

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Branka R. Petrović

**GENETIČKA STRUKTURA POPULACIJE
VIRUSA BRONZAVOSTI PARADAJZA
(*TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS*)
POREKLOM IZ RAZLIČITIH DOMAĆINA U
SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Branka R. Petrović

**GENETIČKA STRUKTURA POPULACIJE
VIRUSA BRONZAVOSTI PARADAJZA
(*TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS*)
POREKLOM IZ RAZLIČITIH DOMAĆINA U
SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Branka R. Petrović

**POPULATION GENETIC STRUCTURE OF
TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS
ORIGINATING FROM DIFFERENT HOSTS IN
SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Ivana Stanković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

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

dr Katarina Zečević, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

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

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

dr Darko Jevremović, viši naučni saradnik
Institut za voćarstvo, Čačak

Datum odbrane: _____

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ivani Stanković, redovnom profesoru, na nesebično prenetom znanju, ukazanoj velikoj posvećenosti, razumevanju, strpljenju za sva moja pitanja, uloženom velikom trudu i pomoći tokom proteklih godina studiranja i izrade ove doktorske disertacije, kao i na prilici da kroz zajednički naučno-istraživački rad steknem dragoceno znanje i iskustvo.

Veliku zahvalnost dugujem dr Branki Krstić, redovnom profesoru, koja mi je ukazala poverenje i pružila priliku da budem član tima Laboratorije za virusologiju, i sa velikim strpljenjem i razumevanjem prenela dragoceno svestrano znanje. Bez profesorkinog velikog angažovanja, pomoći i korisnih saveta tokom svih proteklih godina, ova disertacija ne bi mogla da se ostvari.

Zahvaljujem se kolegini dr Katarini Zečević, naučnom saradniku na lepoj saradnji, pomoći, korisnim savetima i podršci tokom pisanja i izrade diplomskog i master rada, kao i tokom naučno-istraživačkog rada u laboratoriji i tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i ostalim članovima komisije dr Danijeli Ristić, višem naučnom saradniku, dr Dragani Milošević, višem naučnom saradniku i dr Darku Jevremoviću, višem naučnom saradniku na korisnim savetima i sugestijama.

Veliko hvala na podršci i Dragani Đurić, tehničkom saradniku, dr Aleksandri Bulajić, redovnom profesoru, kao i kolegini dr Miri Vojvodić, naučnom saradniku na lepoj saradnji, prijateljstvu i nesebičnoj pomoći koju su mi pružile prilikom izrade diplomskog i master rada, kao i ove doktorske disertacije.

Na kraju, neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici na iskrenoj i bezrezervnoj podršci i savetima, velikoj pomoći i svakodnevno pruženoj ljubavi koja mi beskrajno znači i daje snagu da se izborim sa svim životnim izazovima. Posebno sam zahvalna što sam imala priliku da o zaštiti bilja odmalena učim od svoje majke, čije sam stope pratila tokom čitavog školovanja, i od koje i dan danas dobijam dragocene savete.

GENETIČKA STRUKTURA POPULACIJE VIRUSA BRONZAVOSTI PARADAJZA (*TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS*) POREKLOM IZ RAZLIČITIH DOMAĆINA U SRBIJI

Sažetak: Analiza genetičke strukture populacije virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV) u Srbiji, obuhvatila je molekularnu karakterizaciju 41 izolata poreklom iz različitih biljaka domaćina sakupljenih sa različitih lokaliteta u različitom vremenskom periodu. Filogenetske analize i mreža haplotipova na osnovu delimičnih sekvenci pet gena (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp), kao i na osnovu sekvenci dela S i M segmenta dobijenih spajanjem odgovarajućih sekvenci, ukazale su na postojanje genetičkog diverziteta u populaciji TSWV u Srbiji. Filogenetske analize su pokazale da je većina srpskih izolata TSWV evropskog porekla, međutim neki izolati su pokazali veću bliskost sa izolatima iz severnoameričkog klastera, ukazujući da su srpski izolati TSWV uneti kroz više nezavisnih introdukcija. Osim toga, filogenetsko stablo na osnovu sekvenci M i L segmenta ukazalo je i na postojanje rekombinantnih, odnosno pseudorekombinantnih izolata. Analiza sekvenci M segmenta primenom RDP softvera potvrdila je da je izolat 224-16 poreklom iz *Cinia* sp. prirodni rekombinant dva srpska izolata. Analiza prirodne selekcije pokazala je da na sve testirane genske regione i parove sekvenci TSWV deluje negativna selekcija, dok je pozitivna selekcija ustanovljena samo između nekoliko parova sekvenci NSm, odnosno Gn-Gc gena. Osim toga, poređenje aminokiselinske sekvence NSm proteina ukazalo je na mutacije koje su izazvale dve supstitucije, ili C118Y ili T120N, kod srpskih RB (*resistance-breaking*) izolata poreklom iz otpornog hibrida paradajza Wrestler F1, gajenih na dva lokaliteta, ukazujući na njihov RB fenotip i nezavisnu evoluciju. Biološka karakterizacija je potvrdila da su srpski RB izolati sposobni da prevaziđu otpornost paradajza sa *Sw-5b*, ali ne i paprike sa *Tsw* genom. Rezultati ovih istraživanja ukazuju da je populacija TSWV u Srbiji heterogena usled više nezavisnih introdukcija virusa, ali i pojave genetičke i fenotipske varijabilnosti izazvane mutacijama, rekombinacijama i pseudorekombinacijama što je doprinelo raznolikosti virusa u našoj zemlji.

Ključne reči: virus bronzavosti paradajza, struktura populacije, molekularna karakterizacija, RB (*resistance-breaking*) izolati, analiza rekombinacija, selekcionni pritisak, biološka karakterizacija.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 578.52:632.38(497.11)(043.3)

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF *TOMATO SPOTTED WILT TOSPOVIRUS* ORIGINATING FROM DIFFERENT HOSTS IN SERBIA

Abstract: The study aimed at defining population structure of Serbian *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) isolates is based on molecular characterization of 41 selected isolates from different host plants collected from different locations during different period of time. Phylogenetic analyses and the median-joining haplotype network of the partial sequences of each five genes (N, NSs, NSm, Gn-Gc and RdRp), as well as concatenated sequences of segments S and M obtained by merging the corresponding sequences, showed genetic diversity of TSWV in Serbia. Phylogenetic analyses showed that most Serbian TSWV isolates originated from Europe, but several isolates were more closely related to isolates from North America clade, indicating that Serbian TSWV isolates were introduced through several independent introductions. In addition, the phylogenetic tree based on segments M and L revealed the presence of recombination and reassortment, respectively. Sequence analysis of segment M using RDP software confirmed that isolate 224-16 originating from *Cinia* sp. represents the natural recombinant between two Serbian isolates. Purifying selection was determined as the major natural force influencing all five genes and pairs of sequences, while positive selection was found only between a few pairs of sequences of NSm and Gn-Gc genes. Moreover, the NSm amino acid sequence comparison revealed the presence of two amino acid substitutions (C118Y or T120N) in Serbian RB (*resistance-breaking*) isolates originating from the resistant tomato cultivar Wrestler F1 grown at two locations, indicating their RB phenotype and independent evolutionary events. Bioassay confirmed that Serbian RB isolates had the ability to break the *Sw-5b*-mediated resistance in tomato, but were unable to overcome the *Tsw* resistance gene in pepper. The results of this research indicate that the population of TSWV in Serbia is heterogeneous due to several independent introductions of the virus, but also the occurrence of mutations, recombination and reassortment have contributed to the molecular diversity of the virus in our country.

