

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Dragana N. Milošević

**DIVERZITET I KARAKTERIZACIJA VIRUSA
PAPRIKE U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dragana N. Milošević, MsC

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

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Komisija za ocenu i odbranu:

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

Članovi komisije: dr Mirko Ivanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet

dr Zorica Nikolić, naučni savetnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Mirjana Milošević, naučni savetnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, TR31030, pod nazivom: «Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru».

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru profesorki dr Branki Krstić, koja je definisala plan i program istraživanja ove aktuelne i savremene teme. Takođe se zahvaljujem na svemu što me je naučila, na nesebično prenetom znanju i bezrezervnoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se profesorki dr Aleksandri Bulajić i profesoru dr Mirku Ivanoviću, na konstruktivnim savetima i sugestijama.

Zahvaljujem se profesorki dr Mirjani Milošević na dragocenoj pomoći i sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu disertacije.

Najlepše hvala dr Zorici Nikolić na razumevanju i korisnim savetima koje mi je pružila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem dr Ivani Stanković na uloženom trudu i pravovremenim savetima u toku ove višegodišnje saradnje.

Takođe, želim da izrazim svoju zahvalnost kolegici mr Maji Ignjatov i ostalim kolegama iz Laboratorije za ispitivanje semena, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo.

DIVERZITET I KARAKTERIZACIJA VIRUSA PAPRIKE U SRBIJI

Rezime. Dvogodišnjim proučavanjima pojave i rasprostranjenosti virusa u usevu paprike u Srbiji utvrđeno je da se virusi javljaju svake godine kako u proizvodnji rasada, tako i u usevu paprike bilo da je gajen u zaštićenom prostoru ili na otvorenom polju. Serološkim analizama prikupljenih uzoraka paprike primenom DAS-ELISA testa, detektovano je prisustvo pet virusa: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) i virus blagog šarenila paprika (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV), koji su se javili u pojedinačnim ili kompleksnim infekcijama. U obe godine istraživanja, utvrđeno je dominantno prisustvo CMV i/ili PVY u proizvodnji rasada, kao i kod oba načina gajenja paprika.

Pregledom useva paprike u različitim lokalitetima gajenja zabeležena je pojava niza simptoma na lišću, stablu, cvetovima i plodovima, koji su upućivali na virusnu zarazu, ali nije bilo moguće utvrditi njihovu povezanost sa detektovanim virusom.

Za molekularnu detekciju i identifikaciju kao i za potvrdu rezultata dobijenih na osnovu antigenih osobina, korišćeni su odabrani izolati virusa paprike koji su detektovani u usevu paprike serološkim analizama. Amplifikacija različitih regiona genoma virusa obavljena je primenom RT-PCR metode korišćenjem odgovarajućih specifičnih prajmera.

Nakon sekvencioniranja i višestrukog uparivanja sekvenci izolata sa sekvencama drugih virusa dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti obavljena je molekularna identifikacija odabranih izolata virusa paprike poreklom iz naše zemlje. Determinisane su nukleotidne sekvence CP gena tri izolata CMV, AMV i PMMoV, sekvence gena za P1 protein tri izolata PVY, sekvence NC gena tri izolata TSWV, kao i nukleotidne sekvence RdRp gena tri izolata PMMoV.

Filogenetska analiza na osnovu sekvenci gena za P1 protein, pokazala je grupisanje izolata PVY iz Srbije u klaster sa ostalim evropskim izolatima nekrotičnih sojeva, zatim na osnovu sekvenci CP gena izolata CMV, utvrđena je pripadnost ispitivanih izolata iz paprike podgrupi IA gde je svrstana većina sojeva iz drugih delova sveta. Filogenetska analiza izolata TSWV pokazuje grupisanje ispitivanih izolata u klaster koji čini većina izolata iz Evrope, dok je na osnovu sekvence CP gena izolata

AMV, pokazano grupisanje izolata u četiri genetička soja, gde se većina izolata, uključujući i ispitivane, izdvojila u grupu I. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence CP gena izolata PMMoV, pokazalo je svrstavanje ispitivanih izolata u prvu grupu sa izolatima koji izazivaju hipersenzitivnu reakciju (HR) na paprici koja je nosilac L^3 rezistentnog gena.

U okviru ove disertacije proučavana je prisutnost i rasprostranjenost virusa paprike u Srbiji, usvojene su i poboljšane molekularne tehnike njihove detekcije, identifikacije i dat je doprinos boljem razumevanju njihovog porekla i širenja u našoj zemlji.

Ključne reči: paprika, virusi, *Cucumber mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Tomato spotted wilt virus*, *Alfalfa mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, DAS–ELISA, RT-PCR.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 578.869:635.649(497.11)(043.3)

DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF PEPPER VIRUSES IN SERBIA

Abstract. A two-year investigation of the presence and distribution of pepper viruses in Serbia revealed that viruses occur each year of transplant, and also in greenhouse and in open field production. Serological analyses of collected pepper samples using DAS-ELISA test detected the presence of five viruses: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), which occurred in single or complex infections. The prevalence of CMV and/or PVY was found in both years of investigation in transplant production and in both ways pepper is grown in Serbia.

Survey of pepper crops in different growing regions indicated the occurrence of a number of symptoms on leaves, stem, flowers and fruit, which resembled those of virus infection, but it was not possible to determine their association with detected virus.

Selected pepper virus isolates were used for molecular detection and identification as well as for confirmation of the results obtained on the basis of antigenic properties, which have been detected in a crop of pepper by serological analysis. The amplification of different genome regions was performed by RT-PCR method, using specific corresponding primers of the respective viruses.

After the sequencing, sequences of Serbian virus isolates were compared with the respective virus sequences available in the GenBank and calculation of genetic homology was performed for molecular identification of selected isolates of the pepper viruses originating from our country. Nucleotide sequences of CP gene of three isolates of CMV, AMV and PMMoV, the P1 protein gene sequence of three PVY isolates, sequences of NC gene of three TSWV isolates and nucleotide sequences of RdRp gene of three PMMoV isolates were determined.

Phylogenetic analysis based on gene sequences for P1 protein showed a grouping of PVY isolates from Serbia in a cluster with other European isolates of necrotic strains. On the basis of CP gene phylogenetic analysis, it was shown that tested pepper CMV isolates from Serbia belong to subgroup IA, where most strains from the other parts of the world are classified. Phylogenetic analysis of TSWV isolates showed grouping of Serbian isolates into cluster with most of the isolates from Europe, while, based on the CP gene sequences of AMV isolates, showed grouping of isolates into four genetic strains, where most of the isolates, including tested, allocated in group I.

Reconstructed phylogenetic tree based on CP gene sequences of PMMoV isolates showed that the tested isolates belong to the first group of isolates with the isolates that cause hypersensitive response (HR) on pepper carrying the L3 resistant gene.

The present study investigated the presence and distribution of pepper viruses in Serbia the molecular methods for their detection, identification and characterization were implemented and improved, and contribution regarding better understanding of their origin and expansion in our country was done.

Key words: pepper, viruses, *Cucumber mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Tomato spotted wilt virus*, *Alfalfa mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, DAS-ELISA, RT-PCR

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 578.869:635.649(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Paprika kao gajena biljka	4
2.1.1. Poreklo paprike.....	4
2.1.2. Naziv i podela paprike.....	4
2.1.3. Morfologija paprike.....	6
2.1.4. Gajenje paprike.....	6
2.1.5. Značaj i perspektive gajenja paprike.....	7
2.2. Bolesti i štetočine paprike.....	8
2.3. Virusi paprike i njihov značaj.....	9
2.4. Proučavanja virusnih oboljenja paprike u svetu.....	9
2.5. Proučavanja virusnih oboljenja paprike u našoj zemlji.....	10
2.6. Pregled virusa koji se najčešće javljaju u rasadu, zaštićenom prostoru i na otvorenom polju.....	11
2.7. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa paprike.....	12
2.7.1. Virus mozaika krastavca (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV).....	12
2.7.2. Virus crtičastog mozaika krompira (<i>Potato virus Y</i> , PVY).....	15
2.7.3. Virus bronzavosti paradajza (<i>Tomato spotted wilt virus</i> , TSWV).....	19
2.7.4. Virus mozaika duvana (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV).....	24
2.7.5. Virus mozaika lucerke (<i>Alfalfa mosaic virus</i> , AMV).....	26
2.7.6. Virus blagog šarenila paprike (<i>Pepper mild mottle virus</i> , PMMoV).....	28
2.8. Kontrola virusnih oboljenja paprike.....	30
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka paprike.....	33
4.2. Direktni imunoenzimski metod na ploči (DAS–ELISA).....	34
4.3. Molekularna detekcija virusa paprike primenom reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (RT–PCR).....	37
4.3.1. Ekstrakcija RNA iz biljnog materijala.....	38
4.3.2. Molekularna detekcija izolata CMV.....	39
4.3.3. Molekularna detekcija izolata PVY.....	41
4.3.4. Molekularna detekcija izolata TSWV.....	42
4.3.5. Molekularna detekcija izolata AMV.....	44
4.3.6. Molekularna detekcija izolata PMMoV.....	45
4.3.7. Vizuelizacija PCR produkta.....	47
4.4. Molekularna identifikacija virusa paprike.....	48
4.5. Filogenetska analiza.....	50
5. REZULTATI	57
5.1. Simptomi u rasadu, zaštićenom prostoru i polju.....	57
5.2. Serološka detekcija virusa.....	59
5.2.1. Prisustvo i rasprostranjenost virusa u usevu paprike tokom 2009. godine.....	59
5.2.2. Prisustvo virusa u usevu paprike tokom 2010. godine.....	66
5.2.3. Rasprostranjenost virusa paprike i prisustvo virusa na pojedinim sortama.....	73
5.2.4. Zastupljenost virusa paprike u obe ispitivane godine.....	75
5.3. Simptomi virusa paprike.....	79
5.4. Molekularna detekcija izolata virusa paprike.....	87
5.4.1. Ekstrakcija RNA iz biljnog materijala.....	87

5.4.2. Molekularna detekcija izolata CMV.....	87
5.4.3. Molekularna detekcija izolata PVY.....	88
5.4.4. Molekularna detekcija izolata TSWV.....	89
5.4.5. Molekularna detekcija izolata AMV.....	92
5.4.6. Molekularna detekcija izolata PMMoV.....	93
5.5. Molekularna identifikacija izolata virusa paprike poreklom iz Srbije.....	95
5.5.1. Molekularna identifikacija izolata CMV.....	95
5.5.2. Molekularna identifikacija izolata PVY.....	96
5.5.3. Molekularna identifikacija izolata TSWV.....	97
5.5.4. Molekularna identifikacija izolata AMV.....	98
5.5.5. Molekularna identifikacija PMMoV.....	99
5.6. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa paprike u Srbiji.....	101
5.6.1. Filogenetska analiza sekvenci CMV.....	101
5.6.2. Filogenetska analiza sekvenci PVY.....	104
5.6.3. Filogenetska analiza sekvenci TSWV.....	107
5.6.4. Filogenetska analiza sekvenci AMV.....	109
5.6.5. Filogenetska analiza sekvenci PMMoV.....	112
6. DISKUSIJA.....	114
6.1. Serološka identifikacija virusa paprike.....	115
6.2. Povezanost simptoma na prirodno zaraženim biljkama paprike i detektovanih virusa..	119
6.3. Molekularna detekcija i identifikacija virusa paprika.....	121
6.3.1. Detekcija CMV primenom RT–PCR metode.....	122
6.3.2. Detekcija PVY primenom RT–PCR metode.....	123
6.3.3. Detekcija TSWV primenom RT–PCR metode.....	124
6.3.4. Detekcija AMV primenom RT–PCR metode.....	125
6.3.5. Detekcija PMMoV primenom RT–PCR metode.....	126
6.4. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata virusa paprike poreklom iz Srbije sa izolatima virusa iz drugih delova sveta.....	126
6.4.1. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata CMV.....	127
6.4.2. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata PVY.....	128
6.4.3. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata TSWV.....	129
6.4.4. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata AMV.....	131
6.4.5. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata PMMoV.....	132
6.5. Filogenetska analiza virusa paprike.....	133
6.5.1. Filogenetska analiza CMV izolata.....	133
6.5.2. Filogenetska analiza PYV izolata.....	135
6.5.3. Filogenetska analiza TSWV izolata.....	136
6.5.4. Filogenetska analiza AMV izolata.....	138
6.5.5. Filogenetska analiza PMMoV izolata.....	139
7. ZAKLJUČAK.....	141
8. LITERATURA.....	145
PRILOZI.....	178
BIOGRAFIJA.....	200
IZJAVE.....	201

1. UVOD

Po svom poreklu, paprika (*Capsicum annuum* L.) je tropska biljka poreklom iz Centralne i Južne Amerike, odakle su je Španci doneli u Evropu početkom XVI veka. U naše krajeve dospela je iz Turske, te je, turski, mađarski, nemački i naš naziv ove biljke isti (**Greenleaf, 1986**).

Paprika u našoj zemlji ima veliki privredni značaj i spada u grupu najznačajnijih povrtarskih useva. Površine pod paprikom variraju iz godine u godinu sa tendencijom povećanja. U svetu, paprika se gaji na oko 1.600.000 ha sa prosečnim prinosom od 14 t/ha, dok se u Srbiji proizvodi na oko 21.000 ha, sa prosečnim prinosom od 8,3 t/ha (**Gvozdenuć, 2010**). Površine pod paprikom u našoj zemlji povećavaju se pre svega u Vojvodini i u područjima gde ima prerađivačkih kapaciteta. Razlog za povećanje površina, kako kod nas tako i u svetu, je zbog kvalitetnije ishrane i biološki važnih materija u paprici (**Marković, 2004**).

U nacionalnoj privredi zemlje ovo povrće ima veliki značaj, kako za ishranu stanovništva, tako i u međunarodnoj trgovini, jer se pored izvoza u svežem stanju, izvoze i razni proizvodi od paprike, kao i začini, što svakako čini i devizni priliv zemlji.

Gaji se na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru. Zbog višestrukog načina upotrebe u ishrani kao i u prerađivačkoj industriji, smatra se veoma cenjenim povrćem. U zavisnosti od sorte i cilja proizvodnje, koristi se u tehnološkoj (upotrebnoj) ili fiziološkoj (botaničkoj) zrelosti u svežem i prerađenom stanju, dok se začinska koristi za proizvodnju mlevene začinske paprike (**Jovanović, 1946**). Mlevena začinska paprika se dobija od fiziološko zrelih i osušenih plodova. To je začim crvene boje, dobre moći bojenja, prijatnog mirisa, a poboljšava ukus i miris hrani.

Brojne biljne bolesti izazvane gljivama, bakterijama i virusima mogu da smanje ili ugroze uspešnu proizvodnju kako semenske tako i konzumne paprike ometajući normalan razvoj biljke i umanjujući prinos i kvalitet plodova. Fitopatogeni virusi predstavljaju grupu patogena koji svake godine odnose deo roda paprike, a nije retkost da prouzrokuju gubitke i do 90% (**Krstić i Bulajić, 2008**). Velike štete mogu da nastanu naročito kad je usev zaražen sa dva ili više virusa usled ispoljavanja sinergističkog delovanja. Takođe, velike štete mogu nastati ako se zaraze jave u ranim fazama razvoja biljke, pre svega ukoliko dođe do zaraze rasada. Praćenje pojave virusa, njihova detekcija i identifikacija, kao i utvrđivanje prevalentnih virusa za određene regione

gajenja prvi je i osnovni korak u sprečavanju njihovog širenja kada se već pojave u usevu paprike ili sprečavanju ponovne pojave u sledećem ciklusu proizvodnje.

Zbog značajnih šteta koje često prouzrokuju, viroze paprike su predmet proučavanja mnogih autora u svetu (**Choi et al., 2005a; Arli-Sokmen et al., 2005; Ozaslan et al., 2006**). U Srbiji, prva proučavanja virusa paprike bila su vazana za virus mozaika duvana (**Panjan i Prpić, 1955**), virus mozaika krastavca i virus mozaika lucerke (**Šutić, 1959; Delević, 1963**). Dosadašnja malobrojana proučavanja utvrdila su prisustvo sledećih virusa paprike u Srbiji: virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus mozaika krompira (*Potato virus X*, PVX) i virus blagog šarenila paprike (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) (**Mijatović, 1986; Mijatović i sar., 1999, 2002, 2005; Krstić i sar., 1996**).

Iako su simptomi izazvani virusima veoma varijabilni i zavise od domaćina, ekoloških uslova i vrste virusa, najčešći simptomi su nekrotične pege, crtičavost, prstenaste pege, zakržljalost, uvenuće, itd. Simptomi na zaraženim biljkama, mogu ličiti na simptome mikozne ili bakterijske bolesti, a takođe često može da dođe do zabune između simptoma viroznih oboljenja i simptoma koji se javljaju pod uticajem herbicida ili oštećenja od zagađenja vazduha ili mineralnih nedostataka. Dakle, ako se dijagnostika viroza na biljkama vrši samo na osnovu simptoma često može da dođe i do grešaka (**Ozaslan et al., 2006**).

S obzirom da virusi svake godine smanjuju prinos i kvalitet paprike u našoj zemlji, a pojedinih godina se javljaju u epidemijским razmerama, stalno praćenje prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti viroza paprike, pravilna detekcija prouzrokovala i kombinovanje različitih metoda u cilju njihove identifikacije i karakterizacije, od velikog su značaja i imaju kao osnovni cilj razvijanje i primenu adekvatnih i pravovremenih mera kontrole.

Imajući u vidu navedene činjenice, ova doktorska disertacija predstavlja doprinos sveobuhvatnijem sagledavanju problematike koju virusi izazivaju u proizvodnji paprike, a posebno unapređenju metoda detekcije, identifikacije i

karakterizacije virusa prisutnih u našoj zemlji, kao osnov za razumevanje epidemiologije u cilju uspešne prevencije i kontrole virusnih bolesti paprike u Srbiji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Paprika kao gajena biljka

2.1.1. Poreklo paprike

Mišljenja o poreklu paprike su podeljena. Većina smatra da ona vodi poreklo iz Južne Amerike, Brazila i severnih zemalja Južne Amerike, kao i iz Centralne Amerike, Meksika, Gvatemale, Tihookeanskih ostrva i Antila. Iz ovih krajeva paprika je prenešena na sever (u SAD) i na jug (u Kolumbiju, Venecuelu, Ekvador, Peru, Boliviju, Paragvaj, Čile, Argentinu i Urugvaj) (**Veselinov, 1984**).

Takođe, postoji, mišljenje da paprika vodi poreklo iz Azije, i to iz zapadnog dela Indije. Kao potvrdu ovom tvrđenju navodi se da su kod cara Nerona pronađene slike paprika pod nazivom Piper i Rotunde, što odgovara današnjem nazivu ove vrste povrća na jeziku raznih naroda (**Filov, 1956**).

Nakon otkrića Amerike, paprika je prenetu u Evropu i raširena po celom svetu. Prvi su za nju saznali Španci, jer ju je Kolombo preneo iz Novog Sveta, sa svog drugog puta u Ameriku, 1493. godine. U početku je gajena u baštama kao ukrasna biljka, a zatim kao povrće za jelo i začim. Gajenje je prvo prošireno u Portugaliji, a zatim i u drugim evropskim zemljama. Već u XVII veku više nije korišćena samo kao začim nego i kao salata, naročito u Španiji, Italiji i na Balkanu. U našu zemlju paprika je prenetu iz Turske, i to za vreme turske okupacije u XVII veku (**Veselinov, 1984**).

2.1.2. Naziv i podela paprike

Ime paprika potiče od grčke reči *peperi* i latinske reči *piper* što znači crni biber. Naš naziv za papriku takođe potiče od grčko-latinske reči *peperi-piper*, što znači biber. U početku gajenja paprike smatralo se da je to zamena za biber, pre svega zbog ljutine. Srpski, turski i mađarski naziv je isti – *paprika*, pa vlada mišljenje da je u Srbiji i Mađarskoj dospela iz Turske. Kod većine naziva, osnova reči paprike u imenu je *piper*.

Paprika pripada familiji Solanaceae (pomoćnica), rodu *Capsicum* i vrsti *annuum*. Sva proučavanja vezana za klasifikaciju zasnivaju se na morfološkim i biološkim

karakteristikama najrazličitijih formi paprike sakupljenih u rod *Capsicum* koji ima 25 vrsta, a najznačajnije su sledećih pet (**Bosland et al., 1994**):

1. *Capsicum frutescens* L. – višegodišnja paprika, visine stabla 30-60 cm. Cvetovi imaju 5-6 kruničnih listića krem do belozelene boje. Plodovi su sitni i biljke su samonikle (divlje forme) iz Brazila, Venecuele, Meksika, Kube, Kostarike i Perua.
2. *Capsicum pubescens* Ruit at Pavon – višegodišnja biljka, razgranatog stabla. Ima plave cvetove, a seme sitno i crno. Domovina ove paprike je Peru, Kolumbija i Gvatemala.
3. *Capsicum baccatum* L. – višegodišnja vrsta iz Južne Amerike. Odlikuju se razgranatom biljkom, cvetovi su žuti, beli ili boje kafe. Plodovi su trešnjolike do izdužene forme na dugim drškama. Posebno su otporni na sušu i niske temperature.
4. *Capsicum chinense* L. – vodi poreklo iz Amazona i trougla Kariba, Centralne i Južne Amerike. Cvetovi su joj krem bele boje, a prašnici plave, dok je plod različite veličine, oblika i boje.
5. *Capsicum annuum* L. – jednogodišnja vrsta, za gajenje u tropskim uslovima i u zaštićenom prostoru. Kod nas je to jednogodišnja zeljasta biljka koja bi mogla biti i dvogodišnja pri gajenju u područjima toplog klimata ili u zaštićenom prostoru.

Od navedenih vrsta najrasprostranjenija je i najveći privredni značaj ima *Capsicum annuum* koja se deli na sledeće podvrste:

1. *Capsicum annuum* ssp. *macrocarpum*,
var. *grossum*
var. *longum*
2. *Capsicum annuum* ssp. *microcarpum*,
var. *chipka* P.
var. *cerasiforme* Mill
3. *Capsicum annuum* ssp. *fasciculatum*

2.1.3. Morfologija paprike

Korenov sistem paprike jako je razgranat i žiličast. Najvećim delom se nalazi u oraničnom sloju, slabe usisne i regenerativne moći. Stablo je zeljasto i razgranato, čvrsto, starenjem donji delovi odrvenjavaju. Visina stabla se kreće od 30-90 cm, mada, u zaštićenom prostoru, može da dostigne visinu i preko 2 m. Paprika je dikotiledona kultura. Pravi listovi su prosti, eliptični, jajoliki, zašiljeni na dugoj peteljci sa izraženim glavnim nervom. Krupnoplode paprike imaju širokoeliptične liske i obrnuto, sitnoplode imaju uskolancetaste liske. Površina lista je glatka. Kod nekih sorti manje ili više je izražena maljavost. Cvetovi paprike su najčešće pojedinačni, dok u nekim slučajevima mogu se javiti dva do tri zajedno. Cvet paprike je hermafroditan (dvopolan) i nalazi se u pazuhu listova. Svojom građom cvet je podešen za samooplodnju, međutim postoji i mogućnost stranooplodnje.

Plod, u botaničkom smislu, je šuplja bobica na kojoj razlikujemo perikarp (mesnati deo ploda), centralnu placentu (semenošu), bočne placente (pregrade i žilice), seme, čašicu i peteljku. Plod paprike je veoma različit i zavisi od sorte. Osnovne razlike se uočavaju u obliku ploda, veličini, površini, boji, debljini perikarpa, ljutini, građi čašice i drške ploda, kao i položaju ploda na biljci (babure, paradajz paprike, dugačke, feferone, trešnjolike i buketne paprike) (**Merkulov i sar., 2000**). Duž unutrašnje strane "mesa" ploda (perikarpa) u obliku trake, od osnovice pa do vrha ploda, proteže se uzdužna ili bočna placenta (žilica ili pregrada). Na svim žilicama nalaze se žlezde koje sadrže kapsaicin. Ukus ploda paprike potiče od alkaloida kapsaicina i prema njegovoj količini, plod može biti ljut, srednje ili slabo ljut i sladak. Seme paprike je tanko, pljosnato, bubrežastog oblika, sa izraženim ožiljkom, spojnim mestom sa placentom ploda. Prečnik semena je 3-5 mm, debljine 0,5-1 mm. Semena ljuska (semenjača) je glatka, čvrsta, debela, zlatno-žute do sive boje.

2.1.4. Gajenje paprike

Paprika se u svetu gaji na oko 1.600.000 ha sa prosečnim prinosom od 14 t/ha. U Srbiji se gaji na površini od oko 21.000 ha sa prosečnim prinosom od 8,3 t/ha (**Gvozdrenović, 2010**).

Najveći proizvođači paprike u svetu su Kina i Indonezija. Kina ima relativno visoke prosečne prinose (12 t/ha) dok Indonezija ima niske (2,5 t/ha). Najveće prosečne

prinosima ima Španija (26,6 t/ha) i Italija (23,8 t/ha). Porast površina pod paprikom u našoj zemlji je pre svega u Vojvodini i u područjima gde ima prerađivačkih kapaciteta. Razlog za povećanje površina, kako u svetu tako i kod nas, je zbog kvalitetnije ishrane i biološki važnih materija u paprici. Rezultati niskih prinosa kod nas su nedovoljno poznavanje bioloških osobina paprike i neodgovarajuće agrotehnike, kao i nepravovremena i neodgovarajuća kontrola biljnih bolesti.

Paprika se gaji kao jednogodišnja ili višegodišnja kultura u zavisnosti od klimatskih uslova i regiona. Kod nas se gaji jednogodišnja paprika, jer to diktiraju klimatski uslovi. Uspeva u svim rejonima naše zemlje gde su srednje dnevne temperature za vreme vegetacije iznad 15°C. Kod nas se gaje razni tipovi paprike, kako za potrošnju u svežem stanju i preradu u razne proizvode, tako i za proizvodnju začina. Gajenje začinske paprike je uglavnom skoncentrisano u Vojvodini gde se nalazi oko 80% celokupne proizvodnje u Srbiji. Kod nas se začinska paprika gaji na oko 4.000 do 5.000 ha godišnje (**Marković i Vračar, 1998**).

2.1.5. Značaj i perspektive gajenja paprike

U nacionalnoj privredi zemlje ovo povrće ima veliki značaj, kako za ishranu stanovništva, tako i u međunarodnoj trgovini, jer se pored izvoza u svežem stanju izvoze i razni proizvodi od paprike, kao i začini, što svakako čini i devizni priliv zemlji.

Značaj paprike proizilazi i po površinama na kojima se gaji. Ona je pre svega visokoakumulativna kultura jer ostvaruje visok dohodak po jedinici površine. Veoma je intenzivna kultura. Gaji se na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru. Zbog višestrukog načina upotrebe u ishrani kao i u prerađivačkoj industriji, smatra se veoma cenjenim povrćem. U zavisnosti od sorte i cilja proizvodnje, koristi se u tehnološkoj (upotrebnoj) ili fiziološkoj (botaničkoj) zrelosti u svežem i prerađenom stanju, dok se začinska koristi za proizvodnju mlevene začinske paprike. Mlevena začinska paprika se dobija od fiziološko zrelih i osušenih plodova. To je začim crvene boje, dobre moći bojenja, prijatnog mirisa, a poboljšava ukus i miris hrani (**Jovanović, 1946**).

2.2. Bolesti i štetočine paprike

Kako se paprika gaji zbog ploda, bitno je da se pored prinosa, ostvari i visok kvalitet ploda. Jedan od uslova za postizanje visokog prinosa i dobrog kvaliteta ploda paprike je efikasna zaštita od štetnih organizama, uzročnika bolesti, štetočina i korova.

Bolesti paprike se javljaju još u rasadničkom periodu naročito za vreme hladnih i oblačnih dana koja nastaju aktivnošću fitopatogenih organizama. Osetljiva je na gljive, bakterije, viruse, pa i fitoplazme. Korišćenje lošeg semena, supstrata, loše higijene i uopšte nepovoljnih uslova, uzrok su pojave različitih oboljenja. Jedno od bitnih oboljenja rasada paprike je poleganje rasada izazvano gljivom *Rizoctonia solani*, koja izaziva trulež korena i prizemnog dela stabla kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju (Ivanović i Ivanović, 2001).

Jedna od ekonomski najznačajnijih gljivičnih bolesti paprike kod nas je plamenjača čiji je prouzrokovač *Phytophthora capsici* a izaziva uvenuće i sušenje biljaka kao i trulež stabla pri osnovi (Mijatović i sar., 2007). Takođe, postoji još nekoliko bitnih oboljenja paprike među kojima je zeleno uvenuće koje prouzrokuje gljiva *Verticillium albo-atrum*, zatim *Botrytis cinerea* prouzrokovač sive plesni koji kod mladih biljaka izaziva poleganje ili topljenje rasada, dok se kod starijih biljaka na stablu javljaju sivomrke pege. Pepelnicu paprike prouzrokuje gljiva *Leveillula taurica* pri čemu se pojavljuju hlorotične mrlje na gornjoj strani lista koje ga mogu u potpunosti prekriti. Na lišću biljaka zaražene gljivom *Alternaria* spp. koja prouzrokuje crnu pegavost, javljaju se pege koje su krupne, sivomrke, sa crnim koncentričnim krugovima i oivičeni hlorotičnim oreolom. Pege se mogu pojaviti i duž stabla i na plodovima (Jovićević i sar., 2006; Ivanović i Ivanović, 2001).

Od bakterioza na paprici se javlja bakteriozna plamenjača rasada i nekrotična pegavost lišća (prouzrokovač *Pseudomonas syringae*) (Buonaurio and Scortichini, 1994) i bakteriozna pegavost i krastavost plodova paprika (prouzrokovač *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) (Ignjatov i sar., 2010).

Pored gljiva, bakterija i virusa, na paprici problem predstavljaju lisne vaši i tripsi. Papriku zaražava veći broj virusa koji se prenose na neperzistentan način većim brojem raznih vrsta vaši. Dosadašnja ispitivanja pokazala su da su vaši *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* ispoljile naročitu aktivnost u prenošenju virusa na papriku. Posle ishrane

na zaraženoj biljci, *M. persicae* je, na primer, sposobna da u toku prvih pet minuta obavi najveći broj zaraza, a svoju vektorsku aktivnost zadržava najčešće 10 do 30 minuta, a najduže do 4 časa. Smatra se da je TSWV najrasprostranjeniji virus u svetu, zahvaljujući brzom ekspanziji svog najefikasnijeg vektora-kalifornijskog tripsa, *Frankliniella occidentalis*. Međutim, njegovi prenosioci mogu biti i drugi tripsi *Thrips tabaci*, *Frankliniella schultzei* i *F. fusca*. Pošto su populacije vaši i tripsa skoro redovno mnogobrojne, to je i njihova uloga u prenošenju virusa veoma značajna.

2.3. Virusi paprike i njihov značaj

Utvrđeno je da više od 45 različitih virusa može da zarazi papriku, ali se smatra da je među njima svega nekoliko ekonomski značajno (**Green and Kim, 1990**). Lista virusa infektivnih za papriku stalno se proširuje ne samo zbog pojave novih virusa već i zbog nastanka novih patotipova/sojeva u okviru populacije pojedinih virusa. Pojava i rasprostranjenost većine vrsta virusa zavise od brojnih faktora kao što su region i lokacija gajenja, vegetaciona sezona, genotip paprike i drugih. Neki virusi su široko rasprostranjeni, kao što su *Cucumber mosaic virus* (virus mozaika krastavca, CMV), *Tobacco mosaic virus* (virus mozaika duvana, TMV), *Potato virus Y* (virus crtičastog mozaika krompira, PVY) i *Alfalfa mosaic virus* (virus mozaika lucerke, AMV), dok su drugi još uvek vezani samo za određena geografska područja (*Begomovirus*-i) (**Krstić i Bulajić, 2008**). Međutim, situacija se vremenom menja. Najbolji primer za to je *Tomato spotted wilt virus* (virus bronzavosti paradajza, TSWV). Ovaj virus se ranije češće javljao u suptropskim i tropskim regionima, ali danas je opšte rasprostranjen na svojim brojnim domaćinima, uključujući i papriku (**Krstić i Bulajić, 2007**).

2.4. Proučavanja virusnih oboljenja paprike u svetu

Zbog značajnih šteta koje često prouzrokuju, viroze paprike su predmet proučavanja mnogih autora u svetu. **Conti and Masenga (1977)**, proučavajući prisustvo virusa infektivnih za papriku u Italiji, utvrdili su da je najzastupljeniji bio CMV u 80,2% biljaka paprike gajene na otvorenom prostoru, dok je u zaštićenom prostoru najzastupljeniji bio TMV sa 84%. Osim ova dva virusa zabeleženo je prisustvo i PVY,

AMV, *Potato virus X* (virus mozaika krompira, PVX), *Broad bean wilt virus* (virus uvenulosti boba, BBWV) i *Tobacco rattle virus* (virus šuštavosti duvana, TRV). Prema istraživanjima **Gaborjanyi et al. (1998)**, najzastupljeniji virusi paprike u Mađarskoj su TMV, CMV, PVY i TSWV, čije se infekcije kreću i do 100%. Prema podacima **Kovačevskog (1977) (loc. cit. Mijatović i sar., 1999)**, u Bugarskoj je inficiranost paprike sa CMV iznosila 80% do 90%, a u nešto manjem procentu su identifikovani TMV, PVY i TSWV. **Sepulveda et al. (2005)** su konstatovali da je oko 30% paprike u severnom Čileu inficirano sa dva ili više virusa. Detekcijom virusa DAS-ELISA testom utvrđeni su CMV, TSWV, AMV, PVY, *Impatiens necrotic spot virus* (virus nekrotične pegavosti impatiensa, INSV), *Tomato mosaic virus* (virus mozaika paradajza, ToMV) i TMV. Tokom istraživanja koja su sprovedena 1998. i 1999. godine u Turskoj, determinisano je šest virusa AMV, CMV, PVY, ToMV, TMV i TSWV. Od 313 testiranih biljaka, 42 biljke posedovale su mešanu infekciju TMV i PVY (15,4%) što je predstavljalo najčešću mešanu infekciju (**Arlı-Sokmen et al., 2005**). Iako su *Tobacco etch virus* (virus graviranosti duvana, TEV) i PVY najzastupljeniji u stakleničkoj proizvodnji i proizvodnji u polju u Kaliforniji (**Abdalla et al., 1991**), *Pepper mottle virus* (virus šarenila paprike, PepMoV) se često smatra kao uzročnik smanjenja porasta biljaka kao i gubitaka prinosa plodova (**Rodriguez-Alvardo et al., 2002; Yoshihiro et al., 2003**). Takođe, PepMoV je od velike važnosti, i predstavlja najčešće detektovani *Potyvirus* u Južnoj Koreji otkako je dat prvi izveštaj o ovom virusu 1991. godine (**Im et al., 1991**). Međutim, za Korejsku industriju paprike ovo nije patogen sam po sebi toliko problematičan kao CMV i PVY. Ovaj virus je veoma značajan i dovodi do teških gubitaka u prinosu ploda kada se javi zajedno sa *Pepper mild mottle virus* (virus blagog šarenila paprike, PMMoV) (**Jung-Heon et al., 2006**).

2.5. Proučavanja virusnih oboljenja paprike u našoj zemlji

Iako se virusi na paprici kod nas javljaju svake, a pojedinih godina mogu da izazovu epidemije, nisu dovoljno proučeni. U Srbiji, prva proučavanja virusa paprike bila su vezana za TMV (**Panjan i Prpić, 1955**), CMV i AMV (**Šutić, 1959; Delević, 1963**). Dosadašnja malobrojna proučavanja utvrdila su prisustvo sledećih virusa: TSWV, CMV, PVY, AMV, TMV, PMMoV, PepMV i *Pepper veinal mottle virus* (virus

šarenila nerava paprike, PepVMV) (Mijatović, 1986; Krstić i sar., 1996, 2005; Mijatović i sar., 1999, 2002, 2005). Prvih pet virusa ekonomski su značajni u proizvodnji paprike u Srbiji, a ostala tri se javljaju sporadično (Mijatović i sar., 2007; Krstić i Bulajić, 2008). Istraživanja u Srbiji sprovedena 2007. godine na devet lokaliteta gajenja paprike pokazala su prisustvo virusa iz dve osnovne grupacije: karantinski (TSWV) i ekonomski štetni (CMV, AMV i TMV) (Tomić i sar., 2007).

2.6. Pregled virusa koji se najčešće javljaju u rasadu, zaštićenom prostoru i na otvorenom polju

Osobine i biologija svakog virusa određuju njegovu izrazitiju pojavu bilo u zaštićenom prostoru ili na otvorenom polju. Neki od virusa paprike se prenose sokom zaraženih biljaka (mehanički), drugi semenom, vašima ili tripsima, a uglavnom se svi održavaju u korovskim vrstama i drugim gajenim biljkama domaćinima. Dosadašnja proučavanja pokazala su da su za stakleničku proizvodnju više vezani virusi koji se prenose mehanički ili putem zemljišta (zaraženi biljni ostaci u zemljištu) bez vektora, dok se na otvorenom polju češće javljaju virusi koji se prenose insektima vektorima. Na biljkama rasada paprike izvori primarnih virusnih infekcija su zaraženo seme, biljni ostaci i korovi, sa kojih viruse prenose lisne vaši, a takođe gust sklop biljka u lejama pogoduje širenju virusa koji se prenose dodiranjem (Mijatović, 2011)

Jedan od najrasprostranjenijih virusa na paprici je TMV, koji se može održati u zemljištu i nekoliko godina. Širenje virusa sokom zaraženih biljaka, odnosno mehanički, pre svega se odnosi na TMV, PMMoV i ostale *Tobamovirus*-e, i zbog toga mogu se često javiti u stakleničkoj proizvodnji. Za ove viruse nije ustanovljeno širenje vektorima. CMV, PVY i AMV, prenose se biljnim vašima na neperzistentan način, što znači da je njihova pojava veća u proizvodnji na otvorenom polju. Veliki broj vrsta vaši može da prenosi ove viruse, ali najveću aktivnost i efikasnost imaju *Myzus persicae* (zelena breskvina vaš) i *Aphis gossypii* (pamukova vaš). TMV, PMMoV i drugi *Tobamovirusi* i AMV prenose se semenom paprike i to u visokom procentu. Drugi izvor zaraze su zaražene biljke i biljni ostaci u zemljištu, u kojima ovi virusi opstaju toliko dugo dok se zaraženo biljno tkivo ne raspadne, što znači da se zaražene biljke ovim virusima mogu javiti još i u rasadu.

TSWV prenosi se drugom vrstom insekata, tripsima i to na perzistentan način. Tako vektor osim za širenje ujedno služi i za održavanje virusa. Zbog pojave efikasnijeg vektora, *Frankliniella occidentalis*, koji je više vezan za zaštićen prostor, bez obzira što je širenje virusa insektima više vezano za otvoreno polje, virus bronzavosti paradajza ugrožava proizvodnju paprike i u zaštićenom prostoru u našoj zemlji. Ovaj virus se ne prenosi semenom paprike ili drugih biljaka domaćina (**Krstić i Bulajić, 2008**).

2.7. Osnovne karakteristike najznačajnijih virusa paprike

Papriku u prirodnim uslovima zaražava veliki broj virusa, ali mnogi od njih se javljaju sporadično, ne izazivajući velike gubitke u proizvodnji. Kao najzastupljeniji i ekonomski najznačajniji virusi u svetu, ali i u našoj zemlji izdvajaju se CMV, PVY, TSWV, TMV, AMV i PMMoV (**Arlı-Sokmen et al., 2005; Choi et al., 2005a; Ozaslan et al., 2006; Tomić i sar., 2007**).

2.7.1. VIRUS MOZAIKA KRSTAVCA (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) član je roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* (**Rodríguez-Alvarado et al., 1995**).

CMV je opisan pre oko 90 godina, kao prouzrokovatelj opasnog oboljanja krastavca i dinje u SAD-u. Nakon tog perioda, CMV se proširio u mnoge delove sveta i kako u pojedinačnim tako i u mešanim infekcijama, identifikovan je kao uzročnik brojnih epidemija u različitim delovima sveta (**Palukaitis et al., 1992**).

CMV pripada grupi opšte rasprostranjenih virusa infektivnih za papriku. Prisutan je svuda gde se gaje osetljive biljne vrste, mada je pojava oboljenja, koje ovaj virus prouzrokuje, najizraženija u umerenom klimatskom regionu (**Krstić i Vico, 2004**). Oboljenje koje ovaj virus izaziva je geografski široko rasprostranjeno i otkriveno je u Evropi, Australiji, Severnoj Americi (**Zitikaitė and Samuitienė, 2009**). U Srbiji je CMV prvo utvrđen 1956. godine na industrijskoj paprici u Horgošu (**Šutić, 1982**). **Mijatović i sar. (1999)** u svojim istraživanjima navode ovaj virus kao najrasprostranjeniji, kada je bio prisutan u svim ispitivanim lokalitetima sa zarazom i do 100%. Takođe i novija istraživanja pokazuju da je ovaj virus tokom 2007. godine bio

prevalentan u mnogim lokalitetima gajenja paprike kada se zaraza javljala i do 86% (Tomić i sar., 2007).

Štetnost virusa ogleda se u smanjenom prinosu i pogoršanom kvalitetu plodova. U rano zaraženih biljaka, gubici u prinosu su posebno izraženi i mogu se kretati od 60% do 100% (Šutić, 1995).

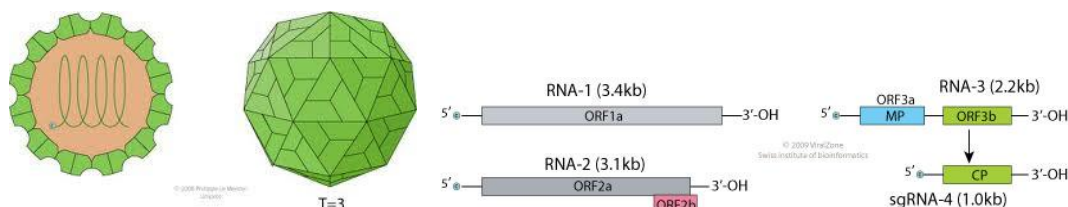
Virus mozaika krastavca može da zarazi 1287 biljnih vrsta u okviru 518 rodova i 100 familija (Edwardson and Christie, 1997). U našoj zemlji, pored zaraze paprike, prisustvo virusa dokazano je i na duvanu, paradajzu, običnoj tikvi, vrgu, dinji, lucerki, crvenoj detelini i pasulju (Šutić, 1995; Mijatović i sar., 1999; Krstić i sar., 2002; Dukić i sar. 2002b; Dukić i sar., 2004a; Petrović, 2008; Đekić, 2010; Vučurović i sar., 2010).

Na donjem starijem lišću javljaju se prstenaste pege ili hrastolike nekrotične šare. Pojava prstenastih pega je česta pojava, a takođe i blagi do umereni mozaik. Rane infekcije značajno smanjuju veličinu, brojnost i kvalitet plodova. Plodovi su kržljavi, deformisani i sa čestom nekrozom površinskog tkiva (Krstić i Bulajić, 2007). Kod nekih osetljivih sorti često se javlja nekroza duž stabla. Virus izaziva metličavost biljaka, odnosno formiranje većeg broja grančica sa skraćenim internodijama i zbijenim lišćem. Ukoliko su infekcije rane, metličavost zahvata cele biljke (Krstić i Vico, 2004).

CMV se sastoji od tri vrste čestica identične veličine, koje nose različite RNA (RNA1, RNA2 i RNA3). Čestice su izometrijskog oblika, prečnika oko 30 nm izgrađene od nukleinske kiseline (18%) i proteina, koji čine 82% ukupne težine (Francki et al., 1979; Palukaitis et al., 1992). 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).

Genom čine tri jednolančane infektivne genomne RNA (RNA1, RNA2 i RNA3) (Balaji et al., 2008) i dve subgenomne RNA4 i RNA4A (Palukaitis et al., 1992). RNA1 i RNA2 kodiraju 1a i 2a proteine uključene u replikaciju virusa (Nitta et al., 1988; Hayes and Buck, 1990; Palukaitis et al., 1992), a RNA2 sadrži i region koji se prepisuje u subgenomsku RNA4A i kodira 2b protein, koji ima ulogu u širenju virusa i ispoljavanju virulentnosti (Ding et al., 1994, 1995). RNA3 kodira stvaranje 3a proteina čija je funkcija u širenju virusa u biljci zbog čega se često označava i kao transportni

protein („movement protein“) (Canto et al., 1997; Perry et al., 1994, 1998). RNA3 nosi i gen koji se prepisuje u subgenomsku RNA4 i kodira sintezu proteina omotača virusa (Palukaitis et al., 1992; Gallitelli, 2000) (Slika 1).



Slika 1. Genomna organizacija virusa mozaika krastavca (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/135.html)

Neki sojevi CMV poseduju i RNA5, koja predstavlja mešanu populaciju nukleotida konzerviranog 3' terminalnog regiona genomskih RNA1 i RNA2. Smatra se da RNA5 ima ulogu u replikaciji CMV. Neki sojevi virusa poseduju i satelitnu RNA (satRNA) (Blanchard et al., 1996), koja zavisi od genoma CMV u pogledu svoje replikacije i širenja. Prisustvo satRNA ima uticaja na ekspresiju simptoma, odnosno na ublažavanje ili pojačavanje simptoma na zaraženim biljkama (Grieco et al., 1997).

Mnogobrojni domaćini, jednogodišnji i višegodišnji, zeljasti i drvenasti, gajeni i spontani, predstavljaju mnogobrojne izvore zaraza ovog virusa. U prirodi se CMV lako prenosi na neperzistentan način sa više od 80 vrsta vaši, prvenstveno sa *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Palukaitis et al., 1992; Kaper and Waterworth, 1981). Efikasnost prenošenja vašima zavisi od nekoliko faktora, kao što su biotip vektora, soj virusa, uslovi spoljašnje sredine i priroda vegetacije. Takođe, CMV se prenosi semenom 22 vrste biljaka u različitom stepenu (Palukaitis et al., 1992). Utvrđeno je da se prenosi semenom sledećih gajenih i korovskih biljaka: *Glycine max* L. Merril, *Phaseolus vulgaris* L., *Stelaria media* (L.) Vill, *Vigna unguiculata* (L.) Walp itd. S obzirom da se virus prenosi semenom malog broja povrtarskih biljaka, većina epidemija se javlja zbog toga što primarni virusni inokulum predstavljaju zaražene korovske vrste (Krstić i Vico, 2004). Virus se lako prenosi sokom (mehanički) zaraženih biljaka. Ovaj način prenošenja je naročito opasan ako su zaražene mlade biljke u rasadu. Zbog njihovog gustog sklopa, u toku nege rasada i kasnije, prilikom presađivanja, zaraza se može

dodirom preneti na sve biljke. Značajno je pomenuti da se virus održava i prenosi zaostalim zaraženim biljnim delovima u zemljištu. Ovaj način prenošenja je od posebne važnosti u proizvodnji rasada i biljaka u zaštićenom prostoru, jer se u staklenicima i plastenicima biljni ostaci sporije razlažu nego na otvorenom polju.

Veliki broj različitih sojeva virusa mozaika krastavca, njihovih grupa i podgrupa je do danas opisano (**Kaper and Waterworth, 1981; Perry et al., 1993**). Veliki broj sojeva virusa mozaika krastavca prijavljenih iz celog sveta svrstani su u dve podgrupe, podgrupu I i podgrupu II, na osnovu bioloških, seroloških (**Wahyuni et al., 1992; Hu et al., 1995; Iardi et al., 1995**) i molekularnih osobina (**Owens and Palukaitis, 1988; Owen et al., 1990; Szilassy et al., 1999; Rizos et al., 1992; Sialer et al., 1999**). Filogenetskom analizom, na osnovu sekvenci gena, podgrupa I se dalje može podeliti podgrupe IA i IB (**Palukaitis and Zaitlin, 1997; Roossinck et al., 1999; Roossinck, 2002**). U podgrupu IB svrstani su Istočnoazijski izolati CMV, dok u podgrupu IA su svrstani sojevi iz celog sveta (**Roossinck et al., 1999**).

2.7.2. VIRUS CRTIČASTOG MOZAIKA KROMPIRA (*Potato virus Y*, PVY)

Potato virus Y je vrsta roda *Potyvirus* koji zajedno sa rodovima *Rymovirus*, *Bymovirus* i *Ipomovirus* spadaju u familiju *Potyviridae* (**Brunt, 1992**). Ovi rodovi su prvobitno razlikovani na osnovu njihovih prenosilaca (vektora): rod *Potyvirus* se prenosi vašima, *Rymovirus* grinjama, *Bymovirus* gljivama sa zaraženog korena i *Ipomovirus* pomoću bele leptiraste vaši. 1998. godine, dodata su još dva roda *Macluravirus* (**Badge et al., 1997**) i *Tritimovirus* (**Salm et al., 1996; Pringle, 1999**), koji se prenose vašima i grinjama. Rod *Potyvirus* uključuje više od 200 definitivnih ili mogućih članova, dok je fam. *Potyviridae* najveća familija u koju spada blizu 25% poznatih biljnih virusa.

Virus crtičastog mozaika krompira prvi put je opisan 1931. godine na biljkama duvana sorte „White Burley“ (**Smith, 1931, loc. cit. Todorović, 1995**). U Evropi, prisutan je od sredine 1980.-tih godina i još uvek je odgovoran za velike gubitke u proizvodnji mnogih biljaka familije Solanaceae (**Kogovšek et al., 2007**). PVY je široko rasprostranjen u celom svetu na velikom broju familija, ali je najčešći na biljkama koje pripadaju familiji Solanaceae. Izolati PVY iz paprike su identifikovani i proučavani u

Turskoj (Yilmaz et al., 1983; Erkan, 1986), Španiji (Arteaga and Ortega, 1986), Francuskoj (Selassie et al., 1985), Italiji (Davino et al., 1989) i u mnogim drugim zemljama.

U Srbiji, pored paprike, prisustvo PVY dokazano je i na duvanu i krompiru (Mijatović i sar., 1999; Milošević, 1989, 1992; Todorović, 1995; Bulajić i sar., 2006; Đekić, 2010). Iako se PVY navodi kao jedan od ekonomski najvažnijih virusa paprike (Tomlison, 1987; Agrios, 1988; Kogovšek et al., 2007), ovaj virus je malo proučavan na paprici u našoj zemlji. Tokom proučavanja rasprostranjenosti virusa paprike u Srbiji, Mijatović i sar. (1999) su naveli podatak da je PVY identifikovan u 22% ispitivanih uzoraka i kao takav zauzima treće mesto po zastupljenosti posle TMV i CMV.

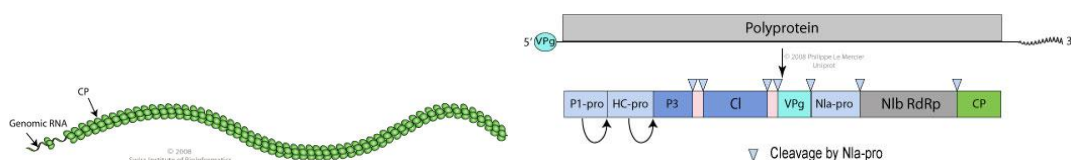
Istraživanja širom sveta pokazala su da je PVY ekonomski vrlo značajan virus (Tomlinson, 1987; Milne, 1988; Shukla et al., 1994). PVY spada u prvih pet virusa koji ugrožavaju proizvodnju povrća u svetu (Milne, 1988). On je jedan od ekonomski najznačajnijih virusa na paradajzu i paprici u mnogim zemljama, kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju (Tomlinson, 1987). Nekrotični soj ovog virusa izaziva smanjenje prinosa i kvaliteta plodova kod nekih sorti paradajza (Gebre-Selassie et al., 1987; Legnani et al., 1995), a na usevima paprike se često vezuje sa teškim oboljenjima (Edwardson and Christie, 1997). Takođe je česta mešana infekcija ovog virusa sa TEV, PepMoV i TMV (Abdallah et al., 1991).

Krug prirodnih domaćina ovog virusa je širok i obuhvata do devet familija, uključujući najznačajnije biljne vrste kao što su paprika (*Capsicum* spp.), krompir (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.), duvan (*Nicotiana* spp.), paradajz (*Lycopersicon esculentum* L.), neke ukrasne biljke (*Dahlia* i *Petunia* spp.) i mnoge korovske vrste (*Datura* spp., *Physalis* spp., *Solanum dulcamara* i *S. nigrum*) (Jeffries, 1998). Na Novom Zelandu opisane su nove vrste koje predstavljaju prirodnog domaćina PVY: *Cotula australis* (Sieber ex Spreng.) i *Capsella bursa-pastoris* L. (Fletcher, 2001).

Virus crtičastog mozaika krompira pojedinih godina javlja se u znatnom procentu. Ovaj virus takođe izaziva različite simptome, mada su najčešći tipični mozaik i formiranje uskih tamnozelenih površina oko nerava. Manje virulentni sojevi prouzrokuju hlorozu nerava i blagi mozaik, a virulentni sojevi ovog virusa izazivaju nekrozu vršnih delova paprike, sušenje i opadanje lišća. Biljke su slabo razvijene i

formiraju deformisane plodove sa nekrotičnim pegama. Rane infekcije imaju za posledicu zakržljale biljke, slabo formiranje plodova, koji zbog lošeg izgleda nemaju tržišnu vrednost (**Edwardson and Christie, 1997; Krstić i Bulajić, 2008**).

Čestice PVY su izdužene, filamentozne, veličine 730 x 11 nm izgrađene od nukleinske kiseline (5,4–6,4% ukupne težine) i proteina, koji čine 93,6–94,6% ukupne težine. Genom PVY, kao i kod ostalih članova *Potyvirus* roda, čini jednolančana infektivna ribonukleinska kiselina ((+)ssRNA), molekulske mase $3,1 \times 10^6$ Da (**De Bokx and Huttinga, 1981; Büchen–Osmond, 2006**).



Slika 2. Genomna organizacija virusa crtičastog mozaika krompira (http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/50.html)

Jednolančana infektivna RNA je dužine 9741-9795 Kb, sa 3 poly (A) repom (region sastavljen od više adenina) i kratkim virusno-kodiranim proteinom (VPg) povezanim sa genomom („viral protein genome–linked“) (**Glasa and Candresse, 2005**). Genom sadrži jedan jednostavni okvir čitanja (ORF-Open Reading Frame) koji se translacijom prevodi u jedan veliki poliprotein, a on se post-translaciono virus kodiranim proteazama razlaže na više manjih funkcionalnih proteina. Ulogu proteaza imaju P1, HC–pro i NIa proteini. U građi virusnih čestica učestvuju CP protein i VPg protein. CP protein gradi kapsid, dok je VPg protein kovalentno vezan za 5' kraj nukleinske kiseline. Ostali proteini, P3, CI, NIa-pro, NIB i RdRp su nestrukturani, javljaju se u zaraženim biljnim ćelijama i imaju ulogu u replikaciji virusa, širenju virusa u biljci i prenošenju virusa vašima (**Robaglia et al., 1989; Shukla et al., 1994**) (Slika 2).

Lisne vaši su najznačajniji vektori virusa i uglavnom su odgovorne za širenje PVY u prirodi. **Harrington and Gibson (1989)** su identifikovali 26 vrsta vaši familije Aphididae koje predstavljaju vektore PVY. *M. persicae* je najefikasniji vektor ovog virusa (**Katis and Gibson, 1985; Woodford, 1992**). Njoj je za usvajanje virusa

potrebno veoma kratko vreme od 2-3 minuta ishrane na oboleloj biljci, a svoju infektivnost zadržavaju do 4 časa. Pored ove vaši, kao vektori virusa javljaju se i *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus certus*, *Phorodon humuli*, *Rhopalosiphum insertum* i druge (**Büchen-Osmond, 2006**). Razlog epidemijskog širenja ovog virusa u našoj zemlji je to što se prenosi velikim brojem lisnih vaši (**Milošević, 1992**). Zaražen korov ili kulturno bilje, npr. paradajz ili duvan u blizini paprike mogu da služe kao izvor primarne infekcije. Od korava koji su značajni kao izvor inokuluma ovog virusa su: *Solanum nigrum* i ostale *Solanum* spp., *Portulaca oleracea* i *Physalis* spp. (**Luis-Arteaga and Ponz, 2003**). Virus se ne prenosi semenom paprike (**Mijatović i sar., 2007**).

