis-Arteaga, M. and Cambra, M. (2000): First report of natural infection of greenhousegrown tomato and weed species by Pelargonium zonate spot virus in Spain. *Plant Disease* 91: 633.
- Maksimović, P. i Simović, N. (1991): Povrtarstvo. Univerzitet "Svetozar Marković" u Kragujevacu-Agronomski fakultet-Čačak.
- Mandal, B., Pappu, H. R., Csinos, A. S. and Culbreath, A. K. (2006): Response of peanut, pepper, tobacco and tomato cultivars to two biologically distinct isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 90: 1150-1155.
- Marie-Jeanne Tordo, V., Chschulka, A. M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C. and Astier-Manificier, S. (1995): Sequence polymorphism in the 5' NTR and in the P1 coding region of *Potato virus Y* genomic RNA. *Journal of General Virology* 76: 939-949.
- Mariones, E. and Navas-Castillo, J. (2000): Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71: 123-134.
- Marković, V. i Ilin, Ž. (1998): Povrtarstvo. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Maroon-Lango, C. J., Guaragna, M. A., Jordan, R. L., Hammond, J., Bandla, M. and Marquardt, S. K. (2005): Two unique US isolates of Pepino mosaic virus from a

- limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (EU like) US isolate. *Archives of Virology* 150: 1187-1201.
- Mascia, T., Cillio, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M., De Stratis, A., Palukaitis, P. and Gallitelli, D. (2010): Characterisation of the Interactions Between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in Mixed Infections in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 1514-1524.
- Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J. and Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease* 93: 67-72.
- Matthews, R. E. F. (1979): Classification and nomenclature of viruses. 3rd report of the International Committee on Taxonomy on Viruses. *Intervirology* 12: 131-296.
- Maul, F. (1999): Flavor of fresh market tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as influenced by harvest maturity and storage temperature. PhD dissertation, University of Florida.
- Mickovski, J. (1969): *Tomato spotted wilt virus* na duvanu u Jugoslaviji (*Lycopersicon virus 3-Smith*). *Zaštita bilja* 105: 203-214.
- Mijatović M., Obradović A. i Ivanović M. (2007): Zaštita povrća od bolesti, štetočina i korova. Agromivas, Smederevska Palanka.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. i Stevanović, D. (1999) Rasprostranjenost i intezitet pojave nekih virusa parazita paprike u Srbiji. *Zaštita bilja* 50: 151-159.
- Mijatović, M., Zdravković, J., Marković, Z. and Obradović, A. (2000): Disease intensity of some tomato viruses in Serbia. *Acta Physiologiae Plantarum* 22: 332-335.
- Milojević, K. (2016): Biloška i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*) u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu- Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Milojević, K., Radović, N., Stanković, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Bulajić, A. and Krstić, B. (2016): First report of *Cucumber mosaic virus* infecting *Wisteria sinensis* in Serbia. *Plant Disease* 100: 1799.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milošević, D., Bulajić, A. and Krstić, B. (2013): First Report of *Cucumber mosaic virus* Infecting *Peperomia tuisana* in Serbia. *Plant Disease* 97: 1004.

- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A. and Krstić, B. (2012): First Report of *Cucumber mosaic virus* Infecting Watermelon in Serbia. *Plant Disease* 96: 1706.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013a): Proučavanje prirodne populacije virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*) u Srbiji. Zbornik rezimea radova XII Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 109-110.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A., i Krstić, B. (2013b): Biološka i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom iz lubenice u Srbiji. *Zaštita bilja* 64: 14-25.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Ristić, D., Bulajić, A. and Krstić, B. (2014): First report of *Cucumber mosaic virus* in *Tulipa* sp. in Serbia. *Plant Disease* 98: 1449.
- Milošević, D. (2013): Diverzitet i karakterizacija virusa paprika u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Stanković, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): *Cucumber mosaic virus* - značajan patogen paprike u Srbiji. Zbornik rezimea radova XII Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 55-57.
- Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Gvozdanić-Varga, J., Petrović, G., Stanković, I. and Krstić, B. (2015a): First report of *Cucumber mosaic virus* causing chlorotic mottle on pot marigold (*Calendula officinalis*) in Serbia. *Plant Disease* 99: 736.
- Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Gvozdanić-Varga, J., Tamindžić, G., Stanković, I. and Krstić, B. (2015b): The presence of *Cucumber mosaic virus* in pot marigold (*Calendula officinalis*) in Serbia. *Ratarstvo i povrtarstvo* 52: 67-73.
- Milošević, D., Marjanović-Jeromela, A., Jovičić, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Terzić, S. and Stanković, I. (2015b): First report of *Alfalfa mosaic virus* on safflower in Serbia. *Plant Disease* 99: 896.
- Moury, B. (2004): Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1602-1611.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E. and Jacquemond, M. (2002): Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *Journal of General Virology* 83: 2563-2573.