Key words: *Tomato spotted wilt tospovirus*, population structure, molecular characterization, RB (*resistance-breaking*) isolates, recombination analysis, selection pressure, bioassay.

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific subfield: Phytopathology

UDC: 578.52:632.38(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Taksonomski status virusa.....	3
2.2. Rasprostranjenost TSWV.....	4
2.3. Prisustvo TSWV u Srbiji.....	5
2.4. Ekonomski značaj.....	6
2.5. Domaćini.....	7
2.6. Simptomatologija.....	8
2.7. Epidemiologija.....	10
2.8. Morfologija virusnih čestica i organizacija genoma.....	11
2.9. Funkcije proteina.....	13
2.10. Filogenetska ispitivanja.....	14
2.11. Varijabilnost virusa.....	16
2.12. „Resistance-breaking“ izolati TSWV.....	18
2.13. Kontrola.....	20
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
4. MATERIJAL I METODE	24
4.1. Poreklo odabranih izolata TSWV.....	24
4.2. Utvrđivanje prisustva TSWV u odabranim uzorcima primenom DAS-ELISA testa.....	28
4.3. Amplifikacija različitih gena odabranih izolata TSWV.....	30
4.4. Sekvenciranje delova genoma odabranih izolata TSWV.....	35
4.5. Filogenetske analize.....	35
4.6. Analiza rekombinacija.....	36
4.7. „Codon-based“ Z-test selekcije.....	36
4.8. Mehaničke inokulacije test biljaka RI i RB izolatima TSWV poreklom iz paradajza.....	37
5. REZULTATI	38
5.1. Simptomi na prirodno zaraženim biljkama.....	38
5.2. DAS-ELISA test.....	43
5.3. Analiza sekvenci i molekularna karakterizacija odabranih izolata TSWV.....	43
5.3.1. Analiza sekvenci N gena.....	43
5.3.2. Analiza sekvenci NSs gena.....	50
5.3.3. Filogenetska analiza na osnovu sekvenci S segmenta.....	57
5.3.4. Analiza sekvenci NSm gena.....	60
5.3.5. Analiza sekvenci Gn-Gc gena.....	66
5.3.6. Filogenetska analiza na osnovu sekvenci M segmenta.....	72
5.3.7. Analiza sekvenci RdRp gena.....	75
5.4. Analiza rekombinacija.....	80
5.5. Uticaj selekcije na genske regione odabranih izolata TSWV.....	81
5.6. Biološka karakterizacija odabranih srpskih RI i RB izolata TSWV poreklom iz paradajza.....	82
6. DISKUSIJA	87
6.1. Simptomi TSWV na prirodno zaraženim biljkama.....	87
6.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata TSWV.....	89
6.3. Mreža haplotipova izolata TSWV.....	93
6.4. Analize rekombinacije.....	93
6.5. Uticaj evolutivnih parametara na populaciju TSWV.....	94
6.6. Biološka karakterizacija RB izolata TSWV.....	95
7. ZAKLJUČAK	97
8. LITERATURA	100
PRILOG 1	119
PRILOG 2	121

PRILOG 3.....	122
PRILOG 4.....	124
PRILOG 5.....	125
PRILOG 6.....	126
PRILOG 7.....	127
PRILOG 8.....	128
PRILOG 9.....	129
PRILOG 10.....	130
PRILOG 11.....	131
PRILOG 12.....	132
BIOGRAFIJA.....	133
Izjava o autorstvu.....	134
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	135
Izjava o korišćenju	136

1. UVOD

U veoma kratkom vremenskom periodu došlo je do brojnih promena u zvaničnom nazivu virusa bronzavosti paradajza od *Tomato spotted wilt virus*, preko TSW *orthospovirus* i TSW *tospovirus*, da bi trenutno zvanični naziv virusa glasio *Tomato spotted wilt orthospovirus*. Zbog toga se u publikacijama objavljenim čak iste godine mogu naći različiti nazivi virusa. Prema poslednjim podacima virus bronzavosti paradajza pripada rodu *Orthospovirus*, familiji *Tospoviridae* i redu *Bunyavirales*.

Virus bronzavosti paradajza se ubraja u grupu *re-emerging* virusa. Virus je prvi put zabeležen na paradajzu u Australiji početkom XX veka (**Brittlebank, 1919; Samuel et al., 1930**), da bi se vrlo brzo proširio u sve delove sveta i postao jedan od ekonomski najznačajnijih biljnih virusa. Međutim, polovinom XX veka usled manje zastupljenosti TSWV gubi na značaju, da bi tokom ranih 80-ih godina XX veka došlo do njegove ponovne pojave i izraženog geografskog širenja (**Kirk and Terry, 2003**).

TSWV zauzima drugo mesto među ekonomski najznačajnijim biljnim virusima (**Scholthof et al., 2011; Rybicki, 2015**) i jedan je od najproučavanijih biljnih virusa, koji pričinjava značajne štete u proizvodnji različitih useva. Pojava ovog virusa u epidemijским razmerama u proizvodnji različitih poljoprivrednih kultura širom sveta, doprinela je gubicima koji se procenjuju na oko jednu milijardu dolara godišnje (**Scott, 2000**), pri čemu gubici mogu biti i potpuni (**Berling et al., 1990**), što ga čini jednim od najdestruktivnijih biljnih virusa u svetu.

U Srbiji TSWV prvi put je detektovan na duvanu 1969. godine (**Mickovski, 1969**). Kasnije je prisustvo virusa dokazano i na paradajzu (**Mijatović i sar., 1999**), paprici (**Dukić i sar., 2002**), kao i na brojnim vrstama ukrasnih biljaka (**Krstić i Bulajić, 2007; Stanković i sar., 2013; Stanković et al., 2011b; Stanković et al., 2013; Nikolić et al., 2013**). Poslednjih godina zabeleženo je i širenje kruga domaćina TSWV u našoj zemlji, na šta upućuju i prvi nalazi ovog virusa na crnom i belom luku (**Stanković et al., 2012**) i dve vrste tikava *Cucurbita pepo* 'Beogradska' i *C. maxima* (**Vučurović et al., 2012**).

Dosadašnja istraživanja ukazala su na proširenje kruga domaćina ovog virusa kako u Srbiji, tako i u Evropi i svetu, što potkrepljuje činjenicu da se TSWV ubraja u biljne viruse sa najširim krugom domaćina, koji za sada broji preko 1300 biljnih vrsta iz 92 familije, koje uključuju brojne značajne povrtarske i industrijske kulture, kao i različite ukrasne biljke, ali i korovske vrste (**Pappu et al., 2009; EFSA, 2012**).

U prirodi TSWV se prenosi putem vektora-tripsa i zaraženim propagativnim biljnim materijalom. Devet vrsta tripsa iz dva roda *Frankliniella* i *Thrips* opisane su kao vektori TSWV, koji ovaj virus prenose na cirkulativan (perzistentan) i propagativan način, ali kao najznačajniji navode se vrste *F. occidentalis* (kalifornijski ili zapadni cvetni trips) i *T. tabaci* (lukov trips) (**Pappu et al., 2009; Rotenberg et al., 2015**). Drugi veoma značajan način širenja TSWV predstavlja međunarodna trgovina biljnim materijalom, najčešće u vidu rasada i reznica, koje mogu biti zaražene virusom ili infestirane zaraženim tripsima (**Hausbeck et al., 1992**).