Na osnovu lokalnih i sistemskih simptoma na različitim sortama krompira, duvana i biljci *Physalis floridana*, izolati PVY su podeljeni na tri soja: PVY^O (obični soj), PVY^N (nekrotični soj) i PVY^C (crtičasti soj). Simptomi sistemske zaraze koje izaziva obični soj su u vidu blagog mozaika, naboranosti i kovrdžavosti lišća na krompiru, hlorotičnog šarenila na duvanu, a na *Physalis floridana* izaziva sistemske nekroze. Ovaj soj je široko rasprostranjen širom sveta. Nekrotični soj prouzrokuje veoma blago hlorotično šarenilo kod većine sorti krompira, sistemske nekroze nerava duvana i hlorotično šarenilo na *Physalis floridana*. Zabeležen u Južnoj Americi, Evropi, Africi, Aziji (**Weidemann, 1988**) i Novom Zelandu (**Fletcher, 1989**). Crtičasti soj na nekim sortama krompira izaziva hipersenzibilnu reakciju, dok na drugim prouzrokuje sistemske mozaik. Simptomi na duvanu i vrsti *Physalis floridana* slični su simptomima koje izaziva obični soj. PVY^C soj je poznat u Evropi, Severnoj Americi, Indiji, Južnoj Africi, Australiji, Novom Zelandu i Ekvadoru (**Elis et al., 1997**). Velika varijabilnost PVY često je uslovljena genetskom rekombinacijom (**Revers et al., 1996**). Tako je i za PVY ustanovljeno postojanje većeg broja rekombinantnih sojeva: PVY^{NTN} koji je identifikovan u većini zemalja širom sveta gde se gaji krompir: SAD (**McDonalds and Sing, 1996; Croslin et al., 2002; Nie and Sing, 2003**), Japan (**Ohshima et al., 2000**), i Peru (**Salazar et al., 2000**); PVY^Z (**Jones, 1990**), kao i PVY^N W koji je postao dominantan u Poljskoj (**Chrzanowska, 1991**), a otkriven je u nekoliko drugih zemalja, uključujući Francusku, Španiju (**Blanko-Urgoiti et al., 1998; Kerlan et al., 1999**), Nemačku i Rusiju (**Chrzanowska, 1991; Glais et al., 2005**). PVY^{N:O} zabeležen je u Kanadi (Manitoba) i SAD (Minesota, Montana, Severna Dakota) (**Sing et al., 2003**).

Prema **Gebré Sélassié et al. (1985)** izolati virusa PVY sa paprike svrstani su u tri patotipa PVY-0, PVY-1 i PVY-1-2, u zavisnosti od mogućnosti da prevaziđu gene otpornosti (*pvv1*, *pvv2*) prisutne u nekoliko sorti paprike. Prema **Choi et al. (2005b)** u okviru ova tri patotipa izolati se dalje grupišu na obične i nekrotične, u zavisnosti da li prouzrokuju simptome u vidu promene boje duž nerava lista ili simptome u vidu nekroze lista.

2.7.3. VIRUS BRONZAVOSTI PARADAJZA (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)

Virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) tipičan je predstavnik roda *Tospovirus*, familije *Bunyaviridae* (**Francki et al., 1991**), i jedan je od najrasprostranjenijih i najznačajnijih biljnih virusa (**Goldbach and Peters, 1994**). Ovaj virus je 50-tih godina prošlog veka bio jedini član „Tomato spotted wilt“ grupe (**Matthews, 1979**). Međutim, danas se zna da ovom rodu pripada veći broj značajnih fitopatogenih virusa, i ti virusi u većini slučajeva imaju izrazito širok krug domaćina i njihovi vektori su tripsi. *Tospovirus* rod obuhvata 19 različitih vrsta, osam potpuno definisanih, usaglašanih i prihvaćanih od strane ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) dok se preostali virusi, za sada, označavaju kao privremeni i verovatni pripadnici ovog roda (**Fauquet et al., 2005**). TSWV se nalazi na EPPO A2 listi (**OEPP/EPPO, 2008**), a u Srbiji na listi IA deo II (”Štetni organizmi za koje je poznato da su prisutni na ograničenom području Republike Srbije i čije je unošenje i širenje u Republiku Srbiju zabranjeno”) („**Službeni glasnik RS**“ br. 7/2010).

Virus bronzavosti paradajza je virus za koji se smatra da je najrasprostranjeniji i da ima najširi krug domaćina među svim biljnim virusima. TSWV je prvi put detektovan na paradajzu u Australiji 1915. godine (**Brittlebank, 1919**), od tada se virus proširio u mnoge delove sveta. Nakon II Svetskog rata potvrđeno je prisustvo TSWV u Zapadnoj Evropi, SAD, Istočnoj Evropi, Južnoj Americi i Južnoj Africi, dok se 1950. godine, virus proširio u sve zemlje Južne Evrope u kojima se proizvodi duvan i pri tom je u pojedinim godinama nanosio značajne ekonomske štete.

Virus bronzavosti paradajza je široko rasprostranjen i javlja se u umerenim, suptropskim i tropskim regionima sveta. Prisutan je u svim zemljama EPPO regiona, Aziji, Africi, Severnoj, Centralnoj i Južnoj Americi, Karibima, kao i zemljama Okeanije

(OEPP/EPPO, 2004). U našem okruženju 1972. godine ovo oboljenje je nađeno u Grčkoj i jugoistočnom delu Makedonije na usevima duvana (**Chatzivassiliou et al., 2000; Tsakiridis and Ivancheva-Gabrovska, 1980**), dok je u Sloveniji TSWV konstatovan 2000. godine na duvanu, paprici i paradajzu (**Mavrič and Ravnikar, 2001**).

Prvi podaci o prisustvu ovog virusa na paprici u Srbiji potiču iz 1998. godine (**Mijatović i sar., 1999**), od tada je praćenjem simptoma, primećena sve učestalija pojava ovog virusa, što govori o njegovom progresivnom širenju. Juna 2002. godine u plastenicima u okolini Beograda, zabeleženi su na lišću paprike simptomi hlorotičnih i nekrotičnih šara, bez deformacije liski. Iz plodova sa ovakvim simptomima molekularno je identifikovan TSWV (**Dukić i sar., 2002a**). U većem broju lokaliteta u Srbiji prisustvo virusa je dokazano 2005. i 2006. godine na paradajzu, paprici, luku, duvanu i mnogobrojnim vrstama ukrasnih biljaka (**Krstić i sar., 2005; Krstić i Bulajić, 2007; Stanković i sar., 2011a; Zindović i sar., 2011; Stanković i sar., 2012; Stanković i sar., 2013**). Kako se poslednjih godina oboljenje koje ovaj virus izaziva javljalo u sve većim razmerama, **Dukić i sar. (2002a)** su pristupili molekularnoj karakterizaciji TSWV izolata paprike iz naše zemlje.

TSWV izaziva gubitke u proizvodnji raznih useva širom sveta. Virus je odgovoran za brojne epidemije na različitim usevima i različitim delovima sveta, a najčešće na povrću, duvanu i ukrasnim biljkama (**Krstić i Bulajić, 2007**). U Francuskoj i Španiji su zabeležene epidemije na paradajzu, paprici i *Anemone* vrstama, kako na biljkama gajenim u zaštićenom prostoru tako i na biljkama u polju (**OEPP/EPPO, 1999**). Potpun izostanak prinosa konstatovan je u proizvodnji paprike i paradajza u zaštićenom prostoru (**Fineti Sialer et al., 2000**) i na otvorenom polju (**Gitatis et. al., 1998**), a takođe da gubici u proizvodnji mogu biti i do 100% navodi i **Berling et al. (1990)**.

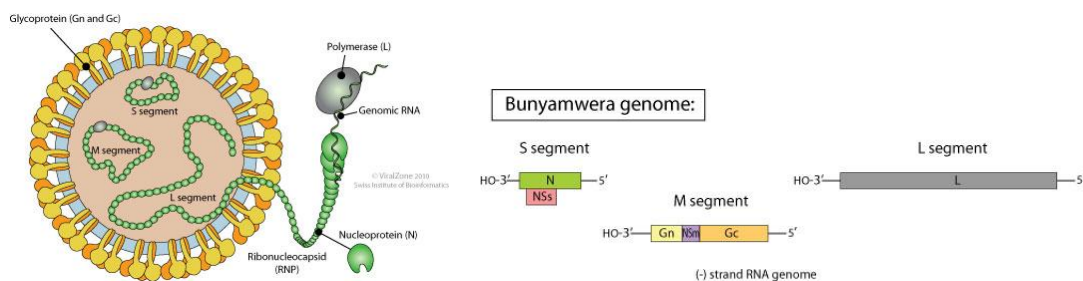
TSWV je poznat po tome što pored paprike napada veliki broj drugih, kako gajenih tako i korovskih biljaka. Kao prirodni domaćini ovog virusa navodi se veliki broj vrsta, oko 1090 biljnih vrsta iz 15 familija monokotiledonih, 69 familija dikotiledonih biljaka i jedne familije razdela Pteridiophyta, fam. Pteridaceae (**Parrella et al., 2003**). Parazitira kako dikotiledone tako i monokotiledone biljke, a najbrojniji prirodni domaćini virusa su u okviru familija Asteraceae (247 vrsta), Solanaceae (172

vrste) i Fabaceae (60 vrsta) (Krstić i Bulajić, 2007). Među povrtarskim biljkama glavni domaćini virusa su paradajz, paprika i plavi patlidžan. U druge osetljive povrtarske biljke spadaju *Lactuca sativa* L., *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. i *Vigna sinensis* L. (Kucharek et al., 2000; Rusevski, 2001). TSWV je u periodu od 2002. do 2008. godine u našoj zemlji detektovan osim na paprici, duvanu i paradajzu, i na soji, salati, mrkvi, i ukrasnim biljkama iz 21 roda, a pre svega na: *Impatiens*, *Petunia*, *Sinningia*, *Pelargonium*, *Lysimachia*, *Chrysanthemum*, *Begonia*, *Tagetes*, *Cyclamen*, *Gerbera*, *Salvia* i *Gazania* (Krstić i Bulajić, 2007; Petković i sar., 2007; Simić i sar., 2007; Đekić, 2010). Posebno mesto pripada brojnim korovskim biljkama koji su stalni pripodni domaćini virusa bronzavosti paradajza. Virus je, takođe infektivan i za: tatulu (*Datura stramonium* L.), pomoćnicu (*Solanum nigrum* L.), mišjakinju (*Stelaria media*), bokvicu (*Plantago major* L.) i dr. (Šutić, 1995; Brunt et al., 1997).

Virus bronzavosti paradajza prouzrokuje različite simptome na različitim biljkama domaćinima. Varijabilnost u pogledu ispoljavanja simptoma može biti uslovljena vremenom infekcije, starošću biljke i različitim faktorima spoljne sredine (temperatura, svetlost i dr.). Takođe, raznolikost u pogledu ispoljavanja simptoma može biti posledica prisustva različitih sojeva virusa. TSWV na paprici izaziva uglavnom žutilo lišća i cele biljke, kao i kržljivost, a čest je i mozaik sa izraženim koncentričnim prstenastim pegama ili hlorotični linijski mozaik na starijem lišću. Zaraženo lišće može da ima bronzastu boju. Mlado lišće je deformisano, sitno, naborano, sa zadebljalim nervima. Dugačke nekrotične pruge na stablu proširuju se sve do vršnog meristema. Infekcija ovim virusom ometa zametanje plodova. Na zrelih plodovima uočavaju se mozaične i hlorotične i nekrotične prstenaste pege. Plodovi formirani nakon infekcije su najčešće deformisani i zakržljali. Mlađi plodovi najčešće u potpunosti podležu nekrozi. TSWV može da izazove izumiranje grančica, skraćivanje internodija stabla, tako da biljke imaju žbunast izgled ili propadaju (Goldberg, 2000; Krstić i sar., 2008; Cho et al., 2009; Zindović, 2010).

Virioni TSWV su kvazisferičnog oblika (po nekim istraživačima izometrijskog) i prečnika oko 80 do 120 nm (Sivparsad and Gibba, 2008). Genom čine tri linearne (–) ssRNA neinfektivne, ili (+/–) ssRNA „ambisense” (ambiinformaciona), označene kao S

(short), M (middle) i L (large) smeštene unutar dvostruke lipoproteinske membrane (**Brunt et al., 1996; Sivparsad and Gubba, 2008; Silva et al., 2001**).



Slika 3. Genomna organizacija virusa bronzavosti paradajza (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html)

Najveća RNA (L-RNA) je negativne polarnosti (-) i monocistronska. L-RNA kodira L protein koji predstavlja virusnu RNA-zavisnu RNA polimerazu i uključen je u transkripciju i replikaciju (**Pappu et al., 2000; Silva, 2001**).

M-RNA fragment ima „ambisense“ (+/-) polarnost. Na 5' kraju kodira nestrukturani protein (NSm-„non-structural protein“) dok na 3' kraju kodira prekursore glikoproteina G1 i G2. Glikoproteini imaju značajnu ulogu u međusobnoj interakciji virus-vektor (**Fauquet et al., 2005**), dok NSm protein učestvuje u kretanju virusa iz ćelije u ćeliju („movement“, transportni protein), ekspresiji simptoma i stimulise stvaranje cevastih (tubularnih) struktura u protoplastu biljnih ćelija i ćelijama tripsa.

Najkraći S-RNA frgment ima „ambisense“ (+/-) polarnost. Na 5' kraju S-RNA kodira nestrukturani protein (NSs-„non-structural protein“), dok na 3' kraju kodira nukleokapsid (NC-„nucleocapsid“). Nukleokapsid (NC) ima ulogu u formiranju proteinskog omotača oko virusne RNA i kontroliše promenu procesa transkripcije u proces translacije, dok NSs protein ima ulogu u ekspresiji simptoma i ispoljavanju supresorske aktivnosti u procesu „utišavanja gena“ („gen silencing“) od strane biljke domaćina (**Mumford et al., 1996; Pappu et al., 1998; Silva et al., 2001**) (Slika 3).

Virus se održava u mnogobrojnim prirodnim domaćinima koji služe i kao izvori zaraze. Korovi imaju značajnu ulogu u održavanju i širenju TSWV. Kao široko rasprostranjeni korovi, a u isto vreme domaćini TSWV ističu se: gorčika (*Sonchus* sp.), ljutić (*Ranunculus arvensis* L.), maslačak (*Taraxacum officinale* L.), mišjakinja (*Stellaria media*), čičak (*Arctium lappa* L.), piskavica (*Solanum dulcamara* L.),

pepeljuga (*Chenopodium album* L.), štavelj (*Rumex crispus* L.), tatula (*Datura stramonium*), bokvica (*Plantago major* L.), poponac (*Polygonum convolvulus* L.), štir (*Amaranthus albus* L.), lisac (*Polygonum lapathifolium* L.), tušt (*Portulaca oleracea* L.), žutenica (*Senecio vulgaris* L.), pomoćnica (*Solanum nigrum*) i drugi (**Jorda et al., 1995; OEPP/EPPO, 1999; Parrella et al., 2003; Love, 2005**).

Osnovni načini širenja TSWV u prirodi su prenošenje vektorima, mehanički i prenošenje zaraženim propagativnim biljnim materijalom:

- I. Širenje putem vektora. Vrste tripsa koji su poznati kao prenosioci *Tospovirus*-a, pripadaju rodovima *Frankliniella* i *Thrips*. U literaturi kao najznačajnije vrste TSWV vektora se navode: *Frankliniella occidentalis* (zapadni cvetni trips), *F. schultzei* (pamukov trips), *F. fusca* (duvanov trips), *F. intonsa* (cvetni trips) i *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* (lukov trips) (**Maris et al., 2003; Fauquet et al., 2005**). Vrste roda *Tospovirus* prenose larve drugog stupnja (L2) i imago, ako su se larve u prvom stupnju (L1) (0-2 dana starosti) ishranjivale na zaraženoj biljci. Ukoliko se larva u prvom stupnju nije ishranjivala na zaraženoj biljci, virus ne prenosi L2 larva i imago. Prilikom ishrane na zaraženim biljkama, larve usvajaju virus iz citoplazme biljne ćelije. Virus se transportuje do srednjeg creva larve, a zatim i do pljuvačne žlezde. Lučenjem pljuvačke prilikom ishrane, trips prenosi virus na zdravu biljku (**Nagata et al., 1999; Rusevski, 2001**). Za unošenje virusa u organizam larve *T. tabaci* potrebna je ishrana larve na zaraženoj biljci najmanje 10 minuta. Inkubacioni period u insektu iznosi do 10 dana, a njegova najveća infektivnost traje 23 dana posle unošenja virusa u telo vektora, a ponekad se infektivnost proteže i na ceo život insekta. Ne prenosi se na potomstvo insekta. Virus se održava i u prezimelim zaraženim tripsima. Posle aktiviranja s proleća oni postaju sposobni za prenošenje virusa. Tripsi se prenamnožavaju u godinama sa toplim i suvim vremenom, pa se tada i bronzavost paradajza javlja u štetnim razmerama.
- II. Mehaničko prenošenje. Mehaničko prenošenje TSWV u prirodi malo je verovatno iz razloga što virus ima veoma nestabilnu prirodu (**Best, 1968**). Drugi autori smatraju da sok zaraženih biljaka može da bude izvor TSWV i da svako mehaničko oštećenje zaraženih biljaka omogućava prenošenje infektivnog soka na zdrave biljke (**Kucharek et al., 2000**). Međutim, mehaničko prenošenje, iako je moguće, nema značaja u odnosu na efikasno širenje vektorima (**Krstić i Bulajić, 2007**).

III. Širenje putem međunarodne trgovine. TSWV se intenzivno širi putem međunarodne trgovine biljaka i biljnih delova. Širenje TSWV reznicama, rasadom, krtolama, lukovicama itd. su od posebnog značaja. Veliki značaj u prenošenju virusa imaju krtole krompira pa samim tim krompir sapada i u domaćina ovog virusa (**Rodoni and Henderson, 2004**). Međutim, najznačajnije je širenje zaraženim biljkama ili biljnim delovima ukrasnih biljaka (**Krstić i Bulajić, 2008**).

Izolati virusa koji pripadaju *Tospovirus* rodu prvo su identifikovani na osnovu antigenih osobina i uspostavljena je klasifikacija na VI serogrupa (**Kormelink et al., 1998**) u kojoj je TSWV bio jedini predstavnik serogrupe I. Današnjom klasifikacijom, 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 postoji kao kompleks sojeva (**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**).

2.7.4. VIRUS MOZAIKA DUVANA (*Tobacco mosaic virus, TMV*)

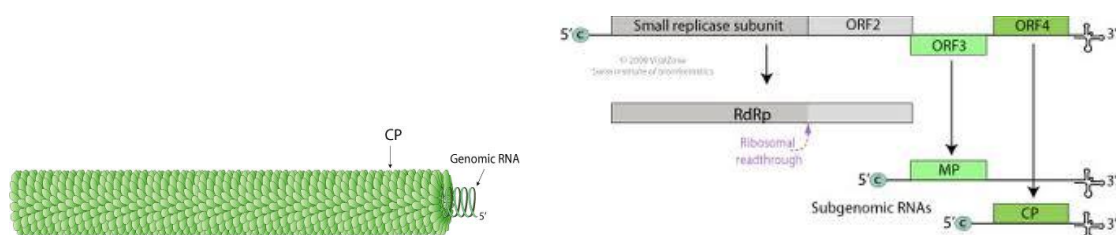
Virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus, TMV*) tipičan je predstavnik roda *Tobamovirus* i familije *Virgaviridae* (**Silva et al., 2008**).

Virus mozaika duvana jedan je od najbolje proučenih virusa. Prva istraživanja o ovom virusu dao je **Adolf Mayer 1886.** godine. Kasnije, proučavan je od strane mnogih autora u svetu (**Dawson, 1999; Stoimenova and Yordanova, 2005; Silva et al., 2008**) i kod nas. Među prvo opisanim virusima na paprici u Jugoslaviji je virus mozaika duvana (**Panjan i Prpić, 1955**). Dalja istraživanja ovog virusa vršili su **Jasnić (1978), Šutić i sar. (1978), Tošić i sar. (1979)** i **Mijatović (1986, 1995)**. Istraživanja u proteklih nekoliko godina pokazuju tendenciju smanjenja zaraze paprike ovim virusom, tako je 1999. godine bio prisutan sa 26% (**Mijatović i sar., 1999**), dok 2007. godine sa 17% (**Tomić i sar., 2007**).

TMV može da inficira 199 biljnih vrsta iz 30 familija (**Shew and Lucas, 1991**). U najznačajnije prirodne domaćine ovog virusa ubrajaju se biljke familije Solanaceae: duvan, paprika, paradajz i krompir (**Himmel, 2003; Đekić, 2010**).

Na starijem lišću zaraženom ovim virusom javlja se žutilo, dok je na mlađem izražen mozaik. Najkarakterističniji simptom koji ovaj virus izaziva je žuto zeleno šarenilo lišća. Listovi mogu da budu uvijeni, deformisani i sitniji. Na cvetovima javljaju se nekrotične crtice. Biljke zaostaju u porastu, smanjen je broj formiranih plodova koji su deformisani i ponekad sa pojavom nekrotičnih pega. Duž stabla takođe se mogu javiti nekroze (**Krstić i Bulajić, 2008**).

Čestice virusa su štapićaste, 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. Proteinski omotač se sastoji od 2130 identičnih proteinskih podjedinica, raspoređenih u vidu heliksa oko centralne šupljine (**Stryer and Lubert, 1988**). Genom TMV čini jednolančana infektivna ribonukleinska kiselina ((+)ssRNA), molekulske mase 2×10^6 Da (**Silva et al., 2008; Gibbs, 1977**). Za 5' kraj nukleinske kiseline vezan je 7-metilganozin, dok je 3' kraj aminoacetiliran sa histidinom i gradi strukturu sličnu transportnoj RNA (**Knapp and Lewandowski, 2001**). Genom virusa kodira sintezu četiri proteina: CP protein (protein omotača virusa) - molekulske mase 17,5 kDa; MP protein („movement protein“) - molekulske mase 30 kDa koji omogućava širenje virusa u biljci i 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**) (Slika 4).



Slika 4. Genomna organizacija virusa mozaika duvana (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html)

Virus se veoma lako prenosi mehaničkim putem. Ne prenosi se putem vektora, iako postoje navodi o tome, međutim, to je najverovatnije bila posledica mehaničkog

dodira insekata sa biljkom (**Lojek and Orlob, 1969; Harris and Bradley, 1973**). Virusne čestice i zaraženi biljni ostaci ovim virusom mogu vrlo lako predstavljati izvor zaraze. Takođe, jedan od osnovnih načina prenošenja virusa mozaika duvana u stakleničkoj proizvodnji je prenošenje kontaminiranom odećom, alatom i mašinama (**Broadbent and Fletcher, 1963**).

Na paprici virus mozaika duvana odnosno njegovi sojevi prouzrokuju različite simptome oboljenja. Sa paprike je izolovano nekoliko sojeva ovog virusa koji se međusobno razlikuju kako po simptomima koje prouzrokuju na paprici i test biljkama tako i serološki (**Holmes, 1934; Mc Kinney, 1952; Greenleaf et al., 1964**). Na osnovu simptoma koje prouzrokuju na paprici, reakciji test biljaka, biofizičkih konstanti i seroloških reakcija možemo konstatovati da su u našoj zemlji uglavnom rasprostranjena dva soja ovog virusa. Soj koji prouzrokuje nekrotične simptome na paprici i slab mozaik, i soj koji izaziva simptome mozaika bez nekroze (**Mijatović, 1995**).

2.7.5. VIRUS MOZAIKA LUCERKE (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)

Virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) predstavnik je roda *Alfamovirus*, familije *Bromoviridae* (**Zitikaitè and Samuitienè, 2008**). Prvi put je otkriven 1931. godine u Americi, kao prouzrokovač oboljenja lucerke (**Bos and Jaspars, 1971**). U zemljama Istočne Evrope, kao što su Bugarska, Mađarska i Srbija može da dovede do značajnih gubitaka u proizvodnji paprike. Takođe, svake godine se javlja i u usevima paprike u zemljama Severne Amerike, ali gubici nisu od ekonomskog značaja (**Creamer, 2003**).

Virus mozaika lucerke ubraja se u grupu opšte rasprostranjenih virusa i smatra se da je prisutan u svim područjima gajenja paprike (**Arli-Sokmen et al., 2005**). Virus mozaika lucerke u Srbiji je prvo utvrđen u rejonu Horgoša 1956. godine (**Šutić, 1959**), a prema podacima **Delevića (1963)** ovaj virus prouzrokuje značajne štete. Istraživanja sprovedena 1999. godine pokazala su da je AMV bio prisutan u usevu paprike, ali ne u značajnoj meri (**Mijatović i sar., 1999**). Noviji podaci o AMV u našoj zemlji, pre svega o prisustvu i rasprostranjenosti, ali i prvi podaci o molekularno identifikovanim i okarakterisanim izolatima, potiču iz proučavanja ovog virusa na paradajzu (**Krstić i**

sar., 2007a), paprici (Tomić i sar., 2007; Krstić i Bulajić, 2008) i lucerki (Bulajić i sar., 2010).

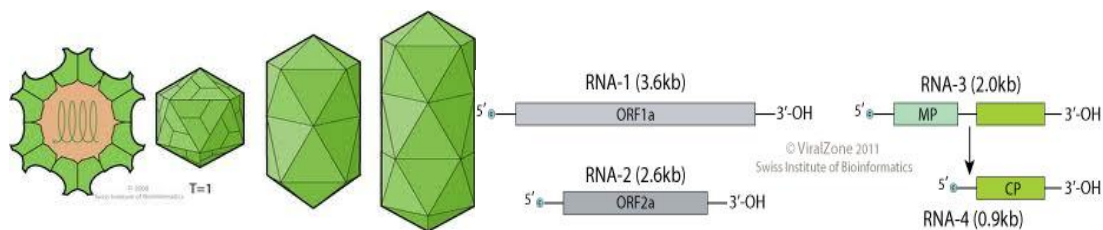
AMV ima širok krug domaćina i ustanovljeno je da se javlja kod velikog broja zeljastih i drvenastih biljaka (150 biljnih vrsta) iz 22 familija (Schmelzer et al., 1973). Ovaj virus može da se prenese na oko 430 biljnih vrsta iz 51 familija (Hull, 1969; Crill et. al., 1970; Schmelzer et al., 1973; Jaspars and Bos, 1980). Većina biljaka domaćina pripada familijama Fabaceae, Solanaceae i Asteraceae (Jaspars and Bos, 1980). Od povrtarskih biljaka najznačajniji domaćini su paprika, luk, pasulj, grašak, salata, paradajz i plavi patlidžan (Zitikaitè and Samuitienè, 2008).

U Srbiji, pored paprike, prisustvo AMV dokazano je i na lucerki, duvanu (Šutić, 1995; Đekić, 2010) detelini, grašku (Šutić, 1995) i pasulju (Petrović, 2008).

Kako se virus prenosi semenom paprike, simptomi se mogu uočiti još na kotiledonim listićima. Najčešći simptom na paprici zaraženoj ovim virusom su žućkastobeličaste pege različitog oblika i veličine. Biljke zaostaju u porastu i što su infekcije ranije, deformacije su izraženije. Na plodovima koji su kržljavi, deformisani, mogu se javiti linearne trake beličaste ili žućkaste boje (Krstić i Bulajić, 2007).

Virus mozaika lucerke sastoji se od četiri vrste čestica: B (bottom), M (middle), Tb (top b) i Ta (top a) koje nose različite RNA (RNA1, RNA2, RNA3 i RNA4). Čestice su izgrađene od nukleinskih kiselina (16%) i proteina koji čine 84% ukupne težine (Jaspars and Bos, 1980; Büchen–Osmond, 2006). Genom čine tri jednolančane infektivne genomne RNA (RNA1, RNA2 i RNA3) i subgenomska RNA4 (Bol, 1999).

RNA1 i RNA2 kodiraju P1 i P2 proteine uključene u replikaciju virusa (Bol, 1999), dok je RNA3 bicistronska i kodira stvaranje MP proteina („movement protein“) koji je odgovoran za širenje virusa u biljci (Erny et al., 1992). RNA3 nosi i gen koji se prepisuje u subgenomsku RNA4 i kodira sintezu proteina omotača virusa (CP proteina) (Tenllado and Bol, 2000). Za 5' kraj nukleinskih kiselina vezan je 7–metilganozin, a na 3' kraju se nalazi struktura slična transportnoj RNA (Bol et al., 1971) (Slika 5).



Slika 5. Genomna organizacija virusa mozaika lucerke (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/133.html)

Vektori virusa u prirodi su mnogobrojne vrste vaši koje ga prenose na neperzistentan način. Smatra se da najmanje 14 vrsta vaši mogu da prenesu ovaj virus, a kao najčešći vektor navodi se vrsta *Myzus persicae* (Crill et al., 1970). Takođe, značajni vektori ovog virusa su i vrste *Aphis fabae*, *Aphis medicaginis*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus certus*, *Macrosiphum euphorbiae* i druge (Garran and Gibbs, 1982). Virus mozaika lucerke lako se prenosi i sokom zaraženih biljaka paprike. Ovaj način prenošenja je naročito značajan u rasadu, gde se biljke dodiruju u gustom sklopu. Prenosenje sokom doprinosi većem širenju virusa u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru, što se ostvaruje dodiranjem biljaka u toku nege i gajenja. Značajno širenje virusa mozaika lucerke postiže se i semenom lucerke, paprike i semenom nekih korova (*Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium quinoa* i *Melilotus* sp.) (Zitikaitė and Samuitienė, 2008).

Do danas je opisan veliki broj sojeva koji se međusobno razlikuju po krugu domaćina i simptomima koje izazivaju na biljkama domaćinima. Prve klasifikacije bile su na osnovu simptoma koje prouzrokuju na biljkama *Phaseolus vulgaris* i *Vigna unguiculata*, kasnije su izolati AMV grupisani u sojeve na osnovu agregacije čestica u citoplazmi zaraženih ćelija duvana, mogućnosti prenošenja polenom i semenom i na osnovu fizičko-hemijskih osobina (Jaspars and Bos, 1980). Međutim, Kraal (1975) je predložio grupisanje sojeva na osnovu hemijskih osobina proteinskog omotača.

2.7.6. VIRUS BLAGOG ŠARENILA PAPRIKE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)

Virus blagog šarenila paprike (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) tipičan je predstavnik roda *Tobamovirus* (Martinez-Ochoa et al., 2003).

PMMoV je jedan od glavnih virusa koji se javlja na paprici (**Genda et al., 2005; Oka et al., 2008**). Virus je prisutan u Severnoj Americi (**Adkins et al., 2001; Beczner et al., 1997**), Australiji (**Pares, 1985**), Japanu (**Honda and Kameya-Iwaki, 1991; Ikegashira et al., 2004**), Kini (**Xiang et al., 1994; Wang et al. 2006**), Tajvanu (**Green and Wu, 1991**), Evropi (**Alonso et al., 1989; Marte and Wetter, 1986**) i Severnoj Africi (**Mnari-Hattab et al., 2006**).

PMMoV je prvi put identifikovan na paprici u Americi (**McKinney, 1952**). Od tada veliki broj istraživača je proučavao ovaj virus (**Svoboda et al., 2006; Jarret et al., 2008; Sidaros et al., 2009**). Novija istraživanja pokazuju da ovaj virus može biti prisutan i u stolici čoveka praćen specifičnim simptomima (**Colson et al., 2010**). U Srbiji je prvi put utvrđeno njegovo prisustvo 1996. godine kada su **Krstić i sar. (1996)** izolovali ovaj virus iz biljaka paprike sorte Duga bela.

Virus je ekonomski značajan za papriku koja se gaji u plastenicima i tunelima i često dovodi do značajnog smanjenja prinosa (**Wetter and Conti, 1988**). U proizvodnji paprike, infekcije mogu biti i do 100%, što drastično smanjuje prinos plodova paprike (**Wetter and Conti, 1988; Green, 2003**).

Simptomi na lišću ispoljavaju se u vidu blagog šarenila, deformacija listova i nekrotičnih pega (**Mijatović i sar., 2007**). Plodovi su sitni, deformisani sa karakterističnim nekrozama što dovodi do redukovanja prinosa, a što utiče na ekonomsku produktivnost paprike u svetu (**Nagai, 1981; Alonso et al., 1989**).

Čestice virusa su štapićaste, 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. Proteinski omotač se sastoji od 2130 identičnih proteinskih podjedinica, raspoređenih u vidu heliksa oko centralne šupljine (**Stryer and Lubert, 1988**). Genom PMMoV čini jednolančana infektivna ribonukleinska kiselina ((+)ssRNA). 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 (**Wang et al., 2006**).

Smatra se da postoje četiri soja PMMoV, P₀, P₁, P_{1,2} i P_{1,2,3} koji se razlikuju prema hipersenzitivnoj reakciji koju izazivaju na paprici koje su nosioci L¹, L², L³ i L⁴ rezistentnih gena. Ovi sojevi se među sobom ne razlikuju serološki (**Green, 2003; Takeuchi et al., 2005**).

Virus se lako prenosi mehaničkim putem, kontaminiranim rukama radnika prilikom obavljanja različitih agrotehničkih mera, kao i zaraženim semenom paprike (**Lewandowski, 1999; Svoboda et al., 2006**).

2.8. Kontrola virusnih oboljenja paprike

Izražena zaraza paprike brojnim virusima sa različitom epidemiologijom i često velike štete u našoj zemlji, ukazuju da kontroli viroza paprike treba posvetiti posebnu pažnju. Neophodno je rigorozno kontrolisati zarazu semena (na prisustvo TMV i AMV), poboljšati fitosanitarnu ispravnost proizvodnje (TMV i CMV), kao i stalno kontrolisati populaciju vektora (TSWV, CMV i AMV) (**Krstić i Bulajić, 2007**).

Kod većine virusnih zaraza, osnovu kontrole oboljenja koje izazivaju čine preventivne mere (**Šutić, 1995; Krstić i Vico, 2004; Krstić i Bulajić, 2007**):

- Rasad paprike treba proizvoditi odvojeno od rasada drugih osetljivih povrtarskih biljaka, kao i od rasada duvana;
- Izbegavanje ranih infekcija (izolovanje proizvodnje rasada, zaštitni pojasevi oko useva ili primena mineralnih ulja koja bi omela prenošenje virusa vašima);
- Papriku treba prostorno odvajati od biljaka koje mogu biti izvor zaraze virusima (lucerka i crvena detelina);
- Pre početka proizvodnje, kao i u toku proizvodnje, korov oko useva treba tretirati insekticidima, jer se kolonije vaši prvo formiraju i razvijaju na njima odakle prelaze na biljke paprike;
- S obzirom da se virusi koji se prenose vašima, prenose na neperzistentan način, insekticidi ne mogu da spreče širenje virusa u usevu i sa useva na usev u toku vegetacije. Primena insekticida u toku vegetacije nije efikasna, ali tretiranja u toku proizvodnje rasada i neposredno pred rasađivanje može da bude veoma korisna;

- Kontrola vektora-tripsa u cilju sprečavanja prenošenja TSWV. Ukoliko se reaguje na vreme i uključi pravilan izbor insekticida, rotacija insekticida iz različitih hemijskih grupa i kvalitetna primena, moguće je efikasno uništiti većinu populacije tripsa;
- Gajenje otpornih sorti je jako važna mera, kojom se može značajno smanjiti problem virusnih zaraza.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Izučavanje viroza ima izuzetan značaj zbog velike brojnosti virusa infektivnih za papriku i njihove različite epidemiologije, što zahteva potpuno različit pristup kontroli virusnih bolesti. Dobijeni podaci o virusima paprike, naročito informacije o strukturi populacije prevalentnih vrsta, biće nezamenljivi u oplemenjivačkom radu na selekciji genotipova paprike sa povišenim nivoom otpornosti.

Izučavanje prisustva i rasprostranjenosti TSWV na paprici u našoj zemlji od izuzetnog je značaja zbog ponovne pojave u epidemijским razmerama ovog "re-emerging" virusa u svetu i Evropi. Rezultati ovih ispitivanja doprineće potpunijem sagledavanju prisustva ovog virusa na teritoriji Srbije u usevu paprike kao jednoj od najvažnijih biljaka domaćina.

Izuzetan značaj virusa paprike i njihova nedovoljna proučenost u našoj zemlji doveli su do definisanja osnovnih ciljeva ove doktorske disertacije:

- utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa paprike u našoj zemlji u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju, primenom ELISA testa;
- molekularna detekcija i identifikacija prisutnih virusa paprike u Srbiji primenom RT-PCR metode;
- sekvencioniranje amplifikovanih fragmenta virusa prisutnih u Srbiji i utvrđivanje nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sa sekvencama izolata odgovarajućih virusa poreklom iz različitih delova sveta;
- rekonstrukcija filogenetskih stabala izolovanih virusa paprike u Srbiji i određivanje mesta izolata virusa poreklom iz Srbije u odnosu na izolate poreklom iz drugih delova sveta;

Detaljnija ispitivanja prisutnih virusa paprike kod nas, kao i primena najsavremenijih molekularnih tehnika, unaprediće metode detekcije, identifikacije i karakterizacije ovih virusa, doprineće inventarizaciji virusa u Srbiji i doprineće razumevanju njihovog porekla i daljeg širenja u našoj zemlji.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka paprike

Tokom 2009. i 2010. godine, radi utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti virusa paprike u Srbiji, pregledani su različiti lokaliteti gajenja paprike u Srbiji.

Prisustvo virusa kao i njihova rasprostranjenost utvrđivana je kako u proizvodnji paprike u rasadu, proizvodnji u zaštićenom prostoru, tako i u proizvodnji paprike na otvorenom polju, s tim što se vodilo računa da se obuhvati veći broj sorti. Iz pregledanih useva prikupljeni su uzorci paprike sa simptomima koji su ukazivali na moguću virusnu zarazu. Uzimanje uzoraka je obavljeno u polju na usevima kod kojih se sumnjalo na prisustvo virusa. Ukoliko su parcele bile manjih dimenzija ili intenzitet zaraze slab, sakupljen je manji broj uzoraka sa simptomima, a ukoliko su parcele bile veće ili je intenzitet zaraze bio jači, uzorci su sakupljeni kretanjem po usevu dijagonalno odabirom uzoraka sa simptomima. Tom prilikom sakupljeno je ukupno 881 uzorak paprike, i to 457 uzoraka paprike u 2009.-toj i 424 uzoraka u 2010.-toj godini. Za vreme pregleda useva paprike, vršena je i ocenu intenziteta zaraze, tako što je utvrđivana učestalost pojave virusnih simptoma, odnosno procenat zaraženih biljaka.

Tokom 2009. godine, 121 uzorak je sakupljen tokom pregleda proizvodnje paprike u rasadu na 15 lokaliteta gajenja: Bačka Palanka, Obrovac, Veternik, Kruševac (dva useva paprike), Srbobran, Kula, Ruma, Đurđevo, Žabalj, Pivnice, Gospođinci, Rimski Šančevi, Aleksinac i Šabac. Prilikom pregleda proizvodnje paprike u zaštićenom prostoru prikupljeno je 129 uzoraka sa 15 lokaliteta gajenja: Lukino Selo, Srbobran, Velika Plana, Trstenik, Smederevo, Kikinda, Đurđevo, Selenča, Aleksinac, Sivas, Sombor, Čačak, Pivnice, Žabalj i Veternik. Iz useva proizvodnje paprike na otvorenom polju, prikupljeno je 207 uzoraka sa 16 lokaliteta gajenja: Selenča, Velika Plana, Horgoš (dva useva paprike), Ravno Selo, Čonoplja, Čačak, Đurđevo, Trstenik, Bačka Palanka, Senta, Kraljevo, Smederevo, Indija, Veternik i Aleksinac.

Tokom 2010. godine, ispitivanje prisustva virusa na paprici gajene u rasadu, obuhvatilo je pregled 13 lokaliteta: Aleksinac, Bukovac, Ruma, Trstenik, Kula, Srbobran, Rimski Šančevi, Indija, Sombor, Bačka Palanka, Šabac, Subotica i Bačka

Topola. Sakupljeno je ukupno 115 uzoraka sa simptomima virusne zaraze. Pregled prisustva virusnih zaraza u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru obavljen je sa 14 lokaliteta gajenja: Pećinci, Lukino Selo, Žabalj, Ruma, Šabac, Kać, Valjevo, Horgoš, Sirig, Užice, Aleksinac, Sombor, Kikinda i Smederevo i tom prilikom je za dalju analizu prikupljen 141 uzorak. Iz useva proizvodnje paprike u polju, prikupljeno je 168 uzoraka sa 16 lokaliteta gajenja: Đurđevo, Bačka Topola, Ruma, Šabac, Horgoš, Kikinda, Bački Jarak, Čonoplja, Smederevo, Užice, Aleksinac, Valjevo, Knjaževac, Bukovac, Vašica, Rimski Šančevi.

Svaki formiran uzorak, sastojao se od više listova paprike sa jedne biljke. Sakupljeni uzorci su do laboratorije transportovani u plastičnim kesama u ručnom frižideru. Ukoliko je analiza rađena u roku od 48 časova, uzorci su čuvani na temperaturi od +4°C, a ukoliko je do analize bio potreban vremenski period od nekoliko dana, uzorci su čuvani na -20°C do trenutka analize.

Prethodna saznanja o simptomima oboljenja koje uzrokuju virusi na paprici (**Ozaslan et al., 2006; Krstić i Bulajić, 2007; Mijatović i sar., 2007; Lamb et al., 2008**) iskorišćena su za identifikaciju patogena u prirodnim uslovima. Tokom pregleda biljaka uočeni simptomi u vidu promena opšteg izgleda biljaka ili promena na lišću, stablu i plodovima zabeleženi su i dokumentovani fotografijom, tako da bi se na osnovu formirane dokumentacije o ispitivanim uzorcima i završenih laboratorijskih analiza moglo utvrditi postojanje veze između određenog dokazanog virusa i simptoma koje izaziva na paprici.

4.2. Direktni imunoenzimski metod na ploči (DAS–ELISA)

Prikupljeni uzorci paprike koji su po simptomima nagoveštavali da se radi o virusnoj prirodi oboljenja, serološki su analizirani u cilju detekcije najrasprostranjenijih i ekonomski najznačajnijih virusa paprike, pri čemu bi se na osnovu seroloških analiza utvrdila prisutnost i rasprostranjenost virusa paprike po lokalitetima u obe ispitivane godine.

Uzorci paprike sa simptomima virusnih zaraza sakupljeni tokom 2009. i 2010. godine, testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS–ELISA) po protokolu koji su opisali **Clark and Adams (1977)**, korišćenjem komercijalnih

poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju odgovarajućih virusa i po uputstvu proizvođača (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka). Serološko testiranje uzoraka obuhvatilo je detekciju devet najznačajnijih virusa paprike: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus crtičastog mozaika krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus mozaika krompira (*Potato virus X*, PVX), virus šarenila paprike (*Pepper mottle virus*, PepMoV), virus blagog šarenila paprike (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) i virus šarenila nerava paprike (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV). Jedan uzorak za analizu, pripreman je kao zbirni uzorak više fragmenata listova ili stabla, peteljke ili plodova iste biljke sa izraženim simptomima. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:20. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatizom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Svaki uzorak je testiran u dva ponavljanja. Promena boje je praćena vizuelno, a zatim i merenjem ekstinkcije na talasnoj dužini 405 nm na spektrofotometru (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

Osnovni koraci, u izvođenju DAS–ELISA testa bili su sledeći:

- Polisterinske mikrotitarske ploče obeležene su specifičnim antitelima (IgG) na virus čije se prisustvo ispituje.
- Napravljen je rastvor za oblaganje ploče u odnosu 1 IgG : 200 pufera za oblaganje i u svako udubljenje na ploči je dodato 200 µl pomenutog rastvora. Ploča je umotana u transparentnu foliju i zatim je stavljena na inkubaciju u trajanja 4 časa na 37°C.
- Nakon inkubacije, ploče su isprane 4 puta puferom za ispiranje.
- Homogenizacija uzorka vršena je pomoću avana i tučka u ekstrakcionom puferu u razređenju 1:20.
- U udubljenja na mikrotitarskoj ploči, koja su prethodno isprana puferom za ispiranje naneto je 200 µl svakog ispitivanog uzorka u dva ponavljanja. Pozitivna i negativna kontrola su takođe nanete u dva ponavljanja. Inkubacija je vršena na +4°C preko noći.

- Posle ispiranja ploče, u bunarčice je uneto po 200 μ l antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (antibody-AP-conjugate), razređenog u konjugatnom puferu u odnosu 1:200, a ploče su inkubirane 4 časa na 37°C.
- Posle inkubacije, mikrotitarske ploče ispirane su kako je napred navedeno, a zatim je u svaki bunarčić uneto po 200 μ l pripremljenog supstrata (p-nitrofenilfosfat) u supstratnom puferu (20 μ l/20 ml). Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi do pojave bojene reakcije (1-2 časa).
- Nakon 1-2 časa po dodavanju supstrata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski na automatskom čitaču (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) merenjem ekstinkcije na talasnoj dužini od 405 nm. Rezultati za svaki uzorak su preračunati kao prosečna vrednost dva ponavljanja, a pozitivnim su se smatrali svi uzorci čija je vrednost apsorpcije bila dva ili više puta veća od negativne kontrole.

Za izvođenje DAS–ELISA testa (LOEWE Biochemica GmbH, Germany) 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	1000 ml

Pufer za ispiranje (Wash buffer)	NaCl	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	Tween 20	0,5 ml
	dH ₂ O	1000 ml

Pufer za ekstrakciju/ konjugatni pufer (Sample buffer /Conjugate) pH 7,4	Polivinilpirolidon	20 g
	bovine serum albumin	2 g
	NaN ₃	0,1 g
	NaCl	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	Tween 20	0,5 ml
	dH ₂ O	do 1000 ml

Supstratni pufer (Substrate buffer) pH 9,8	Diethanolamine	97 ml
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
	dH ₂ O	do 1000 ml

4.3. Molekularna detekcija virusa paprike primenom reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (RT–PCR)

Detekcija izolata virusa koji su tokom ovog rada izolovani iz prirodno zaraženih biljka paprike i potvrda rezultata dobijenih serološkim analizama, obavljena je pomoću metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*, RT–PCR). RT-PCR reakciji prethodila je ekstrakcija totalne RNA iz zaraženog biljnog materijala, primenom Rneasy Plant Mini Kita (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača.

RT-PCR metoda za molekularnu detekciju, identifikaciju i karakterizaciju odabranih izolata virusa izvođena je primenom protokola za „One–step“ RT–PCR kit

(Qiagen, Hilden, Germany) po uputstvu proizvođača. Po ovom protokolu, reakcije reverzne transkripcije i lančane polimeraze izvode se jedna za drugom u istoj PCR tubici. Primenom PCR metode i korišćenjem specifičnih prajmera vrši se sinteza određenog, ciljnog dela DNA. Od više raspoloživih nukleinskih kiselina, prajmeri prepoznaju i vezuju se za komplementarna mesta i kroz veći broj ponovljenih ciklusa lančane reakcije polimeraze omogućavaju amplifikaciju samo ciljne sekvence DNA. Kako izolovani virusi paprike imaju genom u vidu RNA, da bi se mogla obaviti njihova detekcija primenom PCR metode, neophodno je prethodno prepisati virusnu RNA u komplementarni lanac DNA (cDNA). Ovaj korak označava se kao reverzna transkripcija ili RT korak.

Analiza dobijenih PCR produkata obavlja se elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu i vizuelizacijom bojenjem etidijum bromidom i posmatranjem pod UV svetlom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine baznih parova (bp).

4.3.1. Ekstrakcija RNA iz biljnog materijala

Ekstrakcija RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka paprike izvedena je primenom Rneasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Za izolaciju ukupnih RNA iz lišća paprike, korišćeno je 100 mg zamrznutog biljnog materijala prethodno čuvanog na -80°C . Ekstrakcija ukupne RNA obavljena je na sledeći način:

- Zaraženo lišće je izmacerirano u avanu sa tučkom, dodavanjem tečnog azota.
- Usitnjen biljni materijal i tečni azot su prebačeni u ependorf tubicu od 2 ml u koju je dodato 450 μl RLT pufera, a zatim je sadržaj tubice vorteksovan.
- Tubice su inkubirane 3 min u vodenom kupatilu na 56°C , u cilju što efikasnije razgradnje biljnog tkiva.
- Nakon inkubacije uzorak je prebačen u QIAshredder spin filter u tubicama od 2 ml i centrifugiran 3 min na maksimalnom broju obrtaja (14 000 obrtaja/min) u cilju odstranjivanja ćelijskih delova i homogenizacije lizata.
- Supernatant je pipetiran u novu ependorf tubicu od 2 ml pazeći da se ne razbije talog. U tubicu je dodato 225 μl 96% etanola da bi se razbistrio supernatant.

- Sadržaj tubice je zatim pipetiran u RNase spin filter smešten u nove kolekcione tubice od 2 ml. Centrifugiranjem uzorka 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm obezbeđeno je izdvajanje i vezivanje RNA za filter kao i uklanjanje većeg dela DNA koji se odbacuje zajedno sa supernatantom.
- Na RNase spin filter smešten u kolekcionu tubicu pipetirano je 700 μ l RW1 pufera za ispiranje, a zatim je izvršeno centrifugiranje 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm.
- Tečna faza je odbačena, a na RNase spin filter je pipetirano 500 μ l RPE pufera u cilju ispiranja RNA, tubica sa uzorkom centrifugirana je 15 s na $\geq 10\ 000$ rpm.
- Tečna faza je odbačena, a ispiranje RNase spin filtera je ponovljeno sa novih 500 μ l RPE pufera, centrifugiranjem 2 min na $\geq 10\ 000$ rpm.
- Nakon centrifugiranja RNase spin filter je prebačen u novu kolekcionu tubicu i centrifugiran 1 min na maksimalnom broju obrtaja da bi se uklonili ostaci etanola i pufera.
- Rnase spin filter je prebačen u novu kolekcionu tubu od 1,5 ml i pipetirano je 40 μ l RNase-free vode direktno na filter. Centrifugiranje je trajalo 1 min na $\geq 10\ 000$ rpm da bi se rastvorila RNA.
- Pipetirano je još 10 μ l RNase-free vode direktno na filter, a takođe je izvršeno i centrifugiranje kao u prethodnom koraku.
- Tako dobijena i izolovana RNA čuvana je na -80°C .

4.3.2. Molekularna detekcija izolata CMV

Za ova ispitivanja odabrana su četiri izolata CMV koji su prethodno detektovani serološkom metodom:

1. P-14-09 sakupljen 2009. godine (Velika Plana)
2. PL-25-09 sakupljen 2009. godine (Velika Plana)
3. PL-43-09 sakupljen 2009. godine (Smederevo)
4. PL-52-09 sakupljen 2009. godine (Kikinda)

Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ovog virusa iz paradajza (746-07) (Stanković et al., 2011) koji se nalazi u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao negativna

kontrola korišćena je PCR smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNA, ali je umesto 0,8 µl uzorka dodato 0,8 µl RNase free vode.

Za molekularnu detekciju CMV izolata iz paprike korišćeni su prajmeri Au1u/Au2d koji obuhvataju celi gen za proteinski omotač i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona koji se nalaze na RNK3 segmentu (ili subgenomnom RNK4)(Krstić i sar., 2002) (Tabela 1):

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju CMV

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'-3'	Veličina amplikoma (bp)
CP gen	Au1u	CAT GGA TGC TTC TCC RCG AG	847
	Au2d	CGT AAG CTG GAT GGA CAA CC	

RT-PCR reakcije obavljane su u 20 µl zapremine PCR smeše, koja je sadržavala: 4 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 0,8 µl dNTP mešavine (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smeši 400 µM), 0,8 µl Qiagen OneStep RT-PCR smeše enzima (koji sadrži Omniscript Reverse transkriptazu, Sensiscript Reverse transkriptazu i HotStar Taq DNA polimerazu), po 1,2 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,6 µM, 11,2 µl RNase-free vode i 0,8 µl izolovane ukupne RNA.

Reakcija je izvedena pri sledećim uslovima:

- reverzna transkripcija 30 min na 50°C
- denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C 15 min na 95°C
- denaturacija 30 s na 94°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 30 s na 58°C (35 ciklusa)
- i elongacija 30 s na 72°C
- finalna elongacija 10 min na 72°C

4.3.3. Molekularna detekcija izolata PVY

Za ova ispitivanja odabrano je četiri izolata čija je prethodna detekcija obavljena DAS-ELISA testom:

1. PL-28-09 sakupljen 2009. godine (Velika Plana)
2. PL-15-09 sakupljen 2009. godine (Srbobran)
3. PL-3-10 sakupljen 2010. godine (Pećinci)
4. PL-108-10 sakupljen 2010. godine (Aleksinac)

Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat D7-06 izolovan iz biljke duvana koji je ranije okarakterisan (Stanković et al., 2011) i nalazi se u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao negativna kontrola korišćena je PCR smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNA, ali je umesto 0,8 µl uzorka dodato 0,8 µl RNase free vode.

Korišćeni su prajmeri PVYc/PVYd (Tabela 2) čije sekvence umnožavaju deo genoma vezan za sekvencu 5' neprepisujućeg (5' UTR) regiona i gena za P1 protein, regiona sa najvećom varijabilnošću unutar genoma PVY (Marie–Jeanne Tordo et al., 1995; Glais et al., 1996). Mesto vezivanja PVYc prajmera je homologo sa ciljnom sekvencom od 1-21 nt, a PVYd prajmera komplementarno pozicijama nukleotida od 955-975. Degenerativni prajmer PVYd omogućava prepoznavanje svih do sada testiranih PVY izolata.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za detekciju PVY

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'-3'	Veličina amplikona (bp)
Gen za P1 protein	PVYc	AAT TAA AAC AAC TCA ATA CA	975
	PVYd	TGY GAH CCA CGC ACT ATG AA	

PCR reakcije obavljane su u 20 µl zapremine PCR smeše, čiji je sadržaj opisan u prethodnom poglavlju.

Reakcija je izvedena pri sledećim uslovima:

- reverzna transkripcija 30 min na 50°C
- denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C
- denaturacija 1 min na 94°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 57°C (35 ciklusa)
- elongacija 1 min na 72°C
- finalna elongacija 10 min na 72°C

4.3.4. Molekularna detekcija izolata TSWV

Molekularna detekcija TSWV urađena je na tri odabrana izolata iz paprike koji su prethodno detektovani na serološkom nivou:

1. PL-35-09 sakupljen 2009. godine (Trstenik)
2. PL-60-09 sakupljen 2009. godine (Đurđevo)
3. PL-14-10 sakupljen 2010. godine (Lukino Selo)

Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat 53-05 dobijen iz biljke *Nicotiana tabacum* koji je ranije okarakterisan (Stanković et al., 2011) i nalazi se u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao negativna kontrola korišćena je PCR smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNA, ali je umesto 0,8 µl uzorka dodato 0,8 µl RNase free vode.

Umnožavanje različitih delova genoma izolata TSWV obavljeno je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) korišćenjem tri para prajmera koji umnožavaju fragmente cDNK od 276 bp (Mumford et al., 1996a; OEPP/EPPO, 2004), 800 bp (Jain et al., 1998; Pappu et al., 1998; Holguin-Pena and Rueda-Puente, 2007) i 738 bp (Vučurović et al., 2012), locirane na različitim delovima genoma TSWV čije su sekvence date u tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za detekciju TSWV

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'-3'	Veličina ampikona (bp)
RdRp gen L RNA	L2 TSWVF	ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA	276
	L1 TSWVR	AGG AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC	
NC gen S RNA	TSWVgene F	ATG TCT AAG GTT AAG CTC	800
	TSWVgene R	TTA AGC AAG TTC TGT GAG	
NC gen S RNA	TSWV CP-f	GT TAA GCT CAC TAA GAA ARC A	738
	TSWV CP-r	TTT AAC YCC RAA CAT TTC ATA GA	

PCR reakcije obavljane su u zapremini PCR reakcione smeše od 20 μ l, čiji je sadržaj opisan u poglavlju 3.3.2. Odstupanja postoje kod prajmera TSWV CP-f/ TSWV CP-r gde je prajmer TSWV CP-f dodat u količini od 2,4 μ l, dok je TSWV CP-r u količini od 3,6 μ l, kao i 7,6 μ l RNase-free vode.

RT-PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima:

- reverzna transkripcija 30 min na 50°C
- denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C
- denaturacija, hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) i elongacija (veći broj ciklusa) – uslovi za izvođenje reakcije su u zavisnosti od vrste korišćenih prajmera
- finalna elongacija 10 min na 72°C

Zavisno od korišćenih prajmera uslovi za izvođenje PCR reakcije bili su sledeći:

L2 TSWVF/L1 TSWVR par prajmera:

- denaturacija 1 min na 94°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 55°C (35 ciklusa)
- elongacija 1 min na 72°C

TSWVgene F/TSWVgene R par prajmera:

- denaturacija 1 min na 94°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 55°C (40 ciklusa)
- elongacija 2 min na 72°C

TSWV CP-f/ TSWV CP-r par prajmera:

- denaturacija 1 min na 94°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 53°C (40 ciklusa)
- elongacija 1 min na 72°C

4.3.5. Molekularna detekcija izolata AMV

Za ova ispitivanja odabrani su sledeći izolati AMV sa različitih lokaliteta:

1. P-27-09 sakupljen 2009. godine (Velika Plana)
2. PL-2-10 sakupljen 2010. godine (Pećinci)
3. P-10-10 sakupljen 2010. godine (Bačka Topola)

Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat ovog virusa 196-08 poreklom iz duvana (**Stanković et al., 2011**) koji se nalazi u kolekciji biljnih virusa Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao negativna kontrola korišćena je PCR smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNA, ali je umesto 0,8 µl uzorka dodat 0,8 µl RNase free vode.

Za molekularnu detekciju AMV izolata iz paprike korišćeni su prajmeri CP AMV1/ CP AMV2, koji umnožavaju segment DNK finalne dužine 751 bp koji obuhvata kodirajući gen za proteinski omotač (CP) virusa (**Finetti-Sialer et al., 1997; Parella et al., 2000**). Mesto vezivanja CP AMV1 prajmera je homologo sa ciljnom sekvencom od 1187-1205 nt, a CP AMV2 prajmera komplementarno pozicijama nukleotida od 1920-1938 (Tabela 4).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za detekciju AMV

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'-3'	Veličina amplikona (bp)
CP gen	CP AMV1	TCC ATC ATG AGT TCT TCA C	751
	CP AMV2	AGG ACT TCA TAC CTT GAC C	

PCR reakcije su obavljane u PCR reakcionoj smeši od 20 μ l, čiji je sadržaj opisan u poglavlju 3.3.2.