- Mumford, R. A. and Metcalfe, E. J. (2001): The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* 146: 2455-2460.
- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1994): The detection of *Tomato spotted wilt virus* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 46: 303-311.
- 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.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabral, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. (1995): Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology (Supplementum)* 10: 350-354.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. and Sánchez-Campos, S. (2011): Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219-248.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. and Moriones, E. (2000): Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease* 84: 835-837.
- Nelson, A., Roth, D. A. and Johnson, J. D. (1993): *Tobacco mosaic virus* infection of transgenic *Nicotiana tabacum* plants is inhibited by antisense constructs directed at the 5' region of viral RNA. *Gene* 127: 227-232.
- Ng, J. C. K. and Perry, K. L. (2004): Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology* 5: 505-511.
- Ng, J. C. K., Josefsson, C., Clark, A. J., Franz, A. W. E. and Perry, K. L. (2005): Virion stability and aphid vector transmissibility of *Cucumber mosaic virus* mutants. *Virology* 332: 397-405.

- Nie, X., Singh, R. P. and Singh, M. (2004): Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the Potato virus Y from Manitoba, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 573-583.
- Nikolić, D., Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Bulajić, A. i Krstić, B. (2012): *Cucumber mosaic virus* - značajan patogen paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea radova XIV Simpozijuma o zaštiti bilja i IX Kongresa o korovima, Zlatibor, Srbija, str. 105-106.
- Nikolić, D., Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): Viroze paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea radova XII Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 44-45.
- 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.
- 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*, doi: 10.1007/s10658-018-1467-y.
- Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B. W. and Groves, R. L. (2014): Genetic Structure and Molecular Variability of *Cucumber mosaic virus* Isolates in the United States. *Plos One* 9: e96582.
- Obradović, A., Moravčević, Đ., Sivčev, I., Vajgand, D. i Rekanović, E. (2017): Priručnik za integralnu proizvodnju paradajza. Agrotekt d.o.o., Sombor.
- OEPP/EPPO (1999): Data sheets on quarantine pests. *Tomato spotted wilt virus*. *Bulletin OEPP/EPPO* Bulletin 29: 465-472.
- 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.
- OEPP/EPPO (2016): EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulations as quarantine pests. EPPO standard PM 1/2(25). <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>
- Ogawa, T., Nakagawa, A., Hataya, T. and Ohshima, K. (2012): The Genetic Structure of Populations of Potato virus Y in Japan; Based on the Analysis of 20 Full Genomic Sequences. *Journal of Phytopathology* 160: 661-673.

- Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A. and Ohshima, K. (2008): Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan, comparison with North American and European populations. *Virus Research* 131: 199-212.
- Ohki, S. T., Tanaka, H. and Inouye, T. (1989): Cucumber mosaic virus satellite RNA transmissible to plants infected with a different isolate of CMV. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 69-71.
- Pagán, I., Córdoba-Sellés, M. C., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C. and García-Arenal, F. (2006): Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 96: 274-279.
- Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62: 241-323.
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1997): Replicase-mediate resistance to plant virus disease. *Advance in Virus Research* 48: 349-377.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. (1992): *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- Papayiannis, L. C. (2010). Pepino mosaic virus (PepMV): A new virus disease infecting tomato crops in Cyprus. Agricultural Report 1. Agricultural Research Institute.
- Pappu, H. R., Hellier, B. C. and Dugan, F. M. (2008): Evaluation of the national plant germplasm system's garlic collection for seven viruses. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/PHP-2008-0919-01-RS.
- 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, S. S., Bhat, A. I., Pappu, H. R., Deom, C. M. and Culbreath, A. K. (2000): Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: Bunyaviridae) based on the intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. *Archives of Virology* 145: 1035-1045.
- Pappu, H., Pappu, S., Jain, R., Bertrand, P., Culbreath, A., McPherson, R. and Csinos, A. (1998): Sequence characteristics of natural populations of *Tomato spotted wilt tospovirus* infecting flue-cured tobacco in Georgia. *Virus Genes* 17: 169-177.