Čestice TSWV su kvazisferične, prečnika 80-120 nm i sadrže tri pseudocirkularna ribonukleoproteina okružena lipoproteinskim omotačem koji vodi poreklo od membrane Goldžijevog aparata iz koje u vidu površinskih šiljaka vire glikoproteini Gn i Gc, kodirani od strane genoma virusa (**Kikkert et al., 1999**). Genom čine tri linearne jednolančane neinfektivne RNK [ss (-) RNK] ili „ambisense” RNK [ss (+/-) RNK], označene kao S (*short*), M (*middle*) i L (*large*). Najveća L RNK je neinfektivna (-) i kodira RNK-zavisnu RNK polimerazu (RdRp). M RNK je bicistronska i kodira nestrukturani NSm protein koji je uključen u kretanje virusa od ćelije do ćelije i glikoproteine Gn i Gc koje kodira virusno-komplementarni lanac M RNK. S RNK je, takođe, bicistronska i kodira stvaranje NSs nestrukturnog proteina koji izaziva formiranje agregata ili filamenata u ćelijama zaraženim

TSWV i ima funkciju utišavanja gena i N strukturni protein (protein nukleokapsida), koji je kodiran virusno-komplementarnim lancem S RNK (**Pappu et al., 2009**).

Heterogenost populacije i brza adaptibilnost su dve osnovne karakteristike po kojima se TSWV ističe među ostalim biljnim virusima (**Tsompana et al., 2005**). Zbog postojanja trodelnog genoma, raznovrsnost sojeva ovog virusa uslovljena je ne samo mutacijama i rekombinacijama, već i pseudorekombinacijama (rearanžiranjem) koje podrazumevaju preraspodelu genomnih segmenata (**Qiu et al., 1998**). Na osnovu dosadašnjih istraživanja, zasnovanih na filogenetskim analizama, utvrđeno je da je populacija ovog virusa definisana na osnovu geografskog porekla, uz izvesna odstupanja usled intenzivne razmene zaraženog biljnog materijala, koja dovodi do protoka gena između geografski različitih regiona (**Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008; Tentchev et al., 2011**).

Dosadašnja proučavanja u našoj zemlji odnosila su se na utvrđivanje pojave i rasprostranjenosti TSWV na različitim domaćinima, dok je delimična molekularna karakterizacija na osnovu sekvenci N gena obavljena samo za mali broj izolata ovog virusa poreklom iz duvana (**Stanković et al., 2011a**), tikava (**Vučurović et al., 2012**), paprike (**Milošević, 2013**) i paradajza (**Nikolić, 2018**). Imajući u vidu da je poznavanje genetičke strukture populacije i epidemioloških činilaca kao što su poreklo, broj introdukcija i način širenja izolata, kao i evolutivnih mehanizama koji utiču na pojavu novih ili povećanje značaja već postojećih varijanti ključ za uspešnu kontrolu oboljenja, osnovni cilj ove doktorske disertacije je utvrđivanje strukture i genetičkog diverziteta populacije TSWV u Srbiji, kao i dobijanje prvih podataka o faktorima koji imaju uticaj na oblikovanje populacije ovog virusa u našoj zemlji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Taksonomski status virusa

Iako su oboljenja biljaka koja se mogu dovesti u vezu sa virusom bronzavosti paradajza primećena još 1906. godine (**Sakimura, 1963**), ovo oboljenje prvi put je opisano na paradajzu 1919. godine u Australiji pod nazivom „pegavo uvenuće paradajza“ („spotted wilt of tomato“) (**Brittlebank, 1919**). Tokom 1930. godine ustanovljeno je da je prouzročivač ovog oboljenja virus koji je imenovan kao „tomato spotted wilt virus“ (**Samuel et al., 1930**). Do početka 1990-ih godina, virus bronzavosti paradajza bio je jedini član „Tomato spotted wilt“ grupe (**Matthews, 1979; ICTV, 2017**). Međutim, razvoj molekularnih istraživanja doprineo je uočavanju taksonomske povezanosti TSWV sa drugim virusima familije *Bunyaviridae* (**Law et al., 1992**), što je doprinelo svrstavanju TSWV u rod *Tospovirus*, koji je po njemu i dobio naziv. Nakon karakterizacije *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV) (**Law and Moyer, 1990**), rod *Tospovirus* dobio je još jednog člana, a razvoj molekularnih istraživanja doprineo je otkrivanju novih virusa koji su kasnije i zvanično postali članovi ovog roda. TSWV je sve do 2016. godine pripadao familiji *Bunyaviridae* i rodu *Tospovirus* koji je brojao ukupno 29 biljnih virusa (**Hassani-Mehraban et al., 2016**), a njegov zvanični naziv glasio je *Tomato spotted wilt virus*. Međutim, taksonomski istorijat TSWV pokazuje da je u veoma kratkom vremenskom periodu došlo do brojnih promena u nazivu kako samog virusa, tako i familije i roda kojima pripada. Najpre je usledila promena zvaničnog naziva ovog virusa u naziv *Tomato spotted wilt orthotospovirus*, usled njegovog svrstavanja u red *Bunyavirales*, familiju *Tospoviridae* i rod *Orthotospovirus*. Međutim, tokom 2018. godine TSWV dobija novi naziv *Tomato spotted wilt tospovirus* i biva svrstan u familiju *Peribunyaviridae* i rod *Tospovirus*, da bi krajem iste godine ponovo bio imenovan kao *Tomato spotted wilt orthotospovirus* i svrstan u familiju *Tospoviridae* i rod *Orthotospovirus*. Prema poslednjim podacima Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*) iz 2019. godine, zvanični naziv virusa bronzavosti paradajza je *Tomato spotted wilt orthotospovirus* i svrstava se u rod *Orthotospovirus*, familiju *Tospoviridae* i red *Bunyavirales*. Danas red *Bunyavirales* obuhvata preko 350 virusa koji većinom prouzrokuju oboljenja životinja i čoveka, dok manji broj prouzrokuje oboljenja biljaka. Red *Bunyavirales* obuhvata 12 familija, među kojima i familiju *Tospoviridae*, koja sadrži samo jedan rod *Orthotospovirus*. U odnosu na ostale rodove u okviru reda *Bunyavirales*, rod *Orthotospovirus* je izdvojen je jer sadrži samo članove infektivne za biljke, čiji broj prema poslednjim podacima iznosi 26 (**ICTV, 2019**).