Reakcija je izvedena pri sledećim uslovima:

- reverzna transkripcija 30 min na 50°C
- denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C
- denaturacija 1 min na 95°C
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 49°C (35 ciklusa)
- elongacija 2 min na 72°C
- finalna elongacija 10 min na 72°C.

4.3.6. Molekularna detekcija izolata PMMoV

Za ova ispitivanja odabrana su tri izolata PMMoV čija je prethodna detekcija obavljena DAS-ELISA testom:

1. P-57-09 sakupljen 2009. godine (Čonoplja)
2. P-60-09 sakupljen 2009. godine (Čonoplja)
3. P-3-10 sakupljen 2010. godine (Đurđevo)

Pozitivna kontrola nije postojala. Kao negativna kontrola korišćena je PCR smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNA, ali je umesto 0,8 μ l uzorka dodato 0,8 μ l RNase free vode.

Za molekularnu detekciju PMMoV izolata iz paprike korišćeni su prajmeri P12/3/P12/3A (Velasco et al., 2002) i PMR1/ PMF1 (Hamada et al., 2002), čije su sekvence date u tabeli 5 i koji omogućavaju amplifikaciju RdRp i CP gena virusa.

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za detekciju PMMoV

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'-3'	Veličina amplikona (bp)
RdRp gen	P12/3	ACAGCGTTTGGATCTTAGTAT	836
	P12/3A	GTGCGGTCTTAATAACCTCA	
CP gen	PMR1	CGGAATTCGAGTTATCGTACTCGCCACGGACG	474
	PMF1	CGCGGATCCAGAACTCGGAGTCATCGGAC	

PCR reakcije su obavljane u zapremini PCR reakcione smeše od 20 µl, čiji je sadržaj opisan u poglavlju 3.3.2.

Reakcija je izvedena pri sledećim uslovima:

- reverzna transkripcija 30 min na 50°C,
- denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C
- denaturacija, hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) i elongacija (veći broj ciklusa) - uslovi za izvođenje reakcije su u zavisnosti od vrste korišćenih prajmera.
- finalna elongacija 10 min na 72°C.

Zavisno od korišćenih prajmera uslovi za izvođenje PCR reakcije bili su sledeći:

P12/3 i P12/3A par prajmera:

- denaturacija 30 s na 92°C,
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 30 s na 60°C (30 ciklusa)
- elongacija 45 s na 72°C

PMF1 i PMR1 par prajmera:

- denaturacija 30 s na 94°C,
- hibridizacija nukleinskih kiselina (annealing) 1 min na 50°C (35 ciklusa)
- elongacija 1 min na 72°C

4.3.7. Vizuelizacija PCR produkta

Dobijeni produkti su elektroforetski razdvojeni u 1% agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine agaroze u odgovarajućoj količini 1x TBE pufera (0,1 g:10 ml) i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Pod mlazom hladne vode, ohlađen gel do temperature 60°C, razliven je u kalup za horizontalnu elektroforezu, u koji je prethodno postavljen češalj, a zatim je ostavljen na sobnoj temperaturi pola sata da se ohladi i očvrсне. Po očvršćavanju gela, češalj je izvađen, a kalup je uronjen u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1x TBE puferom (90 mM Tris, 90 mM Borna kiselina, 1 mM Na₂EDTA).

Uzorci su pripremljeni od 1 µl boje (6x Loading dye, Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i 5 µl PCR proizvoda. Za određivanje veličine umnoženih amplikona korišćeni su markeri MassRuler™ DNA ladder, Mix i O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pripremljeni uzorci nanošeni su na gel sa bunarčićima u odgovarajućem rasporedu.

Reakcija elektroforeze je obavljena u aparatu za elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK) pri konstantnom naponu od 40 mA u trajanju od približno 40 min.

Posle završene elektroforeze, gel je inkubiran 15 min u rastvoru za bojenje od destilovane vode i etidijumbromida u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori na transiluminatoru (Biometra, UK) pod UV svetlošću. Pojava traka na očekivanoj poziciji u poređenju sa markerom, smatrana je pozitivnom reakcijom. Dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela.

4.4. Molekularna identifikacija virusa paprike

U cilju određivanja redosleda nukleotida u amplifikovanom delu genoma, višestrukog uparivanja sekvenci odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata odgovarajućih virusa dostupnih u NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) bazi podataka, proračuna genetičke sličnosti, kao i u cilju filogenetske analize, obavljeno je sekvencioniranje.

Nakon sinteze, PCR produkti izolata odabranih za sekvencioniranje prečišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany). Višestrukim uparivanjem sekvenci izolata sa sekvencama drugih virusa dostupnih u NCBI bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti obavljena je molekularna identifikacija odabranih izolata virusa paprike poreklom iz naše zemlje.

Za sekvencioniranje je odabrano ukupno 16 izolata i to: četiri izolata PVY, i po tri izolata CMV, AMV, TSWV i PMMoV. Za sekvencioniranje izolata CMV, TSWV, AMV korišćeni su PCR produkti dobijeni korišćenjem prajmera koji omogućavaju amplifikaciju CP odnosno NC gena, za izolate PVY produkti dobijeni korišćenjem prajmera koji omogućavaju umnožavanje 5' UTR i gena za P1 protein, dok su za sekvencioniranje izolata PMMoV korišćeni PCR produkti dobijeni korišćenjem prajmera koji omogućavaju amplifikaciju RdRp i CP gena (Tabela 6).

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za umnožavanje fragmenata za sekvencioniranje

Virus	Izolat	Naziv prajmera	Ciljna sekvenca
CMV	PL-43-09	Au1u/Au2d	CP gen
CMV	PL-52-09	Au1u/Au2d	CP gen
CMV	PL-25-09	Au1u/Au2d	CP gen
PVY	PL-3-10	PVYc/PVYd	5' UTR i gen za P1 protein
PVY	PL-15-09	PVYc/PVYd	5' UTR i gen za P1 protein
PVY	PL-28-09	PVYc/PVYd	5' UTR i gen za P1 protein
PVY	PL-108-10	PVYc/PVYd	5' UTR i gen za P1 protein
TSWV	PL-35-09	TSWV CP-f/ TSWV CP-r	CP gen
TSWV	PL-14-10	TSWV CP-f/ TSWV CP-r	CP gen
TSWV	PL-60-09	TSWV CP-f/ TSWV CP-r	CP gen
AMV	P-10-10	CP AMV1/CP AMV2	CP gen
AMV	PL-2-10	CP AMV1/CP AMV2	CP gen
AMV	P-27-09	CP AMV1/CP AMV2	CP gen
PMMoV	P-3-10	PMR1/PMF1	CP gen
PMMoV	P-57-09	PMR1/PMF1	CP gen
PMMoV	P-60-09	PMR1/PMF1	CP gen
PMMoV	P-3-10	P12/3/P12/3A	RdRp gen
PMMoV	P-57-09	P12/3/P12/3A	RdRp gen
PMMoV	P-60-09	P12/3/P12/3A	RdRp gen

Nakon uspješne sinteze, PCR produkti izolata određenih za sekvencioniranje prečišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prateći upustvo proizvođača:

1. Jedna zapremina dobijenog PCR produkta i miksa pomešana je sa pet zapremina PBI pufera, a zatim prebačena u QIAquick kolonu smeštenu u kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13000 rpm) u cilju vezivanja DNA za filter.
2. Tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolonu je pipetirano 750 µl PE pufera u cilju ispiranja RNA, posle čega je tubica sa uzorkom centrifugirana 1 min na 13 000 rpm.
3. Tečna faza je odbačena, a QIAquick kolona vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na 13 000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera.
4. U cilju rastvaranja DNA u QIAquick kolonu smeštenu u novu tubicu od 1,5 ml pipetirano je 50 µl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13 000 rpm. Tako dobijena DNA čuvana je na +4°C za dalji rad.

U cilju provere čistoće uzoraka, njihove molekularne mase i količine sintetisane DNA, uzorci su zatim elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu. Količina

umnoženih fragmenata u uzorcima određena je poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima komercijalnog markera 100 bp DNA Ladder (Serva GmbH, UK).

Reakcije sekvencioniranja urađene su u BMR Genomics (Padova, Italy) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvencionatoru. Umnoženi fragmenti gena virusa sekvencionirani su u oba smera upotrebom odgovarajućih prajmera, odnosno prajmerima koji su korišćeni za njegovo umnožavanje.

Nakon sekvencioniranja, dobijene sekvence odabranih izolata CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0. i podnete u NCBI banku gena, posle čega im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number). Pomoću MEGA verzije 4.0 (**Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2007**) i pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize izvršeno je međusobno poređenje dobijenih sekvenci kao i višestruko poređenje dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) čime je obavljena potvrda identifikacije dobijene sekvence.

Za proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti na osnovu sekvence dela genoma odabranog izolata sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 4.0.

4.5. Filogenetska analiza

Nakon sekvencioniranja amplifikovanih fragmenata, utvrđena je njihova filogenetska sličnost sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka.

Molekularna karakterizacija virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV, infektivnih za papriku, obavljena je filogenetskom analizom (proučavanje evolutivne povezanosti) odabranih izolata sa drugim izolatima dostupnim u NCBI bazi podataka. Za filogenetske analize odabrana su četiri izolata PVY i po tri izolata CMV, TSWV, AMV i PMMoV.

Nakon obrade dobijenih sekvenci CP gena izolata CMV, PVY, AMV i PMMoV, NC gena izolata TSWV, i gena za P1 protein za izolate PVY, obavljeno je međusobno poređenje, kao i njihovo poređenje sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka (tabela 7, 8, 9, 10 i 11). Nakon toga rekonstruisano je filogenetsko stablo,

korišćenjem Maximum Parsimony metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja integrisanih unutar MEGA 4 programa. U rekonstrukciji filogenetskog stabla, kod CMV, PVY i PMMoV korišćena je „outgroup-a”. Stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci celog gena za protein omotača virusa i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona CMV rutovano je korišćenjem sekvence izolata ER (U15730), stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci gena za P1 protein PVY rutovano je korišćenjem sekvence izolata PepMoV (M96425), dok je stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci CP gena PMMoV rutovano korišćenjem sekvence izolata TMV (X70883) i ToMV (AF411922). Poređenje nukleotidne identičnosti i aminokiselinske sličnosti između sekvenci korišćenih za filogenetsko stabalo obavljeno je, takođe, korišćenjem MEGA 4 programa.

Odabrane sekvence za rekonstrukciju filogenetskih stabala skraćene su prema dužini najkraće sekvence. Za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci NC gena TSWV izolata, odabrane sekvence su skraćene na dužinu 632 bp prema sekvencama iz NCBI baze podataka Z36882 i AJ296599. Za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci gena za P1 protein PVY izolata, odabrane sekvence isečene su na dužinu 756 bp sekvence prema sekvencama iz NCBI baze podataka: EU252529, AF012027, AF012026 i naše sekvence PL-3-10. Za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci CP gena CMV izolata, odabrane sekvence su skraćene na dužinu 657 bp prema većem broju sekvenci iz NCBI baze podataka. Za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci CP gena AMV izolata, odabrane sekvence su skraćene na dužinu 600 bp prema sekvenci iz NCBI baze podataka FJ858264, dok su za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci CP gena PMMoV izolata sekvence skraćene na 474 bp, prema dužini sekvence većine izolata odabranih filogenetsku analizu.

Tabela 7. Sekvence CP gena odabranih izolata CMV korišćenih za filogenetsku analizu

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Acc. No.	Literaturni izvor
PL-25-09	Velika Plana	paprika	KC288146	Ova proučavanja
PL-43-09	Smederevo	paprika	KC288147	Ova proučavanja
PL-52-09	Kikinda	paprika	KC288148	Ova proučavanja
MAD99/4	Španija	tikva	AJ829770	Bonnet et al.,2005
MAD96/1	Španija	dinja	AJ829768	Bonnet et al.,2005
I17F	Francuska	-	X16386	Noel and Tahar, 1989
MAD99/1	Španija	dinja	AJ829776	Bonnet et al., 2005
Ban	Izrael	banana	U43888	Gafny et al., 1996
702-07	Srbija	duvan	GQ340670	Nije publikovano
CMV-P6	USA	duvan	D10545	Shintaku,1991
207	Australija	paradajz	AJ585517	Nije publikovano
151-08	Srbija	tikva	HM065509	Nije publikovano
115-08	Srbija	tikva	HM065510	Nije publikovano
CMV-FC	USA	duvan	D10544	Shintaku, 1991
PR36	USA	-	M98500	Nije publikovano
-	Kolumbija	banana	U32859	Reichel et al., 1996
P1	Kina	-	AJ006988	Zhou et al., 1999
KM	Japan	dinja	AB004780	Takeshita and Takanami, 1997
Cas	Poljska	<i>Lilium</i> spp.	DQ018286	Berniak et al., 2010
RB	Kina	pasulj	AJ006990	Liu et al., 1999
113	USA	-	AF523340	Lin et al., 2003
NT9	Tajvan	-	D28780	Hsu et al.,1995
Trk7	Mađarska	-	L15336	Salanki et al.,1994
C7-2	Japan	-	D42079	Chaumpluk et. al., 1996
M-48	Tajvan	-	D49496	Nije publikovano
K	USA	-	AF127977	Roossinck et al., 1999
ABI	Koreja	gladiola	L36525	Nije publikovano
Tfn	Italija	paradajz	Y16926	Nije publikovano
pCP25	Indija	<i>Physalis minima</i>	X89652	Haq et al.,1996
Ixora	USA	<i>Ixora</i> spp.	U20219	McGarvey et al., 1995
Oahu	Havaji	banana	U31220	Hu et al., 1995
S	USA	-	AF063610	Nije publikovano
Q	Australija	-	M21464	Nije publikovano
LS	USA	-	AF127976	Roossinck et al., 1999
Simp2	Poljska	ljiljan	FJ621495	Berniak et al., 2010
M2	Japan	-	AB006813	Nije publikovano
Kin	Engleska	-	Z12818	Boccard and Baulcombe, 1993
ER	Indija	<i>Vigna unguiculata</i>	U15730	Naidu et al., 1995

Legenda: – nije pronađen podatak

Tabela 8. Sekvence gena za P1 protein PVY izolata korišćene za filogenetsku analizu

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Acc. No.	Literaturni izvor
PL-3-10	Pećinci	paprika	KC288144	Ova proučavanja
PL-15-09	Srbobran	paprika	KC288143	Ova proučavanja
PL-28-09	Velika Plana	paprika	KC288142	Ova proučavanja
PL-108-10	Aleksinac	paprika	KC288145	Ova proučavanja
D7-06	Srbija	duvan	GQ290476	Nije publikovano
D35-06	Srbija	duvan	GQ290475	Nije publikovano
Slovenia1	Slovenija	-	AJ315739	Nije publikovano
Sl 64	Slovenija	krompir	AF401604	Nie and Singh, 2002
Sl 50	Slovenija	krompir	AF401603	Nie and Singh, 2002
PVYN-N242	Francuska	krompir	AF248499	Nije publikovano
605	Švajcarska	-	X97895	Jakab et al., 1997
Tu 648	Kanada	krompir	AF401610	Nie and Singh, 2002
v942490	Velika Britanija	-	EF016294	Nije publikovano
Linda	Nemačka	duvan	AJ890345	Schubert et al., 2007
Satina	Nemačka	duvan	AJ890347	Schubert et al., 2007
423-3	USA	krompir	AY884982	Lorenzen et al., 2006
N 5Yt	Kanada	duvan	AF401605	Nie and Singh, 2002
Rusia	Velika Britanija	-	AJ315746	Nije publikovano
California	Kalifornija	-	AJ315744	Nije publikovano
English	Velika Britanija	-	AJ315747	Nije publikovano
Tu 619	USA	krompir	AF401608	Nie and Singh, 2002
Tu 660	USA	krompir	AF401609	Nie and Singh, 2002
N 27	Kanada	krompir	AF401606	Nie and Singh, 2002
N Jg	Kanada	krompir	AF401607	Nie and Singh, 2002
N266	Kanada	krompir	AF401600	Nie and Singh, 2002
N394	Kanada	krompir	AF401601	Nie and Singh, 2002
Canada	Kanada	-	AJ315745	Nije publikovano
USA	USA	-	AJ315742	Nije publikovano
Ukraine	Ukrajina	-	AJ315740	Nije publikovano
803	Finska	krompir	AJ245555	Maki-Valkama et al., 2000
Viikki	Finska	krompir	AJ245556	Maki-Valkama et al., 2000
Hungarian	Mađarska	-	M95491	Thole et al., 1993
Ditta	Poljska	duvan	AJ890344	Schubert et al., 2007
Scotland	Velika Britanija	-	AJ315743	Nije publikovano
Adgen	Francuska	krompir	AJ890348	Schubert et al., 2007
LYE84.2	Španija	paradajz	AJ439545	Moury et al., 2002
SON41	Francuska	<i>Solanum nigrum</i>	AJ439544	Nije publikovano
PepMoV	Kalifornija	-	M96425	Vance et al., 1992

Legenda: – nije pronađen podatak.

Tabela 9. Sekvence NC gena TSWV izolata korišćene za filogenetsku analizu

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Acc. No.	Literaturni izvor
PL-35-09	Trstenik	paprika	KC182565	Ova proučavanja
PL-14-10	Lukino Selo	paprika	KC182564	Ova proučavanja
PL-60-09	Đurđevo	paprika	KC182566	Ova proučavanja
53-05	Srbija	duvan	GQ373173	Nije publikovano
33-06	Srbija	duvan	GQ355467	Nije publikovano
39-06	Srbija	duvan	GQ373172	Nije publikovano
T304	Italija	paradajz	Z36882	Vaira et al., 1995
T992	Italija	paradajz	AY848922	Ciuffo et al., 2005
Spain-2	Španija	paradajz	AY744480	Tsompana et al., 2005
Spain-1	Španija	paradajz	AY744479	Tsompana et al., 2005
LC	Španija	-	X94550	Nije publikovano
DH37	Bugarska	paradajz	AJ418779	Heinze et al., 2003
BS97	Bugarska	duvan	AJ418777	Heinze et al., 2003
10HK96	Bugarska	duvan	AJ418778	Heinze et al., 2003
Le98/527	Nemačka	<i>Lysimachia</i>	AJ297611	Heinze et al., 2003
TSWV-D	Holandija	<i>Dahlia</i>	AF020660	Qiu et al., 1998
NC-1	Severna Karolina	<i>Dahlia</i>	AY744476	Tsompana et al., 2005
NC-3	Severna Karolina	<i>Dahlia</i>	AY744478	Tsompana et al., 2005
NC-2	Severna Karolina	kikiriki	AY744477	Tsompana et al., 2005
TSWV-10	Severna Karolina	kikiriki	AF020659	Qiu et al., 1998
98/0472	Južna Afrika	krompir	AJ296600	Heinze et al., 2001
TSWV-GP	Južna Afrika	kikiriki	EF059705	Sivparsad and Gubba, 2008
C27084	Češka Republika	kala	AJ296599	Heinze et al., 2001
AC	Džodžija	duvan	AF064469	Pappu et al., 1998
MC	Džordžija	duvan	AF064472	Pappu et al., 1998
Tospo-G	Japan	<i>Chrysanthemum</i>	AB038342	Nije publikovano
Tospo-C	Japan	<i>Chrysanthemum</i>	AB038341	Nije publikovano
Ordinary strain	Japan	-	AB088385	Takeda et al., 2002
CA-1	Kalifornija	<i>Aster</i>	AY744468	Tsompana et al., 2005
CA-4	Kalifornija	<i>Chrysanthemum</i>	AY744471	Tsompana et al., 2005
TSWV-BL	Havaiji	salata	L20953	Pang et al., 1992
L	Havaiji	salata	X61799	Kim et al., 1994
BR	Brazil	paradajz	D00645	de Haan et al., 1989

Legenda: – nije pronađen podatak

Tabela 10. Sekvence CP gena izolata AMV korišćenih za filogenetsku analizu

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Acc. No.	Literaturni izvor
P-10-10	Bačka Topola	paprika	KC182567	Ova proučavanja
PL-2-10	Pećinci	paprika	KC182569	Ova proučavanja
P-27-09	Velika Plana	paprika	KC182568	Ova proučavanja
196-08	Srbija	duvan	FJ527749	Nije publikovano
VRU	Velika Britanija	lupina	AF015716	Thole et al.,1998
15/64	Velika Britanija	lupina	AF015717	Thole et al.,1998
S	Velika Britanija	lucerka	X00819	Ravelonandro et al., 1984
425 Medison	SAD	bela detelina	K02703	Barker et al.,1983
425 Leiden	SAD	bela detelina	L00162	Koper-Zwarthoff et al.,1977
126-A	Italija	paradajz	AJ130704	Parrella et al., 2000
195-AN	Italija	<i>Portulaca oleracea</i>	AJ130705	Parrella et al., 2000
F-430	Italija	pasulj	AJ130706	Parrella et al., 2000
Danza	Italija	paradajz	Y09110	Finetti Sialer et al., 1997
Lye-80	Francuska	paradajz	AJ130703	Parrella et al., 2000
Caa-1	Francuska	paprika	AJ130707	Parrella et al., 2000
Dac-16	Francuska	mrkva	AJ130708	Parrella et al., 2000
Lyh-1	Francuska	<i>Solanum</i> spp.	AJ130709	Parrella et al., 2000
Ca375	Kanada	krompir	DQ314749	Xu and Nie, 2006
Ca175	Kanada	krompir	DQ314750	Xu and Nie, 2006
Ca399	Kanada	krompir	DQ314751	Xu and Nie, 2006
Ca400	Kanada	krompir	DQ314752	Xu and Nie, 2006
Ca401	Kanada	krompir	DQ314753	Xu and Nie, 2006
Ca508	Kanada	krompir	DQ314754	Xu and Nie, 2006
Ca518	Kanada	krompir	DQ314755	Xu and Nie, 2006
Ca616	Kanada	krompir	DQ314756	Xu and Nie, 2006
N20	Australija	-	AF332998	Jayasena and Randles, 2004
NZ34	Novi Zeland	grašak	AF215664	Timmerman-Vaughan et al., 2001
KR1	Koreja	krompir	AF294432	Nije publikovano
KR2	Koreja	krompir	AF294433	Nije publikovano

Legenda: – nije pronađen podatak

Tabela 11. Sekvence CP gena PMMoV izolata korišćene za filogenetsku analizu

Izolat	Geografsko poreklo	Biljka domaćin	Acc. No.	Literaturni izvor
P-60-09	Čonoplja	paprika	KC288151	Ova proučavanja
P-57-09	Čonoplja	paprika	KC288150	Ova proučavanja
P-3-10	Đurđevo	paprika	KC288149	Ova proučavanja
Iw	Japan	paprika	AB254821	Hamada et al., 2007
L4BV	Japan	paprika	AB276030	Genda et al., 2007
P	Koreja	paprika	AB084456	Nije publikovano
KR	Koreja	-	AB126003	Nije publikovano
PO	Koreja	paprika	AF103776	Nije publikovano
Ge1	Japan	paprika	AB062049	Nije publikovano
Ge5	Japan	paprika	AB062051	Nije publikovano
Ge4	Japan	paprika	AB062050	Nije publikovano
DF01	Brazil	paprika	AB550911	Oliveira et al., 2010
CN	Kina	paprika	AY859497	Wang et al., 2006
Taiwan	Tajvan	-	M87827	Nije publikovano
OH	Japan	paprika	AB062052	Nije publikovano
JP-J	Japan	paprika	AB000709	Kirita et al., 1997
S	Španija	paprika	M81413	Alonso et al., 1991
Na	Japan	paprika	AB062054	Nije publikovano
SP-Ia	Španija	paprika	AJ308228	Velasco et al., 2002
Italian	Italija	paprika	X72587	Nije publikovano
Tosa	Japan	paprika	AB062053	Nije publikovano
LinsBR08	Brazil	paprika	AM411433	Nije publikovano
-	Kina	-	AY632863	Nije publikovano
PMMV1.2	Italija	-	AJ429088	Letschert et. al, 2002
Pe1	Japan	paprika	AB119482	Takeuchi et. al., 2005
P98/15	Španija	paprika	FR671392	Fraile et al., 2011
P99/23	Španija	paprika	FR671393	Fraile et al., 2011
P96/44	Španija	paprika	FR671388	Fraile et al., 2011
P83/4	Španija	paprika	FN594853	Fraile et al., 2011
P85/29	Španija	paprika	FN594869	Fraile et al., 2011
P89/4.2	Španija	paprika	FN594881	Fraile et al., 2011
P02/2	Španija	paprika	FN594870	Fraile et al., 2011
P86/10	Španija	paprika	FN594889	Fraile et al., 2011
PMMoV-BD	Kina	paprika	HQ699079	Nije publikovano
TMV	Nemačka	-	X70883	Kuhlmann et. al., 1993
ToMV	Brazil	paradajz	AF411922	Moreira et. al., 2003

Legenda: - nije pronađen podatak.

5. REZULTATI

5.1. Simptomi u rasadu, zaštićenom prostoru i polju

Pregledom proizvodnje rasada i useva paprike u različitim lokalitetima gajenja kako u zaštićenom prostoru, tako i na otvorenom polju zabeležena je pojava niza simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu i koji su varirali u zavisnosti od biljke domaćina, vremena ostvarene infekcije i vrste virusa.

Simptomi na biljkama u rasadu bili su slabo izraženi, usled čega obolele biljke nisu mogle, sa sigurnošću, biti razlikovane od zdravih. Ipak, tokom ovih istraživanja, na određenom broju biljaka uočeni su simptomi u vidu blagog mozaika i hloroze lišća, nekrotičnih lezija kao i različite deformacije liske (Slika 6, 7).



Slika 6. PVY: Hloroza i deformacija lista



Slika 7. CMV: Deformacija lista

Pregledom useva paprike u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju zabeležena je pojava biljaka koje su često zaostajale u porastu, a usled skraćivanja internodija poprimale su žbunast izgled (Slika 8). Simptomi su se manifestovali osim u vidu promena opšteg izgleda biljaka i hromatskim i morfološkim promena na listovima i plodovima. Lišće obolelih biljaka, bilo je sitnije, slabo naborano, često sa različitim tipovima mozaika, od blagog do jako izraženog, sa mozaičnim šarama žućkaste boje i hlorotičnim površinama koje kasnije zahvataju ceo list (Slika 9). Hlorotične promene često su bile praćene pojavom izumiranja tkiva i to uglavnom u vidu nekroze nerava

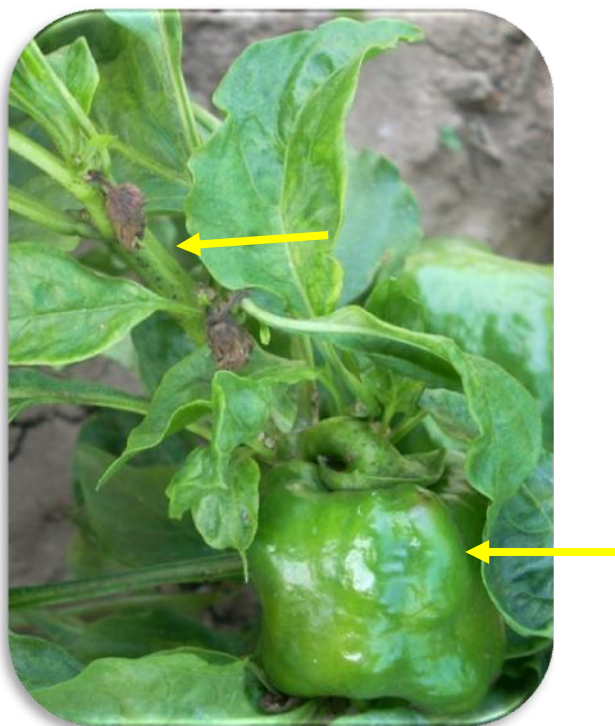
lista i nekrotičnih pega na stablu. Na plodovima, koji su bili kržljavi, deformisani i sa nekrozom površinskog tkiva, često su bile prisutne i linearne beličaste ili žučkaste pruge i prošaravanja. Na zaraženim biljkama primećena je pojava nekroze stable, cvetne drške, kao i čašičnih i kruničnih listića (Slika 10).



Slika 8. CMV: Žbunast izgled biljka



Slika 9. PVY: Hlorotično šarenilo lišća



Slika 10. CMV: Deformacija plodova
i nekroza stabla

5.2. Serološka detekcija virusa

Serološka istraživanja sprovedena u cilju identifikacije i utvrđivanja prisutnosti virusa na paprici u Srbiji, obuhvatila su primenu direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS–ELISA), korišćenjem komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka) specifičnih za detekciju devet najznačajnijih virusa paprike: CMV, PVY, TSWV, TMV, AMV, PVX, PepMoV, PMMoV i PVMV.

5.2.1. Prisustvo i rasprostranjenost virusa u usevu paprike tokom 2009. godine

Ispitivanja sprovedena tokom 2009. godine, koja se tiču paprike gajene u rasadu, obuhvatala su pregled 15 različitih lokaliteta proizvodnje, gde je ustanovljeno prisustvo tri virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način: CMV, PVY i AMV. Na svim lokalitetima procenjen je intenzitet zaraze od 5-10%. Od ukupno sakupljenih 121 uzoraka, prisustvo virusa dokazano je u 23,97%, dok u 76,03% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa (Grafikon 1). Najzastupljeniji virus bio je CMV detektovan u 18,18% testiranih uzoraka, dok je prisustvo PVY i AMV utvrđeno samo kod izuzetno malog broja uzoraka (3,31% i 2,48%) (Tabela 12). Svi detektovani virusi bili su zastupljeni isključivo u pojedinačnoj zarazi. Prisustvo TSWV, TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nije ustanovljeno ni u jednom od testiranih uzoraka. Rezultati testiranja paprike u rasadu, takođe ukazuju na nizak procenat ili odsustvo virusa koji se prenose semenom paprike, kakvi su TMV, AMV i PMMoV.

Kod ukupno testiranih 129 uzoraka paprike sakupljenih na 15 različitih lokaliteta proizvodnje paprike u zaštićenom prostoru, ustanovljeno je prisustvo četiri virusa, i to tri virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način (PVY, CMV, AMV) i TSWV, koji se prenosi tripsima. Na svim lokalitetima procenjen je intenzitet zaraze od 20-40%, a najčešći simptomi bili su blagi do izraženi mozaik na listovima, a takođe se mogla uočiti i uvijenost i deformisanost listova. Prisustvo navedenih virusa u testiranim uzorcima paprike detektovano je sa relativno ujednačenom učestalošću. Najzastupljeniji virus, u pojedinačnim ili mešanim zarazama, bio je PVY (32,56%), zatim CMV (31,01%) i TSWV (23,26%), dok je AMV bio detektovan u nešto manjem broju uzoraka (17,05%) (Tabela 13). Kod najvećeg broja uzoraka utvrđena je

pojedinačna zaraza izazvana TSWV (23,26%), koji je u Lukinom Selu, Trsteniku i Đurđevu detektovan kao jedini prisutan virus. Kod 17,05% testiranih uzoraka detektovana je pojedinačna zaraza PVY i CMV, a kod 12,40% pojedinačna zaraza AMV kao i mešana zaraza PVY i CMV. Mešana zaraza PVY i AMV, kao i CMV i AMV detektovana je u malom broju uzoraka, kod 3,10%, odnosno 1,55% testiranih uzoraka. Kod 13,18% uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa, mada su simptomi bili tipični za virusne zaraze, što je uputilo na prisustvo virusa koji nisu uključeni u ova ispitivanja (Grafikon 2). Prisustvo TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nije dokazano ni u jednom testiranom uzorku.

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa paprike u polju tokom 2009. godine na 16 lokaliteta utvrđeno je prisustvo četiri virusa PVY, AMV, CMV i PMMoV (Tabela 14). Na svim pregledanim lokalitetima intenzitet zaraze virusima bio je preko 50%. U usevima paprike gajenim na otvorenom polju, od ukupno testiranih 207 uzoraka sa simptomima, ustanovljeno je prisustvo virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način sa dominantnim prisustvom PVY (51,21%) u pojedinačnim i mešanim zarazama. U značajnom broju uzoraka ustanovljeno je prisustvo CMV (37,20%) i AMV (21,74%), dok je prisustvo PMMoV ustanovljeno u manjem broju uzorka (1,45%), i to u Čonoplji u vidu mešane infekcije sa dva ili tri virusa. U pogledu pojedinačnih zaraza, najzastupljenije su bile zaraze izazvane PVY (25,60%), a zatim pojedinačne zaraze CMV i AMV (15,46%). U pogledu mešanih zaraza, detektovane su zaraze dva ili tri virusa. Najčešće je detektovana mešana zaraza dva virusa i to PVY i CMV (18,84%), dok su ostale mešane zaraze dokazane u relativno malom broju uzoraka, PVY i AMV (3,87%), AMV i CMV (0,97%), PVY i PMMoV (0,97%), a samo u 4 od 207 uzoraka (1,93%) je imalo mešanu zarazu sa sva tri detektovana virusa. Kod 16,91% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo ispitivanih virusa (Grafikon 3). Od virusa uključenih u ova ispitivanja, nije utvrđeno prisustvo TSWV, TMV, PVX, PepMoV i PVMV.

Tabela 12. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u rasadu u 2009. godini

Lokalitet	Broj uzoraka	PVY	CMV	AMV	Bez prisustva testiranih virusa
Bačka Palanka	6	0	2 (33,33)*		4 (66,67)
Obrovac	7	0	1 (14,29)	0	6 (85,71)
Veternik	6	2 (33,33)	0	0	4 (66,67)
Kruševac I	7	0	0	0	7 (100)
Kruševac II	7	0	0	0	7 (100)
Srbobran	5	0	0	2 (40)	3 (60)
Kula	4	1 (25)	1 (25)	0	2 (50)
Ruma	10	0	1 (10)	1 (10)	8 (80)
Đurđevo	10	0	2 (20)	0	8 (80)
Žabalj	8	0	1 (12,50)	0	7 (87,50)
Pivnice	14	0	3 (21,43)	0	11 (78,57)
Gospodinci	8	0	1 (12,50)	0	7 (87,50)
Rimski Šančevi	13	0	0	0	13 (100)
Aleksinac	13	0	10 (76,92)	0	3 (23,089)
Šabac	3	1 (33,33)	0	0	2 (66,67)
UKUPNO: 121	121	4 (3,31)	22 (18,18)	3 (2,48)	92 (76,03)

Legenda: * broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

Tabela 13. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u pojedinačnim i mešanim infekcijama u zaštićenom prostoru u 2009. godini

Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza				Mešana zaraza			Bez prisustva testiranih virusa	Ukupna zaraza			
		TSWV	AMV	CMV	PVY	PVY +AMV	PVY +CMV	AMV +CMV		TSWV	AMV	CMV	PVY
Lukino Selo	10	10 (100)	0	0	0	0	0	0	0	10 (100)	0	0	0
Srbobran	10	0	0	0	8 (80)*	0	0	0	2 (20)	0	0	0	8 (80)
Velika Plana	10	0	0	0	0	4 (40)	4 (40)	0	2 (20)	0	4 (40)	4 (40)	8 (80)
Trstenik	10	10 (100)	0	0	0	0	0	0	0	10 (100)	0	0	0
Smederevo	5	0	0	5 (100)	0	0	0	0	0	0	0	5 (100)	0
Kikinda	10	0	0	4 (40)	0	0	4 (40)	0	2 (20)	0	0	8 (80)	4 (40)
Đurđevo	10	10 (100)	0	0	0	0	0	0	0	10 (100)	0	0	0
Selenča	15	0	4 (20)	0	5 (33,33)	0	0	0	6 (40)	0	4 (26,67)	0	5 (33,33)
Aleksinac	10	0	0	7 (70)	1 (10)	0	2 (20)	0	0	0	0	9 (90)	3 (30)
Sivac	5	0	5 (100)	0	0	0	0	0	0	0	5 (100)	0	0
Sombor	5	0	0	0	5 (100)	0	0	0	0	0	0	0	5 (100)
Čačak	6	0	0	4 (66,67)	1 (16,67)	0	1 (16,67)	0	0	0	0	5 (83,33)	2 (33,33)
Pivnice	10	0	5 (50)	0	0	0	0	0	5 (50)	0	5 (50)	0	0
Žabalj	8	0	2 (25)	2 (25)	2 (25)	0	0	2 (25)	0	0	4 (50)	4 (50)	2 (25)
Veternik	5	0	0	0	0	0	5 (100)	0	0	0	0	5 (100)	5 (100)
UKUPNO:	129	30 (23,26)	16 (12,4)	22 (17,05)	22 (17,05)	4 (3,1)	16 (12,4)	2 (1,55)	17 (13,18)	30 (23,26)	22 (17,05)	40 (31,01)	42 (32,56)

Legenda: *broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

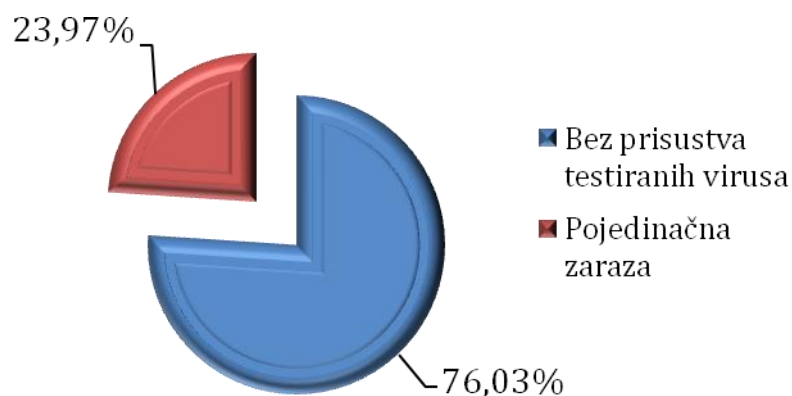
Tabela 14. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u pojedinačnim i mešanim infekcijama u polju tokom 2009. godine

Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza			Mešana zaraza						Bez prisustva tesiranih virusa	Ukupna zaraza			
		AMV	CMV	PVY	PVY +AMV	PVY +CMV	AMV +CMV	PVY+ PMMoV	AMV +PVY +CMV	PVY+ PMMoV +CMV		AMV	CMV	PVY	PMMoV
Selenča	10	5 (50)*	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (50)	5 (50)	0	0	0
Velika Plana	15	3 (20)	7 (46,67)	0	0	0	2 (13,33)	0	0	0	3 (20)	5 (33,33)	9 (60)	0	0
Horgoš I	10	6 (60)	0	2 (20)	0	0	0	0	0	0	2 (20)	6 (60)	0	2 (20)	0
Ravno Selo	15	5 (33,33)	0	3 (20)	2 (13,33)	2 (13,33)	0	0	1 (6,67)	0	2 (13,33)	8 (53,33)	3 (20)	8 (53,33)	0
Horgoš II	5	0	1 (20)	0	0	3 (60)	0	0	1 (20)	0	0	1 (20)	5 (100)	4 (80)	0
Čonoplja	9	0	0	6 (66,67)	0	0	0	2 (22,22)	0	1 (11,11)	0	0	1 (11,11)	9 (100)	3 (33,33)
Čačak	15	0	4 (26,67)	0	0	6 (40)	0	0	0	0	5 (33,33)	0	10 (66,67)	6 (40)	0
Đurđevo	15	0	4 (26,67)	4 (26,67)	0	4 (26,67)	0	0	0	0	3 (20)	0	8 (53,33)	8 (53,33)	0
Trstenik	10	0	4 (40)	4 (40)	0	0	0	0	0	0	2 (20)	0	4 (40)	4 (40)	0
B. Palanka	15	3 (20)	0	8 (53,33)	2 (13,33)	0	0	0	0	0	2 (13,33)	5 (33,33)	0	10 (66,66)	0
Senta	20	5 (25)	3 (15)	7 (35)	0	0	0	0	0	0	5 (25)	5 (25)	3 (15)	7 (35)	0

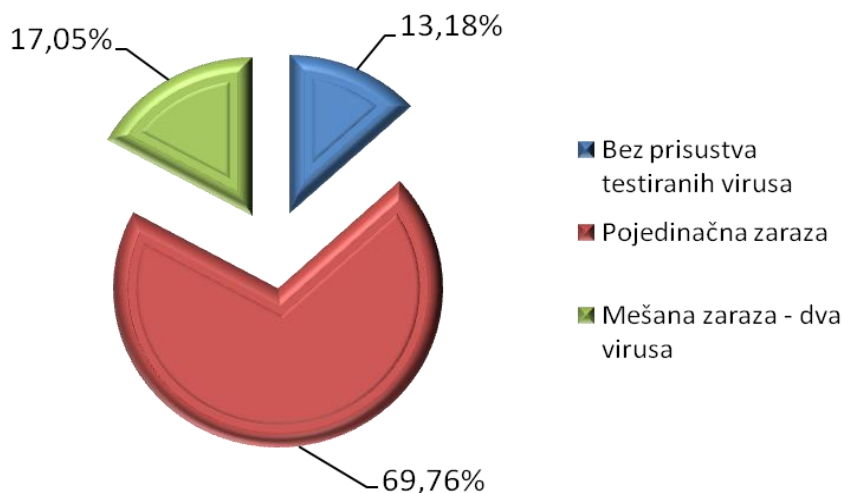
Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza			Mešana infekcija						Bez prisustva testiranih virusa	Ukupna zaraza			
		AMV	CMV	PVY	PVY+AMV	PVY+CMV	AMV+CMV	PVY+PMMoV	AMV+PVY+CMV	PVY+PMMoV+CMV		AMV	CMV	PVY	PMMoV
Kraljevo	15	0	0	8 (53,33)*	0	4 (26,67)	0	0	0	0	3 (20)	0	4 (26,67)	12 (80)	0
Smederevo	15	0	7 (46,67)	2 (13,33)	0	6 (40)	0	0	0	0	0	0	13 (86,67)	8 (53,33)	0
Indija	15	0	0	5 (33,33)	4 (26,67)	4 (26,67)	0	0	0	0	2 (13,33)	4 (26,67)	4 (26,67)	13 (86,67)	0
Aleksinac	14	5 (35,71)	2 (14,29)	2 (14,29)	0	4 (28,57)	0	0	0	0	0	5 (35,71)	6 (42,86)	6 (42,86)	0
Veternik	9	0	0	2 (22,22)	0	6 (66,67)	0	0	1 (11,11)	0	0	1 (11,11)	7 (77,78)	9 (100)	0
UKUPNO:	207	32 (15,46)	32 (15,46)	53 (25,6)	8 (3,85)	39 (18,84)	2 (0,97)	2 (0,97)	3 (1,45)	1 (0,48)	35 (16,91)	45 (21,74)	77 (37,2)	106 (51,21)	3 (1,45)

Legenda: * broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

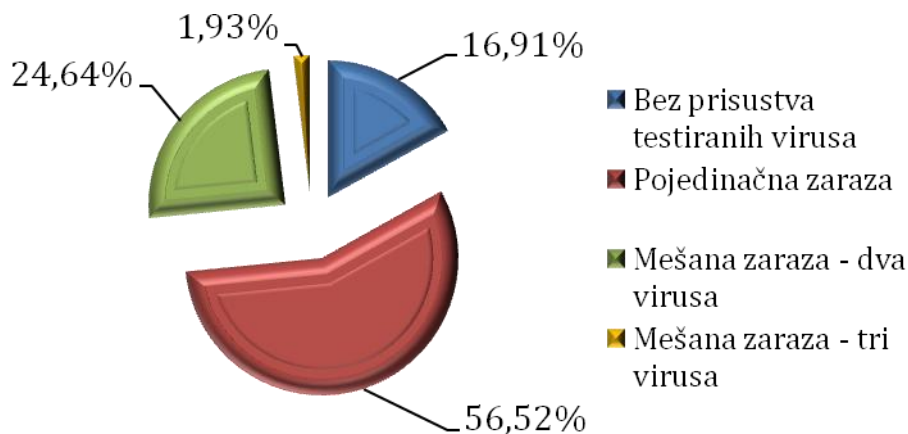
Grafikon 1. Zastupljenost virusa paprike u rasadu 2009. godine



Grafikon 2. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paprike u zaštićenom prostoru 2009. godine



Grafikon 3. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paprike na otvorenom polju 2009. godine



5.2.2. Prisustvo virusa u usevu paprike tokom 2010. godine

Ispitivanja sprovedena tokom 2010. godine, koja se tiču pregleda rasada paprike na prisustvo virusnih infekcija, obuhvatila su pregled 13 različitih lokaliteta proizvodnje rasada paprika. Rezultati su pokazali da je kao u prethodnoj godini ispitivanja, ustanovljeno prisustvo tri virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način: CMV, PVY i AMV. Od ukupno sakupljenih 115 uzoraka, prisustvo virusa dokazano je u 35,65%, dok u 64,35% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa (Grafikon 4). Najzastupljeniji virus bio je CMV detektovan u 20,87% testiranih uzoraka. Drugi po zastupljenosti bio je PVY (11,3%), dok je prisustvo AMV utvrđeno samo kod izuzetno malog broja uzoraka (3,48%) (Tabela 15). Svi detektovani virusi bili su zastupljeni isključivo u pojedinačnoj zarazi. Prisustvo TSWV, TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nije ustanovljeno ni u jednom od ispitivanih uzoraka. Kao i u prethodnoj godini, rezultati testiranja paprike u rasadu, ukazuju na nizak procenat ili odsustvo virusa koji se prenose semenom paprike, kao što su TMV, AMV i PMMoV.

Kod ukupno testiranih 141 uzoraka paprike sakupljenih na 14 različitih lokaliteta proizvodnje paprike u zaštićenom prostoru, kao i prethodne godine ustanovljeno je prisustvo četiri virusa, i to tri virusa (PVY, CMV, AMV) koji se prenose vašima na neperzistentan način i TSWV, koji se prenosi tripsima. Na svim pregledanim lokalitetima intenzitet zaraze virusima bio je preko 20-30%. Najzastupljeniji virus, u pojedinačnim ili mešanim zarazama, bio je CMV (36,17%), zatim PVY (31,21%) i AMV (17,73%), dok je TSWV bio detektovan u nešto manjem broju uzoraka (6,38%) (Tabela 16). Kod najvećeg broja uzoraka utvrđena je pojedinačna zaraza CMV (27,66%), dok je PVY bio zastupljen sa 19,15%, AMV sa 14,18%, TSWV 6,38%. Mešana zaraza PVY i AMV, kao i PVY i CMV je detektovana u 10,64% odnosno 8,51% testiranih uzoraka. Kod 20,57% uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa (Grafikon 5). Prisustvo TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nije dokazano ni u jednom testiranom uzorku.

Ispitivanja sprovedena tokom 2010. godine, pregledom različitih lokaliteta proizvodnje paprike na otvorenom polju, konstatovano je prisustvo četiri virusa: PVY, CMV, AMV i PMMoV (Tabela 17). Na svim pregledanim lokalitetima intenzitet zaraze virusima bio je preko 50%. U usevima paprike gajenim na otvorenom polju, od ukupno

testiranih 168 uzoraka sa simptomima, ustanovljeno je prisustvo virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način sa dominantnim prisustvom CMV (50%) u pojedinačnim i mešanim zarazama. U značajnom broju uzoraka ustanovljeno je prisustvo PVY (40,48%) i AMV (16,67%), dok je prisustvo PMMoV zabeleženo u Đurđevu i Čonoplji u znatno manjem procentu (1,19%). U pogledu pojedinačnih zaraza, najzastupljenije su bile zaraze izazvane CMV (33,33%), zatim PVY (23,81) i AMV (12,5%), dok je PMMoV bio zastupljen u jednom od 168 prikupljenih uzoraka (0,59%). U pogledu mešanih zaraza, detektovane su zaraze dva ili tri virusa. Najčešće je detektovana mešana zaraza dva virusa i to PVY i CMV (13,69%), dok su ostale mešane zaraze PVY i AMV, CMV i AMV dokazane u relativno malom broju uzoraka (1,79%). U jednom od 168 uzoraka (0,59%) zabeležena je mešana zaraza tri virusa AMV, PVY i CMV, kao i u jednom uzorku mešana zaraza tri virusa PVY, CMV i PMMoV (Grafikon 6). Kod 11,31% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo ispitivanih virusa, što je ukazalo na uključivanje šireg kruga virusa infektivnih za papriku u sledeće preglede useva paprike u Srbiji. Od virusa uključenih u ova ispitivanja, nije utvrđeno prisustvo TSWV, TMV, PVX, PepMoV i PVMV.

Tabela 15. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u rasadu u 2010. godini

Lokalitet	Broj uzoraka	PVY	CMV	AMV	Bez prisustva testiranih virusa
Aleksinac	10	1(10)*	7 (70)	0	2 (20)
Bukovac	6	0	2 (33,33)	0	4 (66,67)
Ruma	8	2 (25)	0	0	6 (75)
Trstenik	12	2 (16,67)	4 (33,33)	0	6 (50)
Kula	5	1 (20)	0	0	4 (80)
Srbobran	6	0	0	2 (33,33)	4 (66,67)
Rimski Sancevi	5	0	2 (40)	0	3 (60)
Indija	11	2 (18,18)	1 (9,09)	0	8 (72,73)
Sombor	8	0	3(37,5)	0	5 (62,5)
Bačka Palanka	10	1	1 (10)	0	8 (80)
Šabac	12	2 (16,68)	1 (8,33)	0	9 (75)
Subotica	9	1 (11,11)	1 (11,11)	1 (11,11)	6 (66,67)
Bačaka Topola	13	1 (7,69)	2 (15,38)	1 (7,69)	9 (69,23)
UKUPNO:	115	13 (11,3)	24 (20,87)	4 (3,48)	74 (64,35)

Legenda: * broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

Tabela 16. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u pojedinačnim i mešanim infekcijama u zaštićenom prostoru u 2010. godini

Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza				Mešana zaraza		Bez prisustva testiranih virusa	Ukupna zaraza			
		TSWV	AMV	CMV	PVY	PVY +AMV	PVY +CMV		TSWV	AMV	CMV	PVY
Pećinci	12	0	2 (16,67)*	5 (41,67)	1 (8,33)	0	0	4 (33,33)	0	2 (16,67)	5 (41,67)	1 (8,33)
Lukino Selo	10	4 (40)	0	0	3 (30)	0	2 (20)	1 (10)	4 (40)	0	2 (20)	5 (50)
Žabalj	7	0	0	6 (85,71)	0	0	0	1 (14,29)	0	0	6 (85,71)	0
Ruma	10	0	2 (20)	4 (40)	2 (20)	0	1 (10)	1 (10)	0	2 (20)	5 (50)	3 (30)
Šabac	15	3 (20)	0 (0)	4 (26,67)	4 (26,67)	1 (6,67)	0	3 (20)	3 (20)	1 (6,67)	4 (26,67)	5 (33,33)
Kać	5	0	0	4 (80)	0	0	1 (20)	0	0	0	5 (100)	1 (20)
Valjevo	10	0	2 (20)	1 (10)	3 (30)	1 (10)	0	3 (30)	0	3 (30)	1 (10)	4 (40)
Horgoš	15	0	4 (26,67)	4 (26,67)	2 (13,33)	0	1 (6,67)	4 (26,67)	0	4 (26,67)	5 (33,33)	3 (20)
Sirig	5	0	2 (40)	0	0	1 (20)	1 (20)	1 (20)	0	3 (60)	1 (20)	2 (40)
Užice	10	0	0	3 (30)	2 (20)	0	3 (30)	2 (20)	0	0	6 (60)	5 (50)
Aleksinac	15	0	3 (20)	6 (40)	4 (26,67)	0	0	2 (13,33)	0	3 (20)	6 (40)	4 (26,67)
Sombor	15	2 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	3 (20)	0	3 (20)	3 (20)	2 (13,33)	2 (13,33)	5 (33,33)	6 (40)
Kikinda	7	0	1 (14,29)	0	3 (42,86)	2 (28,57)	0	1 (14,29)	0	3 (42,86)	0	5 (71,43)
Smederevo	5	0	2 (40)	0	0	0	0	3 (60)	0	2 (40)	0	0
UKUPNO:	141	9 (6,38)	20 (14,18)	39 (27,66)	27 (19,15)	5 (10,64)	12 (8,51)	29 (20,57)	9 (6,38)	25 (17,73)	51 (36,17)	44 (31,21)

Legenda: * broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

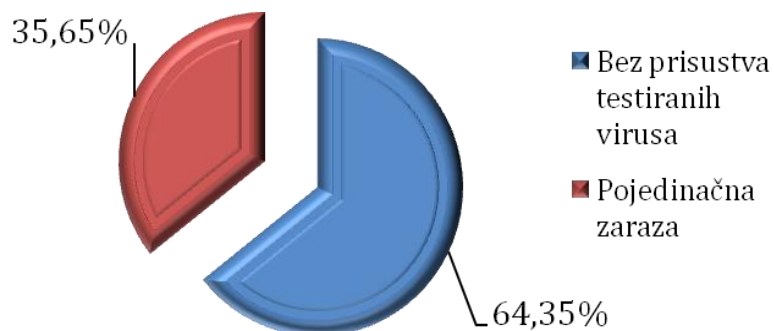
Tabela 17. Prisustvo i procentualne zastupljenost virusa paprike u pojedinačnim i mešanim infekcijama na otvorenom polju u 2010. godini

Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza				Mešana zaraza					Bez prisustva testiranih virusa	Ukupna zaraza			
		AMV	CMV	PVY	PMMoV	PVY+ AMV	PVY+ CMV	AMV+ CMV	AMV+ PVY	PVY+ PMMoV		AMV	CMV	PVY	PMMoV
Đurđevo	7	1 (14,29)	0	4 (57,14)	1 (14,29)	0	0	0	0	0	1 (14,29)	1 (14,29)	0	4 (57,14)	1 (14,29)
B.Topola	15	4 (26,67)	6 (40)*	0	0	0	3 (20)	0	0	0	2 (13,33)	4 (26,67)	9 (60)	3 (20)	0
Ruma	15	0	9 (60)	2 (13,33)	0	0	0	0	0	0	4 (26,67)	0	9 (60)	2 (13,33)	0
Šabac	10	2 (20)	0	4 (40)	0	1 (10)	1 (10)	0	0	0	2 (20)	3 (30)	1 (10)	6 (60)	0
Horgoš	15	1 (6,67)	8 (53,33)	2 (13,33)	0	0	3 (20)	0	1 (6,67)	0	0	2 (13,33)	12 (80)	6 (40)	0
Kikinda	7	0	5 (71,43)	1 (14,29)	0	0	0	0	0	0	1 (14,29)	0	5 (71,43)	1 (14,29)	0
B. Jarak	10	0	4 (40)	2 (20)	0	0	2 (20)	1 (10)	0	0	1 (10)	1 (10)	7 (70)	4 (40)	0
Čonoplja	15	0	5 (71,43)	7 (46,67)	0	0	2 (13,33)	0	0	1 (6,67)	0	0	8 (53,33)	10 (66,67)	1 (6,67)
Smederevo	5	0	0	5 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (100)	0
Užice	10	3 (30)	0	0	0	2 (20)	0	0	0	0	5 (50)	5 (50)	0	2 (20)	0
Aleksinac	12	1 (8,33)	7 (58,33)	2 (16,67)	0	0	0	1 (8,33)	0	0	1 (8,33)	2 (16,67)	8 (66,67)	2 (16,67)	0

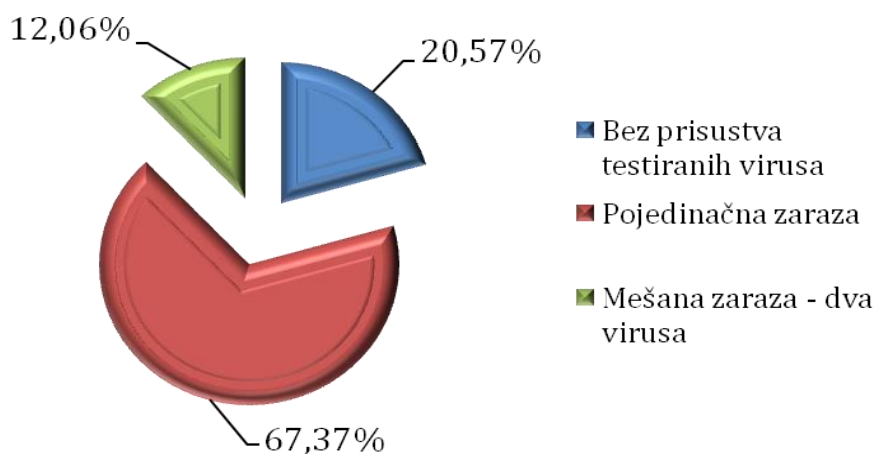
Lokalitet	Broj uzoraka	Pojedinačna zaraza				Mešana zaraza					Bez prisustva testiranih virusa	Ukupna zaraza			
		AMV	CMV	PVY	PMMoV	PVY+ AMV	PVY+ CMV	AMV+ CMV	AMV+ PVY	PVY+ PMMoV		AMV	CMV	PVY	PMMoV
Valjevo	10	2 (20)	3 (30)	3 (30)	0	0	1 (10)	0	0	0	1 (10)	2 (20)	4 (40)	4 (40)	0
Bukovac	10	0	1 (10)	5 (50)	0	0	3 (30)	0	0	0	1 (10)	0	4 (40)	8 (80)	0
Vašica	7	1 (14,29)	1 (14,29)	1 (14,29)	0	0	4 (51,14)	0	0	0	0	1 (14,29)	5 (71,43)	5 (71,43)	0
Rimski Šančevi	10	2 (20)	3 (30)	2 (20)	0	0	2 (20)	1 (10)	0	0	0	3 (30)	6 (60)	4 (40)	0
UKUPNO:	16 8	21 (12,50)	56 (33,33)	40 (23,81)	1 (0,59)	3 (1,79)	23 (13,69)	3 (1,79)	1 (0,59)	1 (0,59)	19 (11,31)	28 (16,67)	84 (50)	68 (40,48)	2 (1,19)

Legenda: * broj zaraženih uzoraka (procenat infekcije preračunat na osnovu broja testiranih uzoraka)

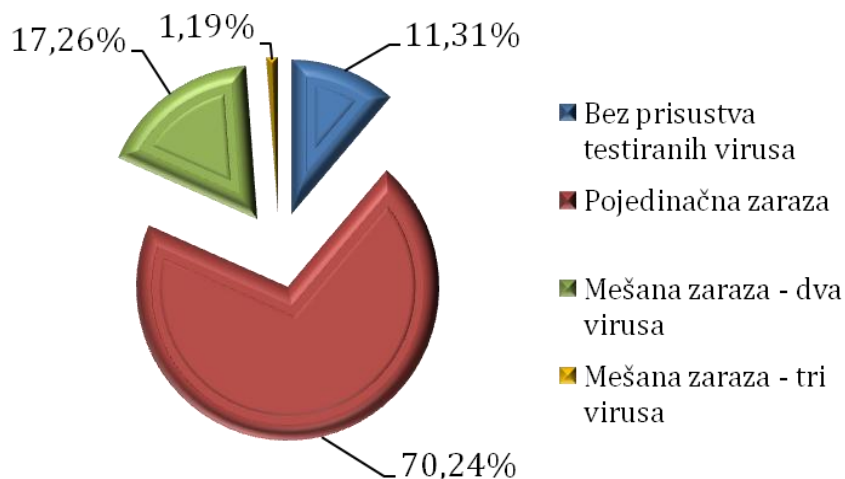
Grafikon 4. Zastupljenost virusa paprike u rasadu 2010. godine



Grafikon 5. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paprike u zaštićenom prostoru 2010. godine



Grafikon 6. Zastupljenost pojedinačnih i mešanih infekcija paprike na otvorenom polju 2010. godine



5.2.3. Rasprostranjenost virusa paprike i prisustvo virusa na pojedinim sortama

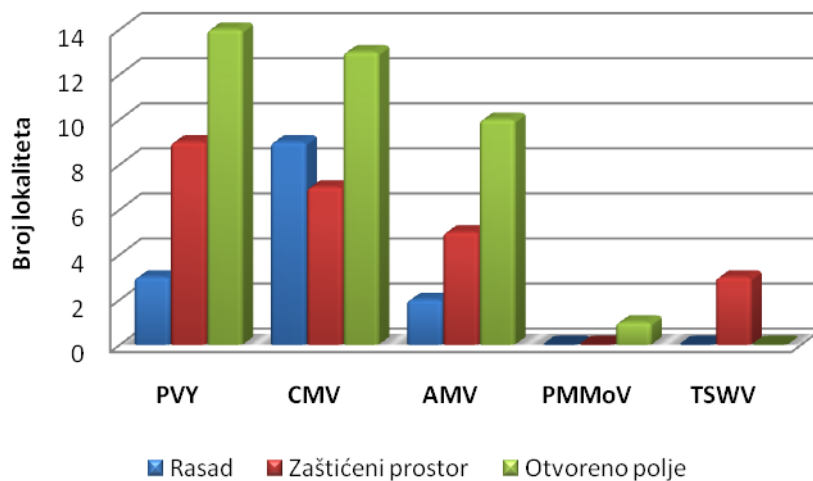
Ispitivanjem rasprostranjenosti virusa paprike tokom dve godine, konstatovana je dominantna rasprostranjenost CMV i PVY u odnosu na ostale detektovane viruse (TSWV, AMV i PMMoV).