- Parrella, G. and Crescenzi, A. (2005). The present status of tomato viruses in Italy. *Acta Horticulturae* 695: 37-42.
- 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* 85: 227-264.
- Parrella, G., Lanave, C., Marchoux, G., Finetti Sialer, M. M., Di Franco, A., Gallitelli, D. (2000): Evidence for two distinct subgroups of Alfalfa mosaic virus (AMV) from France and Italy and their relationships with other AMV strains. *Archives of Virology* 145: 2659-2667.
- Peralta, I. E., Knap, S. and Spooner, D. M. (2006): Nomenclature of Wild and Cultivated Tomatoes. *Tomato Genetic Cooperative Report* 56: 6-12.
- Persley, D. M., Thomas, J. E. and Sharman, M. (2006): *Tospoviruses*-an Australian perspective. *Australasian Plant Pathology* 35: 161-180.
- Petković, N., Jeremić, S., Simić, A., Tomić, Đ., Đekić, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2007): *Tomato spotted wilt virus* prouzročivač sistemične zaraze *Petunia x hybrida*. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 131-132.
- Petrović, D., Bulajić, A., Stanković, I., Ignjatov, M., Vujaković, M. i Krstić, B. (2010): Prisustvo i rasprostranjenost virusa paprike u Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo* 47: 567-576.
- Pett, M. M. and Welles, G. (2005): Greenhouse Tomato Production. In: Heuvelink, E. (ed.), *Tomatoes*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Pico, B., Diez, M. J. and Nuez, F. (1996): Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. The tomato yellow leaf curl virus-A review. *Scientia Horticulturae* 67: 151-196.
- Pitrat, M. (2012). Vegetable crops in the Mediterranean Basin with an overview of virus resistance. *Advances in Virus Research* 84: 1-29.
- Pospieszny, H., Borodynko, N., Obrepalska-Stepłowska, A. and Hasiow, B. (2007): The first report of tomato torrado virus in Poland. *Plant Disease* 91:1364.
- Preedy, V. and Watson R. (2008): *Tomatoes and tomato products: nutritional, medicinal and therapeutic properties*. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

- Prins, M. and Kormelink, R. (2004): Transmission and epidemiology. http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t_1_5.html
- Qiu, W. and Moyer, J. W. (1999): *Tomato spotted wilt tospovirus* adapts to TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology* 89: 575-582.
- Quacquarelli, A. and Gallitelli, D. (1979): Tre virosi del geranio in Puglia. *Phytopathologia Mediterranea* 19: 61-70.
- Quenouille J., Vassilakos N. and Moury B. (2013): Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 14: 439-452.
- Rana, N. H., Krstić, B. i Tošić, M. (1988): Prilog poznavanju zaraženosti semena paradajza virusom mozaika i mogućnosti dezinfekcije. *Zaštita bilja* 39: 393-399.
- Reddy, D. V. R. and Wightman, J. A. (1988): *Tomato spotted wilt virus*: Thrips transmission and control. *Advances in Disease Vector Research* 5: 203-220.
- 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.
- Rodoni, B. and Henderson, A. (2004): *Tomato spotted wilt virus* in potatoes. *Agricultural Notes*. State of Victoria, Department of Primary Industries. www.dpi.vic.gov.au.
- Rojas, M. R. and Gilbertson, R. L. (2008): Emerging plant viruses: A diversity of mechanisms and opportunities. In: Roossinck M. J. (ed.), *Plant Virus Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 27-51.
- Roossinck, M.J. (2002): Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology* 76: 3382-3387.
- Roselló, S., Díez, M. J. and Nuez, F. (1996): Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus-A review. *Scientia Horticulturae* 67: 117-150.
- RZS, (2017): Republika Srbija. Republički zavod za statistiku. <http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/Public/PageView.aspx?pKey=139>
- Sakimura, K. (1963): *Frankliniella fusca*, an additional vector of *Tomato spotted wilt virus*, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. *Phytopathology* 53: 412-415.
- 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.