Najvažniji kriterijumi za klasifikaciju vrste u rod *Orthotospovirus* zasnivaju se na specifičnosti odnosa virus-vektor, krugu domaćina, serološkom odnosu N proteina i procentu sličnosti aminokiselinske sekvence N proteina, koji mora biti veći od 90% (**Francki et al., 1991; Hoffmann et al., 2001; Silva et al., 2001; Fauquet et al., 2005**). Analize sekvenci N gena različitih *Orthotospovirus*-a pokazale su da postoji visok nivo odstupanja unutar ovog regiona, što je kasnije poslužilo kao važan kriterijum za opisivanje vrsta u okviru ovog roda (**Pappu et al., 2000**). Tako se izolati čija je nukleotidna sličnost sekvence N gena veća od 90% klasifikuju kao izolati iste vrste, dok se izolati koji su serološki srodni sa izolatima određenog *Orthotospovirus*-a, a čiji je procenat sličnosti sekvence N gena 80-90% sa izolatima te vrste klasifikuju kao soj ili neka druga vrsta na osnovu drugih kriterijuma, karakterističnih za datu vrstu. Izolati koji pokazuju manje od 80% sličnosti sekvence N gena klasifikuju se kao druga vrsta (**Tsompana and Moyer, 2008**). Zbog toga su virusi u okviru *Orthotospovirus* roda, na osnovu sekvence N proteina, svrstani u pet filogenetski različitih grupa, koje nose naziv po svom tipskom predstavniku: (i) *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV); (ii) *Soybean vein necrosis orthotospovirus* (SVNV); (iii) *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSV); (iv) *Watermelon silver mottle orthotospovirus* (WSMoV); (v) *Groundnut yellow spot orthotospovirus* (GYSV) (**Oliver and Whitfield, 2016**). Osim toga, geografska udaljenost među ovim grupama dovodi se u vezu sa poreklom svakog *Orthotospovirus*-a, pa se izolati virusa iz

WSMoV i GYSV grupe svrstavaju u azijsku grupu, dok se TSWV i SVNV grupe klasifikuju kao američka grupa. Za razliku od ovih grupa, IYSV grupa klasifikuje se kao evroazijska grupa (**Oliver and Whitfield, 2016; Turina et al., 2016**). Poređenje sekvenci nestrukturnog NSm proteina i intergenskog regiona M RNK može poslužiti kao dodatni kriterijum za identifikaciju *Orthospovirus*-a (**Bhat et al., 1999; Silva et al., 2001**). Međutim, aminokiselinske sekvence glikoproteina Gn i Gc, zbog svoje visoke konzervativnosti, ne mogu poslužiti kao demarkacioni kriterijum za *Orthospovirus*-e (**Elliott and Richard, 1996**).

Osim TSWV, najviše proučeni *Orthospovirus*-i do sada su: *Impatiens necrotic spot orthospovirus* (INSV), *Groundnut ringspot orthospovirus* (GRSV), *Iris yellow spot orthospovirus* (IYSV), *Tomato chlorotic spot orthospovirus* (TCSV) i *Watermelon silver mottle orthospovirus* (WSMoV).

2.2. Rasprostranjenost TSWV

Oboljenje koje izaziva virus bronzavosti paradajza prvi put je opisano početkom XX veka u Australiji kao pegasto uvenuće paradajza, a virusna priroda oboljenja potvrđena je 1930. godine (**Brittlebank, 1919; Samuel et al., 1930**). Do 1940. godine TSWV je intenzivno proučavan i opisan u mnogim zemljama kao virus koji prouzrokuje oboljenja različitih biljnih vrsta sa velikim ekonomskim posledicama. Međutim, posle Drugog svetskog rata TSWV je u Zapadnoj Evropi i u Mediteranskom regionu praktično nestao. Mogući uzrok nestanka virusa bilo je ili napuštanje gajenja duvana u Zapadnoj Evropi ili promena u populaciji vektora *Thrips tabaci*, tako da je nastala populacija bez vektorske sposobnosti imajući u vidu da različite populacije *T. tabaci*, koji je u to vreme bio najvažniji vektor ovog virusa, imaju različitu efikasnost u prenošenju TSWV (**Chatzivassiliou et al., 2000a**). Proučavanja koja su sprovedeli **Cho et al. (1988)** pokazala su da *T. tabaci* ne može da prenese sve izolate TSWV, nakon čega je njegov status najvažnijeg vektora TSWV doveden u pitanje. U kasnijim istraživanjima dokazano je da TSWV najefikasnije prenose mužjaci. Veoma slabu efikasnost u prenošenju TSWV pokazuju populacije *T. tabaci* sačinjene od ženki i mužjaka, dok populacije koje sadrže samo ženke uopšte ne prenose TSWV (**Wijkamp et al., 1995**). Smatra se da na različitu efikasnost prenošenja TSWV između mužjaka i ženki utiču kako njihove fiziološke razlike i način ishranjivanja, tako i vrsta biljke hraniteljke. Osim toga, utvrđeno je da na efikasnost prenošenja utiče i sam izolat virusa. Takođe je moguće da je vektor bio prisutan u malom broju zbog sve efikasnije hemijske kontrole lukovog tripsa. Međutim, ranih 80-ih godina XX veka uočena je ponovna masovna pojava i izraženo geografsko širenje virusa, čemu je prethodila brza ekspanzija drugog efikasnog vektora-*Frankliniella occidentalis*. Ova vrsta, poreklom iz Severne Amerike, danas je široko rasprostranjena u Evropi (**EPPO/CABI, 1997**) i ponovno epidemijsko širenje virusa u Evropi tesno je povezano sa pojavom i brzim širenjem novog efikasnog vektora.

Danas se TSWV ubraja među najrasprostranjenije biljne viruse, čije je prisustvo zabeleženo u umerenim, subtropskim i tropskim regionima širom sveta kako na otvorenom polju, tako i u zatvorenom prostoru (**OEPP/EPPO, 1999**), dok je u hladnijim oblastima značajan problem u proizvodnji različitih useva u zaštićenom prostoru. Njegovo prisustvo zabeleženo je u svim zemljama EPPO regiona, ali i u Aziji, Africi, Severnoj, Centralnoj i Južnoj Americi, Karibima, kao i u zemljama Okeanije (**OEPP/EPPO, 2004**).

Prisustvo TSWV zabeleženo je i u zemljama bivše Jugoslavije. U Hrvatskoj je TSWV detektovan prvi put 1997. godine na paprici u Dalmaciji (**Škorić et al., 1997**), a kasnije njegovo prisustvo potvrđeno je i na paradajzu i hrizantemi (**Kajić i Milanović, 2013**). U Sloveniji oboljenje prouzrokovano ovim virusom prvi put je potvrđeno 2001. godine na povrtarskim kulturama kao što su paprika i paradajz, ali i na različitim ukrasnim biljkama poput hrizanteme, kale, ciklame i spatifiluma (**Mavrič and Ravnikar, 2001**). U Bosni i Hercegovini TSWV najpre je utvrđen kao patogen gloksinije (**Trkulja et al., 2013**), a zatim paprike i duvana (**Delić et al., 2018**), kao i

hrizanteme (Kohnić et al., 2019). U Crnoj Gori virus je detektovan u paprici, ali i brojnim različitim ukrasnim biljkama, kao što su *Dracena* sp., *Primula* sp., *Calceolaria* sp., *Gerbera* sp., *Aquilegia* sp., *Petunia* sp. i *Chrysanthemum* sp. (Zindović et al., 2011, 2014).

Iako je prisutan u Evropi, TSWV se svrstava u OEPP/EPPO A2 listu štetnih organizama i zbog svog značaja ima status karantinskog patogena (OEPP/EPPO, 2020). U Republici Srbiji TSWV se nalazi na IA deo II listi karantinski štetnih organizama („Službeni glasnik RS“ br. 57/15).