Ispitivanja rasprostranjenosti virusa u rasadu, pokazala su da je 2009. godine CMV bio zastupljen u devet lokaliteta od ukupno pregledanih 15, dok je 2010. godine bio nešto zastupljeniji kada je bio prisutan u deset od pregledanih 13 lokaliteta. PVY je imao daleko veću rasprostranjenost u 2010. godini kada je detektovan u devet lokaliteta u odnosu na 2009. godinu kada bio je detektovan na tri lokaliteta. AMV je u obe godine ispitivanja bio prisutan na malom broju lokaliteta i to 2009. godine na 2, a 2010. na 3 lokaliteta (Grafikon 7 i 8).

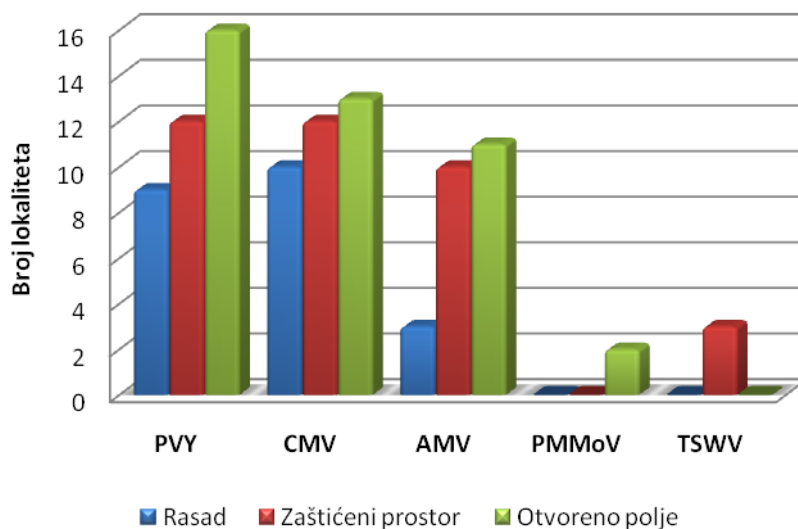
Tokom 2009. godine, ispitivanje rasprostranjenosti virusa na paprici gajene u zaštićenom prostoru, obuhvatilo je pregled 13 lokaliteta, a 2010. godine 14 lokaliteta. Najrasprostranjeniji virus u 2009. godini bio je PVY, na devet lokaliteta, dok su 2010. godine PVY i CMV bili zastupljeni na istom broju lokaliteta (12). CMV je tokom 2009. godine bio zabeležen na nešto manjem broju lokaliteta (sedam), dok je AMV u obe godine ispitivanja zauzimao treće mesto i to 2009. godine njegova zastupljenost zabeležena je na 10 lokaliteta, a 2010. na 5 lokaliteta. TSWV je u obe godine ispitivanja zabeležen na tri lokaliteta (Grafikon 7 i 8).

Tokom 2009. i 2010. godine, ispitivanje rasprostranjenosti virusa na paprici gajene na otvorenom polju, obuhvatilo je pregled 16 lokaliteta. U obe godine ispitivanja najrašireniji virus bio je PVY i to na 14 lokaliteta u 2009. godini i na 16 lokaliteta u 2010. godini. CMV zauzimao je drugo mesto i bio je zastupljen na 13 lokaliteta u obe godine ispitivanja. Tokom 2009. godine PMMoV bio je zabeležen na jednom, a 2009. godine na dva lokaliteta (Grafikon 7 i 8).

Grafikon 7. Rasprostranjenost virusa paprike u 2009. godini



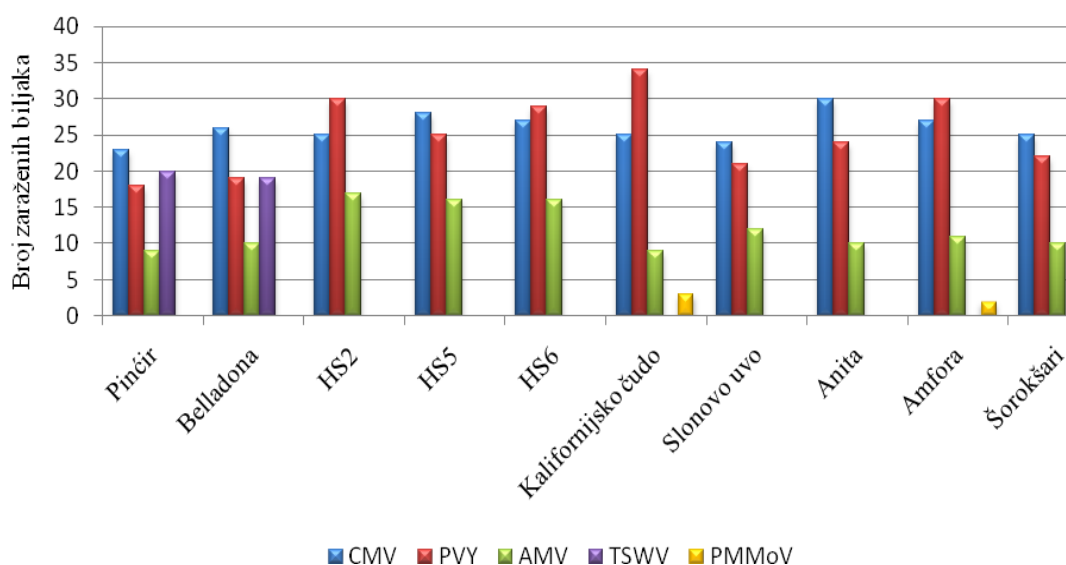
Grafikon 8. Rasprostranjenost virusa paprike u 2010. godini



Prilikom prikupljanja uzoraka paprike vodilo se računa da budu obuhvaćene različite sorte paprike. U Srbiji je uglavnom zastupljen stari sortiment. Korišćene sorte u izradi ove disertacije nisu prepoznate kao otporne ili tolerantne na viruse. U svetu danas postoje konvencionalnim putem dobijene rezistantne i tolerantne sorte paprike kao i transgene sorte koje jesu rezistentne na viruse (<http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/Tables/TableList.htm>). Analizom rezultata nije uočena značajna razlika u pogledu osetljivosti sorti na prisustvo pojedinih

virusa. Jedino što se može videti iz analize dobijenih rezultata, je da je samo kod sorte Pinćir i Belladona detektovan TSWV. Kod svih ostalih sorata je konstatovano približno jednako prisustvo CMV, PVY i AMV, s tim što su Horgoške sorte HS 2, HS 5 i HS 6, sorte namenjene za industrijsku proizvodnju paprike, imale nešto veću prisutnost AMV u odnosu na druge sorte. PMMoV je detektovan na sortama Kalifornijsko čudo i Amfora (Grafikon 9). Amfora, Kalifornijsko čudo, Šorokšari i Slonovo uvo su sorte koje su imale najveći broj mešane zaraze dva ili tri virusa.

Grafikon 9. Prisutnost virusa po sortama u 2009. i 2010. godini



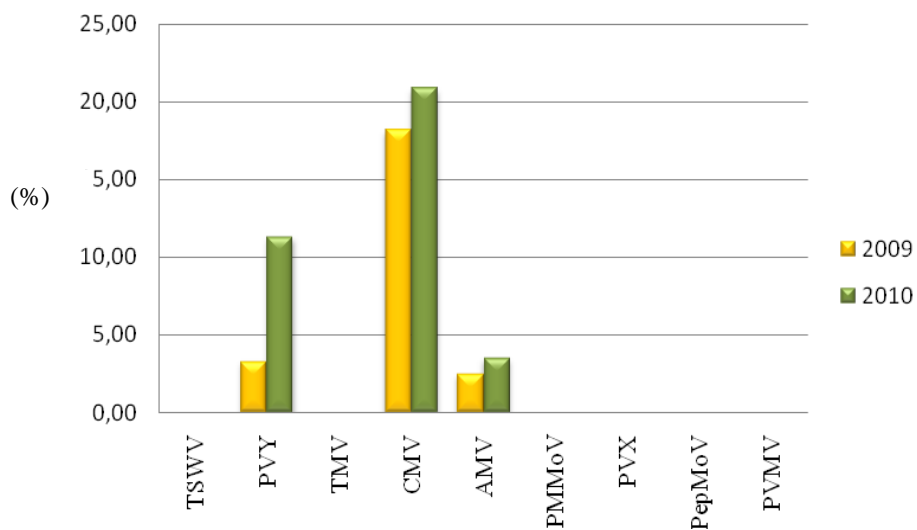
5.2.4. Zastupljenost virusa paprike u obe ispitivane godine

Ispitivanjem prisustva i rasprostranjenosti virusa paprike tokom dve godine, konstatovano je prisustvo 5 virusa i to: CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV (Tabela 18). Ni u jednoj godini ispitivanja nije utvrđeno prisustvo TMV, PVX, PepMoV i PVMV.

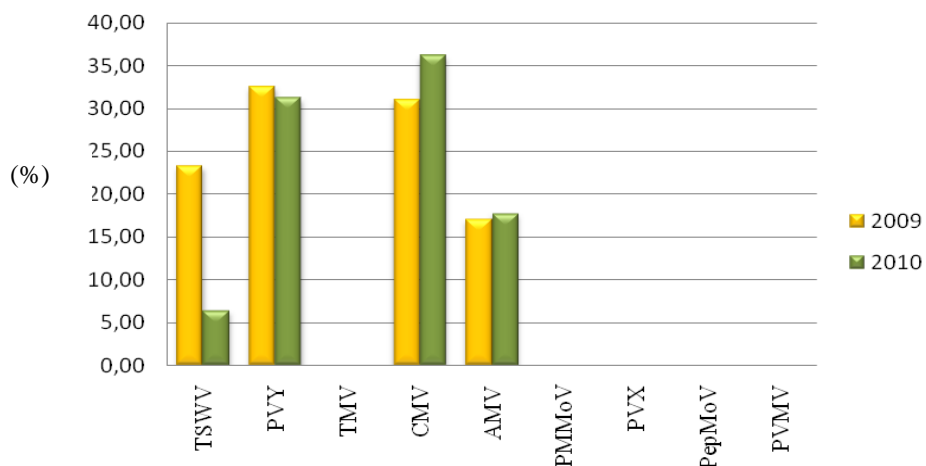
Ispitivanja prisutnosti virusa na paprici u rasadu, pokazala su dominantno prisustvo CMV u obe ispitivane godine. U znatno nižem procentu bili su zastupljeni PVY i AMV, dok TSWV, TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nisu bili detektovani ni u jednoj ispitivanoj godini (Grafikon 10). Tokom 2009. godine, PVY je

bio najdominantniji, kako u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru tako i u proizvodnji na otvorenom polju (Grafikon 11). Drugi po zastupljenosti bio je CMV, međutim, 2010. godine došlo je do promena, i ovaj virus bio je najzastupljeniji u proizvodnji paprike, kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju, dok je PVY bio prisutan u nešto manjem broju uzoraka (Grafikon 12). Prisustvo AMV ustanovljeno u obe godine ispitivanja kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju, i to 2009. godine bio je četvrti po zastupljenosti, kako u zaštićenom prostoru tako i u polju, dok je 2010. godine njegovo prisustvo dokazano u nešto većem broju uzoraka i zauzimao je treće mesto iza PVY i CMV. TSWV bio je zabeležen samo u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru kako u 2009. tako i u 2010. godini, s tim što je veća prisutnost ovog virusa zabeležena u prvoj godini ispitivanja. PMMoV detektovan je samo u proizvodnji paprike u polju i to na manjem broju uzoraka, u obe ispitivane godine. Poređenjem učestalosti pojave detektovanih virusa tokom dve godine ispitivanja ustanovljeno je da su se virusi u proizvodnji paprike u rasadu nalazili u pojedinačnim infekcijama. U proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru dominantna je bila pojedinačna zaraza, međutim mogla se uočiti i mešana zaraza sa dva virusa, gde je najdominantija mešana zaraza bila izazvana PVY i CMV u obe godine ispitivanja. U proizvodnji paprike u polju takođe je dominirala pojedinačna zaraza, međutim, pored mešane zaraze dva virusa detektovana je i mešana zaraza tri virusa. I u proizvodnji paprike na otvorenom polju najdominantija mešana zaraza bila je izazvana PVY i CMV u obe godine ispitivanja.

Grafikon 10. Zastupljenost virusa paprike u rasadu u 2009. i 2010. godini



Grafikon 11. Zastupljenost virusa paprike u zaštićenom prostoru u 2009. i 2010. godini



Grafikon 12. Zastupljenost virusa paprike u polju u 2009. i 2010. godini

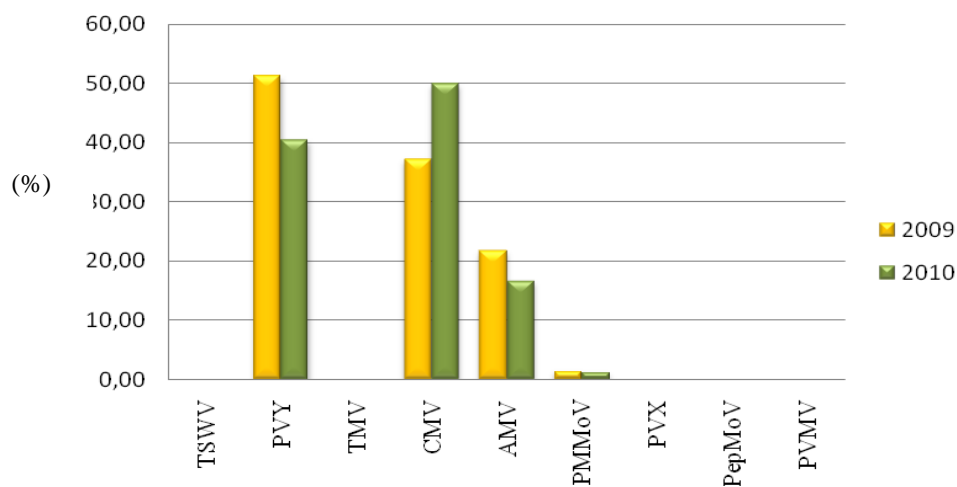


Tabela 18. Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa paprike u pojedinačnim i mešanim infekcijama po godinama ispitivanja

Tipovi zraze	Virus	Način gajenja paprike					
		Rasad		Zaštićeni prostor		Polje	
		2009.	2010.	2009.	2010.	2009.	2010.
Pojedinačna zaraza	TSWV	0/121 0%	0/115 0%	30/129 23,26%	9/141 6,38%	0/207 0%	0/168 0%
	PVY	4/121 3,31%	13/115 11,30%	22/129 17,05%	27/141 19,15%	53/207 25,60%	40/168 23,81%
	TMV	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	0/207 0%	0/168 0%
	CMV	22/121 18,18%	24/115 20,87%	22/129 17,05%	39/141 27,66%	32/207 15,46%	56/168 33,33%
	AMV	3/121 2,48%	4/115 3,48%	16/129 12,40%	20/141 14,18%	32/207 15,46%	21/168 12,50%
	PMMoV	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	0/207 0%	1/168 0,59%
	PVX	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	0/207 0%	0/168 0%
	PepMoV	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	0/207 0%	0/168 0%
	PVMV	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	0/207 0%	0/168 0%
	Ukupno	29/121 23,97%	41/115 35,65%	90/129 69,77%	95/141 67,38%	117/207 56,52%	118/168 70,24%
Mešana zaraza	Dva virusa	0/121 0%	0/115 0%	22/129 17,05%	17/141 12,06%	51/207 24,64%	29/168 17,26%
	Tri virusa	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	4/207 1,93%	2/168 1,19%
	Ukupno	0/121 0%	0/115 0%	22/129 17,05%	17/141 12,06%	55/207 26,57%	31/168 18,45%
Ukupna zaraza	TSWV	0/121 0%	0/115 0%	30/129 23,26%	9/141 6,38%	0/207 0%	0/168 0%
	PVY	4/121 3,31%	13/115 11,30%	42/129 32,56%	44/141 31,21%	106/207 51,21%	68/168 40,48%
	CMV	22/121 18,18%	24/115 20,87%	40/129 31,01%	51/141 36,17%	77/207 37,20%	84/168 50,00%
	AMV	3/121 2,48%	4/115 3,48%	22/129 17,05%	25/141 17,73%	45/207 21,74%	28/168 16,67%
	PMMoV	0/121 0%	0/115 0%	0/129 0%	0/141 0%	3/207 1,45%	2/168 1,19%

5.3. Simptomi virusa paprike

Iako je poznato da virusi paprike mogu da izazivaju veoma različite tipove simptoma u zavisnosti od starosti biljke, uslova spoljašnje sredine (naročito temperature), kao i u zavisnosti od soja virusa, postojanje izvesne veze između tipa simptoma i detektovanog virusa moguće je samo u pojedinim slučajevima. Prisustvo PVY utvrđeno je u uzorcima paprike sa raznolikim simptomima, a najčešće u vidu hlorotičnog prosvetljavanja nerava (Slika 11), hlorotičnog prošaravanja listova sa ili bez deformacije mladih listova (Slika 12), nekroze listova, mozaikom u vidu hlorotičnih prstenova i sitnih tamno zelenih površina. Većina biljaka u kojima je dokazano prisustvo PVY bile su kržljave i često žbunastog izgleda često praćene nekrozom mladih listova, što je upućivalo na rane zaraze u toku vegetacije (Slika 13).



Slika 11. PVY: Hlorotično prosvetljavanje nerava



Slika 12. PVY: Hlorotično prošaravanje listova



Slika 13. PVY: Nekroza mlađeg lišća

Iako se smatra da nijedan drugi biljni patogen ne izaziva takav niz simptoma kao TSWV, u ovim istraživanjima prisustvo TSWV ustanovljeno je u uzorcima paprike sa simptomima blagog do izraženog mozaika (Slika 14). Na nekim biljkama pored mozaika primećena je i hloroza nerava.



Slika 14. TSWV: Blagi mozaik na listovima

Prisustvo CMV utvrđeno je u uzorcima paprike sa izraženim simptomima mozaika i hlorotičnog prošaravanja (Slika 15). Ono što je karakteristično za biljke zaražene ovim virusom, uz navedene simptome, su i deformacija ili blaga klobučavost listova (Slika 16), kao i izražena deformacija plodova (Slika 17).



Slika 15. CMV: Mozaik i hlorotično prošaravanje listova



Slika 16. CMV: Deformacija i blaga klobučavost listova



Slika 17. CMV: Deformacija ploda

Najčešći simptomi na paprici zaraženoj virusom AMV su hlorotično beličaste pege različitog oblika i veličine koje se vremenom spajaju, tako da u nekim slučajevima zahvataju i čitave liske (Slika 18). Nešto drugačiji, ali vrlo slični simptomi su rasute bele do žute tačkice koje mogu prekriti celu lisku (Slika 19). Jedino kod ovog virusa, simptomi na paprici su karakteristični i nisu primećeni kod ispoljavanja simptoma zaraza koje drugi virusi paprike izazivaju.



Slika 18a. AMV:Hlorotično beličaste površine na listu



Slika 18b. AMV:Hlorotično beličaste površine na listu



Slika 19. AMV: Rasute bele do žute tačkice

Simptomi koji su se javljali na paprici zaraženoj virusom PMMoV, je prošaranost listova tamno zelenim površinama koje su rasute po celoj liski (Slika 20).



Slika 20. PMMoV: Prošaranost listova tamno zelenim površinama

Mešane zaraze sa dva ili više virusa najčešće su menjale tip kao i intenzitet ispoljavanja simptoma usled sinergističkog delovanja. Izuzetak su biljke u kojima je konstatovana mešana zaraza izazvana PVY i AMV koje su pokazivale simptome tipa hlorotičnog prošaravanja i šarenila listova najčešće praćene prisustvom žutih površina

koje se često javljaju pri pojedinačnim zarazama virusom AMV. Mešana zaraza PVY i CMV odlikuje se kompleksnijom slikom simptoma, zbog čega simptomi gube dijagnostički značaj. Najčešći simptomi koji su se javljali na biljkama su hlorotično prošaravanje liske uz blagu ili jaču deformaciju, žuto-zeleni mozaik (Slika 21), šarenilo listova, sitne tamno zelene površine na liski uz blago kovrdžanje, kao i nekroza listova uz blagu deformisanost listova (Slika 22). Na plodovima uočena je izražena nekroza sa ili bez deformisanosti (Slika 23). Mešana infekcija AMV i CMV utvrđena je kod biljka sa simptomima svetlozelenih površina i deformacije listova (Slika 24). Mešana zaraza PVY, AMV i CMV uglavnom se ispoljavala simptomima hlorotičnog prošaravanja, deformacija i žutobelih površina.



Slika 21. PVY i CMV: Žutozeleni mozaik



Slika 22. PVY i CMV: Nekroza listova uz blagu deformisanost



Slika 23: PVY i CMV: Nekroza plodova sa i bez deformacija



Slika 24: PVY i AMV: Svetlo zelene površine i deformacija listova

Kako je na paprici u našoj zemlji prisutno najmanje pet virusa, u pojedinačnim i mešanim zarazama, uočeni simptomi i njihova veza sa virusom prouzrokovačem imaju samo preliminarni dijagnostički značaj. Mada je u slučaju pojedinačnih zaraza paprike dijagnostički značaj uočenih simptoma veći, ipak postavljanje dijagnoze samo na osnovu simptomatologije nije moguće. Simptomi, koliko god bili izraženi i karakteristični, ipak samo ukazuju na postojanje zaraze određenim virusom, a konačna tačna dijagnoza može se postaviti samo posle odgovarajućih laboratorijskih analiza.

5.4. Molekularna detekcija izolata virusa paprike

Za molekularnu detekciju i potvrdu rezultata dobijenih na osnovu antigenih osobina, korišćeni su odabrani izolati virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV koji su detektovani u usevu paprike serološkim analizama. Amplifikacija različitih regiona genoma virusa sa odgovarajućim setom prajmera obavljena je primenom „One-step“ RT-PCR kita, po protokolu proizvođača (Qiagen, Germany). Pojava amplikona, prilikom elektroforetskog razdvajanja PCR produkata očekivane veličine smatrana je za pozitivnu reakciju.

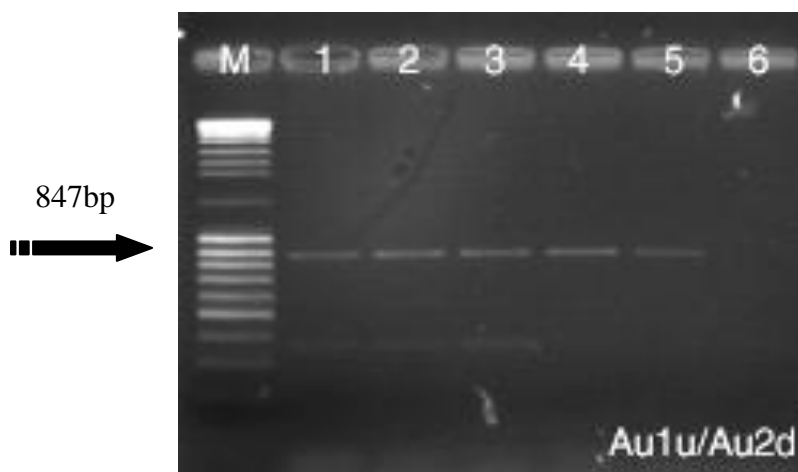
5.4.1. Ekstrakcija RNA iz biljnog materijala

Ekstrakcija RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka paprike izvedena je pomoću Rneasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Tako dobijena i izolovana RNA čuvana je na -80°C .

5.4.2. Molekularna detekcija izolata CMV

Molekularna detekcija CMV izvršena je primenom „One-step“ RT-PCR metode korišćenjem prajmera Au1u/Au2d. Kod testiranih uzoraka paprike P-14-09, PL-43-09, PL-25-09 PL-52-09, sa lokaliteta Velika Plana, Smederevo i Kikinda, uspešno su amplifikovani fragmenti očekivane veličine od oko 850 bp koji obuhvataju ceo gen za protein omotača virusa i delove 5' i 3' neprepisujućih regiona.

Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike i pozitivne kontrole (izolat 746-07 iz paradajza) sa korišćenim markerom (M), kod sva četiri ispitivana izolata ustanovljeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 847 bp (Slika 25). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

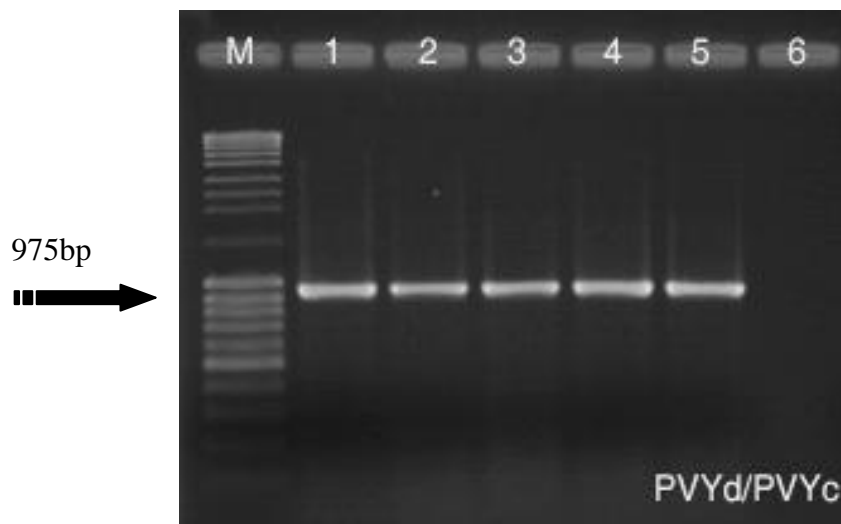


Slika 25. Detekcija fragmenata od 847 bp primenom seta prajmera Au1a/Au2d. Kolone: M–MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1–izolat PL-43-09, 2–izolat P-14-09, 3–izolat PL-52-09, 4– izolat PL-25-09, 5–pozitivna kontrola (746-07 iz paradajza), 6 - negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda).

5.4.3. Molekularna detekcija izolata PVY

Molekularna detekcija PVY izvršena je primenom „One–step“ RT–PCR metode primenom prajmera PVYc/PVYd koji omogućavaju amplifikaciju dela genoma vezanog za sekvencu 5' UTR i gena za P1 protein (helper komponenta, HC–Pro). Odabrani su izolati koji su prethodno okarakterisani na serološkom nivou, PL-28-09, PL-3-10, PL-15-09, PL-108-10 poreklom iz Pećinaca, Srbobrana, Aleksinca i Velike Plane.

Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike i pozitivne kontrole (izolat 7-06 iz duvana) sa korišćenim markerom (M) kod sva četiri ispitivana izolata došlo je do amplifikacije ciljne sekvence, odnosno dobijen je specifični fragment od 975 bp (Slika 26). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

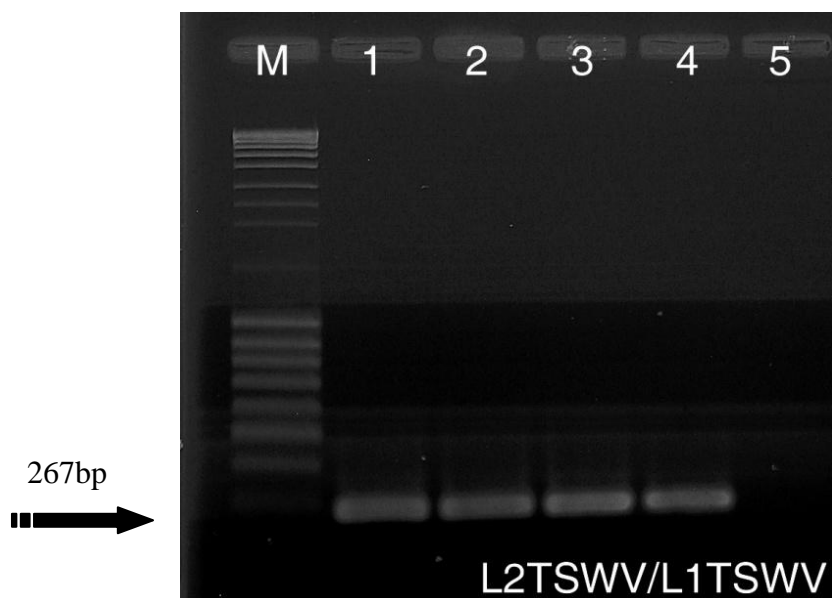


Slika 26. Detekcija fragmenata od 975 bp primenom seta prajmera PVYc/PVYd. Kolone: Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat PL-28-09, 2- izolat PL-3-10, 3- izolat PL-15-09, 4-izolat PL-108-10, 5- pozitivna kontrola (izolat 7-06 iz duvana), 6- negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

5.4.4. Molekularna detekcija izolata TSWV

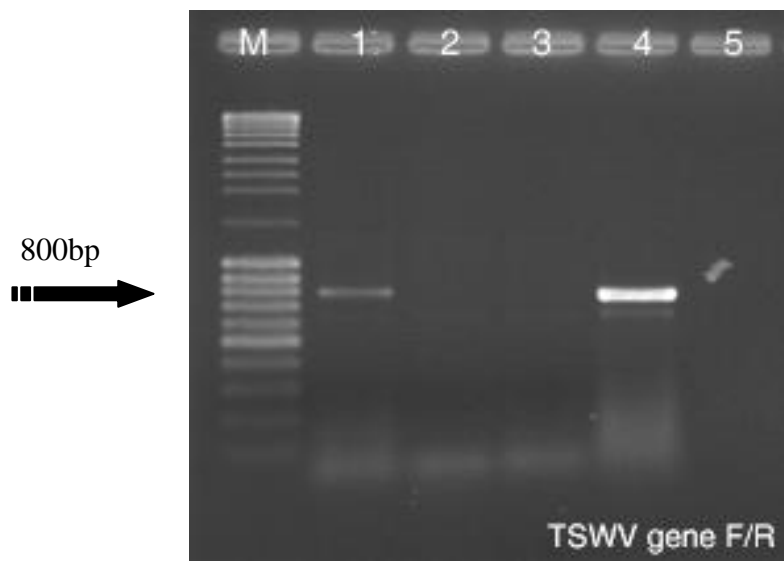
Molekularna detekcija TSWV izvršena je primenom „One-step“ RT-PCR metode sa prajmerima L2 TSWV F/L1 TSWV R, koji omogućavaju amplifikaciju fragmenta RdRp gena L RNA TSWV (delimična sekvenca gena za RNA-zavisnu RNA polimerazu), zatim prajmerima TSWVgene F/TSWVgene R i TSWV CP-f/TSWV CP-r, koji omogućavaju amplifikaciju NC (nucleocapsid) gena S RNA. Za ovu analizu odabrani su izolati PL-14-10, PL-60-09, PL-35-09, sa lokaliteta Lukino Selo, Đurđevo i Trstenik, koji su prethodno okarakterisani na serološkom nivou.

Primenom RT-PCR reakcije uz korišćenje para prajmera L2 TSWV F/L1 TSWV R i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata i pozitivne kontrole (izolat 53-05 iz duvana) sa korišćenim markerom (M), za sva tri ispitivana izolata amplifikovan je fragment veličine oko 276 bp. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom) (Slika 27).



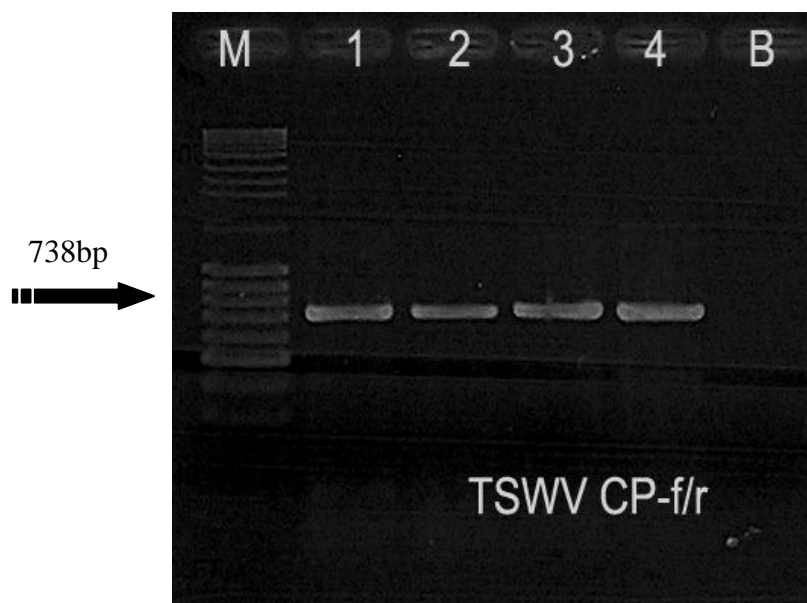
Slika 27. Detekcija fragmenata od 276 bp primenom seta prajmera L2 TSWV F/L1 TSWV R. Kolone: M-Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat PL-14-10, 2- izolat PL-35-09, 3- izolat PL-60-09, 4- pozitivna kontrola (53-05 iz duvana), 5 - negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

Primenom para prajmera TSWVgene F/TSWVgene R, koji omogućavaju amplifikaciju NC gena S RNA TSWV i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike i pozitivne kontrole (53-05 iz duvana) sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 800 bp kod izolata PL-35-09. Kod izolata PL-14-10 i PL-60-09, kao i kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom) nije došlo do amplifikacije ciljne sekvence (Slika 28).



Slika 28. Detekcija fragmenata od 800 bp primenom seta prajmera TSWVgene F/TSWVgene R. Kolone: M-Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat PL-35-09, 2- izolat PL-14-10, 3- izolat PL-60-09, 4- pozitivna kontrola (53-05 iz duvana), 5 - negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

Primenom para prajmera TSWV CPf /TSWV CPr, koji takođe omogućavaju amplifikaciju NC gena i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike i pozitivne kontrole (izolat 53-05 iz duvana) sa korišćenim markerom (M), kod sva tri ispitivana uzorka utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 738 bp. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom) (Slika 29).

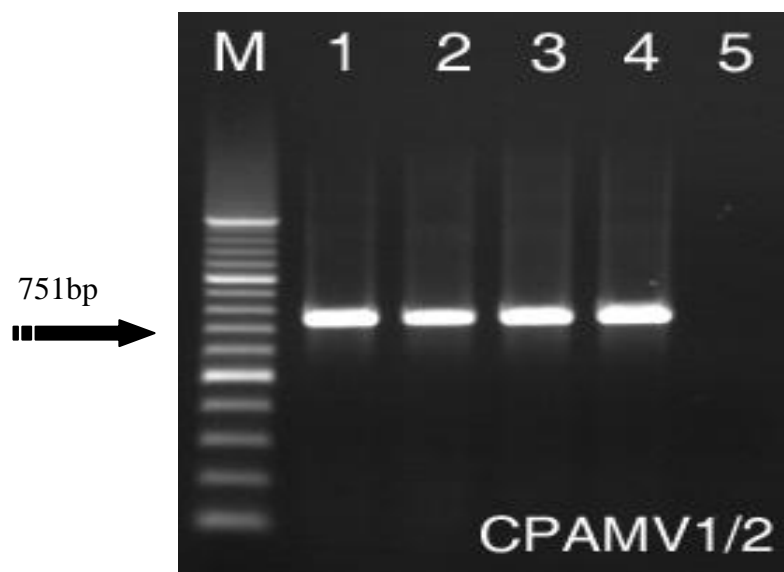


Slika 29. Detekcija fragmenata od 738 bp primenom seta prajmera CP1 TSWV/CP2 TSWV. Kolone: M-Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat PL-14-10, 2- izolat PL-35-09, 3- izolat PL-60-09, 4- pozitivna kontrola (53-05 iz duvana), 5 - negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

5.4.5. Molekularna detekcija izolata AMV

U odabranim izolatima PL-2-10, P-10-10, P-27-09 iz Pećinaca, Bačke Topole i Velike Plane koji su prethodno okarakterisani na serološkom nivou izvršena je molekularna detekcija AMV primenom „One-step“ RT-PCR uz korišćenje prajmera AMV CP1/AMV CP2.

Primenom ovih prajmera došlo je do uspešne amplifikacije regiona genoma koji obuhvata deo gena za protein omotača što je potvrđeno prisustvom pojedinačnog fragmenta odgovarajuće veličine od 751 bp, kako kod ispitivanih uzoraka tako i kod pozitivne kontrole (Slika 30). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



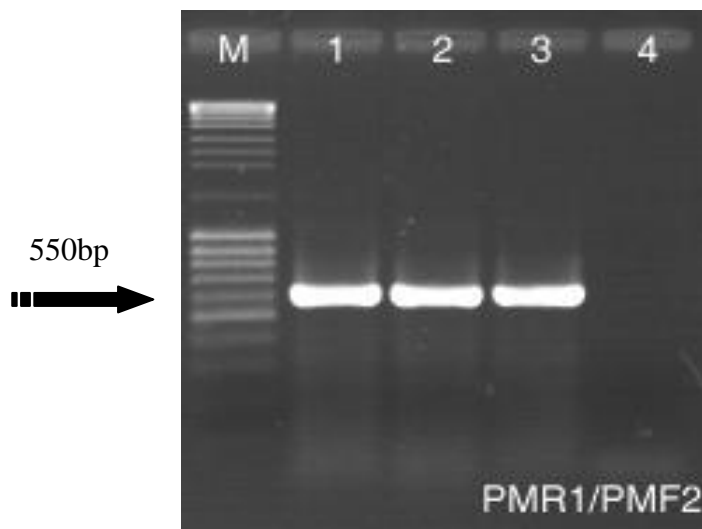
Slika 30. Detekcija fragmenata od 751 bp primenom seta prajmera AMV CP1/AMV CP2. Kolone: M-Marker (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat PL-2-10, 2- izolat P-10-10, 3- izolat P-27-09, 4- pozitivna kontrola (196-08 iz duvana), 5- negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

5.4.6. Molekularna detekcija izolata PMMoV

Molekularna detekcija PMMoV izvršena je primenom „One-step“ RT-PCR metode sa prajmerima PMR1/PMF1 koji omogućavaju amplifikaciju CP gena virusa i primenom prajmera P12/3/P12/3A koji omogućavaju amplifikaciju delimične sekvence RdRp gena virusa. Odabrani su izolati P-3-10, P-57-09, P-60-09 iz Đurđeva i Čonoplje koji su prethodno okarakterisani na serološkom nivou.

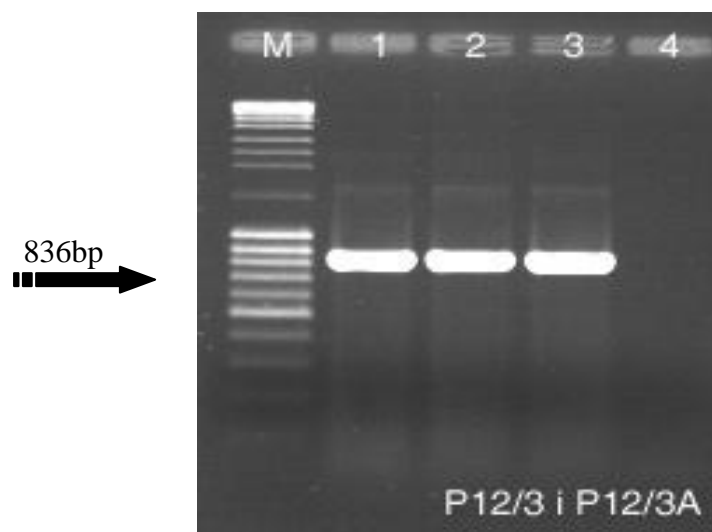
Za molekularnu detekciju PMMoV izolata iz paprike korišćeni su prajmeri PMR1/PMF1 koji umnožavaju segment DNK finalne dužine 550 bp koji obuhvata kodirajući gen za proteinski omotač (CP) virusa. Mesto vezivanja PMR1 prajmera je komplementarno pozicijama nukleotida od 6194-6217, a PMF1 prajmera je komplementarno pozicijama nukleotida od 5642-5661. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je da je kod sva tri testirana uzorka dobijen specifični fragment od 550 bp (Slika 31).

Pozitivna kontrola nije postojala, a do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 31. Detekcija fragmenata od 474 bp primenom seta prajmera PMR1/PMF1. Kolone: M-Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat P-3-10, 2- izolat P-57-09, 3- izolat P-60-09, 4- negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

Primenom „One-step“ RT-PCR sa prajmerima P12/3/P12/3A, koji omogućavaju amplifikaciju RdRp gena i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka paprike sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je da je kod sva tri testirana uzorka dobijen specifični fragment od 836 bp (Slika 32). Pozitivna kontrola nije postojala, a do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).



Slika 32. Detekcija fragmenata od 836 bp primenom seta prajmera P12/3/P12/3A. Kolone: M-Marker (MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 1- izolat P-3-10, 2- izolat P-57-09, 3- izolat P-60-09, 4- negativna kontrola (PCR mix bez uzorka, voda)

5.5. Molekularna identifikacija izolata virusa paprike poreklom iz Srbije

Odabrani izolati najznačajnijih virusa paprike, za koje je primenom seroloških i molekularnih metoda utvrđeno da pripadaju TSWV, PVY, CMV, AMV i PMMoV, korišćeni su za sekvencioniranje u cilju njihove identifikacije i čime je omogućeno proučavanje genetičke sličnosti sekvenci ispitivanih izolata virusa paprike poreklom iz Srbije sa izolatima virusa iz drugih delova sveta dostupnih u NCBI bazi podataka.

5.5.1. Molekularna identifikacija izolata CMV

Molekularna identifikacija odabranih izolata CMV obavljena je, nakon sekvencioniranja CP regiona, višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata CMV dostupnih u GenBank bazi podataka. Odabrana su tri izolata sa različitih lokaliteta, izolat PL-25-09 (Velika Plana), PL-43-09 (Smederevo) i PL-52-09 (Kikinda).

Za sekvencioniranje korišćeni su PCR produkti dobijeni korišćenjem para prajmera Aul1/Au2d koji omogućavaju amplifikaciju CP gena nakon čega je dobijena delimična sekvenca 5' UTR, sekvenca kompletnog CP gena i delimična sekvenca 3' UTR subgenomne RNA4. Dobijene sekvence CP gena odabranih izolata (KC288146 za izolat PL-25-09, KC288147 za izolat PL-43-09 i KC288148 za izolat PL-52-09), upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata CMV dostupnih u GenBank bazi podataka. Proračun genetičke sličnosti CP gena, pokazao je visok stepen nukleotidne (98,1-99,7%) i aminokiselinske (98,6-100%) homologije između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona. Proračunom genetičke sličnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je najviši stepen nukleotidne sličnosti između izolata PL-43-09 i PL-52-09 (99,5%), izolat PL-52-09 ima stepen identičnosti 99,4% sa izolatom PL-25-09, dok je između izolata PL-43-09 i PL-25-09 stepen nukleotidne sličnosti 99,2%. Izolat PL-43-09 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99,5%) sa izolatom iz duvana iz Amerike (U20668), izolatom Ny iz Australije (U22821), izolatom iz Amerike (D10538) i izolatom iz paradajza iz Španije (AM183119). Izolat PL-25-09 ima 99,7% identičnosti sa izolatom iz duvana iz Amerike (U20668), izolatom Ny iz Australije (U22821), izolatom iz Amerike (D10538) i izolatom 701-09 iz Srbije (GQ340670), dok PL-52-09 ima 99,7% identičnosti sa izolatom iz duvana iz Amerike (U20668), izolatom Ny iz Australije (U22821), izolatom iz Amerike (D10538) (prilog 1). Potpunu identičnost u aminokiselinskoj sekvenci (100%) ispoljili su ispitivani izolati CMV poreklom iz paprike sa većinom izolata odabranih iz NCBI baze podataka (prilog 2).

5.5.2. Molekularna identifikacija izolata PVY

Molekularna identifikacija izolata PVY izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ova ispitivanja odabrana su četiri izolata PL-28-09 (Velika Plana), PL-3-10 (Pećinci), PL-15-09 (Srbobran) i PL-108-10 (Aleksinac) koji su prethodno okarakterisani na serološkom nivou.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženih u PCR reakciji korišćenjem prajmera PVYc/PVYd, dobijene su delimične sekvence 5' UTR i gena za P1 protein.

Dobijene sekvence izolata (KC288142 za izolat PL-28-09, KC288144 za izolat PL-3-10, KC288143 za izolat PL-15-09 i KC288145 za izolat PL-108-10), upoređivane su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata PVY dostupnim u GenBank bazi podataka. MEGA4 softerom izvršen je proračun genetičke sličnosti kako između ispitivanih izolata tako i sa drugim izolatima PVY. Upotreba MEGA4 softvera pokazala je 98,8-100% nukleotidne i 98,2-100% aminokiselinske identičnosti ispitivanih izolata sa sekvencama CP gena drugih izolata PVY deponovanih u NCBI bazi podataka. Proračunom genetičke sličnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je najviši stepen nukleotidne sličnosti između izolata PL-15-09, PL-108-10 i PL-28-09 (99,9%). Izolat PL-3-10 ima stepen identičnosti 99,3% sa izolatom PL-15-09 dok sa izolatima PL-108-10 i PL-28-09 ima nešto niži stepen identičnosti od 99,1%. Između izolata PL-108-10 i PL-28-09 stepen nukleotidne sličnosti je 99,7%. Najviši stepen nukleotidne identičnosti ispitivani izolati pokazali su sa izolatom Sl 64 (AF401604) iz krompira poreklom iz Slovenije, izolatom D35-06 (GQ290475) iz duvana poreklom iz Srbije i izolatom 38MYPVY (HQ335258) iz krompira iz Kolumbije. Izolat PL-3-10 pokazao je 99,3% nukleotidne identičnosti sa svim navedenim izolatima, izolat PL-15-09 100%, dok su izolati PL-108-10 i PL-28-09 pokazali 99,9% nukleotidne identičnosti (prilog 3). Sa većinom odabranih izolata iz NCBI baze podataka, ispitivani izolati pokazuju visok stepen homologije aminokiselinskih sekvenci, i to 99,6% izolati PL-3-10, PL-28-09, PL-108-10, a izolat PL-15-09 poseduje 100% homologije sa većinom odabranih izolata (prilog 4).

5.5.3. Molekularna identifikacija izolata TSWV

Višestrukim uparivanjem sekvenci ispitivanih izolata dobijenih sekvencioniranjem CP regiona genoma ovog virusa sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti primenom MEGA4 softvera, izvršena je molekularna identifikacija odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza iz paprike poreklom iz Srbije. Za ova ispitivanja odabrana su tri izolata, PL-14-10 (Lukino Selo), PL-60-09 (Đurđevo) i PL-35-09 (Trstenik).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog korišćenjem para prajmera TSWV CP-f/TSWV CP-r koji omogućavaju amplifikaciju CP gena, dobijene delimične

sekvence CP gena odabranih izolata (KC182564 za izolat PL-14-10, KC182566 za izolat PL-60-09 i KC182565 za izolat PL-35-09) upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata TSWV dostupnih u GenBank bazi podataka korišćenjem MEGA4 softvera. MEGA4 softver pokazao je visok stepen nukleotidne homologije (98,7-100%) odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata TSWV dostupnim u NCBI bazi podataka, kao i visok stepen aminokiselinske sličnosti (97,8-100%). Na osnovu proračuna genetičke sličnosti između samih ispitivanih izolata utvrđeno je da izolati među sobom imaju 99,7% sličnosti nukleotidne sekvence. Najviši stepen nukleotidne identičnosti sva tri izolata imaju sa izolatom Sr-603 iz paradajza iz Srbije (GU369723). PL-60-09 ima 100% identičnosti sa ovim izolatom dok izolati PL-14-10 i PL-35-09 99,7% (prilog 5). Stepen aminokiselinske homologije između ispitivanih izolata i odabranih izolata iz NCBI baze podataka iznosio je 100% (izolati PL-60-09 i PL-35-09) i 99,6% (izolat PL-14-10) sa izolatima iz Srbije: Sr-603 iz paradajza (GU369723), 240-09 iz tikve (JF303081), 236-09 iz tikve (JF303080), Is-56 iz duvana (GU369729), 53-05 iz duvana (GQ373173), 33-06 iz duvana (GQ355467), i izolatom iz duvana poreklom iz Holandije (D13926) (prilog 6).

5.5.4. Molekularna identifikacija izolata AMV

Nakon sekvencioniranja CP regiona genoma AMV, molekularna identifikacija odabranih izolata obavljena je, višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata AMV dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti primenom MEGA4 softvera. Za sekvencioniranje odabrana su tri izolata, PL-2-10 (Pećinci), P-10-10 (Bačka Topola) i P-27-09 (Velika Plana).

Sekvencioniranjem fragmenata dobijenih u PCR reakciji korišćenjem para prajmera CP AMV1/CP AMV2 dobijene su delimične sekvence CP gena i 3' UTR subgenomne RNA4. Dobijene sekvence CP gena odabranih izolata (KC182569 za izolat PL-2-10, KC182567 za izolat P-10-10 i KC182568 za izolat P-27-09) upoređene su sa dostupnim sekvencama drugih izolata AMV u GenBank bazi podataka. Proračun genetičke sličnosti CP gena, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,5-100%) i aminokiselinske (97,5-100%) homologije između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona. Proračunom genetičke sličnosti sekvenci izolata

dobijenih u ovom radu, utvrđen je najviši stepen nukleotidne sličnosti između izolata P-10-10 i PL-2-10 (99,6%). Izolat P-27-09 ima stepen identičnosti 99,2% sa izolatom PL-2-10, dok između izolata P-10-10 i P-27-09 stepen nukleotidne sličnosti je 98,7%. Najviši stepen nukleotidne identičnosti izolati P-10-10 i PL-2-10 pokazali su sa izolatom 196-08 (FJ 527749) iz duvana iz Srbije (100% i 99,6%), dok je izolat P-27-09 pokazao najviši stepen identičnosti (98,7%) sa izolatom 196-08 (FJ 527749) iz duvana iz Srbije, izolatom No.14 (AB451173) iz krompira iz Japana, izolatom NY-B 2002 iz pasulja (AY340071) poreklom iz Amerike, izolatom NZ34 iz graška (AF215664) poreklom iz Novog Zelanda i izolatom iz duvana (M59241) poreklom iz Holandije (prilog 7). Potpunu homologiju u aminokiselinskoj sekvenci (100%) ispoljili su ispitivani izolati AMV iz paprike poreklom iz Srbije sa izolatom 196-08 iz duvana iz Srbije (FJ527749), izolatom Hz iz duvana iz Kine (HQ316637), izolatom No.14 iz krompira iz Japana (AB451173), izolatom TN iz soje iz Amerike (HQ185568), izolat iz duvana iz Holandije (M59241) i izolatom S-30 iz lucerke iz Australije (HM807305) (prilog 8).

5.5.5. Molekularna identifikacija izolata PMMoV

Molekularna identifikacija PMMoV izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata PMMoV dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ova ispitivanja odabrana su tri izolata P-3-10 (Đurđevo), P-57-09 (Čonoplja) i P-60-09 (Čonoplja).

Sekvencioniranjem fragmenta umnoženih u PCR reakciji korišćenjem prajmera PMR1/PMF1 koji omogućavaju amplifikaciju CP gena dobijene su kompletne sekvence CP gena i 3'UTR i 5' UTR subgenomne RNA. Dobijene sekvence izolata PMMoV (KC288149 za izolat P-3-10, KC288150 za izolat P-57-09 i KC288151 za izolat P-60-09), upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Proračun genetičke sličnosti CP gena između ispitivanih izolata i izolata PMMoV dostupnih u NCBI bazi podataka iz različitih geografskih regiona, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,5-100%) i aminokiselinske (98,5-100%) homologije. Proračunom genetičke sličnosti sekvenci dobijenih u ovom radu utvrđeno je da izolat P-60-09 ima 99,5% nukleotidne sličnosti sa izolatom P-3-10 i P-57-09, dok za izolate P-3-

10 i P-57-09 nisu utvrđene razlike u nukleotidnoj sekvenci CP gena. Najviši stepen identičnosti, 100% za izolat P-60-09, odnosno 99,5% za izolate P-3-10 i P-57-09, odabrani izolati PMMoV iz paprike poreklom iz Srbije pokazali su sa Mađarskim izolatima Sz24 (AM491598), Sz17 (AM491596), Sz15 (AM491595), Sz13 (AM491594), Sz23 (AM491601) iz paprike, izolatom P91/2 iz paprike (FR671383) iz Španije, izolatom AY632863 iz Kine, izolatom PMMV1.2 (AJ429088) iz Italije, izolatom iz paprike LinsBR08 (AM411433) iz Brazila, izolatima iz prehrambenih proizvoda MRS-PV3p-RP-22 i MRS-PV3p-CyP-54 (GQ427044, GQ427043) iz Francuske (prilog 9). Potpunu identičnost u aminokiselinskoj sekvenci (100%) ispitivani izolati PMMoV ispoljili su sa svim izolatima odabраних iz NCBI baze podataka, osim sa izolatом L4BV iz paprike iz Japana (AB276030) (prilog 10).

Nakon sekvencioniranja fragmenata umnoženih u PCR reakciji korišćenjem prajmera koji omogućavaju amplifikaciju RdRp gena (P12/3/P12/3A) dobijene su delimične sekvence RdRp gena ispitivanih izolata. Dobijene sekvence izolata PMMoV (KC288154 za izolat P-3-10, KC288152 za izolat P-57-09 i KC288153 za izolat P-60-09), upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata PMMoV dostupnih u GenBank bazi podataka. Proračun genetičke sličnosti CP gena između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,1-99,7%) i aminokiselinske (93,3-99,2%) homologije. Proračunom genetičke sličnosti sekvenci dobijenih u ovom radu utvrđeno je da izolat P-60-09 ima 99,4% nukleotidne sličnosti sa izolatом P-3-10 i P-57-09, dok za izolate P-3-10 i P-57-09 nisu utvrđene razlike u nukleotidnoj sekvenci RdRp gena. Najviši stepen nukleotidne identičnosti (P-60-09 99,7%, P-3-10 i P-57-09 99,4%) ispitivani izolati su pokazali sa izolatima L4BV (AB276030) i Iw (AB254821) iz paprike iz Japana i KR iz paprike (AB126003) poreklom iz Koreje (prilog 11). Najveći stepen homologije aminokiselinskih sekvenci, ispitivani izolati ispoljavaju sa izolatом Iw iz paprike poreklom iz Japana (AB254821), i to izolati P-57-09 i P-3-10 98,7%, a izolat P-60-09 99,6% (prilog 12).