- Savathri, H. S. and Murthy, M. R. N. (1983): Evolutionary relationship of alfalfa mosaic virus with cucumber mosaic virus and brome mosaic virus. *Journal of Biosciences* 5: 183-187.
- Schubert, J., Fomitcheva, V. and Sztangret-Wisniewska, J. (2007): Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods* 140: 66-74.
- Segev, L., Wintermantel, W. M., Polston, J. E., and Lapidot, M. (2004). First report of tomato chlorosis virus in Israel. *Plant Disease* 88:1160.
- Sekulić, R., Spasić, R. i Kereši, T. (2008): Štetočine povrća i njihovo suzbijanje. Univerzitet u Novom Sadu-Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet i Institut za ratarstvo i povrtarstvo-Novu Sad.
- Shukla, D. D., Frenkel, M. J. and Ward, C. W. (1991): Structure and function of the *Potyvirus* genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Phytopathology* 13: 178-191.
- 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.
- Simić, A., Jeremić, S., Tomić, Đ., Petković, N., Đekić, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2007): *Tomato spotted wilt virus* na *Dahlia* vrstama u Srbiji. Zbornik rezimea XIII Simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 133-134.
- Simon, A. E., Roossinck, M. J. and Havelda Z. (2004): Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology* 42: 415-437.
- Sims, W. L. (1980): History of tomato production for industry around the world. *Acta Horticulturae* 100: 25.
- Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008): Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology* 153: 1-13.
- Sivparsad, B. J. and Gubba, A. (2008): Isolation and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in South Africa. *African Journal of Agricultural Research* 3: 428-434.