2.3. Prisustvo TSWV u Srbiji

Izučavanje virusa bronzavosti paradajza u Srbiji započeto je nakon prve detekcije oboljenja prouzrokovanog ovim virusom 1969. godine u proizvodnji duvana, kada je proglašena epidemija u regionu južne Srbije (Mickovski, 1969). Obilazak terena i praćenje zaraženosti duvana biljnim virusima potvrdilo je dominantnost TSWV u usevu duvana u Vojvodini tokom 1995. i 1999. godine (Jasnić i sar., 2000), kao i početkom poslednje decenije XX veka (Krstić i sar., 2005a, 2005b, 2005c; Dukić i sar., 2006; Đekić i sar., 2006; Krstić i sar., 2006a, 2006b, 2006c, 2006d). S obzirom na značajan uticaj virusnih zaraza na proizvodnju duvana u našoj zemlji, sprovedena su opsežna istraživanja virusa duvana u različitim lokalitetima gajenja u Vojvodini i južnoj Srbiji u periodu od 2005. do 2008. godine (Đekić i sar., 2006; Zindović i sar., 2006; Đekić i sar., 2007a, 2007b, 2008a, 2008b), koja su ukazala na značajno prisustvo TSWV iz godine u godinu, a 2008. godine procenat zaraze prouzrokovane ovim virusom iznosio je čak 100% (Đekić, 2009).

Tokom 90-ih godina prošlog veka, zaraze prouzrokovane TSWV zabeležene su i u usevima paprike (Mijatović i sar., 1999; Dukić i sar., 2002), nakon čega je primećena sve učestalija pojava simptoma na povrtarskim kulturama što govori o značajnom širenju TSWV među najznačajnijim povrtarskim kulturama (Đekić i sar., 2007a; Krstić i Bulajić, 2007; Krstić i sar., 2007; Krstić et al., 2007; Tomić i sar., 2007). Prema navodima Krstić i sar. (2011), značajno prisustvo TSWV ustanovljeno je u usevima paprike gajenim u zaštićenom prostoru, dok prisustvo virusa u usevu gajenom na otvorenom polju nije zabeleženo (Milošević, 2013). S obzirom na značaj povrtarskih kultura u poljoprivrednoj proizvodnji naše zemlje, a naročito paradajza, tokom perioda od 2011. do 2015. godine sprovedeno je praćenje pojave i rasprostranjenosti virusa paradajza u različitim lokalitetima gajenja (Nikolić, 2018; Nikolić et al., 2018). U okviru ovih petogodišnjih istraživanja ustanovljeno je da TSWV, iako prisutan svake godine, nije bio zabeležen u većem procentu do 2015. godine kada je bio drugi po zastupljenosti u usevu paradajza. Osim toga, da opasnost od ovog virusa za proizvodnju paradajza nije mala govori i činjenica da je na pojedinim lokalitetima prisustvo TSWV dokazano u svim testiranim uzorcima izazivajući potpuno propadanje useva (Nikolić, 2018).

Poslednjih godina zabeleženo je i širenje kruga domaćina ovog virusa u našoj zemlji, pa su tako zabeleženi i prvi nalazi ovog virusa na dvema vrstama tikava *Cucurbita pepo* 'Beogradska' i *C. maxima*, koja predstavlja novog domaćina ovog virusa ne samo u Srbiji, već i u svetu (Vučurović i sar., 2012).

Istraživanja sprovedena u periodu 2010-2016. godine, koja su obuhvatila utvrđivanje rasprostranjenosti i učestalosti virusa infektivnih za vrste iz roda *Allium* na različitim lokalitetima gajenja, ukazala su na prisustvo TSWV i na biljkama ovog roda. Prisustvo virusa prvi put je potvrđeno i u uzorcima crnog i belog luka (Stanković et al., 2012; Krstić i sar., 2012; Vučurović, 2019).

Uporedo sa pojavom infekcije prouzrokovane TSWV na duvanu i povrću, prisustvo ovog virusa utvrđeno je i kod brojnih ukrasnih biljaka, gde je zabeleženo značajno širenje ovog virusa (Krstić i Bulajić, 2007). Otkriven je veliki broj novih domaćina ovog virusa za našu zemlju, uključujući prvi nalaz TSWV na *Gerbera hybrida* (Stanković et al., 2011b), biljkama hrizanteme (Stanković et al., 2013) i *Brugmansia* sp. (Nikolić et al., 2013). Dugogodišnja istraživanja prisustva i rasprostranjenosti TSWV u stakleničko-plasteničkoj proizvodnji ukrasnih biljaka u Srbiji, sprovedena u periodu 2005-2013. godine ukazala su na stalno prisustvo i visoku učestalost TSWV.

Prisustvo TSWV dokazano je u velikom broju ukrasnih biljaka poreklom iz različitih rodova, uključujući *Impatiens*, *Petunia*, *Pelargonium*, *Dahlia*, *Chrysanthemum*, *Begonia*, *Salvia*, *Sinningia*, *Calla*, *Iris*, *Amarilis*, *Lysimachia*, *Vinca*, *Verbena*, *Tagetes*, *Cyclamen*, *Gazania*, *Gerbera*, *Hyacianthus*, *Calceolaria* i *Aeschynanthus* (Stanković i sar., 2013).

Proučavanja u našoj zemlji, pre svega odnosila su se na utvrđivanje pojave i rasprostranjenosti TSWV na različitim domaćinima, dok je delimična molekularna karakterizacija na osnovu sekvenci N gena obavljena samo za deo izolata ovog virusa poreklom iz duvana (Stanković et al., 2011a), paprike (Milošević, 2013), tikava (Vučurović et al., 2012) i paradajza (Nikolić, 2018).

2.4. Ekonomski značaj

Sa aspekta ekonomskog značaja, virus bronzavosti paradajza rangira se kao drugi najznačajniji biljni virus u čitavom svetu (Scholthof et al., 2011; Rybicki, 2015). Pojava ovog virusa u epidemijским razmerama u proizvodnji različitih useva širom sveta, doprinela je gubicima koji se procenjuju na oko jednu milijardu dolara godišnje (Scott, 2000), pri čemu gubici mogu biti potpuni (Berling et al., 1990). Najčešće napadnuti usevi kod kojih TSWV izaziva veoma destruktivna oboljenja i velike ekonomske štete su: paprika, paradajz, ukrasne biljke iz rodova *Chrysanthemum*, *Cyclamen* i *Sinningia*, kao i *Senecio cruentus* (OEPP/EPPO, 1999). U nekim regionima Brazila, Argentine, Kanade, Danske, Italije, Holandije, Velike Britanije i SAD, TSWV je postao ekonomski najvažniji virus (OEPP/EPPO, 1999).