5.6. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa paprike u Srbiji

Dobijene sekvence uparene su sa odgovarajućim odabranim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstruisano je filogenetsko stablo Maximum Parsimony metodom i bootstrap analizom sa 1 000 ponavljanja integrisanog unutar MEGA 4 programa.

Filogenetska analiza urađena je na osnovu delimične sekvence CP gena izolata TSWV, AMV i CMV, delimične nukleotidne sekvence gena za P1 protein izolata PVY, kompletne sekvence CP gena izolata PMMoV.

Za ova ispitivanja korišćene su sekvence sledećih izolata poreklom iz Srbije: PL-14-10, PL-35-09 i PL-60-09 koji pripadaju virusu bronzavosti paradajza, sekvence izolata PL-2-10, P-10-10 i P-27-09 virusa mozaika lucerke, sekvence izolata PL-28-09, PL-3-10, PL-15-09 i PL-108-10 virusa crtičastog mozaika krompira, sekvence izolata PL-43-09, PL-52-09 i PL-25-09 virusa mozaika krastavca i sekvence izolata P-3-10, P-57-09 i P-60-09 virusa šarenila paprike.

5.6.1. Filogenetska analiza sekvenci CMV

Delimične sekvence CP gena tri izolata CMV iz paprike poreklom iz Srbije, koje su deponovane u NCBI bazi podataka i 35 sekvenci odabranih izolata CMV, međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano je filogenetsko stablo (Maximum Parsimony metod). Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence dužine 657 bp (Slika 33), pokazalo je razdvajanje odabranih izolata CMV u dve podgrupe I i II. Najveći broj izolata CMV, kao i ispitivani izolati, pripadaju podgrupi I.

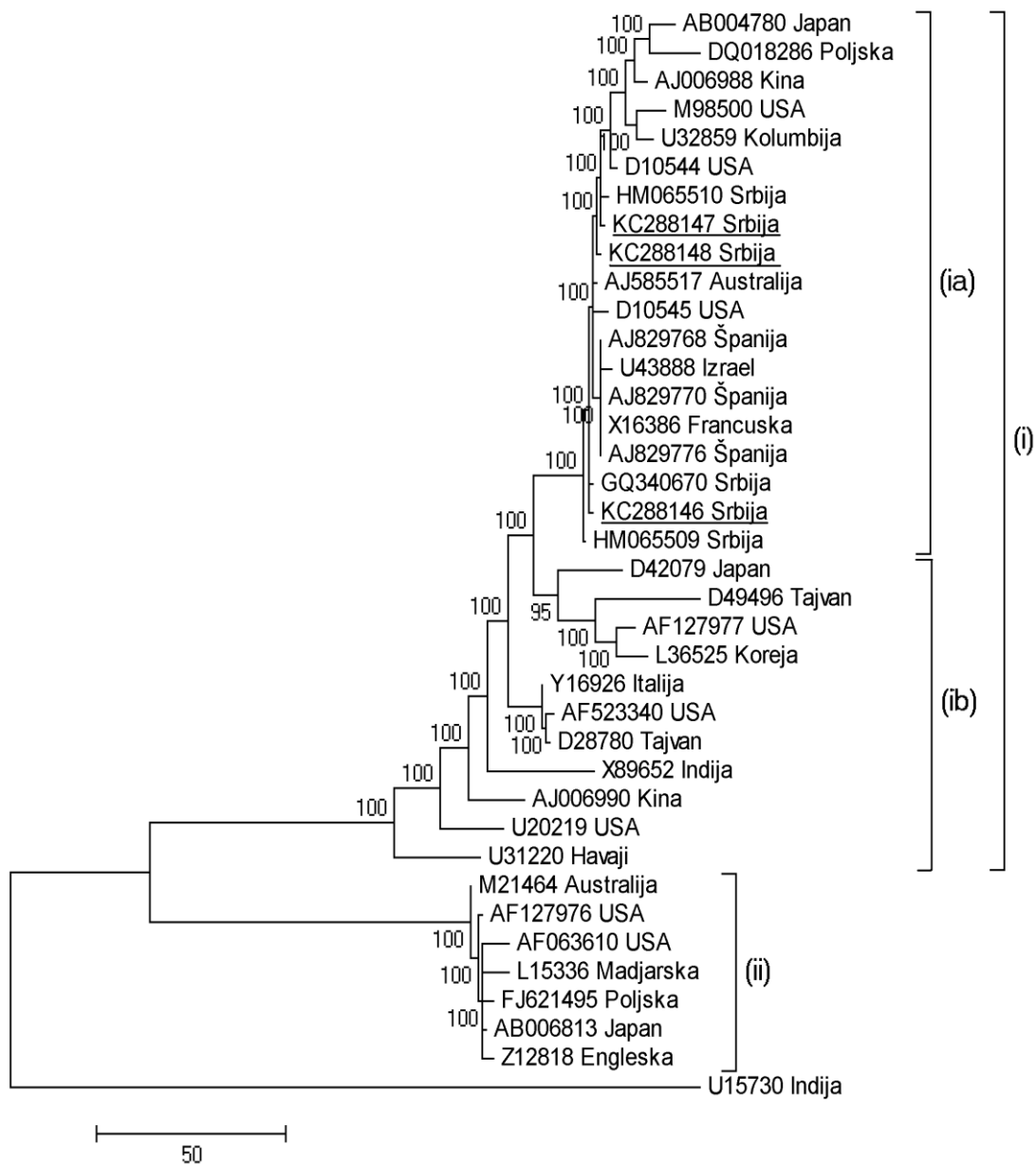
Proračunom genetičke sličnosti utvrđen je stepen nukleotidne sličnosti naših izolata i izolata prikazanih u filogenetskom stablu, od 70,1% do 99,7% (prilog 13), dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 79,1% do 100% (prilog 14).

Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe II ($0,011 \pm 0,002$), dok je varijabilnost u okviru podgrupe Ia bila nešto veća ($0,016 \pm 0,002$). Najveća varijabilnost zabeležena je unutar podgrupe Ib ($0,067 \pm 0,006$). Intergrupna varijabilnost između

podgrupa Ia i Ib bila je $0,068 \pm 0,007$. Između podgrupe Ia i grupe II varijabilnost je bila $0,284 \pm 0,023$, dok je između podgrupe Ib i grupe II varijabilnost bila $0,285 \pm 0,022$ (Tabela 19).

Tabela 19. Proračun genetičke udaljenosti sekvenci unutar i između klastera CMV izolata

	(Ia)	(Ib)	(II)
(Ia)	$0,016 \pm 0,002$		
(Ib)	$0,068 \pm 0,007$	$0,067 \pm 0,006$	
(II)	$0,284 \pm 0,023$	$0,285 \pm 0,022$	$0,011 \pm 0,002$



Slika 33. Maximum Parsimony stablo rekonstruisano na osnovu delimične sekvence gena za P1 protein 38 izolata CMV. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem programa MEGA verzija 4.0 i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

5.6.2. Filogenetska analiza sekvenci PVY

Delimične sekvence gena za P1 protein četiri izolata PVY iz paprike poreklom iz Srbije, koje su deponovane u NCBI bazi podataka i 34 sekvenci odabranih izolata PVY iz različitih regiona širom sveta, međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano je filogenetsko stablo (Maximum Parsimony metod) (Slika 34). Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci ovog dela genoma pokazuje da su odabrani izolati grupisani u tri jasno odvojene grupe ili klastera, pri čemu prva grupa odgovara nekrotičnim sojevima (PVY^N i PVY^{NTN}), a druge dve PVY^O i PVY^C soju. U okviru PVY^N/PVY^{NTN} klastera uočavaju se dva sub-klastera koja su u saglasnosti sa geografskim poreklom izolata: (ia) izolati nekrotičnih sojeva poreklom iz Evrope i (ib) izolati nekrotičnih sojeva poreklom iz Amerike. Mada se izolati uglavnom grupišu u skladu sa geografskim poreklom ima i nekoliko izuzetaka, tako u okviru sub-klastera izolata nekrotičnih sojeva PVY poreklom iz Evrope (Srbija, Slovenija, Francuska, Švajcarska, Nemačka i Velika Britanija) grupiše se i izolat iz Kanade (Tu-648) i izolati iz USA (423-3 i PB312), dok se u okviru izolata nekrotičnih sojeva poreklom iz Amerike nalaze i dva izolata iz Velike Britanije (PVY^N-Ru i PVY^N-English AJ315747). Rezultati filogenetske analize pokazuju da se ispitivani izolati poreklom iz Srbije nalaze u okviru sub-klastera PVY^N/PVY^{NTN} izolata poreklom iz Evrope.

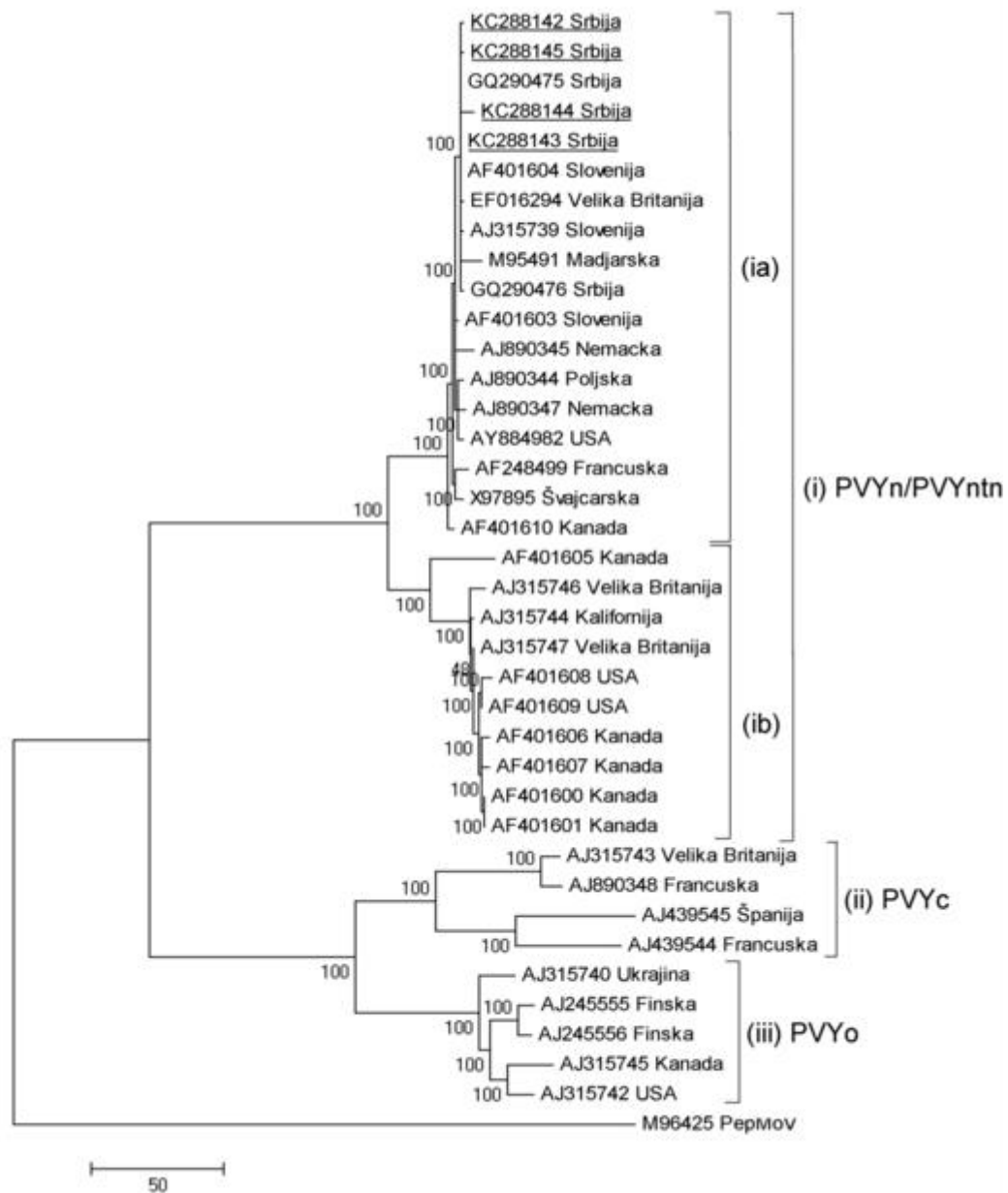
Proračunom genetičke sličnosti utvrđen je stepen nukleotidne sličnosti ispitivanih izolata i izolata prikazanih u filogenetskom stablu od 60,7% do 100% (prilog 15), dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 50,7% do 100% (prilog 16).

Proračunom genetičke udaljenosti sekvenci u okviru izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar sub-klastera (ia) (0,010±0,002) i (ib) (0,019±0,003) dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila nešto veća, 0,046±0,005 unutar klastera (iii) i 0,141±0,011 unutar klastera (ii). Varijabilnost između grupa bila je najveća između klastera (ia) i (ii) i (ib) i (ii) (0,374±0,026), a nešto manja između klastera (ia) i (iii) i (ib) i (iii) (0,361±0,027, 0,361±0,026). Između klastera (ii) i (iii) varijabilnost je bila 0,205±0,015. Najmanja intergrupna varijabilnost bila je između klastera (ia) i (ib) (0,087±0,010) (Tabela 20).

Tabela 20. Proračun genetičke udaljenosti sekvenci u okviru i između klastera PVY izolata

	(ia)	(ib)	(ii)	(iii)
(ia)	0,010±0,002			
(ib)	0,087±0,010	0,019±0,003		
(ii)	0,374±0,026	0,374±0,026	0,141±0,011	
(iii)	0,361±0,027	0,361±0,026	0,205±0,015	0,046±0,005

Legenda: (ia)–izolati PVY^N/PVY^{NTN} soja poreklom iz Evrope; (ib)–izolati PVY^N/PVY^{NTN} soja poreklom iz Amerike; (ii)–izolati PVY^C soja; (iii)–izolati PVY^O soja



Slika 34. Maximum Parsimony stablo rekonstruisano na osnovu delimične sekvence gena za P1 protein 38 izolata PVY. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem programa MEGA verzija 4.0 i bootstrap analize sa 1 000 ponavljanja.

5.6.3. Filogenetska analiza sekvenci TSWV

Za filogenetsku analizu TSWV na osnovu CP gena, odabrane su sekvence tri izolata TSWV iz paprike poreklom iz Srbije, koje su deponovane u GenBank bazu podataka i 30 sekvenci izolata TSWV iz različitih regiona širom sveta. Međusobno uparivanje, skraćivanje, njihovo poređenje i rekonstruisanje filogenetskog stabla (Maximum Parsimony) urađeno je korišćenjem programa integrisanog u programu MEGA verzija 4.0. iz 632 bp fragmenta NC gena. Filogenetska analiza pokazala je postojanje šest klastera, odnosno šest geografskih subpopulacija: (i) izolati poreklom iz Evrope (većina evropskih izolata), (ii) izolati iz Japana, (iii) izolati iz Španije, (iv) izolati sa Havaja, (v) izolati iz Kalifornije (vi) izolati iz Džordžije i Severne Karoline. U klasteru (i) sa izolatima iz Evrope grupisala su se i dva izolata iz Severne Karoline (NC-1 i NC-3) i izolati iz Južne Afrike (98/0472 i TSWV-GP), a u klasteru (iii) sa izolatima iz Španije nalazi se T304 izolat iz Italije. Rezultati filogenetske analize pokazuju da se izolati TSWV poreklom iz paprike iz Srbije grupišu sa većinom evropskih izolata u klasteru (i) (Slika 35).

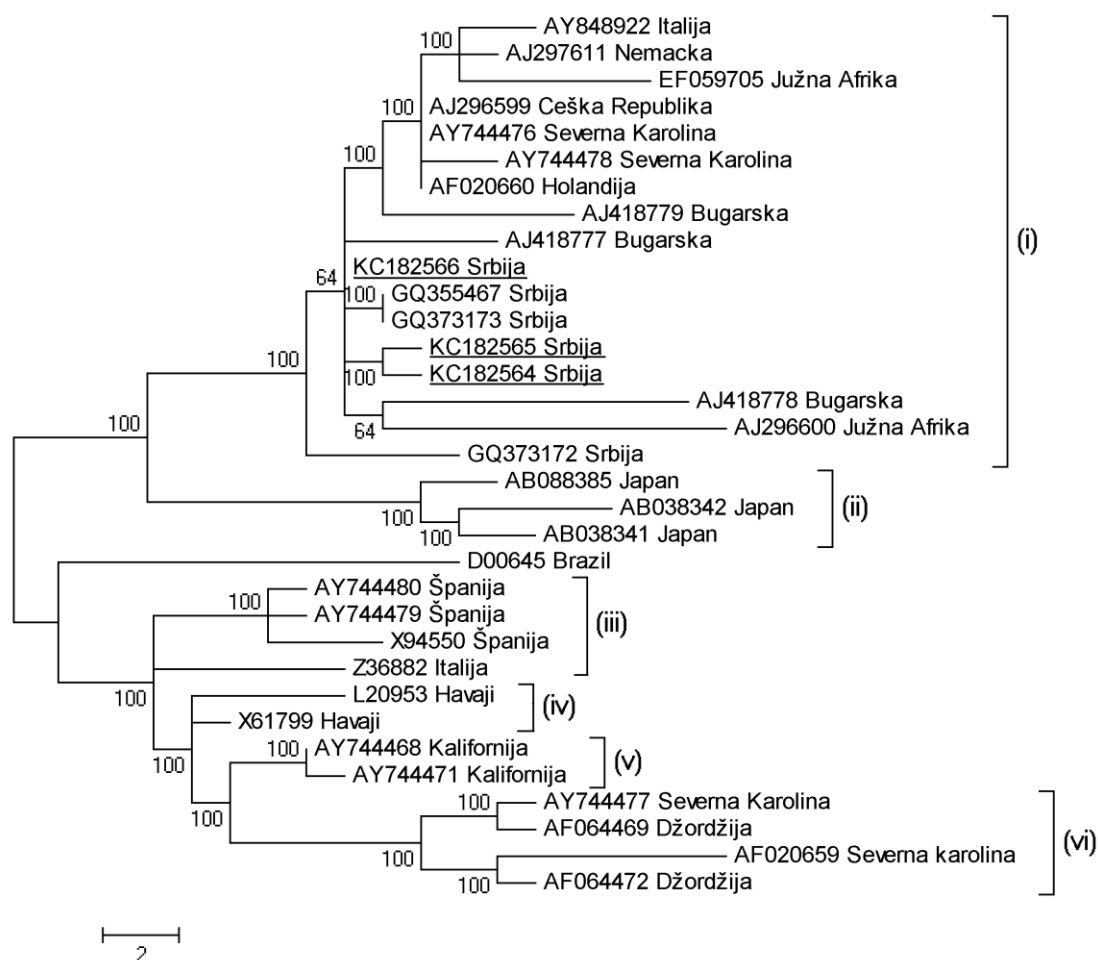
Proračunom genetičke sličnosti utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti ispitivanih izolata i izolata prikazanih u NC filogenetskom stablu, od 95,4% do 99,8% (prilog 17), dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 88,2% do 99,5% (prilog 18).

Proračunom genetičke udaljenosti sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar klastera (v) ($0,002 \pm 0,002$), dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila nešto veća, $0,008 \pm 0,004$ unutar klastera (iv), $0,010 \pm 0,003$ unutar klastera (ii), $0,011 \pm 0,002$ unutar klastera (i), $0,011 \pm 0,003$ unutar klastera (iii) i $0,012 \pm 0,003$ unutar klastera (vi). Intergrupna varijabilnost bila je najveća između klastera (ii) i (vi) ($0,040 \pm 0,007$) dok je najmanja intergrupna varijabilnost bila je između klastera (ii) i (iii) ($0,003 \pm 0,006$) (Tabela 21).

Tabela 21. Prosečne vrednosti genetičke sličnosti unutar i između klastera

	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)
(i)	0,011±0,002					
(ii)	0,029±0,005	0,010±0,003				
(iii)	0,029±0,006	0,003±0,006	0,011±0,003			
(iv)	0,027±0,005	0,027±0,006	0,013±0,003	0,008±0,004		
(v)	0,028±0,006	0,028±0,006	0,015±0,004	0,010±0,003	0,002±0,002	
(vi)	0,038±0,006	0,040±0,007	0,025±0,005	0,021±0,005	0,019±0,005	0,012±0,003

Legenda: (i) - izolati poreklom iz Evrope (većina evropskih izolata), (ii) - izolati iz Japana, (iii) - izolati iz izolati iz Španije, (iv) - izolati sa Havaja, (v) - izolati iz Kalifornije (vi) - izolati iz Džordžije i Severne Karoline.



Slika 35. Maximum Parsimony stablo rekonstruisano na osnovu delimične sekvence NC gena 33 izolata TSWV. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem programa MEGA verzija 4.0 i bootstrap analize sa 1 000 ponavljanja.

5.6.4. Filogenetska analiza sekvenci AMV

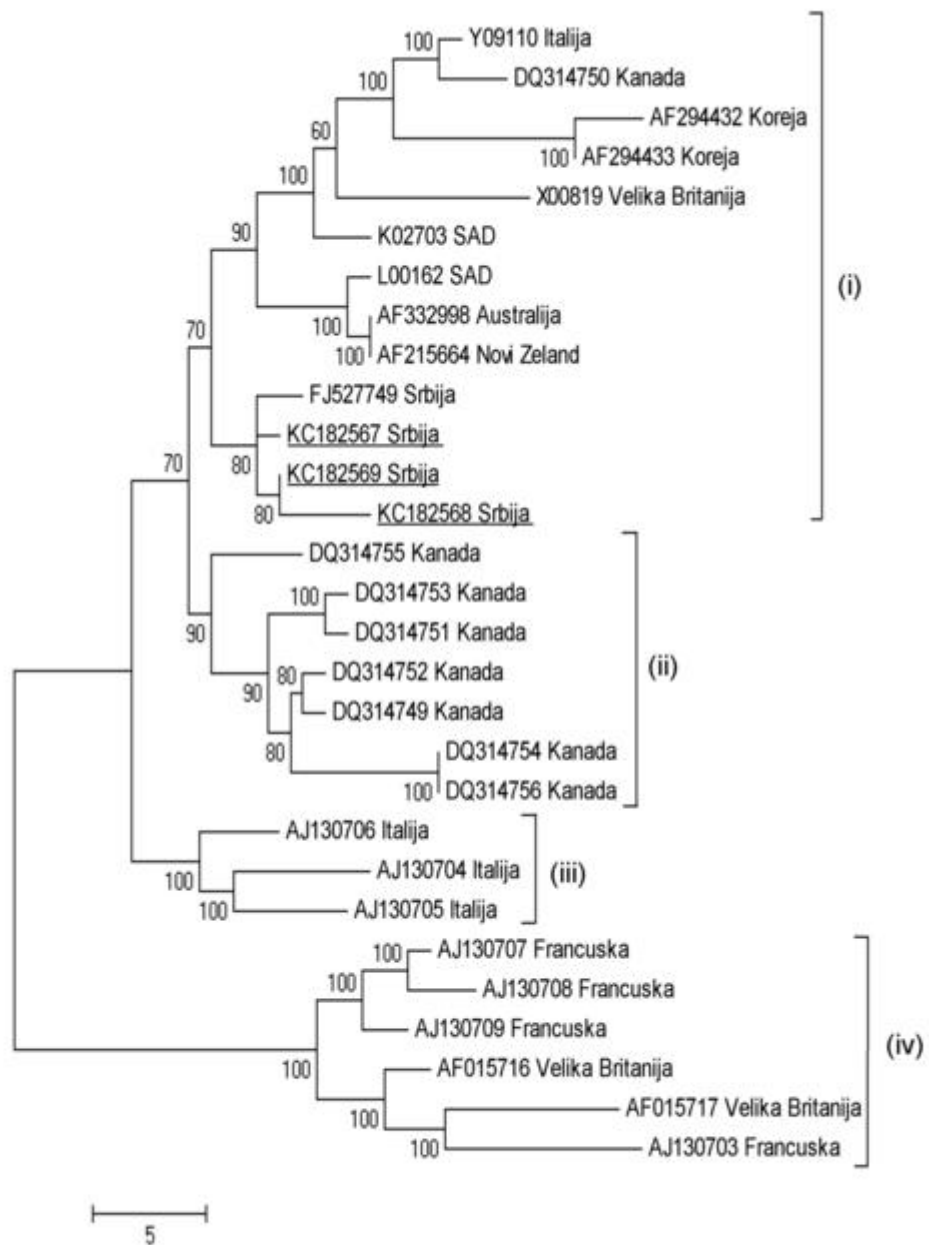
Delimične sekvence CP gena tri izolata AMV iz paprike poreklom iz Srbije, koje su deponovane u GenBank bazi podataka i 26 sekvenci odabranih izolata AMV međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje Maximum Parsimony metodom i rekonstruisano je filogenetsko stablo. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence dužine 600 bp pokazuje izdvajanje četiri klastera, odnosno grupisanje izolata AMV u četiri genetička soja, nezavisno od geografskog porekla i biljke domaćina (Slika 36). Većina izolata, dva iz Koreje (KR1 i KR2), dva iz Amerike (425 Medison i 425 Leiden) i po jedan iz Italije (Danza), Kanade (Ca 175) Velike Britanije (S), Australije (N20) i Novog Zelanda NZ34) izdvojila se u grupu I. Takođe u ovu grupu spadaju i tri izolata AMV iz paprike poreklom iz Srbije (P-27-9, PL-2-10 i P-10-10) zajedno sa još jednim izolatom iz Srbije (196-08). Drugu molekularnu grupu čine sedam izolata iz Kanade (Ca518, Ca401, Ca399, Ca400, Ca375, Ca508, Ca616). Izolati iz Italije (F-430, 126A, 195-AN) čine treću molekularnu grupu, dok su se četiri izolata iz Francuske (Caa-1, Dac16, Lyh-1, Lye-80) i dva izolata iz Velike Britanije (VRU, 15/64) izdvojili u četvrtu grupu.

Proračunom genetičke sličnosti utvrđen je stepen nukleotidne sličnosti izolata prikazanih u filogenetskom stablu, od 93,7% do 99,5% (prilog 19), dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 93% do 100% (prilog 20).

Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe (ii) ($0,009 \pm 0,002$), dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila nešto veća, $0,018 \pm 0,004$ unutar grupe (iii), $0,021 \pm 0,003$ unutar grupe (i) i $0,021 \pm 0,004$ unutar grupe (iv). Intergrupna varijabilnost bila je najveća između grupa (i) i (iv) kao i između (ii) i (iv) ($0,057 \pm 0,008$), zatim između grupa (iii) i (iv) ($0,056 \pm 0,008$), (i) i (iii) ($0,031 \pm 0,005$), a nešto manja između grupa (i) i (ii) kao i između (ii) i (iii) ($0,025 \pm 0,004$) (Tabela 22).

Tabela 22. Proračun genetičke udaljenosti sekvenci unutar i između klastera AMV izolata

	(i)	(ii)	(iii)	(iv)
(i)	0,021±0,003			
(ii)	0,025±0,004	0,009±0,002		
(iii)	0,031±0,005	0,025±0,004	0,018±0,004	
(iv)	0,057±0,008	0,057±0,008	0,056±0,008	0,021±0,004



Slika 36. Maximum Parsimony stablo rekonstruisano na osnovu delimične sekvence CP gena 29 izolata AMV. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem programa MEGA verzija 4.0 i bootstrap analize sa 1 000 ponavljanja.

5.6.5. Filogenetska analiza sekvenci PMMoV

Delimične sekvence CP gena tri izolata PMMoV iz paprike poreklom iz Srbije, deponovane u GenBank bazi podataka i 33 sekvenci odabranih izolata PMMoV iz različitih regiona sveta, međusobno su uparene, izvršeno je njihovo poređenje i rekonstruisano je filogenetsko stablo (Maximum Parsimony metod). Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence CP gena dužine 550 bp, pokazalo je razdvajanje odabranih izolata PMMoV u dva klastera, pri čemu prva grupa odgovara izolatima koji izazivaju hipersenzitivnu reakciju (HR) na paprici i koje su nosioci L^3 rezistentnog gena, a drugu grupu čine izolati koji ne poseduju ovu osobinu. Ispitivani izolati iz Srbije grupišu se u prvi klaster (Slika 37).

Proračunom genetičke sličnosti utvrđen je stepen nukleotidne sličnosti izolata PMMoV prikazanih u filogenetskom stablu, od 93,1% do 100% (prilog 21), dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 96,8% do 100% (prilog 22).

Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, manja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe (ii) ($0,010 \pm 0,004$), dok je varijabilnost u okviru prve grupe bila nešto veća, $0,016 \pm 0,003$. Intergrupna varijabilnost između grupa (i) i (ii) bila $0,060 \pm 0,010$ (Tabela 23).

Tabela 23. Proračun genetičke udaljenosti sekvenci unutar i između klastera PMMoV izolata

	(i)	(ii)
(i)	$0,016 \pm 0,003$	
(ii)	$0,060 \pm 0,010$	$0,010 \pm 0,004$

Legenda: (i)– izolati koji izazivaju HR reakciju na paprici koje su nosioci L^3 rezistentnog gena; (ii)– izolati koji ne izazivaju HR reakciju na paprici koje su nosioci L^3 rezistentnog gena

6. DISKUSIJA

Brojne biljne bolesti mogu da smanje ili ugroze uspešnu proizvodnju paprike ometajući normalan razvoj biljke i umanjujući prinos i kvalitet plodova. Zbog značajnih šteta koje često prouzrokuju, viroze paprike su predmet proučavanja mnogih autora u svetu (**Marchoux et al., 1991; Arli-Sokmen et al., 2005; Choi et al., 2005a; Ozaslan et al., 2006**). Utvrđeno je da više od 45 različitih virusa može da zarazi papriku, ali se smatra da je među njima svega nekoliko ekonomski značajno (**Green and Kim, 1990**).

Prva proučavanja virusa paprike u Srbiji bila su vezana za *Tobacco mosaic virus* (virus mozika duvana, TMV) (**Panjan i Prpić, 1955**), *Cucumber mosaic virus* (virus mozaika krastavca, CMV) i *Alfalfa mosaic virus* (virus mozaika lucerke, AMV) (**Šutić, 1959; Delević, 1963**). Prvi podaci o prisustvu *Tomato spotted wilt virus* (virus bronzavosti paradajza, TSWV) na paprici u Srbiji potiču iz 1998. godine (**Mijatović i sar., 1999**). Od tada je praćenjem simptoma, primećena sve učestalija pojava ovog virusa na različitim biljkama domaćinima, što govori o njegovom progresivnom širenju. Dosadašnja malobrojna proučavanja utvrdila su prisustvo sledećih virusa: TSWV, CMV, *Potato virus Y* (virus crtičastog mozaika krompira, PVY), AMV, TMV, *Pepper mild mottle virus* (virus blagog šarenila paprike, PMMoV), *Pepper mottle virus* (virus šarenila paprike, PepMoV) i *Pepper veinal mottle virus* (virus šarenila nerava paprike, PVMV) (**Mijatović, 1986; Krstić i sar., 1996, 2005; Mijatović i sar., 1999, 2002, 2005**). Prvih pet virusa ekonomski su značajni u proizvodnji paprike u Srbiji, a ostala tri se javljaju sporadično (**Mijatović i sar., 2007; Krstić i Bulajić, 2008**). Juna 2002. godine u plastenicima u okolini Beograda, zabeleženi su na lišću paprike simptomi hlorotičnih i nekrotičnih šara, bez deformacije liski, a iz plodova sa ovakvim simptomima primenom molekularnih metoda je identifikovan TSWV (**Dukić i sar., 2002a**). U većem broju lokaliteta u Srbiji prisustvo virusa je dokazano 2005. i 2006. godine na paradajzu, paprici, duvanu i mnogobrojnim vrstama ukrasnih biljaka (**Krstić i sar., 2005; Krstić i Bulajić, 2007**). Kako se poslednjih godina oboljenje koje ovaj virus izaziva javljalo u sve većim razmerama, **Dukić i sar. (2002a)** su pristupili molekularnoj karakterizaciji TSWV izolata paprike iz naše zemlje. Istraživanja u Srbiji sprovedena 2007. godine na devet lokaliteta gajenja paprike pokazala

su prisustvo virusa iz dve osnovne grupacije: karantinski (TSWV) i ekonomski štetni (CMV, AMV i TMV) (Tomić i sar., 2007).

Pregledom proizvodnje rasada i useva paprike u različitim lokalitetima gajenja kako u zaštićenom prostoru, tako i na otvorenom polju zabeležena je pojava niza simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu i koji su varirali u zavisnosti od starosti biljke domaćina, vremena ostvarene infekcije i vrste virusa. Procenjena učestalost virusnih infekcija, u pregledanim lokalitetima proizvodnje paprike u rasadu tokom 2009. i 2010. bila je od 5% do 10%, u lokalitetima proizvodnje paprike u zaštićenom prostoru od 20% do 40%, dok je u lokalitetima proizvodnje paprike na otvorenom polju bila preko 50%.

Simptomi na biljkama u rasadu bili su slabo izraženi, usled čega obolele biljke nisu mogle, sa sigurnošću, biti razlikovane od zdravih. Ipak, tokom ovih istraživanja, na određenom broju biljaka uočeni su simptomi u vidu blagog mozaika i hloroze lišća, nekrotičnih lezija kao i različite deformacije liske. Pregledom useva paprike u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju zabeležena je pojava biljaka koje su često zaostajale u porastu ili žbunastog izgleda. Lišće obolelih biljaka, bilo je sitnije, slabo naborano, a često sa različitim tipovima mozaika, od blagog do jako izraženog, sa mozaičnim šarama žućkaste boje i hlorotičnim površinama koje kasnije zahvataju ceo list, često su se javili i simptomi nekroze nerava lista i nekrotičnih pega na stablu. Na plodovima, koji su bili krzljavi, deformisani i sa nekrozom površinskog tkiva, često su bile prisutne i linearne beličaste ili žućkaste pruge i prošaravanja. Identični ili slični simptomi uočeni tokom ovih istraživanja zabeleženi su i u ranijim ispitivanjima viroza paprike u našoj zemlji (Krstić i Bulajić, 2008; Mijatović i sar., 2007; Tomić i sar., 2007).

6.1. Serološka identifikacija virusa paprike

DAS-ELISA test korišćenjem poliklonalnih antitela, najčešće je korišćena metoda za rutinsku detekciju virusa paprike (Mijatović, 1999; Chatzivassiliou et al., 2000; Rusevski, 2001; Kim et al., 2004; Krstić i sar., 2005). Na osnovu rezultata dobijenih serološkim testiranjem korišćenjem DAS-ELISA testa u toku ovih istraživanja u usevu paprike u našoj zemlji ustanovljeno je prisustvo pet virusa: CMV, PVY, TSWV, AMV i

PMMoV čija se učestalost po godinama i lokalitetima menjala. Ni u jednoj godini ispitivanja nije utvrđeno prisustvo TMV, PVX, PepMoV i PVMV.

Ispitivanja rasprostranjenosti virusa u rasadu, pokazala su da je najrašireniji virus kako 2009. tako i 2010. godine bio CMV, dok je PVY imao je neznatno manju rasprostranjenost u obe godine ispitivanja. Kod gajenja paprike u zaštićenom prostoru najrasprostranjeniji virus u 2009. godini bio je PVY, dok su 2010. godine PVY i CMV bili zastupljeni na istom broju lokaliteta. PVY bio je najrasprostranjeniji virus i na paprici gajenoj na otvorenom polju u obe godine ispitivanja, dok je CMV zauzimao drugo mesto. **Zitter and Florini (1984)** navode da je CMV najvažnije virusno oboljenje paprike rasprostranjeno u celom svetu, a da je PVY najzastupljeniji virus na biljkama iz porodice Solanaceae. U ovim istraživanjima, najčešće detektovani virusi u 2009. i 2010. godini bili su CMV i PVY, kako u proizvodnji paprike u rasadu tako i u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju. Na osnovu prethodnih i u ovom radu obavljenih ispitivanja, zastupljenost CMV je stalno visoka. CMV je u istraživanjima sprovedenim u ovom radu 2009. godine imao dominantno prisustvo u rasadu (20,87%), dok je bio drugi po zastupljenosti u proizvodnji paprike u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju (zaštićeni prostor 31,01%, otvoreno polje 37,20%). U 2010. godini zauzimao je prvo mesto kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju i rasadu (zaštićeni prostor 36,17%, otvoreno polje 50%, rasad 20,87%). CMV je bio dominantan u usevu paprike 1999. godine (**Mijatović i sar., 1999**) i 2007. godine (**Tomić i sar., 2007**). Ovako značajna zastupljenost CMV dokazana je i u drugim područjima gajenja paprike u svetu (**Conti and Masenga, 1977; Gaborjanyia et al., 1998; Sepulveda et al., 2005**). Dominantno prisustvo PVY u ovim istraživanjima predstavlja značajnu razliku u odnosu na 1999. godinu kada je bio treći po zastupljenosti u usevu paprike (**Mijatović i sar., 1999**) i 2007. godinu kada njegovo prisustvo nije ustanovljeno (**Tomić i sar., 2007**). Dominantno prisustvo PVY potvrđeno je i u drugim područjima gajenja paprike u svetu (**Arli-Sokmen, 2005; Choi et al., 2005b**). Iako je AMV stalno prisutan u usevu paprike (**Mijatović i sar., 1999; Tomić i sar., 2007**), AMV je pokazao tendenciju lokalizovane pojave, pri čemu se uglavnom javljao na manjem broju lokaliteta, ali sa značajnijom učestalošću pri gajenju paprike na otvorenom polju sa uočljivim i prepoznatljivim simptomima. Što se tiče zastupljenosti ovog virusa, u toku

2009. godine dokazan je u manjem broju testiranih uzoraka u rasadu i zaštićenom prostoru (2,48% i 17,05%) u odnosu na 2010. godinu kada je taj procenat iznosio 3,48%, odnosno 17,73%. U proizvodnji paprike na otvorenom polju u prvoj godini ispitivanja, 2009. godine, AMV je bio nešto zastupljeniji (21,74%) u odnosu na drugu 2010. godinu (16,67%). Njihova pojava i rasprostranjenost svakako zavise od izvora inokuluma, prisustva i brojnosti vektora-vaši, kao i sposobnosti prenošenja pojedinim vrstama vaši (**Zitter, 1977**). TSWV je u obe godine ispitivanja zabeležen na tri lokaliteta, međutim što se tiče zastupljenosti virusa u pregledanim uzorcima paprike gajene u zaštićenom prostoru može se uočiti značajnije prisustvo u 2009. (23,26%) nego u 2010. godini (6,38%) što nije neobično imajući u vidu epidemiologiju ovog virusa. Međutim, s obzirom da se poslednjih godina oboljenje koje ovaj virus izaziva javlja u sve većim razmerama, i da se njegov krug domaćina u našoj zemlji širi i da je dokazan na duvanu (**Krstić i sar., 2005a, 2005b; Đukić i sar., 2006; Đekić i sar., 2006; Krstić i sar., 2006a, 2006b, 2006c, 2006d; Stanković et al., 2011**) paradajzu, paprici, luku i mnogobrojnim vrstama ukrasnih biljaka (**Krstić i Bulajić, 2007; Đekić i sar., 2007a, 2007b; Krstić i sar., 2007a, 2007b; Petković i sar., 2007; Simić i sar., 2007; Tomić i sar., 2007, Stanković i sar., 2011; Zindović i sar., 2011; Stanković i sar., 2012; Stanković i sar., 2013**), bilo je za očekivati daleko veću učestalost TSWV. Takođe i širok krug domaćina među povrćem i korovima i efikasno širenje tripsima (**Krstić i Bulajić, 2007**) dovodi do toga da se očekuje da TSWV bude u daljoj ekspanziji na paprici, naročito u zaštićenom prostoru. PMMoV, koji je detektovan u Srbiji 1996. godine pomoću test biljaka (**Krstić i sar., 1996**), u našim ispitivanjima ustanovljen je samo u proizvodnji paprike na otvorenom polju i to u 2009. godini na 2 uzorka (1,19%) na jednom lokalitetu (Čonoplja), a u 2010. godini na 3 uzorka (1,45%), na dva lokaliteta (Čonoplja i Đurđevo). S obzirom na to da je virus ustanovljen 1996. godine, nije se znatnije raširio u našoj zemlji, pre svega iz razloga što je virusu PMMoV jedini domaćin paprika. Međutim, paprika se u Srbiji gaji uglavnom u privatnom sektoru na malom posedu, gde proizvođači vode računa o sakupljanju biljnih ostataka u slučaju obolevanja biljaka, što je od velikog značaja jer se PMMoV može održavati u zemljištu na biljnim ostacima nekoliko meseci, a takođe i zimski period može doprineti smanjenju inokuluma

http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/PopGenetics/Documents/Garcia_ext_ra.pdf). U ispitivanim uzorcima paprike gajene u rasadu, zaštićenom prostoru i na otvorenom polju nije utvrđeno prisustvo TMV, mada su **Mijatović i sar. (1999)** kao i **Tomić i sar. (2007)** ustanovili da je ovaj virus prisutan i pojedinih godina veoma značajan na paprici. Analiza dobijenih rezultata ukazuje na tendenciju smanjenja značaja zaraze paprike sa TMV, verovatno usled dobrog zdravstvenog stanja semena ili dobro sprovedenih higijenskih mera u proizvodnom procesu gajenja paprike. Osim pojedinačnih zaraza, u kojima su najčešće detektovani PVY i CMV, virusi su dokazani i u mešanim infekcijama dva ili tri virusa. Najčešća mešana infekcija dva virusa bila je sa PVY i CMV, dok je najčešća mešana infekcija sa tri virusa bila izazvana PVY, CMV i AMV. **Avilla et al. (1997)** navode da je u Španiji u usevu paprike najčešća mešana infekcija bila CMV i PVY, što je saglasno sa dobijenim rezultatima u ovim istraživanjima. **Sударsono et al. (1998)** navode da je najčešća mešana infekcija kod ljute paprike bila u kombinaciji tri virusa TMV, PVY i CMV. **Arli–Sokmen et al. (2005)** takođe navode da je mešana infekcija virusima konstatovana na paprici i u Turskoj, i to infekcija TMV i PVY je bila najčešća (15,4%).

Pojava i rasprostranjenost većine vrsta virusa zavise od brojnih faktora kao što su region i lokacija gajenja, vegetaciona sezona, genotip paprike i drugih. **Conti and Masenga (1977)** proučavajući prisustvo virusa parazita paprike u Italiji, utvrdili su da je najzastupljeniji bio CMV u 80,2% biljaka paprike gajenih na otvorenom prostoru, dok je u zaštićenom prostoru najzastupljeniji bio TMV sa 84%. Osim ova dva virusa zabeleženo je prisustvo i PVY, AMV, PVX, *Broad bean wilt virus* (virus uvenulosti boba, BBWV) i *Tobacco rattle virus* (virus šuštavosti duvana, TRV). Prema istraživanjima **Gaborjanyia et al. (1998)**, najzastupljeniji virusi paprike u Mađarskoj su TMV, CMV, PVY, i TSWV čije se infekcije kreću i do 100%. Prema podacima **Kovačevskog (1977) (loc. cit. Mijatović i sar., 1999)**, u Bugarskoj je inficiranost paprike izazvana CMV iznosila je 80% do 90%, a u nešto manjem procentu su identifikovani TMV, PVY i TSWV. **Sepulveda et al. (2005)** su konstatovali da je oko 30% paprike u severnom Čileu inficirano sa dva ili više virusa. Detekcijom virusa DAS-ELISA testom utvrđeni su CMV, TSWV, AMV, PVY, *Impatiens Necrotic Spot Virus* (INSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) i TMV. Tokom istraživanja koja su sprovedena 1998. i 1999. godine u Turskoj, determinisano je šest virusa AMV,

CMV, PVY, ToMV, TMV i TSWV. Od 313 testiranih biljaka, 42 biljke posedovale su mešanu infekciju izazvanu TMV i PVY (15,4%) što je predstavljalo najčešću mešovitu infekciju (**Arli-Sokmen et al., 2005**).

Dobijeni podaci u ovoj disertaciji korespondiraju sa rezultatima dobijenim pregledom literaturnih podataka. PMMoV virus je u našim rezultatima pokazao nisku prisutnost (1,45% u 2009. i 1,19% u 2010.), mada **Lamb et al. (2008)** ukazuju na podatke da taj virus može da dostigne nivo zaraženosti biljaka i do 30%. Intenzitet pojave virusa je zavisio od godine, ali evidentno je da CMV i PVY nisu toliko dominantni kao ranije. Nivo zaraženosti uzoraka paprika u sprovedenim istraživanjima se kretao npr. kod CMV u 2009. godini u zaštićenom prostoru i polju 31,01% i 37,2%, a u 2010. godini 36,17%, i 50%, što je značajno niže u odnosu na 80,2% ustanovljene zaraze CMV (**Conti and Masenga, 1977**) ili zaraženosti paprike sa TSWV, AMV i PVY koja se u Mađarskoj kretala i do 100% (**Gaborjanyia et al., 1998**).

6.2. Povezanost simptoma na prirodno zaraženim biljkama paprike i detektovanih virusa

Pregledom proizvodnje rasada i useva paprike u različitim lokalitetima gajenja kako u zaštićenom prostoru, tako i na otvorenom polju zabeležena je pojava niza simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu i koji su varirali u zavisnosti od starosti biljke, uslova spoljašnje sredine (naročito temperature), kao i u zavisnosti od soja virusa. Posle detekcije i identifikacije virusa analizom prikupljenih uzoraka, pokušano je da se povežu simptomi na biljkama u polju sa detektovanim virusom. Kako je na paprici u našoj zemlji prisutno najmanje pet virusa, u pojedinačnim i mešanim zarazama, uočeni simptomi i njihova veza sa virusom prouzrokovačem imali su samo preliminarni dijagnostički značaj. Mnogi istraživači (**Boiteux et al., 1996; Echer and Costa, 2002**) su opisali simptome na paprici prouzrokovane infekcijom PVY koji su istovetni simptomima zapaženim u toku ovih istraživanja. PVY je izazivao različite simptome, a najčešće u vidu hlorotičnog prosvetljavanja nerava, hlorotičnog prošaravanja listova sa ili bez deformacije mladih listova, često praćeno nekrozom listova, mozaikom u vidu hlorotičnih prstenova i sitnih

tamno zelenih površina. Veliki broj biljaka zaraženih virusom PVY, bile su kržljave i često žbunastog izgleda, što je upućivalo na rane zaraze u toku vegetacije. Simptomi koje izaziva PVY, uočeni u toku ovih istraživanja, u saglasnosti su i sa navodima iz literature koje opisuju **Mijatović i sar. (2002)**. Verovatno nijedan drugi biljni patogen ne izaziva takav niz simptoma kao TSWV, a neke biljke ili sorte u usevu mogu biti zaražene i bez ispoljavanja simptoma (**Kucharek et al., 2000**). Simptomi koje izaziva TSWV variraju na istoj biljnoj vrsti u zavisnosti od sorte, starosti biljke, vremena infekcije i uslova spoljašnje sredine, od kojih temperatura ima veoma važnu ulogu u jačini ispoljavanja simptoma (**Allen et al., 1991**). U ovim istraživanjima prisustvo TSWV ustanovljeno je u uzorcima paprike sa simptomima blagog do izraženog mozaika. Na nekim biljkama pored mozaika primećena je i hloroza nerava. Slične simptome tipa hlorotičnog šarenila, deformacija listova i slabiju ili jaču nekrozu opisuju i drugi autori bilo na prirodno ili veštački zaraženim biljkama (**Soler et al., 1999; Chatzivassiliou et al., 2000; Thomas-Carroll and Jones, 2003; Coutts et al., 2004**). **Krstić i sar. (2008)** navode da se infekcija ovog virusa odlikuje simptomima žutila lišća i čitavih biljaka, mozaika sa koncentričnim prstenastim pegama ili hlorotičnim linijskim mozaikom na starijem lišću, a česta je i pojava bronzane boje lišća. Slične simptome tipa mozaične prstenaste pegavosti i nekrotične prstenaste pegavosti navodi **Rusevski (2001)**. Prisustvo CMV utvrđeno je u uzorcima paprike sa izraženim simptomima mozaika i hlorotičnog prošaravanja. Ono što je karakteristično za biljke zaražene ovim virusom, uz navedene simptome, su i deformacija ili blaga klobučavost listova. **Krstić i Vico (2004)** navode kao početne simptome koje ovaj virus izaziva, hlorotični mozaik, dok se u kasnijim fazama javljaju hlorotične pege nepravilnog oblika. Čest tip simptoma je i nekroza do koje dolazi u kasnijim fazama razvoja mozaičnih šara i pega. Hlorotične lokalne lezije i sistemski mozaik takođe su karakteristični simptomi koje izaziva CMV (**Ozaslan et al., 2006; Zitikaitė and Samuitienė, 2009**). Tokom ovih istraživanja, najčešći simptomi zabeleženi na paprici zaraženoj virusom AMV su hlorotično beličaste pege različitog oblika i veličine koje se vremenom spajaju, tako da u nekim slučajevima zahvataju i čitave liske, a vrlo slični simptomi su rasute bele do žute tačkice koje mogu prekriti celu lisku. Simptomi na listovima paprike zaražene sa AMV uočene tokom ovih istraživanja bili su slični opisima simptoma koje navode **Mijatović i sar. (2007)**. Simptomi koji su se javljali na

paprici za koju je utvrđeno da je zaražena virusom PMMoV, bili su u vidu prošaranosti listova tamnozelenim površinama rasutih po celoj liski, što je u saglasnosti sa navodima literature (Sevik, 2011; Svoboda et al., 2006). Iako su u saglasnosti sa opisom simptoma, ne može se na osnovu simptoma reći o kom je virusu reč, jer su takvi simptomi opisani i za neke druge viruse paprika, na primer simptomi koje izaziva *Pepper mottle virus* (PeMoV) su veoma slični simptomima PVY (Zitter and Florini 1984), simptomi *Tomato spotted wilt virus* su veoma slični simptomima koje izaziva *Curly top viruses* (virus kovrdžavosti vrha) na paprici (Koike et al., 2010).

Kod određenog broja biljaka koji su ukazivali na simptome viroznih oboljenja nisu konstatovani ispitivani virusi. Objašnjenje može biti prisustvo virusa koji nisu uključeni u istraživanja ili to da simptomi inficiranih biljaka mogu ličiti na simptome koje prouzrokuju patogene gljive i bakterije, a takođe često može da dođe do zabune kod uspostavljanja dijagnoze između simptoma prouzrokovanih viroznim oboljenjima i simptoma koji se javljaju kao posledica nepravilno primenjenih herbicida ili oštećenja od zagađenja vazduha ili nedostatka mineralnih materija. Stoga, simptomi, koliko god bili izraženi i karakteristični, ipak samo ukazuju na postojanje zaraze virusom, a konačna tačna dijagnoza može se postaviti samo primenom odgovarajućih laboratorijskih analiza. Dakle, ako se dijagnostika viroza na biljkama vrši samo na osnovu simptoma često može da dođe i do grešaka (Ozaslan et al., 2006).

6.3. Molekularna detekcija i identifikacija virusa paprike

Serološka detekcija virusa koji su tokom ovog rada dokazni u prirodno zaraženim biljkama paprike, potvrđena je primenom metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). RT-PCR metoda je primenjena za detekciju i identifikaciju izolata CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV koji predstavljaju najznačajnije viruse paprike, a koji su prethodno identifikovani serološkom metodom.

Ekstrakcija RNA iz lišća prirodno zaraženih biljaka paprike izvedena je primenom Rneasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) čime se obezbeđuje najbolji kvalitet

totalne RNA i dobijaju najpouzdaniji rezultati prilikom daljeg testiranja (**Dietzgen et al., 2005**).

6.3.1. Detekcija CMV primenom RT-PCR metode

Detekciju četiri izolata CMV omogućila je primena „One-step“ RT-PCR. Ovu metodu koristili su u svojim istraživanjima u cilju ustanovljavanje prisustva CMV brojni istraživači (**Gildow et al., 2008; Raj et al., 2008; Chen et al., 2011**). Za potvrdu o prisustvu CMV u testiranim uzorcima listova paprike korišćeni su prajmeri CMV Au1u/CMV Au2d koji umnožavaju segment DNK finalne dužine 847 bp koji obuhvata kodirajući gen za proteinski omotač virusa (**Stanković et al., 2011**). Kod sva četiri ispitivana izolata došlo je do amplifikacije jednog jasnog benda očekivane veličine, čime je potvrđena pripadnost ispitivanih izolata virusu mozaika krastavca.

Molekularna metoda na bazi PCR-a je mnogo pogodnija od seroloških metoda za dobijanje informacija o virusnom genomu i za filogenetske analize. Kombinovano korišćenje seroloških i molekularnih metoda preporučuje se za epidemiološka proučavanja i proučavanja varijabilnosti izolata u okviru populacije CMV (**Đekić i sar., 2008a; Gohnaz et al., 2009**). Molekularne metode zasnovane na PCR-u, su osetljivije i preciznije od seroloških (**Jacobi et al., 1998; Bousalem et al., 2000**) i imaju prednost pri detekciji virusa kada se nalaze u biljci u niskoj koncentraciji, što može biti slučaj i sa nekim izolatima CMV (**Chen et al., 2003; Yu et al., 2005; Chen et al., 2011**). U ovim istraživanjima korišćena metoda RT-PCR omogućila je uspešnu amplifikaciju, pri čemu nije bilo problema sa niskom koncentracijom korišćenih izolata, kako primenom serološke metode tako i primenom RT-PCR-a.

Korišćenje RT-PCR i CMV specifičnih prajmera u jednom koraku (jednoj tubi) omogućava jednostavnu, brzu i preciznu detekciju, te se kao takva može koristiti u dijagnostičkim laboratorijama, kao jednostavna alternativa serološkim analizama (**Đekić, 2010; Ali and Kobayashi, 2010**). Ova istraživanja su pokazala da to važi i za dokazivanje CMV u paprici i da je ovaj protokol koji je primenjen u izradi ove disertacije pouzdan.

6.3.2. Detekcija PVY primenom RT–PCR metode

Molekularna detekcija četiri izolata PVY obavljena je primenom „One–step“ RT–PCR metode prema protokolu proizvođača, uz korišćenje univerzalnih prajmera za PVY (PVYc/PVYd). Primenom para prajmera PVYc/PVYd (**Marie–Jeanne Tordo et al., 1995; Glais et al., 1996**), čije sekvence umnožavaju deo genoma vezan za sekvencu 5' neprepisujućeg (5' UTR) regiona i gena za P1 protein, utvrđeno je prisustvo fragmenta veličine oko 975 bp kod sva četiri ispitivana izolata.

Pošto je prevencija najefikasnije sredstvo za kontrolu ovog virusa, što pored ostalog zahteva i rano otkrivanje zaraze u ranoj fazi, takva metoda treba da bude selektivna i specifična. Molekularna dijagnostika je metod koji ispunjava ove zahteve (**Helgera et al., 2001**). **Bulajić i sar. (2006)** i **Đekić i sar. (2007b)**, u cilju detekcije virusa crtičastog mozaika krompira u duvanu koristili su takođe ove prajmere, dok su **Glais et al. (1996)** primenom ovih prajmera detektovali 18 izolata PVY različitih sojeva. Obzirom da su izolati PVY na osnovu lokalnih i sistemskih simptoma na različitim sortama krompira, duvana i biljci *Physalis floridana*, podeljeni na tri soja: PVY^O (obični soj), PVY^N (nekrotični soj) i PVY^C (crtičasti soj), a takođe i zbog postojanja većeg broja rekombinantnih sojeva: PVY^{NTN} (**Croslin et al., 2002; Ohshima et al., 2000; Salazar et al., 2000**), PVY^Z (**Jones, 1990**), PVY^N W (**Chrzanowska, 1991; Blanco-Urgoiti et al., 1998; Kerlan et al., 1999, Glais et al., 2005**) kao i PVY^{N:O} (**Sing et al., 2003**), univerzalni prajmeri su vrlo značajni u detekciji PVY na različitim biljnim vrstama (**Schubert et al., 2007**). PVY izolati koji su infektivni prema paprici su manje proučavani i prema **Gebré Sélassié et al. (1985)** izolati virusa PVY sa paprike svrstani su u tri patotipa PVY-0, PVY-1 i PVY-1-2, u zavisnosti od mogućnosti da prevaziđu gene otpornosti (vyl, vy2) prisutne u nekoliko sorti paprike. Prema **Choi et al. (2005b)** u okviru ova tri patotipa, izolati se dalje grupišu na obične i nekrotične, u zavisnosti da li prouzrokuju simptome u vidu promene boje duž nerava lista ili simptome u vidu nekroze lista.

Korišćenje RT–PCR i PVY univerzalnih prajmera u jednom koraku (jednoj tubi) omogućava jednostavnu i brzu detekciju, naročito zbog postojanja većeg broja sojeva kao i

rekombinantnih sojeva ovog virusa, stoga je preporučljivo da se ova metoda koristi u dijagnostičkim laboratorijama.

6.3.3. Detekcija TSWV primenom RT–PCR metode

Molekularna detekcija tri odabrana izolata TSWV izvršena je primenom „One–step“ RT–PCR kita po protokolu proizvođača, uz korišćenje tri para prajmera: L2 TSWV F/L1 TSWV R, TSWVgene F/TSWVgene R i TSWV CP-f/TSWV CP-r.