- Službeni glasnik Republike Srbije (2014): Strategija poljoprivrede i ruralnog razvoja Republike Srbije za period 2014-2024. godine, 85/2014.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2015): Pravilnik o listama štetnih organizama i listama bilja, biljnih proizvoda i propisanih objekata, broj 57/15.
- 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.
- Soler, S., Prohens, J., López, C., Aramburu, J., Galipienso, L. and Nuez, F. (2010): Viruses infecting tomato in València, Spain: occurrence, distribution and effect of seed origin. *Journal of Phytopathology* 158: 797-805.
- Ssekyewa, C. (2006): Incidence, Distribution and Characteristics of Major Tomato Leaf Curl and Mosaic Virus Diseases in Uganda. PhD Thesis. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium.
- Stanković, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): Virusi ukrasnih biljaka sa osvrtom na rod *Tospovirus*. *Biljni lekar* 41: 651-663.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B. (2010): Prisustvo, rasprostranjenost i karakterizacija virusa duvana u Srbiji. Zbornik rezimea 7. Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BIH, str. 13-14.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J. and Krstić B. (2011a): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Jović, J. i Krstić, B. (2011b): 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. and 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.
- Stanković, I., Vrandečić, K., Čosić, J., Milojević, K., Bulajić, A. and Krstić, B. (2014): Spreading of *Alfalfa mosaic virus* in lavandin in Croatia. *Pesticides and Phytomedicine* 29: 115-122.
- Stanković, I., Vučurović, A., Bulajić, A., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B. (2011): Prisustvo i molekularna karakterizacija virusa mozaika lucerke u usevu duvana u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 26: 229-243.
- Škorić, D., Krajačić, M., Barbarossa, L., Cillio, F., Grieco, F., Šarić, A. and Gallitelli, D. (1996). Occurrence of Cucumber Mosaic Cucumovirus with Satellite RNA in Lethal Necrosis Affected Tomatoes in Croatia. *Journal of Phytopathology* 144: 543-549.
- Šutić, D. (1959): Die rolle des paprikasamens bei der Virusübertragung. *Phytopathologische Zeitschrift* 36: 84-93.
- Šutić, D. (1995): Viroze biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd.
- Šutić, D., Babović, M., Tošić, M. (1972): Seed transmission of forage legume viruses. PL 480 Project E30-CR-102, Annual report, pp. 13, Yugoslavia.
- Šutić, D., Babović, M., Tošić, M. (1973): Seed transmission of forage legume viruses. PL 480 Project E30-CR-102, Annual report, pp. 19, Yugoslavia.
- Takač, A. (2008): Savremena proizvodnja paradajza. *Povrtarski glasnik* br. 24.
- Takač, A. (2011): Paradajz. *Semenarstvo* 3: 123-172.
- Takač, A. i Gvozdenović, Đ. (1997): Gajenje paradajza, Selekcija i semonarstvo. 4: 45-57.
- Takač A., Gvozdenović, Đ., Bugarski D. i Červenski J. (2007) Savremena proizvodnja paradajza. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 43: 269-281.
- Tamarzizt, H. B., Montarry, J., Girardot, G., Fakhfakh, H., Tepfer, M. and Jacquemond, M. (2013): *Cucumber mosaic virus* populations in Tunisian pepper crops are mainly composed of virus reassortants with resistance-breaking properties. *Plant Pathology* 62: 1415-1428.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tenllado, F. and Bol, J. F. (2000): Genetic detection of the multiple functions of *Alfalfa mosaic virus* coat protein in viral RNA replication, encapsidation and movement. *Virology* 268: 29-40.
- Tenllado, F., Garcia-Luque, I., Serra, M. T. and Diaz-Ruiz, J. R. (1994): Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. *Journal of Virological Methods* 47: 165-173.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M. and Moury, B. (2011): Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92: 961 - 973.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyan, J. and Balazs, E. (1993): Cloning and sequencing of *Potato virus Y* (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123: 149-156.
- 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.
- Tian, Z., Jiyan, Q., Jialin, Y., Chenggui, H. and Weicheng, L. (2009): Competition between *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II isolates in tobacco. *Journal of Phytopathology* 157: 457-464.
- Tomić, Đ., Jeremić, S., Simić, A., Petković, N., Đekić, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2007): Status viroza paprike u Srbiji. Zbornik rezimea XIII Simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 114-115.
- Tošić, M. and Pešić, Z. (1975): Investigation of Alfalfa mosaic virus transmission through alfalfa seed. *Phytopathologische Zeitschrift* 83: 320-327.
- Tsompana, M., and Moyer, J. W. (2008). Tospoviruses. In: Mahy B. W. J. and Van Regenmortel, M. H. V. (eds.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd edition. Elsevier, Oxford, UK, pp. 1-157.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. and Moyer, J. W. (2005): The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53-66.

- Turina, M., Ricker, M. D., Lenzi, R., Masenga, V. and Ciuffo, M. (2007): A severe disease of tomato in the Culiacan area (Sinaloa, Mexico) is caused by a new picorna-like viral species. *Plant Disease* 91:932-941.
- Vaira, A. M., Semeria, L., Crespi, S., Lisa, V., Allavena, A. and Accotto, G. P. (1995): Resistance to Tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of *Tomato spotted wilt virus*: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 66-73.
- Valizadeh, M., Valizadeh, J. and Jafari, M. (2011). Identification, distribution and incidence of important tomato and cucurbits viruses in Southeast of Iran. *American Journal of Plant Physiology* 6: 242-251.
- van der Vlugt, R. A. A., Stijger, C. C. M. M., Verhoeven, J. T. J. and Lesemann, D. E. (2000): First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Disease* 84: 103.
- Varia, A. M., Accotto, G. P., Vecchiati, M. and Bragaloni, M. (2002): Tomato infectious chlorosis virus causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica* 30: 290-294.
- Varveri, C. and Boutsika, K. (1999): Characterization of cucumber mosaic cucumovirus isolates in Greece. *Plant Pathology* 48: 95-100.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van den Heuvel, J. F. J. M., Maris, P. C. and van der Vlugt, R. A. A. (2007): Identification and characterisation of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology* 152: 881-890.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van den Heuvel, J. F. J. M., Maris, P. C. and van der Vlugt, R. A. A. (2008): Tomato marchitez virus, a new plant picorna-like virus from tomato related to tomato torrado virus. *Archives of Virology* 153: 127-134.
- Verbeek, M., Dullemans, A., van den Heuvel, H., Maris, P., and van der Vlugt, R. (2010): Tomato chocoláte virus: A new plant virus infecting tomato and a proposed member of the genus *Torradovirus*. *Archives of Virology* 155: 751-755.
- Verdin, E., Gognalons, P., Wipf-Scheibel, C., Bornard, I., Ridray, G., Schoen, L. and Lecoq, H. (2009): First report of *Tomato torrado virus* in tomato crops in France. *Plant Disease* 39: 1352.
- Vlahović, B. i Puškarić, A. (2012): Obeležja potrošnje povrća u Republici Srbiji. Zbornik radova XVII Savetovanja o biotehnologiji, Čačak, Srbija, str. 125-129.