Tokom 1980-ih godina, usled naglog širenja TSWV, Zapadnu Evropu pogodili su značajni gubici u proizvodnji različitog povrća i ukrasnih biljaka kako u zaštićenom prostoru, tako i na otvorenom polju naročito u Francuskoj, Italiji, Portugaliji i Španiji (Goldbach and Peters, 1994). Nedugo zatim, u Francuskoj i Španiji zabeležene su zaraze ovim virusom u epidemijским razmerama u usevima paradajza, paprike, kao i u proizvodnji ukrasnih biljaka *Anemone* u zaštićenom prostoru, ali i u polju (OEPP/EPPO, 1999). Koliko TSWV može predstavljati opasnost po proizvodnju značajnih povrtarskih kultura, kao što su paprika i paradajz, svedoče i dosadašnja istraživanja koja su ukazala na potpuni izostanak prinosa u proizvodnji ovih kultura, ne samo na otvorenom polju, već i u zatvorenom prostoru (Gitaitis et al., 1998; Finetti Sialer et al., 2000). Groves et al. (2002) beleže gubitke u proizvodnji paradajza od 25 do 50%, a sveukupne štete prouzrokovane ovim virusom mogu dostići i 44 miliona dolara na godišnjem nivou (Riley and Pappu, 2000). U zemljama okruženja, kao što je Mađarska, zaraze povrća ovim virusom dostizale su nivo 21-68%, dok su prosečni godišnji gubici iznosili 5-40% kada je u pitanju proizvodnja u zaštićenom prostoru (loc. cit. Zindović, 2010). Istraživanja sprovedena u Turskoj ukazala su na uticaj TSWV na smanjenje prinosa (42,1-95,5%) i tržišne vrednosti plodova paradajza, a ukupna šteta procenjena je na oko 0,9 miliona dolara (Sevik and Arli-Sokmen, 2012). Sve do 2000. godine ustanovljene su sporadične pojave *Orthospovirus*-a na paradajzu, soji, krompiru, duvanu i kikirikiju, nakon čega su beležene epidemije skoro svake godine (Ghotbi et al., 2005). Tokom 2007. godine u Srbiji je primećena ekspanzija TSWV u proizvodnji povrća (Krstić i sar., 2007; Krstić et al., 2007; Tomić i sar., 2007), da bi tokom 2011. i 2015. godine zaraze ovim virusom dovele do gotovo potpunih šteta u pojedinim regionima gajenja paradajza (Nikolić, 2018). Karavina and Gubba (2017) identifikovali su TSWV u 50% analiziranog povrća, kao i u hrizantemi, pri čemu je najveći nivo zaraze od oko 11,8% zabeležen kod biljaka iz familije *Solanaceae*, dok je kod biljaka iz familije *Cucurbitaceae* iznosio oko 6,3%. U Venecueli nivo zaraze u proizvodnji paradajza dostigao je čak 70% (Rodríguez-Román et al., 2018).

Cho et al. (1998) su zabeležili da je u početku pojave TSWV smanjenje prinosa salate u Kaliforniji bilo od 5 do 10%, da bi u toku narednih 4-5 godina došlo do epidemijske pojave virusa što je za posledicu imalo smanjenje prinosa čak od 50 do 75%. U proizvodnji salate u svetu zabeleženi su značajni prosečni godišnji gubici (25-50%), pri čemu su u pojedinim regionima, gde se salata gaji u zaštićenom prostoru, gubici dostizali i do 100% (Finetti Sialer et al., 2000).

Na Floridi prisustvo TSWV prvi put je zabeleženo 1974. godine na paradajzu, a deceniju kasnije ovaj virus postao je pretnja za proizvodnju duvana, paprike, lubenice, krompira, ali i ukrasnih biljaka poput impatiensa, gloksinije i gladiole (**Kucharek et al., 2000**). Prosečni godišnji gubici u Džordžiji (SAD) u proizvodnji kikirikija, duvana, paradajza i paprike dostizali su vrednost od oko 100 miliona dolara (**Jain et al., 1998**), od čega nekoliko miliona samo u proizvodnji kikirikija (**Mandal et al., 2001; Culbreath et al., 2003**).

TSWV predstavlja ograničavajući faktor i za proizvodnju duvana u svetu. U Džordžiji (SAD) ovaj virus ugrozio je proizvodnju ne samo kikirikija i paradajza, već i duvana sa nivoom zaraze i do 50%, što je dovelo do toga da su proizvođači bili prinuđeni da preseju pojedina polja duvana (**Kucharek et al., 2000**). Tokom 1999. godine, s obzirom na to da je preko 30% biljaka duvana bilo zaraženo ovim virusom, gubici su procenjeni na više od 28 miliona dolara (**Williams-Woodward, 2000**). Ozbiljni gubici u proizvodnji duvana zabeleženi su i na prostorima bivše Jugoslavije. Epidemijska pojava TSWV na 50-90% biljaka duvana u Srbiji dovela je do toga da je proizvodnja duvana bila u potpunosti ugrožena (**Mickovski, 1969**). Kasnija istraživanja sprovedena u našoj zemlji ukazala su na značajno prisustvo TSWV u proizvodnji duvana, a 2008. godine nivo zaraze dostigao je 100% (**Đekić, 2009**). U susednoj Bosni i Hercegovini zabeležen je nivo zaraze od 24% u proizvodnji duvana i paprike (**Delić et al., 2018**).

Ekspanzija *F. occidentalis*, vektora ovog virusa, značajno je ugrozila stakleničko-plasteničku proizvodnju ukrasnih biljaka širom sveta (**Daughtrey et al., 1997**). Zaraze ukrasnih biljaka mogu biti prouzrokovane od strane TSWV koji može biti u pojedinačnoj ili češće u mešanoj zarazi sa INSV, kada dolazi do pojave destruktivnih simptoma i smanjenja tržišne vrednosti zaraženih biljaka (**Daughtrey et al., 1997**). Štete koje ovaj virus prouzrokuje na ukrasnim biljkama veoma su značajne. Osim simptoma na lišću i stablu, i propadanja biljaka, TSWV utiče na smanjenje kvaliteta i brojnosti cvetova, a takođe, smanjuje i klijavost krtola i lukovica (**Whitfield et al., 2003**). U stakleničko-plasteničkoj proizvodnji ukrasnih biljaka u Srbiji, TSWV je dokazan tokom 2005. godine (**Krstić et al., 2005d**), a u narednim godinama zapaženo je njegovo širenje (**Krstić i Bulajić, 2007**). Značajne štete u našoj zemlji zabeležene su u proizvodnji *Gerbera hybrida* gde je procenat zaraze iznosio 30% (**Stanković et al., 2011b**). Osim toga, virus je detektovan i na biljkama hrizanteme (**Stanković et al., 2013**) i *Brugmansia* sp. (**Nikolić et al., 2013**), a naredna dugogodišnja istraživanja ukazala su na njegovo stalno prisustvo i visoku učestalost u većini lokaliteta naše zemlje (**Stanković i sar., 2013**).

2.5. Domaćini

Zbog veoma izražene polifagne prirode, virus bronzavosti paradajza jedan je od biljnih virusa sa najširim krugom domaćina, koji obuhvata više od 1300 biljnih vrsta iz 92 familije (**Pappu et al., 2009; EFSA, 2012**). TSWV podjednako zaražava dikotiledone i monokotiledone biljke, a najzastupljenije biljne familije među domaćinima ovog virusa jesu familije Asteraceae sa 247 vrsta, Solanaceae sa 172 vrste i Fabaceae sa 60 vrsta (**Parrella et al., 2003**).

Kao najznačajniji prirodni domaćini ovog virusa navode se brojne povrtarske (paradajz, paprika, plavi patlidzan, salata, pasulj, grašak, artičoka, cikorija, krastavac, dinja, lubenica), industrijske (duvan, krompir, kikiriki) i ukrasne biljke (*Alstroemeria, Anemone, Antirrhinum, Araceae, Aster, Begonia, Bouvardia, Calceolaria, Callistephus, Celosia, Cestrum, Columnea, Cyclamen, Dahlia, Dendranthema x grandiflorum, Eustoma, Fatsia japonica, Gazania, Gerbera, Gladiolus, Humulus japonicus, Hydrangea, Impatiens, Iris, Kalanchoe, Leucanthemum, Limonium, Pelargonium, Ranunculus, Saintpaulia, Senecio cruentus, Sinningia, Tagetes, Verbena, Vinca i Zinnia*). U Iranu (**Golnaraghi et al., 2001**) i Džordžiji (SAD) (**Nischwitz et al., 2006**), TSWV je detektovan u biljkama soje koje nisu ispoljavale simptome karakteristične za infekciju prouzrokovanu ovim virusom. S obzirom na to, iako još uvek nije potvrđeno, smatra se da asimptomatične biljke soje predstavljaju rezervoar inokuluma ovog virusa koji se dalje, putem vektora-tripsa, može preneti na

različite useve i korovske biljke. Osim toga, kao prirodni domaćini TSWV navode se i neke vrste voćaka kao što su papaja i ananas (Brunt et al., 1995; Cho et al., 1998). Do sada nijedna drvenasta biljka nije navedena kao domaćin TSWV, uključujući dve ukrasne drvenaste biljke, ružu (*Rosa* hibridi) i božićnu zvezdu (*Euphorbia pulcherrima*) (Daughtrey et al., 1997).