Primenom prajmera L2 TSWV F/L1 TSWV R (**Mumford et al. 1996a; OEPP/EPPO, 2004**), koji omogućavaju amplifikaciju RdRp gen L RNA (delimična sekvenca gena za RNA-zavisnu RNA polimerazu), prisustvo fragmenta očekivane veličine ustanovljeno je u svim ispitivanim izolatima. Korišćenjem različitih parova prajmera, odgovornih za amplifikaciju različitih regiona genoma virusa utvrđeno je da najveću specifičnost i pogodnost u pogledu detekcije TSWV u biljnom materijalu imaju prajmeri odgovorni za amplifikaciju gena NC protein (**Zindović, 2010**). Tako je pomoću prajmera TSWV CP-f / TSWV CP-r (**Vučurović et al., 2011**), koji omogućavaju amplifikaciju NC gena S RNA uspešno detektovano prisustvo fragmenta veličine oko 738 bp kod svih ispitivanih izolata. Primenom prajmera TSWVgene F/TSWVgene R (**Jain et al., 1998; Pappu et al., 1998; Holguín–Peña and Rueda–Puentes, 2007**), koji takođe omogućavaju amplifikaciju NC gena S RNA TSWV, utvrđeno je prisustvo fragmenta veličine oko 800 bp kod jednog ispitivanog izolata (PL-35-09), dok kod izolata PL-14-10 i PL-60-09 nije došlo do pojave očekivanog amplikona. Ispitivanja su pokazala, da su TSWV CP-f / TSWV CP-r najpogodniji prajmeri za rutinska testiranja paprike na prisustvo TSWV.

U cilju proučavanja epidemiologije virusa i unapređenja kontrole TSWV neophodno je sprovesti pouzdanu detekciju i identifikaciju virusa u različitim biljnim vrstama (**Dietzgen et al., 2005**). Takođe, tačna i brza dijagnoza virusa je veoma bitan faktor u kontroli biljnih virusa, kao što je TSWV, međutim serološke metode posebno ELISA metod, se trenutno najčešće koristi u rutinskoj detekciji virusa iz zaraženih biljaka. Utvrđeno je da je PCR metoda pogodnija za detekciju TSWV u odnosu na ELISA metod, u biljkama u kojima se nalazi u veoma niskoj koncentraciji, zbog svoje veće osetljivosti (**Krstić i sar.,**

2008a; Đekić i sar., 2008). Analize na bazi nukleinskih kiselina kao što je PCR su osetljivije i specifičnije od seroloških metoda, a neke od varijanti se koriste i u rutinskoj analizi (Henson and French, 1993). Reverznu transkripciju (RT-PCR) za detekciju raznih *Tospovirus*-a razvili su i opisali brojni autori (Dewey et al., 1996; Mumford et al., 1994; Mumford et al., 1996a). Mumford et al. (2000) razvili su real-time RT-PCR metodu na bazi TaqMan tehnologije, koja je veoma osetljiva tehnika, pogodna za velika testiranja kao i za ispitivanje prisustva *Tospovirus*-a u tripsima.

6.3.4. Detekcija AMV primenom RT–PCR metode

Razvijen je veći broj metoda za detekciju i identifikaciju različitih izolata virusa mozaika lucerke zasnovanih na različitim osobinama virusa. Pored biotesta zasnovanog na korišćenju indikator biljaka kao što su *Pisum sativum*, *Amaranthus retroflexus*, *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium amnaranticolor* i dr. (Zitikaitè and Samuitienè, 2008) najčešća metoda koja se koristi za detekciju AMV na različitim biljnih vrstama je ELISA test (Pešić and Hiruki, 1986; Bulajić i sar., 2010; Petrović, 2008). Xu and Nie (2006) navode da se pravilna identifikacija *Alfamovirus*-a može obaviti i na osnovu izgleda čestica korišćenjem elektronskog mikroskopa. Međutim, molekularne metode zasnovane na RT–PCR–u, zbog svoje velike osetljivosti i preciznosti (Robinson, 1992), imaju prednost pri detekciji virusa kada se nalaze u biljci u niskoj koncentraciji, što može biti čest slučaj sa AMV. Stoga molekularna detekcija tri izolata AMV iz paprike izvršena je primenom „One–step“ RT–PCR metode i korišćenjem prajmera koji omogućavaju amplifikaciju CP gena, CP AMV1/CP AMV2. Primenjene prajmere koristili su brojni istraživači (Finetti–Sialer et al., 1997; Parella et al., 2000) kako bi omogućili amplifikaciju dela genoma vezanog za CP gen izolata AMV iz paprike. Prisustvo fragmenta veličine oko 751 bp omogućilo je molekularnu detekciju ovog virusa i potvrdu rezultata ispitivanja primenom serološke metode. U tom smislu primenjena RT-PCR metoda uz upotrebu specifičnih prajmera CPAMV1/CPAMV2 pokazala se uspešnom za detekciju i identifikaciju izolata AMV iz davana Srbije (Đekić, 2010), kao i izolata ovog virusa iz paprike.

6.3.5. Detekcija PMMoV primenom RT–PCR metode

Detekcija izolata PMMoV na molekularnom nivou obavljena je primenom „One–step“ RT–PCR metode uz korišćenje prajmera P12/3/P12/3A (**Velasco et al., 2002**) i PMR1/ PMF1 (**Hamada et al., 2002**) koji omogućavaju amplifikaciju RdRp i CP gena virusa.

Prisustvo PMMoV dokazano je u našoj zemlji (**Krstić i sar., 1996**), ali korišćenjem konvencionalnih metoda, pomoću test biljaka, tako da ova istraživanja predstavljaju prvu molekularnu detekciju ovog virusa u uzorcima zaražene paprike u Srbiji. Primenom P12/3/P12/3A prajmera koji omogućavaju amplifikaciju RdRp, kod ispitivanih izolata iz paprike došlo je do amplifikacije fragmenta veličine oko 836 bp što potvrđuje prisustvo PMMoV u testiranim uzorcima, na osnovu litraturnih podataka (**Velasco et al., 2002**).

Aktivnošću prajmera PMR1/PMF1, koji omogućavaju amplifikaciju CP gena virusa, kod ispitivanog izolata iz paprike dobijen je fragment veličine oko 550 bp, međutim, primenom ovog para prajmera **Hamada et al. (2002)** su dobili fragment veličine 474 bp.

6.4. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata virusa paprike poreklom iz Srbije sa izolatima virusa iz drugih delova sveta

Molekularna identifikacija najznačajnijih virusa paprike obavljena je nakon sekvencioniranja određenih delova genoma karakterističnih za pojedine viruse, zatim višestrukog uparivanja dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka kao i proračunom genetičke identičnosti sekvenci ispitivanih izolata i sekvenci izolata virusa iz različitih geografskih regiona. Za ovu analizu odabrani su izolati za koje je primenom seroloških i molekularnih metoda utvrđeno da pripadaju CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV.

6.4.1. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata CMV

Ranija istraživanja populacije CMV kod nas bila su usmerena na izolate poreklom iz paradajza, paprike, obične tikve (**Dukić i sar., 2004b**) i duvana (**Đekić, 2010**), i tom prilikom je izvršena identifikacija CMV poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka kao i proračunom genetičke identičnosti sekvenci ispitivanih izolata i sekvenci izolata virusa iz različitih geografskih regiona.

Međusobna genetička identičnost izolata CMV (PL-43-09, PL-25-09 i PL-52-09) izolovanih iz paprike sa lokaliteta Smederevo, Žabalj i Horgoš kao i identičnost sa izolatima poreklom iz različitih delova sveta ispitana je analizom sekvenci CP gena. Proračun genetičke identičnosti CP gena, pokazao je visok stepen nukleotidne (98,1-99,7%) i aminokiselinske (98,6-100%) homologije između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona. Najviši stepen nukleotidne identičnosti ispitivani izolati pokazali su sa izolatima iz Amerike, Australije, Španije i Srbije, dok su potpunu identičnost u aminokiselinskoj sekvenci (100%) ispitivani izolati ispoljili sa većinom izolata odabranih iz GenBank baze podataka. Proračunom međusobne genetičke identičnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti (99,2-99,5%). Na osnovu visokog stepena homologije sekvenci sva tri ispitivana izolata, potvrđeno je da odabrani ispitivani izolati iz paprike pripadaju virusu mozaika krastavca.

Na osnovu istraživanja **Vučurović i sar. (2010)** BLAST analiza pokazala je 93 do 99% nukleotidne identičnosti izolata CMV iz tikve poreklom iz Srbije, sa sekvencama CP gena drugih izolata CMV deponovanih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen identičnosti 99,2%, izolat je pokazao sa izolatima iz cukinija, dinje i paradajza iz Španije, a najmanju identičnost od 93,1% sa izolatima iz Koreje iz *Nicotiana tabacum* cv. Burley21. **Đekić (2010)** navode da je stepen nukleotidne identičnosti izolata iz duvana iz Srbije sa izolatima CMV S-I podgrupe dostupnih u GenBank bazi podataka preko 93%.

6.4.2. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata PVY

Međusobna genetička identičnost PL-15-09, PL-28-09, PL-3-10 i P-108-10 izolata PVY izolovanih iz paprike sa lokaliteta Srbobran, Velika Plana, Pećinci i Aleksinac, kao i identičnost sa izolatima poreklom iz različitih delova sveta ispitana je analizom sekvenci gena za P1 protein. Upotreba MEGA4 softvera pokazala je 98,8-100% nukleotidne i 98,2-100% aminokiselinske identičnosti ispitivanih izolata sa sekvencama CP gena drugih izolata PVY deponovanih u GenBank bazi podataka. Proračunom genetičke identičnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti koji se kretao od 99,1% do 99,9%. Najviši stepen nukleotidne identičnosti ispitivani izolati pokazali su sa izolatom SI 64 iz krompira poreklom iz Slovenije, izolatom D35-06 iz duvana poreklom iz Srbije i izolatom 38MYPVY iz krompira iz Kolumbije. Sa većinom odabranih izolata iz GenBank baze podataka, ispitivani izolati pokazuju visok stepen homologije aminokiselinskih sekvenci (99,6%-100%). Utvrđena nukleotidna identičnost ispitivanih izolata PVY iz paprike poreklom iz Srbije, sa ostalim PVY izolatima, potvrđuje njihovu identifikaciju kao PVY.

Ranija istraživanja populacije PVY poreklom iz duvana u Srbiji pokazala su samo prisustvo nekrotičnog soja (**Bulajić et al., 2006; Đekić et al., 2007b**). **Nie and Singh (2002)** ustanovili su da tipični PVY^N i PVY^{NTN} izolati pokazuju oko 70% identičnosti sa izolatima PVY^O, dok je stepen nukleotidne identičnosti izolata iz različitih biljnih vrsta u okviru PVY^N soja veći, 90%.

Kada se govori o nukleotidnoj sličnosti treba imati na umu da svaki rod virusa kao što je *Potyvirus*, kojoj pripada PVY, ima određene molekularne kriterijume po kojima se izolat razvrstava. Smatra se da nukleotidna povezanost sekvenci genoma postoji ako je identitet amino kiselinske sekvence regiona CP manji od 80% a identitet nukleotidne sekvence manji od 85% od celog genoma (**Plyusnin et al., 2011**). **Adams et al. (2005)** su izneli da je 76-77% nt sekvence CP gena optimalan demarkacioni kriterijum za identifikaciju *Potyvirus*-a. Osim toga, **Aleman-Verdaguer et al. (1997)** i **Shukla et al. (1994)** su izneli da je identitet aa sekvence regiona CP među izolatima *Potyvirus*-a preko 90%. Filogenetska analiza optimizovanih nukleotida (NT) predstavnika iz familije

Potiviridae ukazuje na redosled vrsta u porodici i obezbeđuje snažnu podršku za nekoliko podgrupa u okviru roda *Potyvirus*. **Adams et al. (2005)** su ustanovili da većina vrsta u okviru roda *Potyvirus* imaju 50-55% nukleotidne identičnih sa drugim članovima roda, ali da postoje značajne grupe koje bliže korespondiraju i kod kojih je nukleotidna identičnost veća 76%, dok je aminokiselinska identičnost veća 82%. Analizirajući rezultate istraživanja **Adamsa et al. (2005)** i **Plyusnin et al. (2011)** koji ukazuju na kriterijume koji određuju pripadnost određenog virusa nekoj porodici, odnosno rodu, ispitivani izolati pripadaju PVY vrsti, pošto im je nukleotidna identičnost sa ostalim izolatima PVY veća od 77% a aminokiselinska sličnost veća od 90%.

6.4.3. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata TSWV

Primena i razvoj molekularnih metoda omogućili su utvrđivanje taksonomske poveznosti virusa bronzavosti paradajza sa članovima familije *Bunyaviridae* i njegovo svrstavanje u poseban rod (**Law et al., 1992**), kao i pouzdanu identifikaciju i karakterizaciju TSWV kod različitih biljaka domaćina i u različitim geografskim regionima.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenih korišćenjem para prajmera TSWV CP-f/TSWV CP-r koji omogućavaju amplifikaciju CP gena, dobijene delimične sekvence NC gena odabranih izolata upoređene su međusobno kao i sa sekvencama drugih izolata TSWV dostupnih u GenBank bazi podataka. Rezultati su pokazali visok stepen nukleotidne identičnosti (98,7-100%) odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka, kao i visok stepen aminokiselinske identičnosti (97,8-100%). Najviši stepen nukleotidne identičnosti sva tri izolata pokazala su sa izolatom Sr-603 iz paradajza iz Srbije (GU369723). Sekvencione analize NC gena koriste se i kao kriterijumi prilikom definisanja i opisivanja novih *Tospovirus*-a, obzirom na visok nivo odstupanja u nukleotidnoj sekvenci NC regiona različitih virusa ovog roda (**Pappu et al., 2000**). Što znači da bi neki izolat bio opisan kao novi *Tospovirus*, potrebno je da procenat homologije aminokiselinske sekvence njegovog NC proteina bude manji od 90% u poređenju sa istom sekvencom poznatih virusa ovog roda (**Goldbach and Peters,**

1994). Istraživanja **Sivparsad and Gubba (2008)** ukazuju da ne postoji visok stepen varijabilnosti unutar NC sekvence izolata iz južne Afrike i izolata drugih geografskih regiona. Visok stepen homologije nukleotidne sekvence NC gena (95-98%) različitih ispitivanih izolata iz Bugarske i Nemačke saopštili su **Heinze et al. (2003)**, a **Chatzivassiliou et al. (2000)** su utvrdili 96% do 99% homologije u nukleotidnoj sekvenci NC gena ispitivanih izolata poreklom iz Grčke i izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. **Đekić (2010)** ispitala je genetičku identičnost izolata TSWV izolovanih iz duvana sa lokaliteta Beška sa ostalim izolatima TSWV poreklom iz različitih delova sveta, čime se pokazalo da se homologija sekvenci NC gena kretala se od 96,8% do 99,1%, NSm gena 92,7% do 98,9%, dok je homologija sekvenci RdRp gena takođe bila visoka i kretala se od 96% do 100%. Na osnovu visokog stepena homologije sekvenci, potvrđeno je da odabrani izolati, PL-35-09, PL-60-09 i PL-14-10 iz paprike pripadaju virusu bronzavosti paradajza.

Na osnovu sekvenci NC gena, izolati PL-35-09, PL-60-09 i PL-14-10 pokazuju izuzetno visok stepen homologije, pri čemu sva tri izolata među sobom pokazuju identičnost od 99,7%, tako da se na osnovu sekvence NC gena ne može zaključiti da između ovih izolata postoji varijabilnost. Takođe, izolati TSWV iz duvana poreklom iz Srbije pokazuju nukleotidnu identičnost među sobom od 99,9% do 100% (**Đekić, 2010**). Iako izolati TSWV poreklom sa različitih domaćina ispoljavaju veliku varijabilnost i u prirodi se javljaju kao kompleks sojeva (**de Avila et al., 1990; Mandal et al., 2006**), utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti NC gena TSWV izolata širom sveta (**de Avila et al., 1993; Pappu et al., 1998**). Visok stepen nukleotidne identičnosti (>95%) NC gena utvrdili su i **Dietzgen et al. (2005)** ispitujući Australijske izolate TSWV poreklom iz različitih delova kontinenta i različitih domaćina, a takođe, su i **Persley et al. (2006)** utvrdili minimalne razlike između NC sekvence Australijskih izolata poreklom iz paprike, salate, paradajza, krompira i nekoliko vrsta ukrasnih biljaka.

6.4.4. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata AMV

Molekularna ispitivanja izolata AMV dobijenih u toku ovih istraživanja, osim detekcije bila su usmerena i na njihovu identifikaciju. Genetička identičnost izolata P-27-09 (Velika Plana), PL-2-10 (Pećinci) i P-10-10 (Bačka Topola), ispitana je poređenjem sekvence CP gena odabranog izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

BLAST analiza pokazala je visok stepen nukleotidne sličnosti sekvence ispitivanog izolata sa sekvencama gena za protein omotača drugih izolata AMV. Proračun genetičke identičnosti CP gena, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,5-100%) i aminokiselinske (97,5-100%) homologije između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona. Proračunom genetičke identičnosti sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti između ispitivanih izolata (98,7-99,6%). Najviši stepen nukleotidne identičnosti ispitivani izolati AMV pokazali su sa izolatima iz Srbije, Japana, Amerike, Novog Zelanda i Holandije. Potpunu homologiju u aminokiselinskoj sekvenci ispitivani izolati pokazali su sa izolatima iz Srbije, Kine, Japana, Amerike i iz Australije. Prema tome, na osnovu visokog stepena homologije sekvence CP gena, potvrđeno je da ispitivani izolati iz paprike pripadaju virusu mozaika lucerke.

Finetti Sialer et al. (1997) su u Italiji izolovali i okarakterisali novi soj AMV-Danza, koji izaziva simptome hloroze i nekroze na paradajzu i ispoljava 99-96% identičnosti u sekvenci gena za protein omotača sa ostalim ranije opisanim izolatima. Upoređivanjem sekvenci za protein omotača, više izolata sa različitim geografskim poreklom, **Parrella et al. (2000)** ustanovili su da njihova genetička identičnost iznosi 93-99% na nivou nukleotidne sekvence, odnosno 92 -100% na aminokiselinskom nivou. Visok stepen nukleotidne identičnosti (>98%) CP gena utvrdili su i **Xu and Nie (2006)** ispitujući 8 izolata ovog virusa iz krompira poreklom iz Kanade.

Kako u rodu *Alfavirus*, postoji samo jedan član, AMV, ne postoje demarkacioni kriterijumi za razlikovanje vrsta u okviru ovog roda (**Plyusnin et al., 2011**).

6.4.5. Analiza nukleotidnih sekvenci i genetička identičnost izolata PMMoV

Populacija PMMoV poreklom iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, nije poznata genetička struktura, kao ni variranje srpskih izolata u odnosu na izolate PMMoV poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. S obzirom da nije poznata genetička struktura populacije PMMoV prisutne u usevu paprike, molekularna ispitivanja izolata PMMoV dobijena u toku ovih istraživanja, osim detekcije bila su usmerena i na njihovu identifikaciju.

Međusobna genetička identičnost P-57-09, P-60-09 i P-3-10 izolata PMMoV izolovanih iz paprike iz lokaliteta Čonoplja i Đurđevo, kao i identičnost sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, ispitana je poređenjem nukleotidne sekvence CP i RdRp regiona.

Proračun genetičke identičnosti CP gena između ispitivanih izolata i izolata PMMoV dostupnih u GenBank bazi podataka iz različitih geografskih regiona, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,5-100%) i aminokiselinske (98,5-100%) homologije. Proračunom genetičke identičnosti sekvenci dobijenih u ovom radu utvrđen je visok nivo identičnosti ispitivanih izolata 99,5-100%. Najviši stepen identičnosti, odabrani izolati PMMoV iz paprike poreklom iz Srbije pokazali su sa izolatima iz Mađarske, Španije, Kine, Italije, Brazila i iz Francuske. Potpunu identičnost u aminokiselinskoj sekvenci (100%) naši ispitivani izolati ispoljili su sa većinom izolata odabranih iz GenBank baze podataka.

Proračun genetičke identičnosti RdRp gena između ispitivanih izolata i izolata iz različitih geografskih regiona, pokazao je visok stepen nukleotidne (97,1-99,7%) i aminokiselinske (93,3-99,2%) homologije. Proračunom genetičke identičnosti sekvenci dobijenih u ovom radu utvrđeno je da izolati među sobom imaju 99,4-100% nukleotidne identičnosti. Najviši stepen nukleotidne identičnosti ispitivani izolati su pokazali sa izolatima iz Japana i Koreje.

Najveći stepen homologije aminokiselinskih sekvenci, ispitivani izolati ispoljavaju sa izolatima iz Japana. Na osnovu visokog stepena homologije CP i RdRp sekvenci ispitivanih izolata sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka, dokazano je da svi ispitivani izolati pripadaju PMMoV.

Identifikaciju virusa blagog šarenila paprike na osnovu proučavanja sekvenci saopštili su i drugi autori (**Hamada et al., 2002; Velasco et al., 2002; Verhoeven et al., 2002**). Na osnovu istraživanja sprovedenih od strane **Kalman (2001)**, Mađarski izolati pokazuju visok stepen identičnosti nukleotidne sekvence sa ranije opisanim izolatima (94-99%), dok je stepen identičnosti aminokiselinske sekvence 95-100%.

6.5. Filogenetska analiza virusa paprike

Molekularna ispitivanja odabranih izolata iz paprike poreklom iz Srbije su osim detekcije i identifikacije obuhvatila i karakterizaciju virusa, u cilju proučavanja genetičke strukture i variranja ispitivanih izolata u odnosu na izolate poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Filogenetska analiza urađena je na osnovu delimične sekvence CP gena izolata CMV, TSWV i AMV, delimične nukleotidne sekvence gena za P1 protein izolata PVY, kompletne sekvence CP gena izolata PMMoV. Dobijene sekvence su uparene sa odgovarajućim odabranim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstruisano je filogenetsko stablo Maximum Parsimony metodom i bootstrap analizom sa 1 000 ponavljanja integrisanog unutar MEGA 4 programa.

6.5.1. Filogenetska analiza CMV izolata

Veliki broj različitih sojeva virusa mozaika krastavca, njihovih grupa i podgrupa je do danas opisano (**Kaper and Waterworth, 1981; Perry et al., 1993**). Veliki broj sojeva virusa mozaika krastavca prijavljenih iz celog sveta svrstani su u dve podgrupe, podgrupu I i podgrupu II, na osnovu bioloških, seroloških (**Hu et al., 1995; Iardi et al., 1995**) i molekularnih osobina (**Owens and Palukaitis, 1988; Owenet et al., 1990; Rizos et al., 1992; Sialer et al., 1999**). Filogenetskom analizom, na osnovu sekvenci gena, podgrupa I se dalje može podeliti podgrupe IA i IB (**Palukaitis and Zaitlin, 1997; Roossinck et al., 1999; Roossinck, 2002**). U podgrupu IB svrstani su Istočnoazijski izolati CMV dok u podgrupu IA su svrstani sojevi iz celog sveta (**Roossinck et al., 1999**). Rezultati **Liu et al. (2009)** su pokazali da bi se izolati CMV genetički mogli podeliti u tri grupe I, II, i III na

osnovu gena koji kodiraju MP, CP, 1a, i 2a proteine i u dve grupe na osnovu gena 2b. Grupa I bi se dalje mogla podeliti u dve podgrupe (IA i IB) na osnovu gena koji kodiraju CP, MP, 2a, i 2b proteine i u tri podgrupe (IA, IB, i IC) na osnovu gena koji kodira 1a protein.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 38 sekvenci CP gena, uključujući i tri izolata iz paprike iz Srbije pokazalo je razdvajanje odabranih izolata CMV u dve grupe I i II, što su opisali i **Francki et al. (1979)** i **Palukaitis et al. (1992)**. Ispitivani izolati pripadaju grupi I u koju je svrstana većina svetskih izolata ovog virusa (**Roossinck et al., 1999**). Grupa I je podeljena u dve podgrupe (ia) i (ib) pri čemu se izolati iz paprike poreklom iz Srbije grupišu u podgrupu (ia) sa većinom sojeva iz celog sveta. Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe II, zatim kod podgrupe Ia, dok je najveća varijabilnost zabeležena unutar podgrupe Ib. Najmanja intergrupna varijabilnost između podgrupa Ia i Ib, dok je između podgrupe Ia i grupe II kao i između podgrupe Ib i grupe II varijabilnost bila najveća. Nukleotidna identičnost izolata iz paprike poreklom iz Srbije sa izolatima iz filogenetskog stabla bila je od 70,1% do 99,7%, a aminokiselinska identičnost se kretala od 79 do 100%. Kako navode **Yu et al. (2005)**, stepen nukleotidne identičnosti izolata u okviru CMV S–I podgrupe je od 88,8% do 99,2%, a između izolata S–I i S–II podgrupe ispod 80%. **Bonnet et al. (2005)** ističu da većina izolata CMV (98%) pripada S–I podgrupi, a čak 64% izolata S–IA podgrupi. Veoma izraženoj varijabilnosti između izolata CMV doprinose mutacije, rekombinacije i pseudorekombinacije, kao najznačajniji faktori varijabilnosti (**Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003**), ali posebnu pažnju treba posvetiti i veoma značajnoj trgovinskoj razmeni koja može značajno da doprinese pojavi novih sojeva, gde do tada nisu bili prisutni, kao što je slučaj sa nedavnom introdukcijom sojeva IB podgrupe u Italiju (**Gallitelli, 2000**). Prisustvo izolata ove grupe, koji mogu da pričine veoma velike štete, do tada je bilo karakteristično samo za Aziju i Ameriku. Sve ove činjenice ukazuju na potrebu stalnog praćenja i analize strukture populacije virusa mozaika krastavca kod nas.

6.5.2. Filogenetska analiza PVY izolata

U ovom radu određene su i upoređene nukleotidne sekvence CP regiona genoma četiri izolata PVY. Filogenetska analiza 38 sekvenci gena za P1 protein izolata PVY iz različitih delova sveta, uključujući i četiri izolata iz paprike iz Srbije (PL-15-09, PL-28-09, PL-3-10, PL-108-10), pokazala je njihovo grupisanje u tri osnovna klastera: (i) klaster kome pripadaju svi izolati nekrotičnih PVY^N i PVY^{NTN} sojeva, (ii) klaster kome pripadaju svi izolati PVY^C soja i (iii) klaster kome pripadaju izolati PVY^O soja. Klaster (i) nekrotičnih izolata, može se podeliti na sub–klaster kome pripadaju izolati iz Evrope i sub–klaster kome pripadaju izolati poreklom iz Severne Amerike, što ukazuje da su PVY^N i PVY^{NTN} sojevi poreklom sa istog kontinenta međusobno sličniji nego sa odgovarajućim sojem poreklom sa drugog kontinenta (Đekić, 2010). Uočeni su i neki izuzeci, kao što je svrstavanje nekih izolata iz Kanade i USA u grupu evropskih nekrotičnih izolata, što govori o njihovom evropskom poreklu i verovatnu introdukciju putem uvoza krompira. Uočena je i obrnuta situacija, grupisanje nekih izolata iz Velike Britanije sa severnoameričkim nekrotičnim izolatima, što govori o postojećem „gen flow“ između Evrope i Severne Amerike, a koji je omogućen intenzivnom razmenom biljnog materijala (Đekić, 2010). Filogenetske analize sekvenci CP gena (Ohshima et al., 2000) i cele genomne sekvence izolata PVY^{NTN} (Ogawa et al., 2008) poreklom iz Japana pokazuju njihovo grupisanje u poseban klaster.

Izolati iz paprike poreklom iz Srbije grupišu se u sub–klaster (ia) sa ostalim evropskim izolatima PVY^N i PVY^{NTN} sojeva. Ispitivani izolati imaju visoku nukleotidnu i aminokiselinsku identičnost sa PVY^{NTN} izolatom (Sl. 64) iz krompira iz Slovenije. Nukleotidna identičnost izolata PVY iz paprike poreklom iz Srbije sa izolatima iz filogenetskog stabla bila je od 60,7% do 100%, a aminokiselinska identičnost se kretala od 50,7 do 100%. Proračunom genetičke udaljenosti sekvenci u okviru izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar sub-klastera (ia) gde spadaju i ispitivani izolati, a poređenjem intergrupne varijabilnosti može se reći da je sub-klaster (ia) imao najmanju intergrupnu varijabilnost sa sub-klasterom (ib) u koji spadaju izolati iz Amerike, a najveću sa klasterom (ii) koji predstavlja izolate koji pripadaju soju PVY^c. Smatra se da

je širenje populacije nekrotičnih sojeva vezano za kontinentalnu i interkontinentalnu trgovinsku razmenu zaraženih krtola krompira (**Lorezen et al., 2006**). Slične podatke daje i **Đekić (2010)** zbog velike sličnosti izolata iz duvana iz Srbije sa izolatima iz krompira iz Slovenije. Prenošnje PVY vašima na neperzistentan način, znači njegovo kratko zadržavanje na stiletu vektora (2–4 časa), tako da se njegovo prenošenje vašima na veću udaljenost retko dešava (**Berger et al., 1987**), što opet potvrđuje prethodne navode. Na osnovu ovih rezultata utvrđeno je da sva četiri izolata iz paprike poreklom iz Srbije pripadaju grupi nekrotičnih sojeva, mada se na ovaj način ne mogu razlikovati i ne može doneti tačan zaključak kom soju pripadaju, PVY^N, odnosno PVY^{NTN} soju.

6.5.3. Filogenetska analiza TSWV izolata

Dosadašnja filogenetska proučavanja *Tospovirus* roda, odnosila su se na proučavanje osobina različitih gena, u cilju klasifikacije i karakterizacije različitih tospovirusa. Utvrđeno je da je stepen genetičke različitosti u sekvenci NC gena osnovni kriterijum klasifikacije *Tospovirus*-a (**Pappu et al., 2000**). Takođe, vrste roda *Tospovirus* su određene na osnovu specifičnosti njihovih vektora, raspona biljaka domaćina, seroloških odnosa u N proteinu i po kriterijumu da njihova N proteinska sekvenca pokazuje manje od 90% identiteta sa bilo kojom drugom opisanom vrstom roda *Tospovirus* (**Plyusnin et al., 2011**). Prag od 90% identiteta amino-kiseline (AA) tospoviral N sekvenci proteina je jedan od važnih kriterijuma za određivanje vrste virusa i trenutno je opšte prihvaćen. **Silva et al. (2001)** je predložio da klasifikacija u okviru roda *Tospovirus* može da obuhvati i druge parametre, kao što je poređenje sekvenci N i NSm proteina. **Lovato et al. (2004)** i **Nagata et al. (2007)** su predložili korišćenje sekvence gena G prekursora u taksonomske svrhe. **Nagata et al. (2007)** su takođe predložili upotrebu IGR 3'UTR dužine kao i dodatnih parametara za razvrstavanje u taksonomiji *Tospovirus* roda. Na osnovu filogenetskih analiza N i NSm i geografske rasprostranjenosti, *Tospovirus*-i su svrstani u dve grupe, američku i evropsku. Virus bronzavosti paradajza svrstan je u američku grupu tj. vodi poreklo sa Američkog kontinenta (**Silva et al., 2001**). Takođe, veliki broj istraživača je na

osnovu filogenetskih istraživanja dokazao da je u okviru američke grupe opisan veliki broj geografskih subpopulacija (**Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008**).

Filogenetska proučavanja virusa bronzavosti paradajza urađena su na osnovu osobina NC gena izolata poreklom iz različitih geografskih regiona i različitih biljaka domaćina. NC gen tri izolata TSWV sakupljenih u različitim lokalitetima u 2009. i 2010. godini, sekvencionirani su i na osnovu njihovih i dostupnih sekvenci drugih izolata, rekonstruisano je filogenetsko stablo. Na rekonstruisanom filogenetskom stablu jasno se uočava grupisanje izolata u odvojene klastere na osnovu geografskog porekla. Istraživanja su pokazala postojanje dve osnovne grupe izolata, evropske i američke, kao i veći broj subpopulacija u okviru američke grupe. Na osnovu varijabilnosti sekvenci NC gena različitih izolata, izolati su svrstani u šest klastera, (i) izolati poreklom iz Evrope (većina evropskih izolata), (ii) izolati iz Japana, (iii) izolati iz Španije, (iv) izolati sa Havaja, (v) izolati iz Kalifornije (vi) izolati iz Džordžije i Severne Karoline. Isti način grupisanja izolata TSWV iz različitih delova sveta, a na osnovu sekvenci NC i Nsm gena utvrdili su i **Tsompana et al. (2005)**.

Rezultati filogenetskih analiza, sprovedenih u ovom radu, pokazuju da se izolati TSWV poreklom iz paprike iz Srbije nalaze u klasteru koji čini većina izolata iz Evrope (Bugarska, Italija, Nemačka, Češka Republika, Holandija i Srbija), poreklom sa različitih domaćina, uključujući i papriku. Najveću genetičku identičnost izolati iz paprike poreklom iz Srbije pokazali su sa izolatima iz duvana iz Srbije (99,8%), dok je nukleotidna identičnost izolata TSWV iz paprike poreklom iz Srbije sa izolatima iz filogenetskog stabla bila od 95,4% do 99,8%, a aminokiselinska identičnost se kretala od 88,2 do 99,5%. Proračunom genetičke udaljenosti sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar klastera (v), dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila nešto veća. Intergrupna varijabilnost bila je najveća između klastera (ii) i (vi), dok je najmanja intergrupna varijabilnost bila je između klastera (ii) i (iii).

Međutim, postoje i izvesna odstupanja vezana za grupisanje izolata na osnovu geografskog porekla. U ovom radu, kao i u radu **Tsompana et al. (2005)** i **Đekić (2010)**, ta odstupanja odnose se na grupisanje izolata TSWV iz Afrike i nekih izolata iz Severne Karoline sa evropskim izolatima, kao i izdvajanje izolata iz Španije od ostalih evropskih

izolata. **Nischwitz et al. (2007)** objašnjavajući genetičku identičnost izolata TSWV iz Severne Karoline (NC 1 i NC 3) i iz Afrike (98/0472 i TSWV–GP) sa izolatima iz Holandije, navode tzv. „gen flow“ iz Evrope u Severnu Karolinu i iz Evrope u Severnu Afriku, koji je uočen i za neke druge *Tospovirus*–e. Izdvajanje španskih izolata TSWV od drugih evropskih izolata, može se pripisati dvema nezavisnim introdukcijama TSWV u Evropu, pri čemu španski izolati imaju bližeg zajedničkog evolutivnog pretka sa izolatima izvan evropskog, odnosno sa američkog kontinenta (**Đekić, 2010**). Analizirajući izolate jednog drugog *Tospovirus*–a, IYSV (*Iris yellow spot virus*), došlo se do sličnih zaključaka (**Bulajić et al., 2009**).

Izolati poreklom iz Italije, uključeni u ova ispitivanja, pokazuju na osnovu NC filogenetskog stabla grupisanje sa španskim ili ostalim evropskim izolatima, dok jedan izolat T922 iz paradajza, pripada ostalim evropskim. Ovi rezultati upućuju na višestruku introdukciju TSWV u Italiju i moguću rekombinaciju nekih izolata putem izmene celih genomnih segmenata, što je jedan od mogućih vidova velike varijabilnosti unutar TSWV (**Qui et al., 1998; Qui and Moyer, 1999**).

Sagledavanjem NC filogenetskog stabla, uočava se da se jedan izolata TSWV poreklom iz Brazila ne grupiše sa ostalim izolatima uključenim u analizu. Ovaj izolat može se smatrati posebnim klasterom ili podgrupom jednog velikog klastera u kome se nalaze izolati iz Kalifornije, Džordžije, Havaja i Španije.

6.5.4. Filogenetska analiza AMV izolata

Na osnovu tri sekvenci izolata AMV dobijenih u ovom radu i dostupnih sekvenci drugih izolata, rekonstruisano je filogenetsko stablo, koje pokazuje četiri različite grupe, odnosno grupisanje izolata AMV u najmanje četiri genetička soja. Na rekonstruisanom filogenetskom stablu izdvajaju se četiri klastera, odnosno grupisanje izolata AMV u četiri genetička soja, nezavisno od geografskog porekla i biljke domaćina. Većina izolata, izdvojila su se u grupu I. Takođe u ovu grupu spadaju i tri ispitivna izolata AMV iz paprike poreklom iz Srbije (P-27-9, PL-2-10 i P-10-10). Drugu molekularnu grupu čine sedam izolata iz Kanade, izolati iz Italije čine treću molekularnu grupu, dok su se četiri izolata iz

Francuske i dva izolata iz Velike Britanije izdvojili u četvrtu grupu. Prema istraživanjima **Stanković i sar. (2011)**, izolat iz duvana (196-08) iz Srbije, nalazi se u IV grupi koju čine sedam izolata iz Kanade, tri iz Italije, kao i izolat iz lucerke iz Srbije. Međutim, **Parrella et al. (2000)** utvrdili su podelu izolata različitog geografskog porekla i iz različitih biljaka domaćina u dve odvojene grupe, a nukleotidna identičnost izolata između dve grupe bila je manja od 96%. Sa druge strane, istraživanja u Kanadi pokazala su da se svi izolati AMV sa krompira grupišu u jedan od najmanje četiri klastera izolata ovog virusa (**Xu and Nie, 2006**). Nukleotidna identičnost izolata AMV iz paprike poreklom iz Srbije sa izolatima iz filogenetskog stabla bila je od 93,7% do 99,5%, a aminokiselinska identičnost se kretala od 93 do 100%. Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, najmanja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe (ii), dok je varijabilnost u okviru drugih grupa bila nešto veća. Intergrupna varijabilnost bila je najveća između grupa (i) i (iv) kao i između (ii) i (iv) a najmanja manja između grupa (i) i (ii) kao i između (ii) i (iii).

Svi ovi podaci ukazuju na neophodna dalja izučavanja genetičke strukture populacije AMV i definisanje novih kriterijuma, uključujući proučavanje drugih delova genoma ovog virusa. Određivanje varijabilnosti u okviru populacije ovog virusa u usevu paprike, ali i u drugim biljkama domaćina u Srbiji doprineće boljem poznavanju epidemiologije ovog patogena, a sve u cilju osmišljavanja i sprovođenja što efikasnijih mera kontrole, kao i prevencije mogućih introdukcija novih sojeva za našu zemlju usled veoma intenzivne međunarodne razmene biljnog materijala.

6.5.5. Filogenetska analiza PMMoV izolata

Kako populacija PMMoV poreklom iz paprike iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, molekularna ispitivanja, osim detekcije i identifikacije bila su usmerena i na njihovu karakterizaciju.

Smatra se da postoje četiri soja PMMoV, P₀, P₁, P_{1,2} i P_{1,2,3} koji se razlikuju prema hipersenzitivnoj reakciji koju izazivaju na paprici koje su nosioci L¹, L², L³ i L⁴ rezistentnih gena (**Mijatović i sar., 2007**). Ovi sojevi se među sobom ne razlikuju serološki (**Green, 2003; Takeuchi et al., 2005**). Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence CP

gena dužine 550 bp, pokazalo je razdvajanje odabranih izolata PMMoV u dva klastera. Ispitivani izolati iz Srbije kao i većina odabranih izolata grupišu se u prvi klaster što znači da pripadaju izolatima koji izazivaju hipersenzitivnu reakciju (HR) na paprici koja je nosilac L^3 rezistentnog gena, drugu grupu koju čine tri izolata koji ne poseduju ovu osobinu.

Proračunom genetičke identičnosti utvrđen je stepen nukleotidne identičnosti izolata PMMoV prikazanih u filogenetskom stablu, od 93,1% do 100%, dok je stepen aminokiselinske sličnosti iznosio od 96,8% do 100%. Proračunom genetičke udaljenosti CP sekvenci unutar izdvojenih grupa, manja varijabilnost ustanovljena je unutar grupe (ii), dok je varijabilnost u okviru prve grupe bila nešto veća. Intergrupna varijabilnost između grupa (i) i (ii) bila $0,060 \pm 0,010$.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu obavljenih istraživanja sprovedenih u ovoj doktorskoj disertaciji i dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

► Prisustvo virusa utvrđivano je tokom 2009. i 2010. godine kako u proizvodnji paprike u rasadu, proizvodnji u zaštićenom prostoru, tako i u proizvodnji paprike na otvorenom polju.

⇒ Prikupljeni uzorci paprike koji su po simptomima nagoveštavali da se radi o virusnoj prirodi oboljenja, serološki su analizirani u cilju detekcije najrasprostranjenijih i ekonomski najznačajnijih virusa paprike, pri čemu se na osnovu seroloških analiza utvrdila prisutnost i rasprostranjenost virusa paprike po lokalitetima u obe ispitivane godine.

⇒ Uzorci su testirani primenom DAS-ELISA testa, korišćenjem komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju devet najznačajnijih virusa paprike: *Tomato spotted wilt virus* (virus bonzavosti paradajza, TSWV), *Potato virus Y* (virus crtičastog mozaika krompira, PVY), *Cucumber mosaic virus* (virus mozaika krastavca, CMV), *Tobacco mosaic virus* (virus mozaika duvana, TMV), *Alfalfa mosaic virus* (virus mozaika lucerke, AMV), *Potato virus X* (virus mozaika krompira PVX), *Pepper mottle virus* (virus šarenila paprike, PepMoV), *Pepper mild mottle virus* (virus blagog šarenila paprike PMMoV) i *Pepper veinal mottle virus* (virus šarenila nerava paprike, PVMV).

⇒ Ispitivanja prisutnosti virusa na paprici u rasadu, pokazala su dominantno prisustvo CMV u obe ispitivane godine, dok u znatno nižem procentu bili su zastupljeni PVY i AMV. Od ukupno sakupljenih 121 uzoraka, prisustvo virusa dokazano je u 23,97%, dok u 76,03% testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo nijednog od ispitivanih virusa. Na svim lokalitetima procenjen je intenzitet zaraze od 5-10%. TSWV, TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nisu bili detektovani ni u jednoj ispitivanoj godini.

⇒ Ispitivanja prisutnosti virusa na paprici u zaštićenom prostoru pokazuju da je tokom 2009. godine PVY bio najdominantniji, a drugi po zastupljenosti bio je CMV, dok je 2010. godine bilo obrnuto. Prisustvo AMV ustanovljeno u obe godine ispitivanja i to 2009. godine bio je četvrti po zastupljenosti, dok je 2010. godine njegovo prisustvo dokazano u nešto većem broju uzoraka i zauzimao je treće mesto iza PVY i CMV. TSWV bio je

zabeležen kako u 2009. tako i u 2010. godini, s tim što je veća prisutnost ovog virusa zabeležena u prvoj godini ispitivanja. Na svim lokalitetima procenjen je intenzitet zaraze od 20-40%. TMV, PVX, PMMoV, PepMoV i PVMV nisu bili detektovani ni u jednoj ispitivanoj godini.

⇒ Ispitivanja prisutnosti virusa na paprici na otvorenom polju pokazuju da je tokom 2009. godine, PVY bio najdominantniji, a drugi po zastupljenosti bio je CMV, koji je 2010. godine bio najzastupljeniji u proizvodnji paprike na otvorenom polju, dok je PVY bio prisutan u nešto manjem broju uzoraka. Prisustvo AMV ustanovljeno u obe godine ispitivanja i bio je treći po zastupljenosti iza PVY i CMV. PMMoV detektovan je samo u proizvodnji paprike u polju i to na manjem broju uzoraka, u obe ispitivane godine. Na svim pregledanim lokalitetima intenzitet zaraze virusima bio je preko 50%. TSWV, TMV, PVX, PepMoV i PVMV nisu bili detektovani ni u jednoj ispitivanoj godini.

⇒ Kod sva tri načina gajenja paprika bila je dominantna pojedinačna zaraza, međutim u zaštićenom prostoru i na otvorenom polju mogla se uočiti mešana zaraza sa dva virusa, gde je najdominantija mešana zaraza bila sa PVY i CMV u obe godine ispitivanja. U proizvodnji paprike na otvorenom polju, pored mešane zaraze dva virusa detektovana je i mešana zaraza tri virusa.

⇒ Kako je na paprici u našoj zemlji prisutno najmanje pet virusa, u pojedinačnim i mešanim zarazama, uočeni simptomi i njihova veza sa virusom prouzrokovačem imaju samo preliminarni dijagnostički značaj. Simptomi, koliko god bili izraženi i karakteristični, ipak samo ukazuju na postojanje zaraze određenim virusom, a konačna tačna dijagnoza može se postaviti samo posle odgovarajućih laboratorijskih analiza.

► Odabrani izolati najznačajnijih virusa paprike, za koje je primenom seroloških i molekularnih metoda utvrđeno da pripadaju CMV, PVY, TSWV, AMV i PMMoV, korišćeni su za dalje analize sekvenci određenih delova genoma u cilju njihove identifikacije i čime je omogućeno proučavanje genetičke identičnosti sekvenci ispitivanih izolata virusa paprike poreklom iz Srbije sa izolatima virusa iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka.

⇒ Ustanovljen je visok stepen nukleotidne identičnosti gena za P1 protein ispitivanih izolata PVY poreklom iz Srbije sa izolatima iz Slovenije, Srbije i Kolumbije. Determinisane su nukleotidne sekvence CP gena tri izolata CMV, AMV i PMMoV, sekvence NC gena tri izolata TSWV, kao i nukleotidne sekvence RdRp gena tri izolata PMMoV. Rezultati molekularne identifikacije pokazali su najveću identičnost izolata TSWV sa izolatima Sr-603 iz paradajza iz Srbije, izolata CMV sa izolatima iz Amerike, Austarije, Španije i Srbije, izolata AMV sa izolatima iz Srbije, Japana, Amerike, Novog Zelanda i Holandije kao i izolata PMMoV sa izolatima iz Mađarske, Španije, Kine, Italije, Brazila i iz Francuske. Na osnovu sekvence RdRp gena izolati PMMoV pokazuju najveću identičnost sa izolatima iz Japana i Koreje.

► Proučavanje evolutivne povezanosti izolata određenog virusa, višestruko uparivanje sekvenci i rekonstrukcija filogenetskog stabla sekvencioniranih izolata najrasprostranjenijih i najučestalijih virusa paprike iz Srbije sa izolatima dostupnim u bazi podataka, obavljeno je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 4.0 i bootstrap analize sa 1 000 ponavljanja.

⇒ Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci CP gena, uključujući izolate iz paprike iz Srbije pokazalo je razdvajanje odabranih izolata CMV u dve grupe I i II, dok se grupa I dalje deli na podgrupe IA i IB. U podgrupu IB svrstani su istočnoazijski izolati CMV dok u podgrupu IA je svrstana većina sojeva iz celog veta. Ispitivani izolati poreklom iz paprike iz Srbije CMV pripadaju podgrupi I.

⇒ Filogenetska analiza na osnovu sekvenci gena za P1 protein, pokazala je grupisanje izolata PVY u tri osnovna klastera koji odgovaraju opisanim sojevima ovog virusa. Izolati PVY iz paprike poreklom iz Srbije grupišu se u klaster sa ostalim evropskim izolatima nekrotičnih sojeva (PVY^N i PVY^{NTN}). Velika identičnost izolata iz paprike iz Srbije sa izolatima iz krompira iz Slovenije, ukazuje, takođe, da su zaražene krtole krompira osnovni rezervoar PVY i da je razmenom zaraženih krtola između država doprinelo širenju virusa.

⇒ Rezultati filogenetskih analiza pokazuju grupisanje izolata TSWV poreklom iz paprike iz Srbije u klaster koji čini većina izolata iz Evrope. Najveću genetičku identičnost

i grupisanje izolati poreklom iz Srbije pokazali su sa izolatima iz Bugarske upućujući na protok gena („gen flow“) između ova dva geografska regiona Evrope.

⇒ Na filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu sekvence CP gena, pokazalo je grupisanje izolata AMV u četiri genetička soja, nezavisno od geografskog porekla i biljke domaćina. Većina izolata, izdvojila se u grupu I. Takođe u ovu grupu spadaju i tri ispitivna izolata AMV iz paprike poreklom iz Srbije.

⇒ Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvence CP gena, pokazalo je razdvajanje odabranih izolata PMMoV u dva klastera, pri čemu prva grupa odgovara izolatima koji izazivaju hipersenzitivnu reakciju (HR) na paprici i koje su nosioci L^3 rezistentnog gena, a drugu grupu čine izolati koji ne poseduju ovu osobinu. Ispitivani izolati iz Srbije grupišu se u prvi klaster.

► Ispitivanje prisutnih virusa paprike kod nas, kao i primena najsavremenijih molekularnih tehnika, unapredila je metode detekcije, identifikacije i karakterizacije ovih virusa, doprinelo je inventarizaciji virusa u Srbiji, a takođe je i doprinelo razumevanju njihovog porekla i daljeg širenja u našoj zemlji.

8. LITERATURA

- Abdalla, O. A., Desjardins, P. R. and Dodds, J. A.** (1991): Identification, disease incidence and distribution of viruses infecting peppers in California. *Plant Disease*, 75: 1019-1023.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Fauquet, C. M.** (2005): Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 150: 459-479.
- Adkins, S., Lamb, E. M., Roberts, P. D., Gooch, M. D., Breman, L. and Shuler K. D.** (2001): Identification of *Pepper mild mottle virus* in commercial Bell Pepper in Florida. *Plant Disease*, 85: 679.
- Agrios, G. N.** (1988): *Plant Pathology*. Academic Press Inc., London: 1-803.
- Aleman-Verdguer, M .E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N. and Fauquet, C.** (1997): Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology*, 78: 1253-1264.
- Ali, A. and Kobayashi, M.** (2010): Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. *Journal of Virological Methods*, 163 (2): 234-237.
- Allen, W. R., Matteoni, J. A., Broadbent, A. B.** (1991): Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemum infected with *Tomato spotted wilt virus*. pp. 28-45. In: Hsu, H. T., Lawson, R. H. (eds): *Virus-Thrips-Plant Interactions of TSWV*. Springfield, National Technology Information Service.
- Alonso, E. I., Garcia Luque, M. J., Avila-Rincon, B., Wicke, M.T., Serra and Diaz-Ruiz, J. R.** (1989): A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, 125: 67-76.
- Alonso, E., Garcia-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincon, M. J., Serra, M. T., Castresana, C. and Diaz-Ruiz, J. R.** (1991): Nucleotide sequence of the genomic RNA of *Pepper mild mottle virus*, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *Journal of General Virology*, 72 (Pt 12): 2875-2884.

- Arli-Sokmen, M., Mennan, H., Sevik, M. A. and Ecevit O.** (2005): Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33 (4): 347-358.
- Arteaga, M. L., Ortega, R. G.** (1986): Biological characterization of PVY as isolated from pepper in Spain. In: Meeting on genetics and breeding on capsicum and eggplant, Proceedings. Zaragoza: Eucarpia, 6: 183-188.
- Avilla, C., Collar, J. L., Duque, M. and Fereres, A.** (1997): Yield of bell pepper (*Capsicum annuum*) inoculated with CMV and/or PVY at different time intervals, zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz. *Journal of plant diseases and protection*, 104: 1-8.
- Badge, J., Robinson, D. J., Brunt, A. A. and Foster, G. D.** (1997): 3'-Terminal sequences of the RNA genomes of narcissus latent and maclura mosaic viruses suggest that they represent a new genus of the *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 78: 253-257.
- Balaji, B., Bhat, A. I. and Eapen** (2008): A phylogenetic reexamination of *Cucumber mosaic virus* isolates based on 1a, 2a, 3a and 3b proteins. *Indian Journal of Virology*, 19 (1): 27–33.
- Barker, R. F., Jarvis, N. P., Thompson, D. V., Loesch-Fries, L. S. and Hall, T. C.** (1983): Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA3. *Nucleic Acids Research*, 11 (9): 2881-2891.
- Beczner, J., Hamilton, R. and D. M. Rochon.** (1997): Characterization of an isolate of *Pepper mild mottle tobamovirus* occurring in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*: 83-88.
- Berger, P. H., Zeyen, R. J. and Gorth, J. V.** (1987): Aphid retention of *Maize dwarf mosaic virus (Potyvirus)*: epidemiological implications. *Annals of Applied Biology*, 111: 337–344.
- Berling, A., Lianas-Bousquet, W., Malezieux, S., Gebre-Selassie, K.** (1990): *Tomato spotted wilt virus*. Connaitre le probleme pour enraye l' epidemie. *Phytoma*, 422: 46-50.

- Berniak, H., Kaminska, M. and Malinowski, T.** (2010): *Cucumber mosaic virus* groups IA and II are represented among isolates of naturally infected lilies. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 305-309.
- Best, R. J.** (1968): *Tomato spotted wilt virus*. *Adv. Virus Res.* 13: 65-146.
- 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.
- 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.
- Blanco-Urgoiti, Tribodet, Leclere, Ponz, Pérez de San Román, Legorburu and Kerlan** (1998): *European Journal of Plant Pathology* 104 : 811.
- Boccard, F. and Baulcombe, D.** (1993): Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*, 193 (2): 563-578.
- Boiteux, L. S., Cupertino, F. P., Silva, C., Dusi, A. N., Monte-Neshich, D. C., Vlugt, R. A. A. and Fonseca M. E. N.** (1996): Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. *Euphytica*, 87 (1): 53-58.
- Bol, J. F.** (1999): *Alfalfa mosaic virus* and *Iilarviruses*: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology*, 80: 1089-1102.
- Bol, J. F., van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E. M. J.** (1971): A functional equivalence of top component a RNA and coat protein in the initiation of infection by *Alfalfa mosaic virus*. *Virology*, 46: 73-85.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristan, S., Malpica, J. M. and Garcia-Arenal, F.** (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332 (1): 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.
- Bosland, P. W., Iglesias, J. and Gonzalez, M. M.** (1994): 'NuMex Centennial' and 'NuMex Twilight' ornamental chiles. *HortScience* 29: 1090.

- Bousalem, S., Dallot, S. and Guyader, S.** (2000): The use of phylogenetic data to develop molecular tools for the detection and genotyping of *Yam mosaic virus*. Potential application in molecular epidemiology. *Journal of Virological Methods*, 90: 25–36.
- Brittlebank, C. C.** (1919): *Tomato diseases*. *Agricultural Journal of Victoria* 17: 213-235.
- Broadbent and Fletcher** (1963): *Annals of Applied Biology* 52: 233.
- Brunt, A. A.** (1992): The general properties of *Potyriviruses*. *Archives of Virology Supplementum*, 5: 3-16.
- 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/>).
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. Watson, I., Zurcher, E. J.** (1997): *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Plant virus online*. Descriptions and lists from the VIDE database.
- Büchen–Osmond, C.** (2006): *Potato virus Y*. In: *ICTVdB–The Universal Virus Data base*. Version 4. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).
- Bulajić, A., Zindović, J., Berenji, J., Dukić, N., Đekić, I., Duduk, B., Krstić, B.** (2006): Nekrotični soj virusa crtičastog mzaika krompira na duvanu u Srbiji. *Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*: 67-68.
- Bulajić, A. Đekić, I., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A. and Krstić, B.** (2009): Incidence and distribution of *Iris yellow spot virus* on onion in Serbia. *Plant Disease*, 93(10): 976- 982.
- Bulajić, A., Vučurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Ivanović, M., Krstić, B.** (2010): Razvijanje metode za određivanje učestalosti zaraze virusom mozaika lucerke u usevu semenske lucerke. X savetovanje o zaštiti bilja, *Zbornik rezimea radova, Društvo za zaštitu bilja Srbije*: 77-78.
- Buonauro, R., Scortichini, M.** (1994): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pepper seedlings in Italy. *Plant Pathology*, 43 (1): 216–219.

- Canto, T., Prior, D. A. M., Hellwald, K. H., Oparka, K. J. and Palukaitis, P.** (1997): Characterization of *Cucumber mosaic virus*. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*, 237: 237-248.
- 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.
- Chaumpluk, P., Sasaki, Y., Nakajima, N., Nagano, H., Nakamura, I., Suzuki, K., Mise, K., Inouye, N., Okuno, T. and Furusawa, I.** (1996): Six new subgroup I members of Japanese cucumber mosaic virus as determined by nucleotide sequence analysis on RNA3's cDNAs. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 62: 40-44.
- Chen, Y. K.** (2003): Occurrence of cucumber mosaic virus in ornamental plants and perspectives of transgenic control. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands: 144.
- Chen, Sh., Gu, H., Wang, X., Chen, J. and Zhu, W.** (2011): Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(6): 465-471.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, J. Y., Choi, G. S. and Chung, B. N.** (2009): Biological Characteristics and Nucleotide Relationships in Korean *Tomato spotted wilt virus* isolates. *The Plant Pathology Journal*, 25 (1) : 26-37.
- Choi, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Kim, J. S. and Ryu, K. H.** (2005a): Occurrence and Distribution of Viruses Infecting Pepper in Korea. *Journal of Plant Pathology*, 21 (3): 258-261.
- Choi, H. S., Ko, S. J., Kim, M. K., Park, J. W., Lee, S. H., Kim, K. H., Were, H. K., Choi, J. K. and Takanami, Y.** (2005b): Characteristics of Potato virus Y Isolated from Paprika in Korea. *Journal of Plant Pathology*, 21 (4) : 349-354.
- Chrzanowska, M.** (1991): New isolates of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY^N) found recently in Poland. *Potato Research*, 34: 179-182.