- Vrbničanin, S. i Šinžar, B. (2003): Elementi herbologije sa praktikumom. Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Vučurović, A. (2012): Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava i epidemiologija oboljenja u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu- Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J. i Krstić, B. (2011): Karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom sa tikava u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 26: 325-336.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J. i Krstić, B. (2010): Zastupljenost i molekularna detekcija i identifikacija virusa mozaika krastavca u usevima tikava u Srbiji. Zbornik rezimea X Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 58-59.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J. and Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.
- Vučurović, A., Stanković, I., Milojević, K., Nikolić, D., Berenji, J., Bulajić, A. i 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.
- 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.
- Weekes, R., Barker, I. and Wood, K. R. (1996a): An RT-PCR test for the detection of *Tomato spotted wilt virus* incorporating immunocapture and colorimetric estimation. *Journal of Phytopathology* 144: 575-580.
- Weekes, R., Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996b): Diagnosis of *Tospoviruses* by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 431: 159-166.
- Wijnands, J. (2003): The international competitiveness of fresh tomatoes, peppers and cucumbers. *Acta Horticulturae* 611: 79-90.

- Wilson, C. R. (2001): Resistance to infection and translocation of *Tomato spotted wilt virus* in potatoes. *Plant Pathology* 50: 402-410.
- Wintermantel, W. M. (2004): Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. *APSnet Features*. Online. doi:10.1094/APSnetFeature-2004-0604.
- Wisler, G. C., Duffus, J. E., Liu, H.-Y. and Li, R. H. (1998a). Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease* 82: 270-280.
- Wisler, G. C., Li, R. H., Liu, H.-Y., Lowry, D. S. and Duffus, J. E. (1998b): Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem-limited bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88: 402-409.
- Wisler, G. C., Liu, H.-Y., Klaassen, V. A., Duffus, J. E. and Falk, B. W. (1996): Tomato infectious chlorosis virus has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of the closteroviruses. *Phytopathology* 86: 622-626.
- Xu, H. and Nie, J. (2006): Identification, characterization and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in potato. *Phytopathology* 96: 1237-1242.
- Xu, P., Li, M., Lin, Q., Xie L. (1999): Comparative studies on properties of five *Cucumber mosaic virus* isolates infecting *Passiflora* in China. *Virologica Sinica* 14: 73-79.
- Youssef A. (2017): Sequence Analyses of Novel Potato Virus YNTN and Resistance-Breaking PVYO Isolates from Sweden. Master's thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.
- Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2005): Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123: 155-161.
- Zaitlin, M. (1999): Elucidation of the genom organization of *Tobacco mosaic virus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 354: 587-591.
- Zaitlin, M. and Israel, H. W. (1975): *Tobacco mosaic virus* (type strain). CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 151.
- Zeidan, O. (2016): Growing tomatoes in greenhouses and nethouses (practical field manual), Ministry of Agriculture and Rural Development, Extension Service, Israel.

Zhang, L., Kim, Ch. H. and Palukaitis, P. (1994): The chlorosis-induction domain of the satellite RNA of cucumber mosaic virus: Identifying sequences that affect accumulation and the degree of chlorosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 7: 208-213.