Osim kultivisanih biljaka, u prirodne domaćine ovog virusa ubrajaju se mnoge korovske vrste, kao što su: *Sonchus* sp., *Ranunculus arvensis*, *Taraxacum officinale*, *Stelaria media*, *Arctium lappa*, *Solanum dulcamara*, *Chenopodium album*, *Rumex crispus*, *Convolvulus tricolor*, *Datura stramonium*, *Plantago major*, *Polygonum convolvulus*, *Artemisia vulgaris*, *Amaranthus albus*, *Polygonum lapathifolium*, *Portulaca oleracea*, *Senecio vulgaris*, *Solanum nigrum*, *Cirsium arvense*, *Sinapis arvensis*, *Trifolium* sp., *Vicia* sp., *Ballota nigra*, *Lamium amplexicaule*, *Portulaca oleracea*, *Potentilla reptans*, *Galium aparine*, *Veronica officinalis*, *Solanum nigrum*, *Chamomilla* sp., *Verbena officinalis* i druge (Jorda et al., 1995; Mertelik and Mokra, 1999; OEPP/EPPO, 1999; Chatzivassiliou et al., 2001; Mavrič and Ravnkar, 2001; Groves et al., 2002; Parrella et al., 2003; Love, 2005; Takacs et al., 2006). Značaj korovskih vrsta u ulozi prirodnih domaćina TSWV ogleda se ne samo u njihovoj brojnosti, već i u tome što predstavljaju mesto održavanja virusa i vektora u zimskom periodu i na taj način postaju primarni izvor zaraze za gajene biljke.

Pomoću soka prirodno zaraženih biljaka, TSWV se lako prenosi mehanički na test-biljke, mada takvo prenošenje nema značaja za širenje virusa u prirodi. Eksperimentalni domaćini TSWV koji se najčešće koriste u dijagnostičke svrhe su: *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *Datura stramonium*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinningia speciosa*, *Impatiens walleriana* i *Dendrathermum x grandiflorum* (Daughtrey et al., 1997; Parrella et al., 2003; OEPP/EPPO, 2004). Dijagnostički najkorisnijom vrstom, odnosno indikator-biljkom za sve *Orthotospovirus*-e smatra se *Petunia x hybrida* (Allen and Matteoni, 1991), koja ispoljava karakteristične lokalne nekrotične prstenaste pege 2-4 dana nakon inokulacije.

2.6. Simptomatologija

Virus bronzavosti paradajza prouzrokuje veliki broj veoma različitih simptoma na svojim domaćinima, pri čemu kod nekih domaćina može doći do pojave asimptomatske reakcije (Kucharek et al., 2000). U zavisnosti od sorte, faze razvika u kojoj se biljka nalazi i uslova spoljašnje sredine, a naročito temperature kao značajnog faktora u jačini ispoljavanja simptoma, na jednoj zaraženoj biljnoj vrsti simptomi mogu varirati (Allen et al., 1991). Različiti izolati ovog virusa na istom domaćinu pri istim uslovima spoljašnje sredine mogu izazvati različite simptome (de Avila et al., 1992). Da bi došlo do razvoja simptoma, neophodno je da prođe period inkubacije 3-14 dana od nastupanja infekcije, s tim što taj period nekada može trajati i znatno duže (Kucharek et al., 2000). Simptomi koje prouzrokuje TSWV veoma su slični onima koje prouzrokuju drugi *Orthotospovirus*-i i zbog toga je gotovo nemoguće utvrditi samo na osnovu simptoma o kom virusu se radi. Simptomi koje izaziva TSWV ponekad mogu asociirati na simptome koji nastaju ili kao posledica fiziopatije u vidu nedostatka, odnosno viška hranljivih materija, ili na one prouzrokovane drugim biljnim patogenima poput bakterija ili gljiva. Osim toga, nekrotične pege na lišću često se mogu pogrešno protumačiti kao oštećenja od pesticida. One biljke kod kojih dolazi do latentnih zaraza, odnosno zaraza bez vidljivih simptoma, predstavljaju značajnu opasnost kao izvor inokuluma u staklenicima. Biljke domaćini, kao što su paradajz, impatiens, ciklama, begonija i gloksinija, na zarazu TSWV reaguju ispoljavanjem specifičnih simptoma u vidu malih koncentričnih prstenova na lišću, cvetovima ili plodovima, koji su u početku žute ili ljubičaste, a kasnije žutosmeđe do smeđe boje. Na zarazu TSWV ukazuju i specifični simptomi na najmlađem lišću paradajza koje poprma bronzastu boju, kao i pojava ljubičastih pruga na stablu paradajza i impatiensa. Simptomi prouzrokovani ovim virusom, a koji se javljaju kod različitih domaćina jesu i žute ili tamnosmeđe prstenaste pege ili prstenovi, kao i različite linijske šare, crne pruge na peteljka i stablu, nekrotične pege na lišću ili nekroza vrha biljke.

Na biljkama paradajza simptomi se mogu javiti na čitavoj biljci, uključujući lišće, peteljke, stablo i plodove. U zavisnosti od faze razvoja biljke u vreme infekcije, simptomi mogu biti različiti. Mlado lišće je uvijeno i naborano, prekriveno malim tamnosmeđim pegama i sa zadebljalim nervima. Simptom tipičan za infekciju ovim virusom, a koji se javlja na lišću jeste bronzavost. Peteljke i stablo reaguju ispoljavanjem nekroze koja se manifestuje u vidu tamnosmeđih traka, a takve biljke kasnije potpuno propadaju. Zaražena biljka može biti smanjenog porasta ukoliko vršni meristem zahvati sistemična nekroza. Ukoliko dođe do progresije infekcije, simptomi se mogu javiti i na nedozrelim plodovima u vidu svetlozelenih prstenova sa izdignutim centrom, pri čemu ceo plod biva prošaran. Na mladim zelenim plodovima moguća je pojava i nekrotičnih prstenova i šara praćenih deformacijom ploda. Pojava simptoma na zrelih plodovima u vidu bledocrvenih, belih ili narandžastih polja oivičenih koncentričnim prstenovima dovodi do gubitka njihove tržišne vrednosti. Zabeležena je i pojava kada zaražene biljke na infekciju reaguju pojavom simptoma isključivo na plodovima (Pavan et al., 1996; OEPP/EPPO, 1999; Chatzivassiliou et al., 2000b; Krstić i Bulajić, 2007).