- Ciuffo, M., Finetti-Sialer, M. M., Gallitelli, D. and Turina, M.** (2005): First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the sw5 resistance gene. *Plant Pathology*, 54: 564-565.
- Clark, M. F. and Adams, A. N.** (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V.** (2010): *Pepper Mild Mottle Virus*, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. *PLoS ONE* 5(4): e10041.
- Conti, M. and Masenga, V.** (1977): Identification and prevalence of pepper viruses in northwest Italy. *Phitopath. Z.*, 90: 212-222.
- Coutts, B. A., Thomas-Carroll, M. L., Jones, R. A. C.** (2004): Patterns of spread of Tomato spotted wilt virus in field crops of lettuce and pepper: spatial dynamics and validation of control measures, *Annual of Applied Biology*, 145: 231-245.
- Creamer, R.** (2003): *Alfalfa mosaic virus*. In: *Compendium of Pepper Diseases*.
- Crill, Hagedorn and Hanson** (1970): *Res. Bull. agric. Exp. Stn Univ. Wis.* 280: 40.
- Croslin, Hamm, Eastwell, Thornton, Brown, Corsini, Shiel & Berger** (2002): *Plant Disease*, 86: 1177.
- Davino, M., Areddia, R., Polizzi, G. and Grimaldi, V.** (1989): Observations on pitting in pepper fruit in Sicily. *Difesa delle Piante*, 12 (1-2): 65-73.
- Dawson, W. O.** (1999): *Tobacco mosaic virus* virulence and avirulence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 342: 645-651.
- 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.
- 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 Bokx, J. A. and Huttinga, H.** (1981): Potato virus Y. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No 242 (No 37 revised).

- De Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. and Goldbach, R.** (1989): Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 70 (PT 12): 3469-3473.
- Delević, B.** (1963): Viroze paprike u SR Srbiji. Institut za zaštitu bilja S. R. Srbije.
- Dewey, R. A., Semorile, L. C., Grau, O.** (1996): Detection of Tospovirus species by RT-PCR of the N gene and restriction enzyme digestions of the products. *Journal of Virological Methods*, 56: 19-26.
- 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.
- Ding, S. W., Anderson, B. J., Haase, H. R. and Symons, R. H.** (1994): New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 198: 593-601.
- Ding, S. W., Li, W. X. and Symons, R. H.** (1995): A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* 14: 5762-5772.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I., Duduk, B.** (2002a): Molekularna identifikacija virusa bronzavosti paradajza na paprici. XII Simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida. Zlatibor: 72.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D. i Duduk, B.** (2002b): Molekularna identifikacija izolata virusa mozaika krastavca u Jugoslaviji-podgrupe IA. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor: 75.
- Dukić, N.** (2004a): Karakterizacija i molekularna detekcija virusa obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Srbiji. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- 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: 104.

- 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.
- Đekić, I., Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Duduk, B., Antonijević, D. i Krstić, B.** (2006): Karakterizacija virusa bronzavosti paradajza i nivo otpornosti nekih genotipova duvana u Srbiji. Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor: 69-70.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B.** (2007a): Neravnomerna distribucija *Tomato spotted wilt virus* u duvanu, paradajzu i paprici. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor: 117-118.
- Đekić, I., Bulajić, A., Zindović, J., Berenji, J., Pauković, M. i Krstić, B.** (2007b): Identifikacija sojeva virusa crtičastog mozaika krompira na duvanu. *Pesticidi i fitomedicina*, 22: 155-163.
- Đekić, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D. i Krstić, B.** (2008): Uticaj neravnomerne distribucije virusa bronzavosti paradajza na serološko dokazivanje virusa u paradajzu, paprici i ukrasnim biljkama. *Pesticidi i fitomedicina*, 23: 225-234.
- Đekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J., Krstić, B.** (2008a): Zastupljenost i molekularna detekcija virusa mozaika krastavca u usevu duvana. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 40 (81): 70-82.
- Đekić, I.** (2010): Prisustvo, rasprostranjenost i karakterizacija virusa duvana u Srbiji. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultetu Univerziteta u Beogradu.
- Echer, M. de M., Costa, C. de P.** (2002): Reaction of sweet pepper to the potato virus Y (PVY^m)¹: *Scientia Agricola*, 59 (2): 309-314.
- Edwardson and Christie** (1997): Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series 18-II: 467.
- Ellis, Stace-Smith and de Villiers** (1997): *Plant Disease* 81: 481.
- Erkan, S** (1986). *Potato virus Y* on pepper, in Turkey. *Phytopathol. Mediterr.* 25: 149-150.
- Erny, C., Schoumacher, F., Jung, C., Gagey, M. J., Godeefroy-Colburn, T., Stussi-Garud, C. and Berna, A.** (1992): An N-proximal sequence of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein is necessary for association with cell walls in transgenic plants. *Journal of General Virology*, 73: 2115-2119.

- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A.** (2005): Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.
- Filov, A. I.** (1956): Pereg i baklažan, Seljlozgez, 368.
- 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.
- Finetti Sialer, M. M., Parrela, G., Papanice, M., Vovlas, C. and Gallitelli, D.** (2000): Biodiversity of viruses infecting tomato in Italy: methods for diagnosis and diversification, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 30: 301-304.
- Fletcher** (2001): New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 29: 213.
- Fletcher** (1989): New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 17: 259.
- Fraile, A., Pagan, I., Anastasio, G., Saez, E. and Garcia-Arenal, F.** (2011): Rapid genetic diversification and high fitness penalties associated with pathogenicity evolution in a plant virus. Molecular Biology and Evolution, 28 (4): 1425-1437.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Shkula, D. D.** (1979): *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, 213.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., Brown, F.** (1991): Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Archives of Virology (Supplement), 2.
- Gaborjanyi, R., Horvath, J., Kovacs, J. and Kazinczi, G.** (1998): Role of viruses in pepper decline in Hungary. Xth Eucarpia Meeting of Capsicum and Eggplant, Avignon, France: 129-132.
- Gafny, R., Wexler, A., Mawassi, M., Israeli, Y. and Bar-Joseph, M.** (1996): Natural infection of banana by a satellite-containing strain of cucumber mosaic virus. Phytoparasitica, 24 (1): 49-56.
- Gallitelli, D.** (2000): The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. Virus Research, 71: 9-21.
- Garran, J. and Gibbs, A.** (1982): Studies on *Alfalfa mosaic virus* and alfalfa aphids. Australian Journal of Agricultural Research, 33 (4): 657-664.

- Gebré Sélassié, K., Marchoux, G., Delecolle, B., Pochard, E.** (1985): Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie*, 5: 621-630.
- Gebré Sélassié, Marchoux, Laterrot and Blancard** (1987): PHM –Revue Horticole, 281: 43.
- Genda, Y., Sato, G. K., Nunomura, O., Hirabayashi, T., Ohnishi, J., and Tsuda S.** (2005): Immunolocalization of *Pepper mild mottle virus* in *Capsicum annuum* seeds. *Journal of General Plant Pathology*., 71: 238-242.
- Genda, Y., Kanda, A., Hamada, H., Sato, K., Ohnishi, J. and Tsuda, S.** (2007): Two Amino Acid Substitutions in the Coat Protein of Pepper mild mottle virus Are Responsible for Overcoming the L(4) Gene-Mediated Resistance in *Capsicum* spp. *Phytopathology*, 97 (7): 787-793.
- Gibbs, A. J.** (1977): *Tobamovirus* group. CMI/AAB Description of Plant Viruses, 184.
- Gildow, F. E., Shah, D. A., Sackett, W. M., Butzler, T., Nault, B. A. and Fleischer, S. J.** (2008): Transmission efficiency of *Cucumber mosaic virus* by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology*, 98: 1233-1241.
- Gitatis, R. D. Dowler, C. C., Chalfant, R. B.** (1998): Epidemiology of Tomato spotted wilt in pepper and tomato in Southern Georgia. *Plant Disease*, 82: 752-756.
- Glais, L., Kerlan, C., Tribodet, M., Marie-Jeanne Tordo, V., Robaglia, C. and Astier-Manificier, S.** (1996): Molecular characterization of *Potato virus Y^N* isolates by PCR–RFLP. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 655–662.
- 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.
- Glasa, M. and Candresse, T.** (2005): Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of Plum pox virus (PPV). *Virus research*, 105: 199-206.
- Goldbach, R. W. and Peters, D.** (1994): Possible causes of the emergence of Tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5:113-120.

- Goldberg, N. P.** (2000): *Tomato spotted wilt virus*. http://www.cahe.nmsu.edu/pubs/_h/h-242.html.
- Golnaz, N., Jafarpour, B., Rastegar, M. F. and Sabokkhiz, M. A.** (2009): Detection of *Cucumber mosaic virus* and Typing Using Serological and Molecular Methods in Razavi Khorasan Province. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 657-659.
- Green, S. K. and Kim, J. S.** (1990): Characteristics and control of viruses infecting peppers. *Asian Vegetable Research and Development Center Technical Bulletin*, 18: 1-60.
- Green, S. K. and Wu, S. F.** (1991): Tobamoviruses on *Capsicum annuum* in Taiwan. *Plant Disease*, 75: 86.
- Green, S. K.** (2003). *Pepper mild mottle virus*. In Pernezny et al. (eds): *Compendium of pepper diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.: 32-33.
- Greenleaf, W. H., Cook, A. A., Hleyn, A. N. J.** (1964): Resistance to *Tobacco mosaic virus* in *Capsicum* with reference to the samsun latent strain. *Phytopathology*, 54: 1367-1371.
- Greenleaf, W. H.** (1986): *Pepper Breeding in Breeding Vegetable Crops*. M. J. Basset et AVI publishing Co inc. Wesport Connecticut (USA): 67-133.
- 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.
- Gvozdrenović, Đ.** (2010): *Paprika*. Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad.
- Hamada, H., Tomita, R., Iwadate, Y., Kobayashi, K., Munemura, I., Takeuchi, S., Hikichi, Y. and Suzuki, K.** (2007): Cooperative effect of two amino acid mutations in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* overcomes L (3)-mediated resistance in *Capsicum* plants. *Virus Genes*, 34 (2): 205-214.
- Haq, Q. M. R., Singh, B. P. and Srivastava, K. M.** (1996): Biological, serological and molecular characterization of a cucumber mosaic virus isolate from India. *Plant Pathol.* 45: 823-828.
- Harrington and Gibson** (1989): *Potato Research*, 32: 167.
- Harris and Bradley** (1973): *Virology*, 52: 295.

- Hayes, R. J. and Buck, K. W.** (1990): Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell*, 63: 363-368.
- Himmel, P. T.** (2003): *Tobacco mosaic virus*. Compendium of Pepper Diseases: 38-39.
- Hamada, H., Takeuchi, S., Kiba, A., Tsuda, S., Hikichi, Y., Okuno, T.** (2002): Amino Acid Changes in *Pepper mild mottle virus* Coat Protein That Affect L3 Gene-mediated Resistance in Pepper. *Journal of General Plant Pathology*, 68 (2): 155-162.
- Heinze, C., Letschert, B., Hristova, D., Yankulova, M., Kauadjouor, O., Willingmann, P., Atanassov, A. and Adam, G.** (2001): Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). *New Microbiology*, 24: 175-187.
- 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.
- Helgera P.R., Taborda, R., Docampo, D.M. and Ducasse, D.A.** (2001): Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *Journal of Virological Methods*, 95: 93-100.
- Henson, J. M. and French, R.** (1993): The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Plant Pathol.*, 31: 81-109.
- Holguín-Peña, R. J. and Rueda-Puente, E. O.** (2007): Detection of *Tomato spotted wilt virus* in tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, 91 (12): 1682.
- Holmes, F. O.** (1934): Inheritance of ability to localize tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 24: 637-642.
- Honda, Y. and Kameya-Iwaki, M.** (1991): Studies on plant virus disease control in Japan. *Proceedings of the Conference on Integrated Control of Plant Virus Diseases*, vol. 1, Taiwan: 13-19.

- Hsu, Y.H., Wu, C.W., Lin, B.Y., Chen, H.Y., Lee, M.F. and Tsai, C.H.** (1995): Complete genomic RNA sequences of cucumber mosaic virus strain NT9 from Taiwan. *Archives of Virology*, 140: 1841-1847.
http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/PopGenetics/Documents/Garcia_extra.pdf. Characterization of Evolutionary Potential of the Viruses Analyzed.
- <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/Tables/TableList.htm> Tables of Disease Resistant Varieties available for the following crops. Cornell University. Vegetable MD Online.
- Hu, J. S., Li, H. P., Barry, K., Wang, M. and Jordan, R.** (1995): Comparison of dot blot ELISA and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease*, 79: 902-906.
- Hull** (1969): *Adv. Virus Res.* 15: 365.
- Ignjatov, M., Gašić, K., Ivanović, M., Šević, M., Obradović, A., Milošević, M.** (2010): Karakterizacija sojeva *Xanthomonas euvesicatoria*, patogena paprike u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 25 (2): 139-149.
- Ikegashira, Y., Ohki, T., Ichiki, U., Higashi, T., Hagiwara, K., Omura, T., Honda, Y. and Tsuda, S.** (2004): An immunological system for the detection of *Pepper mild mottle virus* in soil from green pepper fields. *Plant Disease*, 88: 650-656.
- Iardi, V., Mazzei, M., Loreti, S., Tomassoli, L. and Barba, M.** (1995): Biomolecular and serological methods to identify strains of *Cucumber mosaic cucumovirus* on tomato. *EPPO Bull*, 25: 321-327.
- Im, K. H., Chung, B. K., Yoon, J. Y. and Green, S. K.** (1991): A survey on viruses infecting peppers (*Capsicum annuum*) in Korea by microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Plant Pathology*, 7: 251-256.
- Ivanović, M., Ivanović, D.** (2001): Mikoze i pseudomikoze. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- 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.

- Jain, R. K., Pappu, S. S., Pappu, H. R. and Culbreath, A. K.** (1998): Molecular diagnosis of *Tomato spotted wilt tospovirus* infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Disease*, 82 (8): 900-904.
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. and Malnoe, P.** (1997): Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of *Potato virus Y*. *Journal of General Virology*, 78: 3141-3145.
- Jarret, R. L., Gillaspie, A. G., Barkley N. A. and Pinnow D. L.** (2008): The Occurrence and Control of *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum Germplasm Collection. *Seed technology*. Vol. 30 (1): 26-36.
- Jasnić, S. M.** (1978): Proučavanje epidemiologije virusa mozaika paradajza na paprici. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, doktorska disertacija.
- Jaspars, E. M. J., Bos, L.** (1980): *Alfalfa mosaic virus*. CMV/AAB Description of Plant Viruses, No. 229.
- Jayasena, K. W. and Randles, J. W.** (2004): A short insert in the leader sequence of RNA 3L, a long variant of *Alfalfa mosaic virus* RNA3, introduces two unidentified reading frames. *Virus Genes*, 29 (3): 311-316.
- Jeffries** (1998) in *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm* 19, p. 70, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations / International Plant Genetic Resources Institute.
- Jones, R. A. C.** (1990): Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with *Potyvirus* in potato cultivars. *Annals of Applied Biology*, 117: 93-105.
- Jorda, C., Ortega, A. and Juarez, M.** (1995): New hosts of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 79: 538.
- Jovanović, V.** (1946): Proizvodnja prerada i upotreba paprike, zadružnoizdavačko preduzeće Beograd, Poljoprivredna biblioteka: 1-43.
- Jovićević, D., Gvozdenović, Đ., Bugarski., D.** (2006): Bolesti paprike i paradajza. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 42: 333-344.

- Jung-Heon, H., Hong-Soo, C., Dong, H. K., Hung-Rul, L. and Byung-Dong, K.** (2006): Biological, Physical and Cytological Properties of Pepper mottle virus-SNU1 and Its RT-PCR Detection. *Journal of Plant Pathology*, 22 (2): 155-160.
- Kalman, D., Palkovics, L., Gáborjányi** (2001): Serological, pathological and molecular characterization of Hungarian Pepper mild mottle tobamovirus (PMMoV) isolates. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 36: 31-42.
- Kaper, J. M., Waterworth, H. E.** (1981): Cucumoviruses. In: Kurstak E. (ed.) *Handbook of plants virus infections*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, 257-332.
- Katis N., Gibson, R. W.** (1985): Transmission of potato virus Y by cereal sphids. *Potato Res.* 28(1): 65-75.
- Kerlan, Tribodet, Glais and Guillet** (1999): *Journal of Phytopathology* 147: 643.
- Kim, J. W., Sun, S. S. M. and German, T. L.** (1994): Disease resistance in tobacco and tomato plants transformed with the *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid gene. *Plant Disease*, 78: 615-621.
- Kirita, M., Akutsu, K., Watanabe, Y., Tsuda, S.** (1997): Nucleotide sequence of the Japanese isolate of Pepper mild mottle tobamovirus (TMV-P) RNA. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 63: 373-376.
- Knapp, E. and Lewandowski, D. J.** (2001): *Tobacco mosaic virus*, not just a single component virus anymore. *Molecular Plant Pathology*, 2 (3): 117- 123.
- Kogovšek, P., Gow, L., Pompe–Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N. and Ravnikar, M.** (2007): Development of a new method for distinguishing of PVY^{NTN} and PVY^N. Books of abstract of 8. Slovenian Conference on Plant Protection, Radenci, Slovenia: 63.
- Koike, S. T., Tian T. and Liu, H. Y.** (2010): First report of tobacco rattle virus in Spinach in California. *Plant Disease*, 94: 125-125.
- Koper-Zwarthoff, E. C., Lockard, R. E., Alzner-deWeerd, B., RajBhandary, U. L. and Bol, J. F.** (1977): Nucleotide sequence of 5' terminus of alfalfa mosaic virus RNA 4 leading into coat protein cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5504-5508.
- Kormelink, R., Peters, D. and Goldbach, R.** (1998): *Tomato spotted wilt virus*. CMI/AAB Description of plant viruses: 363.

- Kraal** (1975): Amino acid analysis of alfalfa mosaic virus coat proteins: an aid for viral strain identification. *Virology*, 66: 336-340.
- Krstić, B., Krnjaja, V., Mijatović, M., Tošić, M.** (1996): Virus blagog šarenila paprike prisutan u Srbiji. Zbornik kratkih sadržaja Prvog balkanskog simpozijuma Povrće i krompir: 164.
- Krstić, B., Vico, I., Dovas, C. I., Eythimiou, C., Katis, N. I. i Berenji, J.** (2002): Molekularna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor: 74.
- Krstić, B. i Vico, I.** (2004): Kontrola virusa mozaika krastavca u okvirima održive poljoprivrede. *Biljni lekar*, 5: 359-363.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N., Berenji, J.** (2005): Virus bronzavosti paradajza na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama na području Srbije. II Simpozijum o zaštiti bilja u Bsni i Hercegovini, Teslić: 15-16.
- Krstić, B., Bulajić, A. and Dukić, N.** (2005a): Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* and *Impatiens necrotic spot virus* in Serbia. Proceeding of Articles XXXth Meeting for Plant Protection in Republica Macedonia and Ist Congress of Plant Protection „Enviromental Concern and Food Safety”, Ohrid, Macedonia: 85-88.
- Krstić, B., Dukić, N., Vico, I., Bulajić, A. i Berenji, J.** (2005b): Principi kontrole virusa bronzavosti paradajza. Zbornik sažetaka Naučno-stručnog savjetovanja agronoma Republike Srpske „Poljoprivreda RS kao sastavni dio evropskih integracionih procesa”, Jahorina, BiH: 45.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B.** (2006a): Virus bronzavosti paradajza i virus nekrotične pegavosti *Impatiensa*. Zbornik predavanja Seminara pejzažne hortikulture, Banja Vrujci: 63-75.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B.** (2006b): Prisustvo fitopatogenih virusa u pošiljkama cveća iz uvoza i u domaćoj proizvodnji. Zbornik predavanja Seminara pejzažne hortikulture, Banja Vrujci: 57-62.

- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N., Duduk, B. i Berenji, J.** (2006c): Integralna zaštita duvana od virusa bronzavosti paradajza. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 79: 49-60.
- Krstić, B., Vico, I., Berenji, J., Dukić, N. i Bulajić, A.** (2006d): Opšti principi kontrole virusnih oboljenja duvana sa posebnim osvrtom na virus mozaika duvana. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 42: 401-412.
- Krstić, B. i Bulajić, A.** (2007): Karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru. Poljoprivredni fakultet, Beograd, i Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS, Beograd.
- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I.** (2007a): Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea IV simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić: 13.
- Krstić, B., Bulajić, A. and Đekić, I.** (2007b): The Tospoviruses in greenhouse tomato and ornamental crops in Serbia. Abstracts book of 5th Balkan Congress for Microbiology, Budva, Montenegro: 133.
- Krstić, B. i Bulajić, A.** (2008): Ekonomski značajni i karantinski virusi paprike u Srbiji. Zbornik radova IX savetovanja "Savremena proizvodnja povrća". Novi Sad: 24-28.
- Krstić, B., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J.** (2008): Virus bronzavosti paradajza-jedan od najdestruktivnijih biljnih virusa. Pesticidi i fitomedicina, 23: 153-166.
- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I.** (2008a): Virus bronzavosti paradajza (virus pegavog uvenuća paradajza) i *Tomato spotted wilt virus*, TSWV–Standardna operativna procedura za fitopatološke dijagnostičke laboratorije. Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Beograd.
- Kucharek, T., Brown, L., Johnson, F. and Funderburk, J.** (2000): Tomato spotted wilt virus of agronomic, vegetable and ornamental crops. Plant Pathology Fact Sheet. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. <http://plantpath.ifos.ufl.edu/takextpub/FactSheet/circ0914.pdf>

- Kuhlmann, U., Sarkar, S. and Rohde, W.** (1993): Capsid protein gene sequences of four tobacco mosaic virus strains defective for virus assembly. *Nucleic Acids Res.* 21 (14): 3325.
- Lamb E. M., Adkins S., Shuler K. D. and Roberts P. D.** (2008): Pepper Mild Mottle Virus, University of Florida, IFAS Extension.
- Law, M. D., Speck, J. and Moyer, J. W.** (1992): The M RNA of impatiens necrotic spot Tospovirus (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization, *Virology*, 188: 732-741.
- Legnani, Gebre Selassie, Nono Womdim, Gognalons, Moretti, Latterot and Marchoux** (1995): *Euphytica*, 86: 219.
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D., Willingmann, P. and Heinze, C.** (2002): Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods*, 106 (1): 1-10.
- Lewandowski, D. J.** (1999). Genus *Tobamovirus*. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego: 889–894.
- Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A., Jiminez, M. and Falk, B. W.** (2003): Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 84 (1): 249-258.
- Liu, Y., Zhou, X., Xue, C. and Li, D.** (1999): Sequence Analysis and expression in *E. coli* of coat protein gene of cucumber mosaic virus isolate infecting *Phaseolus angularis*. *Nong Ye Sheng Wu Ji Shu Xue Bao*, 7: 51-54.
- Liu, Y. Y., Yu, S. L., Lan, Y. F., Zhang, C. L, Hou, S. S., Li, X. D., Chen, X. Z., Zhu X. P.** (2009): Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China. *Acta virologica*, 53: 89-97.
- Lojek and Orlob** (1969): *Science* 164: 1407.

- 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 (6): 1055-1074.
- Lovato, F., Nagata, T., Resende, R., Ávila A. and Inoue-Nagata A.** (2004): Sequence Analysis of the Glycoproteins of *Tomato Chlorotic Spot Virus* and *Groundnut Ringspot virus* and Comparison with other Tospoviruses. *Virus Genes*, 29 (3): 321-328.
- Love, P. G.** (2005): *Tomato spotted wilt virus* in tobacco. www.ces.ncsu.edu/robenson/agriculture/tospotwiltvirus.pdf.
- Luis-Artega and Ponz, F.** (2003): Potato virus Y. *Compendium of Pepper Diseases*.
- Maki-Valkama, T., Valkonen, J. P., Kreuze, J. F. and Pehu, E.** (2000): Transgenic resistance to PVY(O) associated with post-transcriptional silencing of P1 transgene is overcome by PVY(N) strains that carry highly homologous P1 sequences and recover transgene expression at infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (4): 366-373.
- 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.
- Marchoux, G., Gebre-Selassie, K. and Villeveille, M.** (1991): Detection of *Tomato spotted wilt virus* and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology*, 40: 347-351.
- 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.
- Maris, P. C., Joosten, N. N., Goldbach, R. W., Peters, D.** (2003): Restricted Spread of *Tomato spotted wilt virus* in Thrips-Resistant Pepper. *Phytopathology*, 93 (10): 1223-1227.

- Marković, M.** (2004): Tehnologija proizvodnje i standardi kvaliteta začinske paprike. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 40: 335-342.
- Marković, V., Vračar, Lj.** (1998): Proizvodnja i prerada paprike. Feljton d.o.o. Novi Sad.
- Marte, M. and C. Wetter.** (1986): Occurrence of *Pepper mild mottle virus* in pepper cultivars from Italy and Spain. Journal of Plant Disease and Protection, 93: 37-43.
- Martínez-Ochoa, N., Langston, D. B., Mullis, S.W., Flanders, J. T.** (2003). First Report of Pepper mild mottle virus in jalapeno Pepper in Georgia. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-1223-01-HN.
- Matthews, R. E. F.** (1979): Classification and nomenclature of viruses. 3rd report of the International Committee on Taxonomy on Viruses. Intervirology, 12: 131-296.
- Mavrič, I. and Ravnikar, M.** (2001): First report of Tomato spotted wilt virus and Impatiens necrotic spot virus in Slovenia. Plant Disease, 85 (12): 1288.
- Mayer, A.** (1886): Ueber die Mosaikkrankheit des Yabasks. Landwirtsch. Versuchsstationen, 32: 557-578.
- McDonald and Singh** (1996): American Potato Journal 73: 317.
- McGarvey, P., Tousignant, M., Geletka, L., Cellini, F. and Kaper, J. M.** (1995): The complete sequence of a cucumber mosaic virus from Ixora that is deficient in the replication of satellite RNAs. Journal of General Virology, 76 (9): 2257-2270.
- McKinney, H. H.** (1952): Two strains of tobacco mosaic virus one of which is seed borne in an etch-immune pengent pepper. Plant Disease Rep. 36, 184-187.
- Merkulov L., Gvozdrenović, Đ., Krstić, B., Krstić, L.** (2000): Uporedna anatomska analiza perikarpa nekih sorti paprike (*Capsicum annuum* L.), Zbornik radova, PMF, Serija za biologiju, 29: 48-56.
- Milošević, D.** (1989): Rasprostranjenost nekih virusa krompira na području Zapadne Srbije. Zaštita bilja, 189: 367-374.
- Milošević, D.** (1992): Occurence of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY) in some localities in Serbia. Zaštita bilja, 201: 197-202.
- Mijatović, M.,** (1986): Reakcija nekih sorata paprike prema virusu mozaika duvana. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Mijatovic, M.**, (1995): Proučavanje otpornosti paprike prema virusu mozaika duvana. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M., Stevanović, D.** (1999): Rasprostranjenost i intenzitet pojave nekih virusa parazita paprike u Srbiji. *Zaštita bilja*, 50: 151-159.
- Mijatović, M., Ivanović, M., Obradović, A., Zečević, B.** (2002): *Potato virus Y* (PVY) on pepper in Serbia. *Acta Horticulturae*, 579: 454-549.
- Mijatovic, M., Zecevic, B., Ivanovic, M., Obradovic A.** (2005): Diseases of pepper in Serbia and results of breeding for resistance. *Folia horticulturae. Ann.* 17/2: 53-60.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M.** (2007): *Zaštita povrća*. AgroMivas, Smederevska Palanka.
- Mijatović M.** (2011): *Zaštita rasada* <http://www.poljoberza.net/AutorskiTekstoviJedan.aspx?ime=MM001.htm&autor=6>
- Milne** (1988) in *The Plant Viruses*, vol.4, The filamentous plant viruses, p. 333, ed. R. G. Milne, New York: Plenum Press.
- Mnari-Hattab, M., Ezzaier, K. and Hamza, N.** (2006): Sequence analysis of a Tunisian isolate of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) that overcomes *L1* and *L2* resistance genes of pepper in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection* 1: 65-71.
- Moreira, S. R., Colariccio, A., Eiras, M., Chaves, A. L. R. and Galleti, S. R.** (2003): Characterization of the Tomato mosaic virus infecting tomato in Sao Paulo State, Brazil. *Fitopatol. Bras.* 28: 602-607.
- 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 General Virological*, 83 (10): 2563-2573.
- 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.** (1996): The biology of Tospoviruses. *Annals of Applied Biology*, 128: 159-183.

- 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., Walsh, K., Barker, I. and Boonham, N.** (2000): Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90: 448–453.
- Nagai, Y.** (1981): Control of mosaic disease of tomato and sweet pepper caused by *Tobacco mosaic virus*. *Spec. Bull. Chiba. Agric. Exp. Stn.*, 9: 1-109.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Smid, H. M., Goldbah, R., Peters, D.** (1999): Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *Journal of General Virology*, 80: 507-515.
- Nagata, T., Carvalho, K. R., Sodr e, R. D. A., Dutra, L. S., Oliveira, P. A., Noronha, E. F., Lovato, F. A., Resende, R. O., Ávila, A. C. and Inoue-Nagata, A. K.** (2007): The glycoprotein gene of *Chrysanthemum stem necrosis virus* and *Zucchini lethal chlorosis virus* and molecular relationship with other tospoviruses. *Virus Genes*, 35 (3): 785-793.
- Naidu, R. A., Hu, C. C., Pennington, R. E. and Ghabrial, S. A.** (1995): Differentiation of eastern and western strains of peanut stunt cucumovirus based on satellite RNA support and nucleotide sequence homology. *Phytopathology* 85: 502-507.
- Nie, X. and Singh, R. P.** (2002): Probable geographical grouping of PVY^N and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. *Journal of Virological Methods*, 103: 145-156.
- Nie, X. and Singh, R. P.** (2003): *Virus Genes*, 26: 39.
- Nischwitz, C., Pappu, H. R., Mullis, S. W., Sparks, A. N., Langston, D. B., Csinos, A. S. and Gitaitis, R. D.** (2007): Phylogenetic analysis of *Iris yellow spot virus* isolates from onion (*Allium cepa*) in Gorgia (USA) and Peru. *Journal of Phytopathology*, 155: 531-535.

- Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. and Kubo, S.** (1988): Inoculation with RNAs I and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *Journal of General Virology*, 69: 2695-2700.
- Noel, M. J. and Ben Tahar, S.** (1989): Nucleotide sequence of the coat protein gene and flanking regions of Cucumber Mosaic Virus (CMV) strain I17F. *Nucleic Acids Res.* 17 (24): 10492.
- 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** (2008): EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. EPPO standard PM 5/3 (2). <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>
- Ogawa T., Tomitaka Y., Nakagawa A., 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.
- Ohshima, Sako, Hiraishi, Nakagawa, Matsuo, Ogawa, Shikata and Sako** (2000): Plant Disease, 84: 1109.
- Oka, N., Ohki, T., Honda, Y., Nagaoka, K. and Takenaka, M.** (2008): Inhibition of *Pepper mild mottle virus* with Commercial Cellulases, *Journal of Phytopathology*, 156: 65-67.
- Oliveira, L. M., Inoue-Nagata A. K. and Nagata T.** (2010): Complete genome nucleotide sequence of Pepper mild mottle virus isolated in the Federal District, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 35 (6): 373-376 .
- Owens, J. and Palukaitis, P.** (1988): Characterization of *Cucumber mosaic virus*. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology*, 69: 496-502.

- Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S. F. and Palukaitis, P.** (1990): Nucleotide sequence and evolutionary relationships of *Cucumber mosaic virus* (CMV) strains, CMV RNA 3. *Journal of General Virology*, 71: 2243-2249.
- Ozaslan, M., Bas, B., Aytakin, T. and Sıgırcı, Z.** (2006): Identification of pepper viruses by Das-ELISA assays in gaziantep-Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 5: 11-14.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., and Francki, R. I. B.** (1992): *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.*, 41: 281-349.
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M.** (1997): Replicase-mediated resistance to plant virus diseases. *Advances in Virus Research*, 48: 349-377.
- Palukaitis, P. and García-Arenal, F.** (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62: 242-323.
- Pang, S. Z., Nagpala, P. G., Wang, M., Slightom, J. L. and Gonsalves, D.** (1992): Resistance to heterologous isolates of *Tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology*, 82: 1223-1229.
- Panjan, M., Prpić, Z.** (1955): O jednoj varijanti mozaika duvana izolovanog sa paprike. *Arhiv za poljoprivredne nauke*, VIII, 19: 3-9.
- 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 (2): 169-177.
- 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 (5): 1035-45.
- Parrella, G., Lanave, C., Marchoux, G., Finetti-Sialer, M. M., Di Franco, A. and 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.

- 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.
- Pares, R .D. (1985):** A tobamovirus infecting *Capsicum* in Australia. *Ann. Appl. Biol.* 106: 469-474.
- Perry, K. L., Habili, N., Dietzgen, R. G. (1993):** A varied population of cucumber mosaic virus from peppers. *Plant Pathology*, 42: 806-810.
- Perry, K. L., Zhang, L., Shintaku, M. H. and Palukaitis, P. (1994):** Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology*, 205: 591-595.
- Perry, K. L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998):** Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, 242: 204-210.
- 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 prouzrokovatelj sistemične zaraze *Petunia x hybrida*. *Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja*, Zlatibor: 131-132.
- Petrović, D. (2008):** Rasprostranjenost virusa pasulja u Vojvodini. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Pešić, Z. and Hiruki, C. (1986):** Different rates Alfalfa mosaic virus incidence in seed coat and embryo of alfalfa seed. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 39-42.
- Plyusnin, A., Beaty, B. J., Elliott, R. M., Goldbach, R., Kormelink, R., Lundkvist, A., Schmaljohn, C. S. and Tesh, R. B. (2011):** Bunyaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier: 725-741.

- Pringle, C. R.** (1999). Virus taxonomy. The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998 [news]. *Archives of Virology*, 144: 421-429.
- Qiu, W. P., Geske, S. M., Hickey, C. M. and Moyer, J. W.** (1998): *Tomato spotted wilt tospovirus* genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology*, 244: 186-194.
- 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.
- Raj, S. K., Kumar, S., Snehi, S. K. and Pathre, U.** (2008): First Report of *Cucumber mosaic virus* on *Jatropha curcas* in India. *Plant Disease*, 92 (1): 171.
- Ravelonandro, M., Pinck, M. and Pinck, L.** (1984): Complete nucleotide sequence of RNA 3 from alfalfa mosaic virus, strain S. *Biochimie* 66 (5): 395-402.
- Reichel, H., Marino, L., Kummert, J., Belalcazar, S. and Narvaez, J.** (1996): Caracterizacion del gen de la proteina de la capsida de dos aislamientos del virus del mosaico del pepino (CMV), obtenidos de platano y banano (*Musa* spp.). *Revista Corpoica* 1: 1-5.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. and Dunez, J.** (1996): Frequent occurrence of recombinant *Potyvirus* isolates. *Journal of General Virology*, 77: 1953-1965.
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R.** (1992): Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction, *Journal General Virology*, 73: 2099-2103.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Delbart, F.** (1989): Nucleotide sequence of *Potato virus Y* (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, 70: 935-947.
- Robinson, D. J.** (1992): Detection of *Tobacco rattle virus* by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 40: 57-66.
- Rodriguez-Alvarado, G., Kurath, G., Dodds, J. A.** (1995): Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Disease*, 79: 450-455.

- 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.
- Roossinck, M. J.** (2002): Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses; J. Virol. 76: 3382-3387.
- Roossinck, M. J., Zhang, L. and Hellward, K.** (1999): Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. J. Virol. 76: 6752-6758.
- Rusevski, R.** (2001): Virus bronzavosti paradajza-patogen paprike u Makedoniji. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Salanki, K., Thole, V., Balazs, E. and Burgyan, J.** (1994): Complete nucleotide sequence of the RNA 3 from subgroup II of cucumber mosaic virus (CMV) strain: Trk7. Virus Res. 3: 379-384.
- Salazar, Bartolini and Flores** (2000): Fitopatologia, 35: 87.
- Salm, S. N, Rey, M. E, Rybicki, E. P.** (1996). Phylogenetic justification for splitting the Rymovirus genus of the taxonomic family Potyviridae. Archives of Virology, 141: 2237-2242.
- Schmelzer, Schmidt and Beczner** (1973): Biol. Zbl. 92: 211.
- 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.
- Selassie, G. K., Marchoux, G., Delecolle, B. and Pochard, E.** (1985): Variabilite naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sudla France. Characterization et classification en pathotypes. Agronomie, 5 (7): 621-634.
- Sepulveda, P., Larrain, P., Quiroz, C., Rebufel, P. and Grana, F.** (2005): Identification and incidence of pepper viruses in north central Chile and its association with vectors. Agricultura Tecnica, 65: 235-245.
- Sevik, M. A.** (2011): Occurrence of pepper mild mottle virus in greenhousegrown pepper (*Capsicum annuum* L.) in the West Mediterranean region of Turkey. African Journal of Biotechnology, 10 (25): 4976-4979.

- Shew, H. D. and Lucas, G. B.** (1991): *Compendium of Tobacco Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Shintaku, M.** (1991): Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *Journal of General Virology*, 72 (10): 2587-2589.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. and Brunt, A. A.** (1994): *The Potyviridae*, CAB International, Wallingford, UK.
- Sialer, M. M., Cillo, F., Barbarossa, L. and Gallitelli, D.** (1999): Differentiation of *Cucumber mosaic virus* subgroups by RT-PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 81: 145-148.
- Sidaros, S. A., El-Kewey S. A., Hala A. Amin, Eman. A. H. Khatab, Emeran, A. A., El-Khalik, S. A. and El-Kady, M. A. S.** (2009): Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding the Coat Protein of an Egyptian Isolate of Pepper mild mottle virus. 5 (2): 109-118.
- 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 Tosopoviruses. *Archives of Virology*, 146: 1267-1281.
- Silva, R. M., Souto, E. R., Pedroso, J. C., Arakava, R., Almeida, Á. M. R., Barboza, A. A. L. and Vida, J. B.** (2008): Detection and Identification of TMV Infecting Tomato Under Protected Cultivation in Paraná State. *Brazilian archives of biology and technology* 51 (5): 903-909.
- 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: 133-134.
- Singh, McLaren, Nie and Singh** (2003): *Plant Disease* 87: 679.
- 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 (6): 428-464.
- Službeni glasnik Republike Srbije** (2010): Pravilnik o utvrđivanju lista karantinski štetnih organizama, 7/2010.

- Soler, S., Diez, M. J., Rosello, S., Nuez, F.** (1999): Movement and distribution of Tomato spotted wilt virus in resistant and susceptible accessions of *Capsicum* spp. Canadian Journal of Plant Pathology, 21: 317-325.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B.** (2011): 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. and Krstić, B.** (2011a): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. Plant Disease, 95 (2): 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 (6): 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 (1): 150.
- Stoimenova, E. and Yordanova, A.** (2005): Tobamovirus strain P101 isolated from pepper in bulgaria. Biotechnol. & Biotechnol. Eq.: 30-35.
- Stryer and Lubert** (1988). Biochemistry. San Francisco: W.H. Freeman.
- Sudarsono, S. L., Nurhayati, E. and Suseno R.** (1998): Mixed infection among TMV, PVY and CMV. Capsicum and Egg plant Newsletter, 17: 11-14.
- Svoboda, J., Červená, G., Rodová, J. and Jokeš, M.** (2006): First Report of *Pepper mild mottle virus* in Pepper Seeds Produced in the Czech Republic. Plant Protect. Sci., 42 (1): 34–37.
- Szilassy, D., Sala' nki, K. and Bala' zs, E.** (1999): Molecular Evidence for the existence of two distinct subgroups in Cucumber mosaic cucumovirus. Virus Genes 18: 221-227.
- Šutić, D.** (1959): Die Rolle des Paprikasamens bei der Virusübertragung. Phytopath. Ztschrift. Bd. 36, Hf. 1: 84-93.
- Šutić, D., Tošić, M., Pešić, Z.** (1978): Virus mozaika duvana prouzrokoval nekroze paprike. Zaštita bilja, 146: 309-315.

- Šutić, D.** (1982): Viroze biljaka. Beograd: Nolit.
- Šutić, D.** (1995): Viroze biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Politop-P, Beograd.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T.** (2002): Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters*, 532 (1–2): 75-79.
- Takehita, M. and Takanami, Y.** (1997): Complete nucleotide sequences of RNA3s of cucumber mosaic virus KM and D8 strains. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 42: 27-32.
- Takeuchi, S., Hamada, H., Toyoda, K., Suzuki, K., Kiba, A., Hikichi, Y. and Okuno, T.,** (2005): Discrimination between tobamoviruses and their pathotypes for L-gene-mediated resistance in green pepper (*Capsicum annuum* L.) by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 60-67.
- 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.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyan, J. and Balazs, E.** (1993): Cloning and sequencing of *Potato virus Y* (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123 (2): 149-156.
- Thole, V., Miglino, R. and Bol, J. F.** (1998): Amino acids of alfalfa mosaic virus coat protein that direct formation of unusually long virus particles. *Journal of General Virology*, 79 (12): 3139-3143.
- Thomas-Carroll, M. L., Jones, R. A. C.** (2003): Serological, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of *Tomato spotted wilt virus* in pepper. *Annual applied of Biology*, 142: 235-243.
- 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.
- Timmerman-Vaughan, G. M., Pither-Joyce, M. D., Cooper, P. A., Russell, A. C., Goulden, D. S., Butler, R. C. and Grant, J. E.** (2001): Partial Resistance of Transgenic Peas to Alfalfa Mosaic Virus under Greenhouse and Field Conditions. *Crop Sci.* 41 (3): 846-853.
- Todorović, B.** (1995): Prilog proučavanju izolata virusa crtičastog mozaika krompira. *Zaštita bilja*, 212: 111-119.
- 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: 114-115.
- Tomlinson** (1987): *Annals of Applied Biology* 110: 661.
- Tošić, M., Ivanović, M., Mitrović, G., Kršmanović, Ž. i Kojić, Z.** (1979): Prilog poznavanju viroza paprike u našoj zemlji. *Zaštita bilja*, 150: 335-343.
- Tsakiridis, J. P., Ivancheva-Gabrovska, T.** (1980): *Tomato Spotted Wilt Virus* on Tobacco. *Coresta Symp.*, Manila-Philippines: 1-32.
- 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.
- 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.
- Vance, V. B., Moore, D., Turpen, T. H., Bracker, A. and Hollowell, V. C.** (1992): The complete nucleotide sequence of pepper mottle virus genomic RNA: comparison of the encoded polyprotein with those of other sequenced potyviruses. *Virology* 191 (1): 19-30.
- Velasco, L., Janssen, D., Ruiz-Garcia, L., Segundo, E., Cuadrado, I. M.** (2002): The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay

- for a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *Journal of Virological Methods*, 106 (1): 135-40.
- Verhoeven, J. Th. J., Willemsen, T. M. and Roenhorst, J. W.** (2002): First report of *Pepper mottle virus* in tomato. *Plant Disease*, 86 (2): 186-186.
- Veselinov, E.** (1984): Pipera, Sofija.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji J., Jović, J., Krstić, B.** (2010): Zastupljenost, molekularna detekcija i identifikacija virusa mozaika krastavca u usevima tikava u Srbiji. X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor: 58-59.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., 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.
- Wahyuni W. S., Dietzen R. G., Handa, K. and Francki, R. I. B.** (1992): Serological and **biological** variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Pathology*, 41: 282-297.
- Wang, X., Liu, F., Zhou, G., Li, X. H. and Li, Z.** (2006): Detection and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* in China. *Journal of Phytopathology* 154: 755-757.
- Weidemann** (1988): *Potato Research* 31: 85.
- Wetter, C. and Conti, M.** (1988). *Pepper mild mottle virus*. CMI/AAB descriptions of plant viruses: no. 330: 4.
- Woodford, J. A. T.** (1992): Virus transmission by aphids in potato crops. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98 (2): 47-54.
- Xiang, B. C., Xie, H., Cui, X. M., Li, C., Liu, S. P., Xi, D. H. and Yin. Y. Q.** (1994): Isolating and identification of *Pepper mild mottle tobamovirus* in Xinjiang. *Chin. Journal of Virology*: 240-244.
- Xu, H. and Nie, J.** (2006): Identification, characterization and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in potato. *Phytopathology*, 96: 1237-1242.
- Yilmaz, M. A., Davis, R. F. and Varney, E. H.** (1983): Viruses on vegetable crops along the mediterranean coast of Turkey. *Phytopathology*, 73: 378.

- Yu, C., Wu, J. and 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.
- Yoshihiro, O., Kyoji, H., Hisashi, I., Shoichi, I. and Kei, A.** (2003): First report of *Pepper mottle virus* on *Capsicum annuum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 69: 348-350.
- Zaitlin, M.** (1999): Elucidation of the genom organization of *Tobacco mosaic virus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 354: 587-591.
- Zhou, X., Liu, Y., Xue, C. and Li, D.** (1999): Comparison on biology, serology and coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains. *Zi Ran Ke Xue Jin Zhan*, 9: 1254-1261.
- Zindović, J.** (2010): Molekularna karakterizacija izolata virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*) iz različitih domaćina i različitog geografskog porekla. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Zemun
- Zindović, J., Bulajić, A., Krstić, B., Ciuffo, M., Margaria, P. and Turina, M.** (2011): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on Pepper in Montenegro. *Plant Disease*, Vol. 95, 7: 882.
- Zitikaitė, I. and Samuitienė, M.** (2008): Identification and some properties of Alfalfa mosaic alfamovirus isolated from naturally infected tomato crop. *Biologija*, 54 (2): 83-88.
- Zitikaitė, I. and Samuitienė, M.** (2009): Detection and characterization of Cucumber mosaic virus isolated from sweet peppers. *Scientific works of the lithuanian institute of horticulture and lithuanian university of agriculture. Sodininkystė ir daržininkystė*, 28(3): 281-288.
- Zitter, T. A.** (1977): Epidemiology of aphid-borne viruses. *In: Harris, K.F. & K. Maramorosch, K. [eds.] Aphids as Virus Vectors.* Academic Press, New York.
- Zitter, T. A. and Florini, D.** (1984): VEGETABLE CROPS, Virus Diseases of Pepper , Fact Sheet Page: 736.00, COOPERATIVE EXTENSION • NEW YORK STATE • CORNELL UNIVERSITY,
http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Virus_Pepper.htm

Prilog 6. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence NC gena izolata TSWV i izolata iz GenBank baze podataka

	GU369723 Sr-603	JF303081_240-09	JF303080_236-09	GU369729 Is-56	GQ373173_53-05	GQ355467_33-06	FR693257 STM3B	FR693059 LYE46	FR693058 LYE40	FR693056 LYE183	FR693055 LAS2	GU369728 Is-367	GU355940 Is-278	GU355939 Is-288	GU339508 Is-246	GU339506 Is-141	DQ431238	DQ431237	DQ398945	AF020660	FR693256 SOO6	FR693063 LYEPO	FR693062 LYE89	FR693060 LYE47	FR693054 LaReunion	FR693048 CHM6	FR693046 CAA19	GU369722 P-240	GU369721 P-202/1	GU369719 I-186	GU339507 Is-228	AY744476 NC-1	AJ296601 8-Hip_96-12	AJ296599 C27084	
PL-60-09	100	100	100	100	100	100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6
PL-14-10	100	100	100	100	100	100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6
PL-35-09	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.7	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1

	D13926_47-1450	HQ260982_TSWV-Nwon	FR693061 LYE48	FR693057 LYE344	FR693052 France77	GU369716 Is-334	AY744478 NC-3	AJ418781 LE98/527	AJ418777 BS97	AJ297611 LE98/527	AJ297610 BS97	FR693049 CIE43	GU369725 T-1003	AY848922	GU369720 Miz-3	GU369717 Is-344	GQ373172_39-06	AY879107	AJ418780 GD98	AJ297609 GD98	AJ296602_20_Da96/1	AJ296598_97	FR693051 Dahlia	GU369724 Sr-759	AY879110 TSWV-1455	AY818321 TSWV-1439	AJ418779 DH37	GU369715 Is-279	AY818320 TSWV-1438	PL-60-09	PL-14-10	PL-35-09		
PL-60-09	100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	99.6	99.1	99.1	99.6	100	99.1	99.6	99.6	99.1	98.2	99.6	99.6	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7					
PL-14-10	100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	99.6	99.1	99.1	99.6	100	99.1	99.6	99.6	99.1	98.2	99.6	99.6	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	100				
PL-35-09	99.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.7	99.1	98.7	98.7	98.7	99.1	99.6	98.7	99.1	99.1	98.7	97.8	99.1	99.1	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	99.6	99.6			

Prilog 7. Proračun stepena nukleotidne identičnosti CP gena AMV izolata sa izolatima iz GenBank baze podataka

	FJ527749 196-08	HQ316637 Hz	AB451173 No.14	HQ185568 TN	M59241	HM807305 S-30	AF215664 NZ1	AY340071 NY-B 2002	L00162 120-785	P-10-10	P-27-09	PL-2-10
FJ527749 196-08												
HQ316637 Hz	99,6											
AB451173 No. 14	99,2	98,7										
HQ185568 TN	97,5	97	96,6									
M59241	99,2	98,7	98,3	97,5								
HM807305 S-30	98,7	98,3	98,7	96,1	98,7							
AF215664 NZ1	98,3	97,9	98,3	97,5	98,3	97,9						
AY340071 NY-B 2002	98,3	97,9	98,3	96,6	98,3	97	97,5					
L00162 120-785	99,2	98,7	98,3	96,6	98,3	97,9	98,3	98,3				
P-10-10	100	99,6	99,2	97,5	99,2	98,7	98,3	98,3	99,2			
P-27-09	98,7	98,3	98,7	97,9	98,7	97,5	98,7	98,7	97,9	98,7		
PL-2-10	99,6	99,2	98,7	97,9	98,7	98,3	98,7	97,9	98,7	99,6	99,2	

Prilog 8. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence CP gena izolata AMV i izolata iz GenBank baze podataka

	FJ527749 196-08	HQ316637 Hz	AB451173 No.14	HQ185568 TN	M59241	HM807305 S-30	AF215664 NZ1	AY340071 NY-B 2002	L00162 120-785	P-10-10	P-27-09	PL-2-10
FJ527749 196-08												
HQ316637 Hz	100											
AB451173 No. 14	100	100										
HQ185568 TN	100	100	100									
M59241	100	100	100	100								
HM807305 S-30	100	100	100	100	100							
AF215664 NZ1	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7						
AY340071 NY-B 2002	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	97,5					
L00162_120-785	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	98,7	98,7				
P-10-10	100	100	100	100	100	100	98,7	98,7	97,5			
P-27-09	100	100	100	100	100	100	98,7	98,7	97,5	100		
PL-2-10	100	100	100	100	100	100	98,7	98,7	97,5	100	100	

Prilog 9. Proračun stepena nukleotidne identičnosti CP gena PMMoV izolata sa izolatima iz GenBank baze podataka

	FR671383 P91/2	AY632863	AM411433	AM491598 Sz24	AM491596 Sz17	AM491595 Sz15	AM491594 Sz13	AM491601 Sz23	AB254821	AB126003	AB084456 P	GQ427044 MRS-PV3p-RP-22	GQ427043 MRS-PV3p-CyP-54	AB119482	AJ429088_202-675_PMMV1.2	L35074 10-483	FR671392 P98/15	AM491597 Sz20	AB276030	AB062049 PMMoV-Ge1	GQ427046 MRS-PV3p-CyP-55	P-60-09	P-3-10	P-57-09	
FR671383 P91/2																									
AY632863	100																								
AM411433	100	100																							
AM491598 Sz24	100	100	100																						
AM491596 Sz17	100	100	100	100																					
AM491595 Sz15	100	100	100	100	100																				
AM491594 Sz13	100	100	100	100	100	100																			
AM491601 Sz23	100	100	100	100	100	100	100																		
AB254821	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5																	
AB126003	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99																
AB084456 P	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	100															
GQ427044 MRS-PV3p-RP-22	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5														
GQ427043 MRS-PV3p-CyP-54	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	100													
AB119482	99	99	99	99	99	99	99	99	98,5	98,5	98,5	99	99												
AJ429088_202-675 PMMV1.2	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	100	100	99											
L35074 10-483	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	100	100	99	100										
FR671392 P98/15	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	99,5	99,5	98,5	99,5	99,5									
AM491597 Sz20	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	100	100	99,5	99,5	98,5	99,5	99,5	99								
AB276030	98	98	98	98	98	98	98	98	97,5	98,5	98,5	98	98	97	98	98	97,5	98,5							
AB062049 PMMoV-Ge1	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98	98	98	98,5	98,5	97,5	98,5	98,5	98	98	97,5						
GQ427046 MRS-PV3p-CyP-55	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	99,5	99,5	98,5	99,5	99,5	99	99	97,5	99					
P-60-09	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	100	100	99	100	100	99,5	99,5	98	98,5	99,5				
P-3-10	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	99,5	99,5	98,5	99,5	99,5	99	99	97,5	98	99	99,5			
P-57-09	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	99,5	99,5	98,5	99,5	99,5	99	99	97,5	98	99	99,5	100		

Prilog 10. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence CP gena izolata PMMoV i izolata iz GenBank baze podataka

	FR671383 P91/2	AY632863	AM411433	AM491598 Sz24	AM491596 Sz17	AM491595 Sz15	AM491594 Sz13	AM491601 Sz23	AB254821	AB126003	AB084456 P	GQ427044 MRS-PV3p-RP-22	GQ427043 MRS-PV3p-CyP-54	AB119482	AJ429088 202-675_PMMV1.2	L35074 10-483	FR671392 P98/15	AM491597 Sz20	AB276030	AB062049 PMMoV-Gel	GQ427046 MRS-PV3p-CyP-55	P-60-09	P-3-10	P-57-09	
FR671383 P91/2																									
AY632863	100																								
AM411433	100	100																							
AM491598 Sz24	100	100	100																						
AM491596 Sz17	100	100	100	100																					
AM491595 Sz15	100	100	100	100	100																				
AM491594 Sz13	100	100	100	100	100	100																			
AM491601 Sz23	100	100	100	100	100	100	100																		
AB254821	100	100	100	100	100	100	100	100																	
AB126003	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
AB084456 P	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
GQ427044 MRS-PV3p-RP-22	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
GQ427043 MRS-PV3p-CyP-54	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
AB119482	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
AJ429088 202-675_PMMV1.2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
L35074 10-483	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
FR671392 P98/15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
AM491597 Sz20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
AB276030	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5							
AB062049 PMMoV-Gel	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,5					
GQ427046 MRS-PV3p-CyP-55	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,5	100				
P-60-09	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,5	100	100			
P-3-10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,5	100	100	100		
P-57-09	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,5	100	100	100	100	

Prilog 11. Proračun stepena nukleotidne identičnosti RdRp gena PMMoV izolata sa izolatima iz GenBank baze podataka.