BIOGRAFIJA

Diplomirani inženjer Dušan Nikolić rođen je 30.07.1986. godine u Kruševcu. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završio je 2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,55 (devet 55/100). Diplomski rad pod nazivom: „*Fusarium* spp. na semenu nevena“ odbranio je sa ocenom 10 (deset). Dobitnik je nagrade Zadužbine Nikole Spasića za najboljeg diplomiranog studenta Poljoprivrednog fakulteta 2010. godine, a školske 2008/2009. godine bio je stipendista Fonda za mlade talente (Ministarstvo omladine i sporta, Republike Srbije). Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2010/2011. godine, smer Poljoprivredne nauke: modul Fitomedicina. Doktorsku disertaciju pod naslovom „Diverzitet i karakterizacija virusa paradajza u Srbiji“ prijavio je 08.10.2012. godine, a njena izrada je odobrena na sednici Veća naučnih oblasti biotehničkih nauka Univerziteta u Beogradu održanoj 06.12.2012. godine.

Od 2011-2013. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od 01.11.2013. godine kao istraživač-saradnik angažovan je na Katedri za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na projektu „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“ (evidencioni broj projekta III 43001). Odlukom Naučnog veća Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu (broj 993 od 11.06.2012. godine) izabran je u istraživačko zvanje istraživač-saradnik, a 23.04.2015. godine reizabran u isto zvanje na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitetu u Beogradu (odluka br.300/7-6 od 23.04.2015. godine). Od 01.11.2013. godine zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu, kao istraživač-saradnik na projektu.

Tokom dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada Dušan Nikolić, dipl. inž. učestvovao je na više treninga i obavio je nekoliko specijalizacija.

Od 1-5.10.2012. godine učestvovao je na treningu: „Genetic improvement for plant resistance“ u organizaciji European Commission TEMPUS.

Od 3-6.07.2013. godine učestvovao je na treningu: „Clinical Field and Lab Plant Disease Diagnosis“, Biological Control and Specimen Collection“ u organizaciji European Union TEMPUS.

Od 9-20.11.2015. bio je učesnik kursa: “Mini-course in professional speaking skills” u okviru AREA projekta.

Od 3-22.04.2016. godine učestvovao je na kursu: „Course in Integrated Pest Management“ održanom u Volcani Agricultural Research Center pod pokroviteljstvom Israel Agency for International Development Cooperation (MASHAV).

Od 9-20.05.2016. godine učestvovao je na kursu: „Mini-Course on the Responsible Conduct of Research“ u okviru AREA projekta.

Od 25-29.09.2017. godine učestvovao je na treningu: BioLink COST ACTION training school „Soil biodiversity in tree crops“ u okviru COST FP1305 projekta.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije, Srpskog mikrobiološkog društva i Društva virusologa Srbije.

U toku dosadašnjeg bavljenja istraživačkim radom, dipl. inž. Dušan Nikolić je objavio ili saopštio ukupno 40 naučnih radova, od čega 16 objavljenih i 24 saopštenih. U vodećim međunarodnim časopisima kategorije M21 - News Item objavio je 11 radova, jedan rad iz kategorije M22, jedan rad iz kategorije M24, jedan rad iz kategorije M51 i dva rada iz kategorije M52. Od ukupno 24 saopštena rada, devet je saopšteno na međunarodnim naučnim skupovima, od kojih je jedan štampan u celosti, a 15 je saopšteno na domaćim skupovima.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Dušan Nikolić _____

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije _____ 10/18 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Diverzitet i karakterizacija virusa paradajza u Srbiji

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 30.03.2018. _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dušan Nikolić

Broj indeksa 10/18

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Diverzitet i karakterizacija virusa paradajza u Srbiji

Mentor prof. dr Branka Krstić, redovni profesor

Potpisani/a Dušan Nikolić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja 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 doktoranda

U Beogradu, 30.03.2018.

Izjava o korišćenju

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

Diverzitet i karakterizacija virusa paradajza 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 Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 30.03.2018.

Potpis doktoranda