	AB276030 70-4908	AB254821 70-4908	AB126003 70-4908	AB550911 70-4908	AY859497 70-4908	EF061142 Tun-12_183	P-57-09	P-60-09	P-3-10
AB276030 70-4908									
AB254821 70-4908	99,7								
AB126003 70-4908	99,7	99,7							
AB550911 70-4908	97,5	97,5	97,5						
AY859497 70-4908	97,5	97,5	97,5	99,7					
EF061142 Tun-12_183	97,5	97,5	97,5	100	99,7				
P-57-09	99,4	99,4	99,4	97,1	97,2	97,1			
P-60-09	99,7	99,7	99,7	97,5	97,5	97,5	99,4		
P-3-10	99,4	99,4	99,4	97,1	97,2	97,1	100	99,4	

Prilog 12. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence RdRp gena izolata PMMoV i izolata iz GenBank baze podataka

	AB276030 70-4908	AB254821 70-4908	AB126003 70-4908	AB550911 70-4908	AY859497 70-4908	EF061142 Tun-12_183	P-57-09	P-60-09	P-3-10
AB276030 70-4908									
AB254821 70-4908	99,6								
AB126003 70-4908	99,2	99,6							
AB550911 70-4908	94,2	94,6	94,2						
AY859497 70-4908	94,2	94,6	94,2	99,2					
EF061142 Tun-12_183	94,2	94,6	94,2	100	99,2				
P-57-09	98,3	98,7	98,3	93,3	93,3	93,3			
P-60-09	99,2	99,6	99,2	94,2	94,2	94,2	98,3		
P-3-10	98,3	98,7	98,3	93,3	93,3	93,3	100	98,3	

Prilog 13. Proračun stepena homologije CP gena CMV izolata i izolata iz GenBank baze podataka prikazanih u filogenetskom stablu

	AJ585517 207	HM065509 151-08	HM065510 115-08	D10544	M98500	U32859	AJ006988 P1	AB004780 KM	DQ018286 Cas	AJ006990 RB	AF523340 113	D28780 Taiwan	Y16926 Tfn	D42079 C7-2	D49496 M48	AF127977 K	L36525 ABI	X89652	U31220 Oahu	U20219 Ixora	M21464	FJ621495 Simp2	AB006813 M2	AF063610 S	Z12818 Kin	AF127976 LS	L15336 trk7	AJ829770 MAD99/4	AJ829768 MAD96/1	X16386 I17F	AJ829776 MAD99/1	U43888	GQ340670 702-07	D10545 CMV-P6	PL-25-09	PL-52-09	PL-43-09							
AJ585517 207																																												
HM065509 151-08	99,4																																											
HM065510 115-08	99,2	99,2																																										
D10544	98,9	98,9	99,1																																									
M98500	97,4	97,4	97,6	97,4																																								
U32859	97,8	97,8	97,9	98,1	98,1																																							
AJ006988 P1	98,1	98,1	97,9	98,4	97,8	98,1																																						
AB004780 KM	97,1	97,4	97,3	97,4	96,8	97,8	97,8																																					
DQ018286 Cas	96,4	96,8	96,6	96,4	96,1	95,8	96,8	96,8																																				
AJ006990 RB	94,8	94,8	94,9	94,6	93,4	93,4	94,1	94,1	93,7																																			
AF523340 113	95,6	95,3	94,7	95,1	94,8	94,9	95,6	95,3	94,2	94,9																																		
D28780 Taiwan	95,1	95,1	94,2	94,9	94,2	94,8	95,1	95,1	93,7	94,8	99,5																																	
Y16926 Tfn	95,4	95,4	94,6	94,9	94,2	94,8	95,1	95,4	94,1	95,1	99,5	99,7																																
D42079 C7-2	93,7	94,3	93,9	93,6	94,1	93,8	94,1	94,1	92,7	93,2	94,9	94,6	94,6																															
D49496 M48	91,8	92,5	92	92,3	91,1	91,4	91,8	92,2	91,4	90,9	91,4	91,2	91,6	91,3																														
AF127977 K	94,1	94,8	93,9	93,9	93,2	93,7	94,1	94,1	93	92,9	94,2	94,4	94,8	94,3	94,2																													
L36525 ABI	93,7	94,1	93,2	93,2	92,9	93	93,4	93,4	92,5	93,2	94,3	94,4	94,8	94,6	93,2	97,9																												
X89652	91,7	91,7	91,1	90,8	90,9	90,9	90,6	91,1	89,6	92	92,7	92,9	93,2	92	89,7	91,8	92,2																											
U31220 Oahu	90	90	89,4	89,8	89,5	89,6	90,5	89,8	88,7	92	91,1	91,3	91,6	90,4	87,2	91,3	90,8	88																										
U20219 Ixora	92,3	92,3	92,1	91,8	91,4	91,6	91,9	92,3	90,3	93,5	93,2	93,4	93,7	92,7	90,3	93,4	93,4	92,9	91,8																									
M21464	71,8	72,7	72	72,3	72,8	72,5	72,7	73,7	72,3	71,3	73,2	73,4	73,9	72,6	70,3	74,1	73	70,9	70,4	70,8																								
FJ621495 Simp2	71,3	72,2	71,5	71,8	72,3	72	72,2	73,2	71,8	70,9	72,7	73	73,4	72,1	69,8	73,6	72,5	70,4	69,4	70,3	99,1																							
AB006813 M2	71,5	72,5	71,7	72	72,5	72,3	72,5	73,4	72	71,1	72,9	73,2	73,6	72,3	70	73,6	72,5	70,6	70,1	70,6	99,4	99,4																						
AF063610 S	70,6	71,5	70,8	71,1	71,1	71,3	71	72,5	70,6	69,6	71,5	71,8	72,3	70,9	68,8	72,4	71,3	69,1	68,7	69,1	98,4	98,4	98,7																					
Z12818 Kin	70,8	71,8	71	71,3	71,8	71,6	71,8	72,7	71,6	70,6	72,3	72,5	73	71,6	69,6	73,4	72,7	70,6	70,1	70,6	99,1	99,1	99,4	98,4																				
AF127976 LS	71,3	72,2	71,5	71,8	72,3	72	72,2	73,2	71,8	70,9	72,7	73	73,4	72,1	69,8	73,6	72,5	70,4	69,9	70,3	99,5	99,5	99,5	98,6	99,2																			
L15336 trk7	70,1	71,1	70,4	70,6	71,1	70,9	71,1	72,1	70,6	69,7	71,6	71,8	72,3	70,9	68,6	72,5	71,4	69,2	69,2	98,6	98,4	98,7	97,8	98,4	98,7																			
AJ829770 MAD99/4	99,5	99,2	99,4	98,7	97,6	97,9	97,9	97,3	96,3	94,6	95,1	94,6	94,9	93,9	91,8	93,9	93,6	91,7	89,8	92,5	72,2	71,7	72	71	71,3	71,7	70,6	100																
AJ829768 MAD96/1	99,5	99,2	99,4	98,7	97,6	97,9	97,9	97,3	96,3	94,6	95,1	94,6	94,9	93,9	91,8	93,9	93,6	91,7	89,8	92,5	72,2	71,7	72	71	71,3	71,7	70,6	100	100															
X16386 I17F	99,5	99,2	99,4	98,7	97,6	97,9	97,9	97,3	96,3	94,6	95,1	94,6	94,9	93,9	91,8	93,9	93,6	91,7	89,8	92,5	72,2	71,7	72	71	71,3	71,7	70,6	100	100	100														
AJ829776 MAD99/1	99,5	99,2	99,4	98,7	97,6	97,9	97,9	97,3	96,3	94,6	95,1	94,6	94,9	93,9	91,8	93,9	93,6	91,7	89,8	92,5	72,2	71,7	72	71	71,3	71,7	70,6	100	100	100	100													
U43888	99,1	98,7	98,9	98,6	97,8	97,8	98,1	97,1	96,1	94,8	95,3	94,8	95,1	94,1	92	93,7	93,7	91,8	90	92,7	72,7	72,2	72,5	71	71,8	72,2	71,1	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5											
GQ340670 702-07	99,5	99,5	99,4	98,7	97,6	97,9	97,9	97,3	96,3	94,6	95,1	94,9	95,3	94,1	92	94,2	93,9	91,8	90,2	92,8	72,2	71,8	72	71	71,3	71,8	70,6	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,2										
D10545 CMV-P6	99,2	98,9	98,7	98,4	96,9	97,6	97,6	96,9	95,9	94,6	94,7	94,6	94,9	93,6	91,6	94,2	93,9	91,1	90,2	92,5	71,5	71	71,3	70,3	70,6	71	69,9	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,6	99,1										
PL-25-09	99,5	99,5	99,1	98,7	97,3	97,6	97,9	96,9	96,3	94,9	95,1	94,9	95,3	93,7	92	94,2	93,9	91,8	90,5	92,8	72	71,5	71,7	70,8	71	71,5	70,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	98,9	99,7	99,1									
PL-52-09	99,5	99,2	99,7	99,1	97,3	97,6	97,9	96,9	96,6	95,3	95,1	94,6	94,9	93,6	92	93,9	93,6	91,1	89,8	92,1	71,8	71,3	71,5	70,6	70,8	71,3	70,1	99,4	99,4	99,4	99,4	98,9	99,4	99,1	99,4									
PL-43-09	99,4	99,4	99,5	99,2	97,4	97,8	98,1	97,1	96,8	94,8	94,9	94,4	94,7	93,7	92,2	94,1	93,4	90,9	89,6	91,9	72,2	71,8	72	71	71,3	71,8	70,6	99,2	99,2	99,2	99,2	98,7	99,2	98,9	99,2	99,5								

Prilog 14. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence CP gena izolata CMV i izolata iz GenBank baze podataka uključenih u filogenetsko stablo

	AJ585517 207	HM065509 151-08	HM065510 115-08	D10544 CMV-FC	M98500 PR36	U32859	AJ006988 P1	AB004780 KM	DQ018286 Cas	AJ006990 RB	AF523340 113	D28780 NT9	Y16926 Tfn	D42079 C7-2	D49496 M48	AF127977 K	L36525 ABI	X89652 pCP25	U31220 Oahu	U20219 Ixora	M21464	FJ621495 Simp2	AB006813 M2	AF063610 S	Z12818 Kin	AF127976 LS	L15336 trk7	AJ829770 MAD9/4	AJ829768 MAD9/1	X16386 I17F	AJ829776 MAD9/1	U43888 Ban	GQ340670 702-07	D10545 CMV-P6	PL-25-09	PL-52-09	PL-43-09							
AJ585517 207																																												
HM065509 151-08	100																																											
HM065510 115-08	100	100																																										
D10544 CMV-FC	99,5	99,5	99,5																																									
M98500 PR36	99	99	99	98,5																																								
U32859	99	99	99	98,5	99																																							
AJ006988 P1	98,5	98,5	98,5	98,1	98,5	98,5																																						
AB004780 KM	99	99	99	98,5	99	99	99,5																																					
DQ018286 Cas	98,5	98,5	98,5	98,1	98,5	98,5	99	99,5																																				
AJ006990 RB	98,1	98,1	98,1	97,6	97,1	97,1	96,6	97,1	96,6	97,1																																		
AF523340 113	99	99	99	98,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1																																		
D28780 NT9	98,5	98,5	98,5	99	98,5	98,5	98,1	98,5	98,1	97,6	99,5																																	
Y16926 Tfn	99	99	99	98,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	100	99,5																																
D42079 C7-2	97,6	97,6	97,6	97,1	97,6	97,6	97,1	97,6	97,1	97,6	97,1	98,5																																
D49496 M48	93,2	93,2	93,2	92,7	93,2	93,2	92,7	93,2	92,7	93,2	94,2	93,7	94,2	93,7																														
AF127977 K	98,1	98,1	98,1	97,6	98,1	98,1	97,6	98,1	97,6	98,1	99	98,5	99	98,5	95,1																													
L36525 ABI	96,6	96,6	96,6	96,1	96,6	96,6	96,1	96,6	96,1	96,6	97,6	97,1	97,6	98,1	93,7	98,5																												
X89652 pCP25	95,1	95,1	95,1	94,7	95,1	95,1	94,7	95,1	94,7	96,1	96,1	95,6	96,1	94,7	91,7	96,1	94,7																											
U31220 Oahu	93,2	93,2	93,2	92,7	93,2	93,2	93,2	93,2	92,7	94,2	94,2	93,7	94,2	92,7	89,3	94,2	92,7	92,2																										
U20219 Ixora	95,6	95,6	95,6	95,1	95,6	95,6	95,1	95,6	95,1	96,6	96,6	96,1	96,6	95,1	92,7	96,6	95,1	95,1	92,7																									
M21464	81,6	81,6	81,6	81,1	81,6	81,6	82	82,5	82,5	80,6	81,6	81,1	81,6	80,6	79,1	81,6	80,1	81,1	76,2	80,1	80,1	80,1	100																					
FJ621495 Simp2	81,6	81,6	81,6	81,1	81,6	81,6	82	82,5	82,5	80,6	81,6	81,1	81,6	80,6	79,1	81,6	80,1	81,1	76,2	80,1	100	100																						
AB006813 M2	81,6	81,6	81,6	81,1	81,6	81,6	82	82,5	82,5	80,6	81,6	81,1	81,6	80,6	79,1	81,6	80,1	81,1	76,2	80,1	100	100																						
AF063610 S	80,6	80,6	80,6	80,1	80,6	80,6	81,1	81,6	81,6	79,6	80,6	80,1	80,6	79,6	77,7	80,6	79,1	80,1	75,2	79,1	97,6	97,6	97,6																					
Z12818 Kin	81,6	81,6	81,6	81,1	81,6	81,6	82	82,5	82,5	80,6	81,6	81,1	81,6	80,6	79,1	81,6	80,1	81,1	76,2	80,1	99,5	99,5	99,5	97,1																				
AF127976 LS	81,6	81,6	81,6	81,1	81,6	81,6	82	82,5	82,5	80,6	81,6	81,1	81,6	80,6	79,1	81,6	80,1	81,1	76,2	80,1	100	100	100	97,6	99,5																			
L15336 trk7	79,6	79,6	79,6	79,1	79,6	79,6	80,1	80,6	80,6	78,6	79,6	79,1	79,6	78,6	77,2	79,6	78,2	79,1	75,2	78,2	97,6	97,6	97,6	95,1	97,1	97,6																		
AJ829770 MAD9/4	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6																	
AJ829768 MAD9/1	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100																
X16386 I17F	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100	100															
AJ829776 MAD9/1	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100	100	100														
U43888 Ban	99,5	99,5	99,5	99	98,5	98,5	98,1	98,5	98,1	97,6	98,5	98,1	98,5	97,1	92,7	97,6	96,1	94,7	92,7	95,1	81,1	81,1	81,1	80,1	81,1	81,1	79,1	99,5	99,5	99,5	99,5													
GQ340670 702-07	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100	100	100	100	100	99,5											
D10545 CMV-P6	99	99	99	99	98,1	98,1	97,6	98,1	97,6	97,1	98,1	98,1	98,1	96,6	92,2	97,1	95,6	94,2	92,2	94,7	80,6	80,6	80,6	79,6	80,6	80,6	78,6	99	99	99	99	99	98,5	99										
PL-25-09	99,5	99,5	99,5	99	98,5	98,5	98,1	98,5	98,1	98,5	98,5	98,1	98,5	97,1	92,7	97,6	96,1	95,6	93,7	96,1	81,1	81,1	81,1	80,1	81,1	81,1	79,1	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99,5	98,5									
PL-52-09	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100	100	100	100	100	99,5	100	99	99,5								
PL-43-09	100	100	100	99,5	99	99	98,5	99	98,5	98,1	99	98,5	99	97,6	93,2	98,1	96,6	95,1	93,2	95,6	81,6	81,6	81,6	80,6	81,6	81,6	79,6	100	100	100	100	100	99,5	100	99	99,5	100							

Prilog 15. Proračun stepena homologije gena za P1 protein izolata PVY i izolata iz GenBank baze podataka prikazanih u filogenetskom stablu

	AF401600 N266	AF401601 N394	AF401603 SI 50	AF401604 SI 64	AF401605 N 5Yt	AF401606 N 27	AF401607 N Jg	AF401608 Tu 619	AF401609 Tu 660	AF401610 Tu 648	AJ245555 803	AJ245556 Viikki	AF248499 N-N242	X97895 605	AJ315739 Slovenial	AJ315744 California	AJ315746 Rusia	AJ315745 Canada	AJ315740 Ukraine	AJ315742 USA	AJ315743 Scotland	AJ890344 Ditta	AJ890348 Adgen	AJ439545 LYE84.2	AJ439544 SON41	AJ890345 Linda	AJ890347 Satina	GQ290475 D35-06	GQ290476 D7-06	AY884982 423-3	EF016294 v942490	AJ315747 English	M95491 Hungarian	PL-3-10	PL-15-09	PL-28-09				
AF401600 N266																																								
FF401601 N394	100																																							
AF401603 SI 50	92,2	92,2																																						
AF401604 SI 64	91,7	91,7	99,6																																					
AF401605 N 5Yt	93,9	93,9	91,1	90,9																																				
AF401606 N 27	99,4	99,4	91,9	91,4	93,9																																			
AF401607 N Jg	99,4	99,4	91,8	91,4	93,6	99,2																																		
AF401608 Tu 619	99	99	91,7	91,2	93,7	98,7	98,7																																	
AF401609 Tu 660	99,6	99,6	92	91,5	94	99,3	99,4																																	
AF401610 Tu 648	91,8	91,8	99,2	99	90,7	91,5	91,5	91,4	91,7																															
AJ245555 803	64,5	64,5	64,1	63,4	63,4	64,1	63,5	64,6	64,8	64,3																														
AJ245556 Viikki	65	65	64,9	64,1	63,9	64,6	64	65,1	65,3	65,1	98,5																													
AF248499 N-N242	91,2	91,2	98,9	98,7	90,1	90,9	90,9	90,7	91,1	98,6	63,2	64																												
X97895 605	91,5	91,5	99,2	99	90,4	91,2	91,2	91	91,4	98,9	62,6	63,4	98,9																											
AJ315739 Slovenial	91,5	91,5	99,4	99,9	90,7	91,2	91,2	91	91,4	98,9	63,1	63,9	98,6	98,9																										
AJ315744 California	99,2	99,2	92,5	92	94,2	99,2	98,9	99	99,6	92,2	64,6	65,1	91,5	91,8	91,8																									
AJ315746 Rusia	98,5	98,5	92	91,5	93,4	98,5	98,2	98	98,6	91,7	65,1	65,6	91,1	91,4	91,4	99																								
AJ315745 Canada	62,9	62,9	64,6	63,9	64,4	62,5	61,9	63	63,3	64,7	94,2	94,4	63,7	63,6	63,6	64	64,6																							
AJ315740 Ukraine	64	64	64,4	63,7	63,9	63,6	63	63,9	64,3	64,5	95,1	95,3	64,5	63,9	63,4	64,1	64,6	94,2																						
AJ315742 USA	64,5	64,5	65,9	65,2	64,4	64,1	63,5	64,6	64,8	65,9	95,3	95,4	65,5	64,9	64,9	65,6	66,1	96,1	95,6																					
AJ315743 Scotland	64,1	64,1	64,6	63,8	65,4	63,5	64	64,8	64,8	64,4	79,1	80,1	63,7	63,6	63,6	65	64,8	80,3	78,7	80,3																				
AJ890344 Ditta	91,5	91,5	99,4	99,3	90,4	91,2	91,2	91,1	91,4	98,9	63,4	64,2	98,6	98,9	99,2	91,9	91,4	63,9	63,7	65,2	64,2																			
AJ890348 Adgen	63,7	63,7	64	63,2	65	63,2	63,6	64,5	64,4	63,8	79,4	80,4	63	62,9	62,9	63,6	62,8	79,8	79	79,4	97,9	63,5																		
AJ439545 LYE84.2	61,8	61,8	62,5	62,2	61,8	61,2	61,7	62,6	62,5	62,2	79,6	79,8	62	62,5	61,9	61,7	62	77,8	79	77,6	81,5	62,5	82,5																	
AJ439544 SON41	61,4	61,4	62,4	61,5	63,3	60,8	61,3	61,7	61,6	61,6	79,1	79,7	61,4	61,8	61,3	60,8	61	77,9	78,9	79,3	82,7	61,9	82,8	87,1																
AJ890345 Linda	91	91	98,9	98,7	89,9	90,7	90,7	90,6	90,9	98,3	63,5	64,2	98	98,3	98,6	91,4	91,2	64	63,8	65,2	63,9	98,6	63,3	62,3	61,7															
AJ890347 Satina	91,3	91,3	99,3	99,2	90,2	91	91	90,9	91,2	98,7	63,1	63,9	98,5	98,7	99	91,7	91,2	63,4	63,4	64,9	63,3	99,3	62,7	62,2	61,5	98,5														
GQ290475 D35-06	91,7	91,7	99,6	100	90,9	91,4	91,4	91,2	91,5	99	63,4	64,1	98,7	99	99,9	92	91,5	63,9	63,7	65,2	63,8	99,3	63,2	62,2	61,5	98,7	99,2													
GQ290476 D7-06	91,5	91,5	99,4	99,9	90,7	91,2	91,2	91,1	91,4	98,9	63,1	63,9	98,6	98,9	99,7	91,9	91,4	63,7	63,5	64,9	63,9	99,2	63,3	62	61,3	98,6	99	99,9												
AY884982 423-3	91,8	91,8	99,4	99,3	91,1	91,5	91,5	91,4	91,7	98,9	63,6	64,4	98,6	98,9	99,2	92,2	91,7	64,1	63,9	65,4	64,6	99,4	63,7	62,5	61,8	98,6	99,3	99,3	99,2											
EF016294 v942490	91,8	91,8	99,4	99,9	91,1	91,5	91,5	91,4	91,7	98,9	63,1	63,9	98,6	98,9	99,7	92,2	91,7	63,6	63,9	64,9	63,6	99,2	62,9	62,5	61,3	98,6	99	99,9	99,7	99,2										
AJ315747 English	99,4	99,4	92,5	92	94,2	99,2	99	99,6	92,2	64	64,6	91,5	91,8	91,8	99,7	99	63,5	63,6	65,1	65	91,9	63,6	61,7	61,3	91,4	91,7	92	91,9	92,2	92,2										
M95491 Hungarian	90,7	90,7	98,5	98,9	90,9	90,4	90,4	90,2	90,6	97,9	62,4	63,2	97,6	97,9	98,7	91,1	90,6	62,9	62,7	64,2	63,7	98,5	62,5	61,5	61,4	97,6	98,3	98,9	98,7	98,5	98,7	91,1								
PL-3-10	91,2	91,2	98,9	99,3	90,1	90,9	90,9	90,7	91	98,3	62,6	63,4	98	98,3	99,2	91,5	91	63,6	62,9	64,4	63,1	98,6	62,4	61,9	60,7	98	98,5	99,3	99,2	98,6	99,2	91,5	98,2							
PL-15-09	91,7	91,7	99,6	100	90,9	91,4	91,4	91,2	91,5	99	63,4	64,1	98,7	99	99,9	92	91,5	63,9	63,7	65,2	63,8	99,3	63,2	62,2	61,5	98,7	99,2	100	99,9	99,3	99,9	92	98,9	99,3						
PL-28-09	91,5	91,5	99,4	99,9	90,7	91,2	91,2	91	91,4	98,9	63,1	63,9	98,6	98,9	99,7	91,8	91,4	63,6	63,4	64,9	63,6	99,2	62,9	61,9	61,3	98,6	99	99,9	99,7	99,2	99,7	91,8	98,7	99,2	99,9					

Prilog 17. Proračun stepena homologije NC gena TSWV izolata i izolata iz GenBank baze podataka prikazanih u filogenetskom stablu

	GQ355467 33-06	GQ373172 39-06	GQ373173 53-05	Z36882 T304	AY848922 T992	AY744480 SPAIN-2	AY744479 SPAIN-1	X94550 LC	AJ41879 DH37	AJ418777 BS97	AJ418778 10HK96	AJ297611 LE98/527	AF020660 TSWV-D	AY744476 NC-1	AY744478 NC-3	AY744477 NC-2	AF020659 TSWV-10	AJ296600 98/0472	EF059705 TSWV-GP	AJ296599 C27084	AF064469 AC	AF064472 MC	AB038342 Tospo-G	AB038341 Tospo-C	AB088385 Ordinary_strain	AY744468 CA-1	AY744471 CA-4	L20953 TSWV-BL	X61799 L	D00645 BR	PL-60-09	PL-35-09	PL-14-10		
GQ355467 33-06																																			
GQ373172 39-06	99																																		
GQ373173 53-05	100	99																																	
Z36882 T304	97,2	96,9	97,2																																
AY848922 T992	99	98,4	99	97,2																															
AY744480 SPAIN-2	97,4	97,1	97,4	98,6	97,4																														
AY744479 SPAIN-1	97,4	97,4	97,4	98,6	97,4	99,7																													
X94550 LC	97,1	96,7	97,1	98,2	97,1	99,4	99,4																												
AJ41879 DH37	98,9	98,2	98,9	96,7	98,6	96,9	96,9	96,6																											
AJ418777 BS97	99,2	98,6	99,2	96,7	98,6	96,9	96,9	96,6	98,4																										
AJ418778 10HK96	98,4	97,7	98,4	96,2	97,7	96,1	96,1	95,7	97,6	97,9																									
AJ297611 LE98/527	99,2	98,6	99,2	97,4	99,5	97,6	97,6	97,2	98,7	98,7	97,9																								
AF020660 TSWV-D	99,5	98,9	99,5	97,4	99,5	97,6	97,6	97,2	99	99	98,2	99,7																							
AY744476 NC-1	99,5	98,9	99,5	97,4	99,5	97,6	97,6	97,2	99	99	98,2	99,7	100																						
AY744478 NC-3	99,2	98,6	99,2	97,4	99,2	97,2	97,2	96,9	98,7	99	97,9	99,4	99,7	99,7																					
AY744477 NC-2	96,7	96,4	96,7	97,9	97,1	97,7	97,7	97,4	96,2	96,2	95,7	96,9	96,9	96,9	96,9																				
AF020659 TSWV-10	95,5	95,5	95,5	97,1	95,9	96,9	97,2	96,6	95	95	94,2	95,7	95,7	95,7	95,7	98,2																			
AJ296600 98/0472	98,2	97,6	98,2	96,1	97,9	96,2	96,2	95,9	97,4	97,7	97,2	97,7	98,1	98,1	97,7	95,6	94,3																		
EF059705 TSWV-GP	98,6	98,2	98,6	97,1	98,9	96,9	97,2	96,6	98,1	98,1	97,2	99	99	99	98,7	96,2	95,4	97,1																	
AJ296599 C27084	99,5	98,9	99,5	97,4	99,5	97,6	97,6	97,2	99	99	98,2	99,7	100	100	99,7	96,9	95,7	98,1	99																
AF064469 AC	96,7	96,4	96,7	97,9	97,1	97,7	97,7	97,4	96,2	96,2	95,7	96,9	96,9	96,9	96,9	99,7	98,2	95,6	96,2	96,9															
AF064472 MC	96,7	96,7	96,7	97,9	97,1	97,7	98,1	97,4	96,2	96,2	95,4	96,9	96,9	96,9	96,9	99	98,9	95,2	96,6	96,9	99														
AB038342 Tospo-G	97,4	97,1	97,4	96,7	97,4	96,9	96,9	96,6	96,9	96,9	96,1	97,2	97,6	97,6	97,2	96,6	95,4	96,2	96,6	97,6	96,6	96,2													
AB038341 Tospo-C	97,4	97,1	97,4	96,7	97,4	96,9	96,9	96,6	96,9	96,9	96,1	97,2	97,6	97,6	97,2	96,2	95,4	96,2	96,6	97,6	96,2	96,2	99												
AB088385 Ordinary_strain	97,6	97,2	97,6	96,7	97,2	96,7	96,7	96,4	96,7	97,1	96,3	97,1	97,4	97,4	97,1	96,1	95,2	96,4	96,4	97,4	96,1	96,1	98,9	99,2											
AY744468 CA-1	97,4	97,1	97,4	98,6	97,7	98,7	98,7	98,4	96,9	96,9	96,1	97,6	97,6	97,6	97,2	98,4	97,6	96,2	96,9	97,6	98,4	98,4	97,2	97,2	97,1										
AY744471 CA-4	97,6	97,2	97,6	98,4	97,6	98,6	98,6	98,2	97,1	97,1	96,2	97,4	97,7	97,7	97,4	98,2	97,4	96,4	96,7	97,7	98,2	98,2	97,4	97,4	97,2	99,8									
L20953 TSWV-BL	97,2	96,9	97,2	98,4	97,6	98,6	98,6	98,2	96,7	96,7	95,9	97,4	97,4	97,4	97,1	97,9	97,1	96,1	96,7	97,4	97,9	97,9	97,1	97,4	96,9	98,9	98,7								
X61799 L	97,7	97,4	97,7	98,9	98,1	99	99	98,7	97,2	97,6	96,4	97,9	97,9	97,9	97,9	98,4	97,6	96,6	97,2	97,9	98,4	98,4	97,6	97,6	97,4	99,4	99,2	99,2							
D00645 BR	96,9	96,2	96,9	97,1	96,6	97,2	97,2	96,9	96,4	96,4	95,6	96,7	96,7	96,7	96,4	96,6	95,7	95,7	96,1	96,7	96,6	96,6	96,1	96,1	96,2	97,2	97,1	97,4	97,6						
PL-60-09	99,8	99,2	99,8	97,4	99,2	97,6	97,6	97,2	99	99,4	98,6	99,4	99,7	99,7	99,4	96,9	95,7	98,4	98,7	99,7	96,9	96,9	97,6	97,6	97,7	97,6	97,7	97,4	97,9	97,1					
PL-35-09	99,5	98,9	99,5	97,1	98,9	97,2	97,2	96,9	98,7	99	98,2	99	99,4	99,4	99	96,6	95,4	98,1	98,4	99,4	96,6	96,6	97,2	97,2	97,4	97,2	97,4	97,1	97,6	96,7	99,7				
PL-14-10	99,5	98,9	99,5	97,1	98,9	97,2	97,2	96,9	98,7	99	98,2	99	99,4	99,4	99	96,6	95,4	98,1	98,4	99,4	96,6	96,6	97,2	97,2	97,4	97,2	97,4	97,1	97,6	96,7	99,7	99,7			

Prilog 18. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence NC gena izolata TSWV i izolata iz GenBank baze podataka uključenih u filogenetsko stablo

	GQ355467 33-06	GQ373172 39-06	GQ373173 53-05	Z36882 T304	AY848922 T992	AY744480 Spain-2	AY744479 Spain-1	X94550 LC	AJ41879 DH37	AJ418777 BS97	AJ418778 10HK96	AJ297611 Le98/527	AF020660 TSWV-D	AY744476 NC-1	AY744478 NC-3	AY744477 NC-2	AF020659 TSWV-10	AJ296600 98/0472	EF059705 TSWV-GP	AJ296599 C27084	AF064469 AC	AF064472 MC	AB038342 Tospo-G	AB038341 Tospo-C	AB088385 Ordinary_strain	AY744468 CA-1	AY744471 CA-4	L20953 TSWV-BL	X61799 L	D00645 BR	PL-60-09	PL-35-09	PL-14-10			
GQ355467 33-06																																				
GQ373172 39-06	96,8	100																																		
GQ373173 53-05	100	96,8																																		
Z36882 T304	91,4	90,3	91,4																																	
AY848922 T992	97,8	95,7	97,8	91,9																																
AY744480 Spain-2	91,9	90,9	91,9	95,2	92,5																															
AY744479 Spain-1	91,9	91,9	91,9	95,2	92,5	98,9																														
X94550 LC	91,9	90,9	91,9	95,2	92,5	98,9	98,9																													
AJ41879 DH37	97,3	95,2	97,3	90,9	96,8	91,4	91,4	91,4																												
AJ418777 BS97	97,3	95,2	97,3	89,8	96,2	90,3	90,3	90,3	95,7																											
AJ418778 10HK96	97,3	95,2	97,3	90,9	96,2	90,3	90,3	90,3	95,7	95,7																										
AJ297611 Le98/527	97,8	95,7	97,8	91,9	98,9	92,5	92,5	92,5	96,8	96,2	96,2																									
AF020660 TSWV-D	98,9	96,8	98,9	91,9	98,9	92,5	92,5	92,5	97,8	97,3	97,3	98,9																								
AY744476 NC-1	98,9	96,8	98,9	91,9	98,9	92,5	92,5	92,5	97,8	97,3	97,3	98,9	100																							
AY744478 NC-3	97,8	95,7	97,8	91,9	97,8	91,4	91,4	91,4	96,8	97,3	96,2	97,8	98,9	98,9																						
AY744477 NC-2	91,9	90,9	91,9	95,2	92,5	94,6	94,6	94,6	91,4	90,3	90,3	92,5	92,5	92,5	92,5																					
AF020659 TSWV-10	88,7	88,7	88,7	93	89,2	92,5	93,5	92,5	88,2	87,1	87,1	89,2	89,2	89,2	89,2	95,7																				
AJ296600 98/0472	96,2	94,1	96,2	89,8	96,2	90,3	90,3	90,3	94,6	94,6	94,6	95,2	96,2	96,2	95,2	90,3	87,1																			
EF059705 TSWV-GP	96,2	95,2	96,2	91,4	97,3	90,9	91,9	90,9	95,2	94,6	94,6	97,3	97,3	97,3	96,2	90,9	88,7	93,5																		
AJ296599 C27084	98,9	96,8	98,9	91,9	98,9	92,5	92,5	92,5	97,8	97,3	97,3	98,9	100	100	98,9	92,5	89,2	96,2	97,3																	
AF064469 AC	91,9	90,9	91,9	95,2	92,5	94,6	94,6	94,6	91,4	90,3	90,3	92,5	92,5	92,5	92,5	98,9	95,7	90,3	90,9	92,5																
AF064472 MC	91,4	91,4	91,4	94,6	91,9	94,1	95,2	94,1	90,9	89,8	89,8	91,9	91,9	91,9	91,9	97,3	97,3	88,7	91,4	91,9	97,3															
AB038342 Tospo-G	93,5	92,5	93,5	91,4	93	91,9	91,9	91,9	93	91,9	91,9	93	94,1	94,1	93	91,9	88,7	91,9	91,4	94,1	91,9	90,3														
AB038341 Tospo-C	94,1	93	94,1	91,9	93,5	92,5	92,5	93,5	92,5	92,5	93,5	94,6	94,6	93,5	91,4	89,2	92,5	91,9	94,6	91,4	90,9	97,3														
AB088385 Ordinary_strain	94,1	93	94,1	91,4	93	91,4	91,4	91,4	92,5	92,5	92,5	93	94,1	94,1	93	90,3	88,2	92,5	91,4	94,1	90,3	89,8	96,2	97,8												
AY744468 CA-1	93,5	92,5	93,5	96,8	94,1	97,3	97,3	97,3	93	91,9	91,9	94,1	94,1	94,1	93	96,2	94,1	91,9	92,5	94,1	96,2	95,7	93,5	94,1	93											
AY744471 CA-4	94,1	93	94,1	96,2	93,5	96,8	96,8	96,8	93,5	92,5	92,5	93,5	94,6	94,6	93,5	95,7	93,5	92,5	91,9	94,6	95,7	95,2	94,1	94,6	93,5	99,5										
L20953 TSWV-BL	91,9	90,9	91,9	95,2	92,5	95,7	95,7	95,7	91,9	90,3	90,3	92,5	92,5	92,5	91,4	94,6	92,5	90,3	90,9	92,5	94,6	94,1	91,9	93,5	91,4	97,3	96,8									
X61799 L	93,5	92,5	93,5	96,8	94,1	97,3	97,3	97,3	93	93	91,9	94,1	94,1	94,1	94,1	96,2	94,1	91,9	92,5	94,1	96,2	95,7	93,5	94,1	93	98,9	98,4	97,3								
D00645 BR	91,9	89,8	91,9	91,9	91,9	92,5	92,5	92,5	91,4	90,3	90,3	91,9	91,9	91,9	90,9	91,4	89,2	90,3	90,3	91,9	91,4	90,9	89,8	90,3	90,3	94,1	93,5	93,5	94,1							
PL-60-09	99,5	97,3	99,5	91,9	98,4	92,5	92,5	92,5	97,8	97,8	97,8	98,4	99,5	99,5	98,4	92,5	89,2	96,8	96,8	99,5	92,5	91,9	94,6	94,6	94,6	94,1	94,6	92,5	94,1	92,5						
PL-35-09	98,9	96,8	98,9	91,4	97,8	91,9	91,9	91,9	97,3	97,3	97,3	97,8	98,9	98,9	97,8	91,9	88,7	96,2	96,2	98,9	91,9	91,4	93,5	94,1	94,1	93,5	94,1	91,9	93,5	91,9	99,5					
PL-14-10	98,4	96,2	98,4	90,9	97,3	91,4	91,4	91,4	96,8	96,8	96,8	97,3	98,4	98,4	97,3	91,4	88,2	95,7	95,7	98,4	91,4	90,9	93	93,5	93,5	93	93,5	91,4	93	91,4	98,9	99,5				

Prilog 19. Proračun stepena homologije CP gena AMV izolata i izolata iz GenBank baze podataka prikazanih u filogenetskom stablu

	DQ314753 Ca401	DQ314751 Ca399	DQ314752 Ca400	DQ314749 Ca375	AJ130706 F-430	Y09110 Danza	AF332998 N20	K02703 425_Medis	AJ130707 Caa-1	AF015717 15/64	DQ314754 Ca508	DQ314750 Ca175	AJ130704 126A	AJ130705 195-AN	AF015716 VRU	AJ130708 Dac16	AF294432 KR1	X00819 S	AF294433 KR2	DQ314756 Ca616	AJ130709 Lyh-1	AJ130703 Lye-80	L00162 425_Leide	DQ314755 Ca518	FJ527749 196-08	AF215664 NZ34	PL-2-10	P-10-10	P-27-09		
DQ314753 Ca401																															
DQ314751 Ca399	99,7																														
DQ314752 Ca400	99	99																													
DQ314749 Ca375	99	99	99,7																												
AJ130706 F-430	98,1	98,1	97,8	97,8																											
Y09110 Danza	97,4	97,4	97,4	97,4	97,6																										
AF332998 N20	97,5	97,5	97,8	97,8	97,3	98																									
K02703 425_Medis	97,4	97,4	97,8	97,8	97,3	99	98,3																								
AJ130707 Caa-1	94,6	94,6	94,8	95,2	95	95	95,3	94,6																							
AF015717 15/64	93,5	93,5	93,7	93,7	93,9	93,5	94,3	93,5	97,3																						
DQ314754 Ca508	98,3	98,3	98,6	98,6	98,1	97,1	97,1	97,1	94,4	93,3																					
DQ314750 Ca175	97,4	97,4	97,4	97,4	97,3	99,3	97,3	98,3	94,3	93,1	97,4																				
AJ130704 126A	97,3	97,3	96,9	96,9	98,1	96,8	96,4	96,8	94,4	93,5	97,3	96,4																			
AJ130705 195-AN	97,5	97,5	97,1	97,1	98,3	96,9	96,8	96,6	94,8	93,9	97,5	96,6	98,1																		
AF015716 VRU	94,6	94,6	94,8	95,2	95	94,2	95	94,6	98,3	98	94,4	93,9	94,4	94,8																	
AJ130708 Dac16	94,3	94,3	94,4	94,8	94,6	94,6	95	94,2	99,3	97,6	94,1	94,3	94,1	94,5	98,3																
AF294432 KR1	96,4	96,4	96,8	96,8	96,2	97,6	96,2	98	93,5	92,8	96	97,3	95,7	95,5	93,5	93,5															
X00819 S	97,1	97,1	97,4	97,4	96,6	97,6	97,3	98	93,9	93,1	96,4	97,3	95,7	95,9	93,9	93,9	96,2														
AF294433 KR2	96,9	96,9	97,3	97,3	96,7	98,1	96,8	98,1	94,1	93,3	96,6	97,8	95,9	96,1	94,1	94,1	99,5	96,7													
DQ314756 Ca616	98,3	98,3	98,6	98,6	98,1	97,1	97,1	97,1	94,4	93,3	100	97,4	97,3	97,5	94,4	94,1	96	96,4	96,6												
AJ130709 Lyh-1	94,8	94,8	95	95,3	95,2	94,8	95,2	94,8	99,2	97,1	94,6	94,1	94,6	95	98,5	98,8	93,7	94,1	94,3	94,6											
AJ130703 Lye-80	93,4	93,4	93,6	93,9	93,7	93	94,1	93,4	97,1	97,3	93,2	92,6	93,9	93,6	97,8	97,5	92,6	92,6	93,2	93,2	96,9										
L00162 425_Leide	97,5	97,4	97,8	97,8	97,3	98	99,7	98,3	95,3	94,2	97,1	97,3	96,4	96,8	95	95	96,2	97,3	96,7	97,1	95,2	94,1									
DQ314755 Ca518	98,3	98,3	98,7	99	97,8	97,4	97,8	97,8	95,2	93,7	97,6	96,7	96,9	97,1	95,2	94,8	96,4	97,4	96,9	97,6	95,3	93,9	97,8								
FJ527749 196-08	98,3	98,3	98,3	98,3	98,1	98,1	98,1	98,1	95,2	94,1	97,6	97,4	97,3	97,5	95,2	94,8	96,7	97,4	97,3	97,6	95,3	93,9	98,1	98,3							
AF215664 NZ34	97,5	97,5	97,8	97,8	97,3	98	100	98,3	95,3	94,3	97,1	97,3	96,4	96,8	95	95	96,2	97,3	96,8	97,1	95,2	94,1	99,7	97,8	98,1						
PL-2-10	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	98,3	98,3	98,3	95	94,2	97,8	97,6	97,5	97,6	95,3	95	96,9	97,6	97,4	97,8	95,2	94,1	98,3	98,5	99,5	98,3					
P-10-10	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	98,3	98,3	98,3	95	93,9	97,8	97,6	97,5	97,6	95	94,6	96,9	97,6	97,4	97,8	95,2	93,7	98,3	98,5	99,5	98,3	99,7				
P-27-09	98,1	98,1	98,1	98,1	98,3	98	97,6	98	95,3	94,6	97,8	97,3	97,5	97,6	95,7	95,3	96,9	97,3	97,4	97,8	95,5	94,5	97,6	98,1	98,8	97,6	99,3	99			

Prilog 20. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence CP gena izolata AMV i izolata iz GenBank baze podataka uključenih u filogenetsko stablo

	DQ314753 Ca401	DQ314751 Ca399	DQ314752 Ca400	DQ314749 Ca375	AJ130706 F-430	Y09110 Danza	AF332998 N20	K02703 425_Medison	AJ130707 Caa-1	AF015717 15/64	DQ314754 Ca508	DQ314750 Ca175	AJ130704 126A	AJ130705 195-AN	AF015716 VRU	AJ130708 Dac16	AF294432 KR1	X00819 S	AF294433 KR2	DQ314756 Ca616	AJ130709 Lyh-1	AJ130703 Lye-80	L00162 425_Leiden	DQ314755 Ca518	FJ527749 196-08	AF215664 NZ34	PL-2-10	P-10-10	P-27-09	
DQ314753 Ca401																														
DQ314751 Ca399	99																													
DQ314752 Ca400	99	99																												
DQ314749 Ca375	99	99	100																											
AJ130706 F-430	97,5	97,5	97,5	97,5																										
Y09110 Danza	97,5	97,5	97,5	97,5	99																									
AF332998 N20	95	95	96	96	95,5	96,5																								
K02703 425_Medison	97	97	98	98	97,5	98,5	97																							
AJ130707 Caa-1	93	93	94	94	93,5	93,5	94,5	93,5																						
AF015717 15/64	93,5	93,5	94,5	94,5	93,5	93,5	95	94	98,5																					
DQ314754 Ca508	98	98	99	99	97,5	97,5	95	97	93,5	93,5																				
DQ314750 Ca175	98,5	98,5	98,5	98,5	98	99	95,5	97,5	93	93	98,5																			
AJ130704 126A	94,5	94,5	94,5	94,5	96	96,5	93	96	91,5	91,5	94,5	95,5																		
AJ130705 195-AN	95,5	95,5	95,5	95,5	97	97	94	95,5	93,5	93	95,5	96	96																	
AF015716 VRU	94	94	95	95	94	94	94,5	94,5	98	98,5	94	93,5	92	93,5																
AJ130708 Dac16	93,5	93,5	94,5	94,5	94	94	95	94	99,5	99	94	93,5	92	93,5	98,5															
AF294432 KR1	96	96	96	96	96,5	97,5	95	98	91,5	92	95	96,5	95	94,5	92,5	92														
X00819 S	97,5	97,5	98,5	98,5	98	98	97	98,5	94,5	95	97,5	97	95	96	95	95	96,5													
AF294433 KR2	97,5	97,5	97,5	97,5	98	99	96,5	98,5	93	93,5	96,5	98	95,5	96	94	93,5	98,5	98												
DQ314756 Ca616	98	98	99	99	97,5	97,5	95	97	93,5	93,5	100	98,5	94,5	95,5	94	94	95	97,5	96,5											
AJ130709 Lyh-1	94	94	95	95	94,5	94,5	94,5	94,5	99	98,5	94,5	94	92,5	94	99	99,5	92,5	95	94	94,5										
AJ130703 Lye-80	92	92	93	93	92	92	93,5	92,5	96	96,5	92	91,5	92	91,5	96	96,5	90,5	93,5	92	92	96									
L00162 425_Leiden	95,5	95,5	96,5	96,5	96	97	99,5	97,5	95	95,5	95,5	96	93,5	94,5	95	95,5	95,5	97,5	97	95,5	95	94								
DQ314755 Ca518	97,5	97,5	98,5	98,5	98	98	96,5	98,5	94	94,5	97,5	97	95	96	95	94,5	96,5	99	98	97,5	95	93	97							
FJ527749 196-08	98,5	98,5	98,5	98,5	99	99	96,5	98,5	94	94,5	97,5	98	96	97	95	94,5	97,5	99	99	97,5	95	93	97	99						
AF215664 NZ34	95	95	96	96	95,5	96,5	100	97	94,5	95	95	95,5	93	94	94,5	95	95	97	96,5	95	94,5	93,5	99,5	96,5	96,5					
PL-2-10	98,5	98,5	98,5	98,5	99	99	96,5	98,5	94	94,5	97,5	98	96	97	95	94,5	97,5	99	99	97,5	95	93	97	99	100	96,5				
P-10-10	98,5	98,5	98,5	98,5	99	99	96,5	98,5	94	94,5	97,5	98	96	97	95	94,5	97,5	99	99	97,5	95	93	97	99	100	96,5	100			
P-27-09	98,5	98,5	98,5	98,5	99	99	96,5	98,5	94	94,5	97,5	98	96	97	95	94,5	97,5	99	99	97,5	95	93	97	99	100	96,5	100	100		

Prilog 21. Proračun stepena homologije CP gena PMMoV izolata i izolata iz GenBank baze podataka prikazanih u filogenetskom stablu

	AB254821 Iw	AB276030 L4BV	AB084456 P	AB126003 KR	AF103776 PO	AB062049 Ge1	AB062051 Ge5	AB062050 Ge4	AB550911 DF01	AY859497 CN	M87827 Taiwan	AB062052 OH	M81413 S	AB062054 Na	AJ308228 SP-Ia	X72587 Italian	AB062053 Tosa	X70883 TMV	AF411922 ToMV	AB000709 JP-J	FN594889 P86/10	FN594870 P02/2	FN594869 P85/29	AY632863	AJ429088 PMMV1.2	FR671392 P98/15	AM411433 LinsBR08	AB119482 Pe1	FN594881 P89/4.2	FR671393 P99/23	FN594853 P83/4	FR671388 P96/44	HQ699079 PMMoV-BD	P-57-09	P-60-09	P-3-10					
AB254821 Iw																																									
AB276030 L4BV	98,7																																								
AB084456 P	99,6	99,1																																							
AB126003 KR	99,6	99,1	100																																						
AF103776 PO	98,1	97,2	98,1	98,1																																					
AB062049 Ge1	98,7	98,3	98,7	98,7	97,2																																				
AB062051 Ge5	98,5	98,1	98,5	98,5	97	99,8																																			
AB062050 Ge4	98,5	98,1	98,5	98,5	97	99,8	99,6																																		
AB550911 DF01	98,1	97,2	98,1	98,1	97	97,6	97,4																																		
AY859497 CN	97	96,5	97,4	97,4	95,9	96,5	96,3	96,3	98,9																																
M87827 Taiwan	97,4	97	97,9	97,9	96,3	97	96,8	96,8	99,4	99,1																															
AB062052 OH	97,4	97	97,9	97,9	96,3	97	96,8	96,8	99,4	98,7	99,1																														
M81413 S	97,6	97,2	98,1	98,1	96,5	97,2	97	97	99,6	98,9	99,4	99,4																													
AB062054 Na	97,6	97,2	98,1	98,1	96,5	97,2	97	97	99,6	98,9	99,4	99,4	99,6																												
AJ308228 SP-Ia	93,8	92,9	93,8	93,8	92,2	93,3	93,1	93,1	94,5	93,6	93,8	93,8	94,1	94,1																											
X72587 Italian	94	93,1	94,1	94,1	92,4	93,6	93,3	93,3	94,5	93,6	93,8	93,8	94,1	94,1	98,5																										
AB062053 Tosa	94	93,1	94,1	94,1	92,4	93,6	93,3	93,3	94,5	93,6	93,8	93,8	94,1	94,1	98,5	100																									
X70883 TMV	51,5	52	52,3	52,3	51	51,5	51	51,6	51,6	52,1	52	51,6	51,6	51,5	51,6	52,3	52,3																								
AF411922 ToMV	54,4	52,8	54,5	54,5	53,1	54,3	53,8	54,3	54,2	54,3	54,2	53,5	54,2	53,4	56,4	55,8	55,8	71																							
AB000709 JP-J	97,9	97,4	98,3	98,3	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	99,1	99,6	99,6	99,8	99,8	94,3	94,3	94,3	52	53,8																						
FN594889 P86/10	97,9	97,4	98,3	98,3	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	99,1	99,6	99,6	99,8	99,8	94,3	94,3	94,3	52	53,8	100																					
FN594870 P02/2	97,9	97	97,9	97,9	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	98,7	99,2	99,1	99,4	99,4	94,3	94,3	94,3	51,2	54,6	99,6	99,6																				
FN594869 P85/29	97,9	97	97,9	97,9	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	98,7	99,2	99,1	99,4	99,4	94,3	94,3	94,3	51,2	53,8	99,6	99,6	99,6																			
AY632863	99,8	98,9	99,8	99,8	98,3	98,9	98,7	98,7	98,3	97,2	97,6	97,6	97,9	97,9	94	94,3	94,3	52	54,8	98,1	98,1	98,1	98,1																		
AJ429088 PMMV1.2	99,6	98,7	99,6	99,6	98,1	98,7	98,5	98,5	98,1	97	97,4	97,4	97,6	98,1	93,8	94	94	51,5	54,4	97,9	97,9	97,9	97,9	99,8																	
FR671392 P98/15	99,2	98,3	99,2	99,2	97,6	98,3	98,1	98,1	98,1	97	97,4	97,4	97,6	97,6	94,3	95	95	52	55,2	97,9	97,9	97,9	97,9	99,4	99,2																
AM411433 LinsBR08	99,8	98,9	99,8	99,8	98,3	98,9	98,7	98,7	98,3	97,2	97,6	97,6	97,9	97,9	94	94,3	94,3	52	54,8	98,1	98,1	98,1	98,1	100	99,8	99,4															
AB119482 Pe1	99,4	98,5	99,4	99,4	97,9	98,5	98,3	98,3	97,9	96,8	97,2	97,2	97,4	97,4	93,6	93,8	93,8	52,8	54,8	97,6	97,6	97,6	97,6	99,6	99,4	98,9	99,6														
FN594881 P89/4.2	98,1	97,2	98,1	98,1	97	97,6	97,4	97,4	100	98,9	99,4	99,4	99,6	99,6	94,5	94,5	94,5	51,6	54,2	99,8	99,8	99,8	99,8	98,3	98,1	98,1	98,3	97,9													
FR671393 P99/23	97,9	97	97,9	97,9	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	98,7	99,1	99,1	99,4	99,4	94,3	94,3	94,3	52,1	54,6	99,6	99,6	99,6	99,6	98,1	97,9	97,9	98,1	97,6	99,8												
FN594853 P83/4	98,1	97,2	98,1	98,1	97	97,6	97,4	97,4	100	98,9	99,4	99,4	99,6	99,6	94,5	94,5	94,5	51,6	54,2	99,8	99,8	99,8	99,8	98,3	98,1	98,1	98,3	97,9	100	99,8											
FR671388 P96/44	97,9	97	97,9	97,9	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	98,7	99,2	99,1	99,4	99,4	94,5	94,5	94,5	51,6	54,2	99,6	99,6	99,6	99,6	98,1	97,9	97,9	98,1	97,6	99,8	99,6	99,8										
HQ699079 PMMoV-BD	97,9	97,4	98,3	98,3	96,8	97,4	97,2	97,2	99,8	99,1	99,6	99,6	99,8	99,8	94,3	94,3	94,3	52	53,8	100	100	99,6	99,6	98,1	97,9	97,9	98,1	97,6	99,8	99,6	99,8	99,6									
P-57-09	99,6	98,7	99,6	99,6	98,1	98,7	98,5	98,5	98,1	97	97,4	97,4	97,6	97,6	93,8	94	94	52,4	55,3	97,9	97,9	97,9	97,9	99,8	99,6	99,2	99,8	99,4	98,1	97,9	98,1	97,9	98,1	97,9	97,9	97,9	97,9	99,6			
P-60-09	99,6	98,7	99,6	99,6	98,1	98,7	98,5	98,5	98,1	97	97,4	97,4	97,6	97,6	93,8	94,1	94,1	51,6	54,8	97,9	97,9	97,9	97,9	99,8	99,6	99,2	99,8	99,4	98,1	97,9	98,1	97,9	98,1	97,9	97,9	97,9	97,9	99,6			
P-3-10	99,6	98,7	99,6	99,6	98,1	98,7	98,5	98,5	98,1	97	97,4	97,4	97,6	97,6	93,8	94	94	52,4	55,3	97,9	97,9	97,9	97,9	99,8	99,6	99,2	99,8	99,4	98,1	97,9	98,1	97,9	98,1	97,9	97,9	97,9	100	99,6			

Prilog 22. Proračun stepena homologije aminokiselinske sekvence CP gena izolata PMMoV i izolata iz GenBank baze podataka uključenih u filogenetsko stablo

	AB254821 Iw	AB276030 L4BV	AB084456 P	AB126003 KR	AF103776 PO	AB062049 Gel	AB06205 Ge5	AB062050 Ge4	AB550911 DF01	AY859497 CN	M87827 Taiwan	AB062052 OH	M81413 S	AB062054 Na	AJ308228 SP-Ia	X72587 Italian	AB062053 Tosa	X70883 TMV	AF411922 ToMV	AB00070 JP-J	FN594889 P86/10	FN594870 P02/2	FN594869 P85/29	AY632863	AJ429088 PMMV1.2	FR671392 P98/15	AM411433 LinsBR08	AB119482 Pe1	FN594881 P89/4.2	FR671393 P99/23	FN594853 P83/4	FR671388 P96/44	HQ699079 PMMoV-BD	P-57-09	P-60-09	P-3-10					
AB254821 Iw																																									
AB276030 L4BV	98,7																																								
AB084456 P	100	98,7																																							
AB126003 KR	100	98,7	100																																						
AF103776 PO	96,8	95,5	96,8	96,8																																					
AB062049 Gel	98,7	97,5	98,7	98,7	95,5																																				
AB062051 Ge5	98,1	96,8	98,1	98,1	94,9	99,4																																			
AB062050 Ge4	98,1	96,8	98,1	98,1	94,9	99,4	98,7																																		
AB550911 DF01	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1																																	
AY859497 CN	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100																																
M87827 Taiwan	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100																															
AB062052 OH	98,7	97,5	98,7	98,7	95,5	97,5	96,8	96,8	98,7	98,7	98,7																														
M81413 S	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7																													
AB062054 Na	99,4	98,1	99,4	99,4	96,2	98,1	97,5	97,5	99,4	99,4	99,4	98,1	99,4																												
AJ308228 SP-Ia	96,8	95,5	96,8	96,8	94,3	95,5	94,9	94,9	96,8	96,8	96,8	95,5	96,8	96,2																											
X72587 Italian	98,1	96,8	98,1	98,1	94,9	96,8	96,2	96,2	98,1	98,1	98,1	96,8	98,1	97,5	98,7																										
AB062053 Tosa	98,1	96,8	98,1	98,1	94,9	96,8	96,2	96,2	98,1	98,1	98,1	96,8	98,1	97,5	98,7	100																									
X70883 TMV	70,1	70,1	70,1	70,1	68,8	70,1	69,4	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,7	70,7																								
AF411922 ToMV	72,6	71,3	72,6	72,6	70,1	72	71,3	72	72,6	72,6	72,6	72,6	72,6	72,6	72	73,2	73,2	82,2																							
AB000709 JP-J	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6																						
FN594889 P86/10	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100																					
FN594870 P02/2	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100																				
FN594869 P85/29	99,4	98,1	99,4	99,4	96,2	98,1	97,5	97,5	99,4	99,4	99,4	98,1	99,4	98,7	96,2	97,5	97,5	69,4	72	99,4	99,4	99,4																			
AY632863	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4																		
AJ429088 PMMV1.2	99,4	98,1	99,4	99,4	96,2	98,1	97,5	97,5	99,4	99,4	99,4	98,1	99,4	100	96,2	97,5	97,5	70,1	72,6	99,4	99,4	99,4	98,7	99,4																	
FR671392 P98/15	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
AM411433 LinsBR08	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
AB119482 Pe1	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FN594881 P89/4.2	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FR671393 P99/23	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FN594853 P83/4	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FR671388 P96/44	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HQ699079 PMMoV-BD	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P-57-09	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P-60-09	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P-3-10	100	98,7	100	100	96,8	98,7	98,1	98,1	100	100	100	98,7	100	99,4	96,8	98,1	98,1	70,1	72,6	100	100	100	99,4	100	99,4	100	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

BIOGRAFIJA

Dragana N. Milošević je rođena 18.12.1980. godine u Novom Sadu. Školske 1999/2000. godine upisala je Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, odsek za zaštitu bilja, koji je završila 2004. godine sa prosečnom ocenom 9.42. Diplomski rad pod nazivom "Uloga gajenih biljaka u procesu fitoremedijacije " odbranila je ocenom 10 čime je dobila diplomu o stečenom visokom obrazovanju i stručnim nazivom diplomirani inženjer poljoprivrede. Poslediplomske studije upisala je školske 2005/2006. godine na predmetu Fitopatologija, na Institutu za zaštitu bilja, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, a magistarski rad pod nazivom: „Rasprostranjenost virusa pasulja u Vojvodini”, odbranila je 2008. godine. Iste godine izabrana je u zvanje istraživača saradnika.

Od 2005. godine zaposlena je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Laboratoriji za ispitivanje semena kao saradnik na ispitivanju zdravstvene ispravnosti semena.

Do sada je učestvovala je na dva Tehnološka projekta Ministarstva nauke Republike Srbije, na projektu Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, kao i na dva Inovaciona projekta Ministarstva nauke Srbije. Trenutno je angažovana na dva projekta Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: « Razvoj novih sorti i poboljšanje tehnologija proizvodnje uljanih biljnih vrsta za različite namene» i « Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru» čiji je rezultat doktorska disertacija.

Bila je učesnik nekoliko međunarodnih i domaćih skupova, a kao autor i koautor objavila je 55 naučnih i stručnih radova koji su objavljeni u vodećim nacionalnim časopisima i prezentovani na međunarodnim i domaćim skupovima.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Dragana Milošević _____

broj indeksa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Diverzitet i karakterizacija virusa paprike u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena 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 intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

Dragana Milošević

U Beogradu, 19.03.2013. godine

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Dragana Milošević _____

Broj indeksa _____

Studijski program _____ Poljoprivredne nauke _____

Naslov rada _____ Diverzitet i karakterizacija virusa paprike u Srbiji _____

Mentor _____ prof. dr Branka Krstić, redovni profesor _____

Potpisani/a _____ Dragana Milošević _____

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, _____ 19.03.2013. godine _____

Dragana Milošević

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 paprike u Srbiji koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima 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 poleđini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu, 19.03.2013. godine