Zaražene biljke paprike ispoljavaju žutilo lišća i cele biljke, što za posledicu ima kržljivost čitave biljke. Mlado lišće ostaje sitno, deformisano, naborano i sa zadebljalim nervima, dok se kod starijeg lišća često javlja mozaik sa izraženim koncentričnim prstenastim pegama ili hlorotični, prstenasti linijski mozaik. Kao i kod paradajza, i lišće paprike može ispoljiti bronzastu boju. Na stablu se mogu javiti dugačke nekrotične pruge, čije širenje se pruža sve do vršnog meristema. Kod zaraženih biljaka ovim virusom onemogućeno je normalno zametanje plodova, a plodovi koji se formiraju nakon infekcije nerazvijeni su i veoma deformisani, nepravilne obojenosti, sa dugačkim nekrotičnim prugama i pegama ili u vidu mozaične ili nekrotične prstenaste pegavosti, što na kraju kod mlađih plodova rezultira potpunom nekrozom. Osim toga, može doći i do izumiranja grančica, skraćivanja internodija stabla, što zaraženoj biljci daje žbunast izgled koji prati propadanje čitave biljke (Mumford et al., 1996b; OEPP/EPPO, 1999; Chatzivassiliou et al., 2000b; Krstić i Bulajić, 2007).

Na mlađem lišću duvana javljaju se koncentrične prstenaste pege, a nervi postaju zadebljali i prosvetljavaju. Tipičan simptom koji TSWV izaziva na duvanu jeste zastoj u porastu srednjeg lisnog nerva oko kojeg se tkivo dalje razvija, pa list postaje naboran i savija se prema naličju, uz pojavu linijskih ili koncentričnih prstenastih šara. Zaražene liske nakon procesa sušenja pocrne i na taj način gube upotrebnu vrednost. Na cvetovima i čaurama dolazi do pojave nekrotičnih pega, kao i do nekroze vršnog meristema i skraćivanja internodija, što dovodi do toga da takve biljke zaostaju u porastu (OEPP/EPPO, 1999; Chatzivassiliou et al., 2000b; Anonymus, 2002; Krstić i Bulajić, 2007).

Simptomi na ukrasnim biljkama variraju među vrstama, ali i sortama iste vrste. Na lišću *Chrysanthemum indicum* dolazi do pojave koncentrično prstenastih, linijskih ili nepravilnih pega bronzaste boje, a može doći i do pojave hlorotičnog do bronzastog mozaika na lišću novih izdanaka zaraženih biljaka. Cvetovi su sitni, a krunični listići su proređeni i nekrotiraju. Takođe, često se javljaju nekrotične crne pruge na stablu i takve biljke venu. Zaražene biljke muškatile (*Pelargonium* sp.) ispoljavaju simptome u vidu belih do hlorotičnih prstenova ili koncentričnih pega, a vršni listovi su sitniji. Kod zaraženih biljaka iz roda *Impatiens* na lišću se javlja hlorotičan mozaik nepravilnog oblika ili hlorotični i nekrotični koncentrični prstenovi, dok se brojnost i kvalitet cvetova smanjuje (Matteoni and Allen, 1989; Chatzivassiliou et al., 2000b; Whitfield et al., 2003; Krstić i Bulajić, 2007).

Dijagnoza oboljenja koje prouzrokuje TSWV veoma je teška na osnovu simptoma, imajući u vidu njihovu raznovrsnost i variranje u zavisnosti od vremena infekcije, soja virusa, vrste, sorte i faze razvoja biljke domaćina, ali i faktora spoljne sredine, kao što su temperatura i intenzitet svetlosti.

2.7. Epidemiologija

Virus bronzavosti paradajza u prirodi se širi putem vektora-tripsa i zaraženim propagativnim biljnim materijalom. Do sada je ustanovljeno devet vrsta tripsa iz dva roda *Frankliniella* i *Thrips*, koji ovaj virus prenose na cirkulativan (perzistentan) i propagativan način, što znači da se virus umnožava u telu vektora (Rotenberg et al., 2015). Dva najznačajnija vektora TSWV jesu vrste *Frankliniella occidentalis* (kalifornijski ili zapadni cvetni trips) i *Thrips tabaci* (lukov trips), a kao učestale vrste navode se i *F. schultzei* (pamukov trips) i *F. fusca* (duvanov trips) (Amin et al., 1981; EPPO/CABI, 1992; Webb et al., 1997). Prvi opisani i dokazani vektor TSWV je *Thrips tabaci*, a 1930. godine potvrđena je vektorska uloga *F. schultzei* (Samuel et al., 1930). Pet godina kasnije potvrđena je i vektorska uloga vrste *F. occidentalis* (Gardner et al., 1935). Nakon toga, vektorska uloga ustanovljena je i kod preostalih vrsta, kao što su: *F. fusca* (Sakimura, 1963), *T. setosus* (Fujisawa et al., 1988), *F. intonsa* (Wijkamp et al., 1995), *F. bispinosa* (Webb et al., 1998), *F. gemina* (de Borbón et al., 1999) i *F. cephalica* (Ohnishi et al., 2006). Prema navodima Fauquet et al. (2005) i *Thrips palmi* je smatran vektorom TSWV, ali se danas ova vrsta tripsa ne ubraja među vektore ovog virusa.

Od svih razvojnih stadijuma tripsa, usvajanje TSWV moguće je samo od strane larvi prvog i drugog stupnja (L1 i L2) tokom ishrane na zaraženoj biljci, a dalje prenošenje virusa odvija se od strane L2 i imaga (Oliver and Whitfield, 2016). Za uspješno usvajanje virusa može biti dovoljna intenzivna ishrana larvi na zaraženoj biljci u trajanju od svega nekoliko minuta, ali sa dužim periodom ishrane mogućnost usvajanja virusa znatno je veća. Larve usvajaju virus iz citoplazme biljne ćelije, a njegov transport odvija se kroz lumen digestivnog trakta larve gde dospeva do srednjeg creva. Proces endocitoze omogućava prolazak virusa kroz membranu srednjeg creva i njegovo dospevanje u pljuvačne žlezde. Da bi se virus zadržao u telu tripsa, neophodno je njegovo dospevanje u pljuvačne žlezde pre prelaska larve u stadijum lutke (Chatzivassiliou et al., 2002), jer tokom presvlačenja dolazi do obnavljanja epitelnih ćelija srednjeg creva, što može dovesti do njegove eliminacije iz tela vektora (Nagata et al., 2000). Nakon uspešnog usvajanja, virus se održava u larvi i tokom preobražaja prenosi na odraslu jedinku. Iako imago nema sposobnost usvajanja, on prenosi virus i omogućava njegovo dalje širenje. Inokulacija zdravih biljaka, odnosno njihovo zaražavanje postiže se lučenjem pljuvačke prilikom takozvane plitke ishrane tripsa u epidermalnim ćelijama (Moyer et al., 1999). Dokazano je da 80% larvi postaje virulentno nakon ishrane na zaraženim biljkama i da drugi larveni stadijum, kao i imago, ima sposobnost prenošenja virusa. Takođe, pojedina istraživanja ukazuju i na to da su larve drugog stupnja, kao prenosioci virusa, potencijalno efikasnije u odnosu na imaga, naročito u zaštićenom prostoru. Dužina trajanja latentnog perioda, odnosno vreme koje je potrebno da bi se virus umnožio u telu larve, traje od 3 do 10 dana i može biti završeno tokom ovog razvojnog stadijuma (German et al., 1992; Peters and Goldbach, 1995; Nagata et al., 2000; Naidu et al., 2008). Period maksimalne infektivnosti vektora nakon usvajanja virusa može trajati od 22 do 30 dana i često traje sve do uginuća vektora (OEPP/EPPO, 1999). Prenošnje virusa jajima tripsa nije registrovano (Elliott and Richard, 1996). U proleće primarno širenje TSWV obavljaju imaga tripsa tako što prelaze sa korovskih na povrtarske biljke (Groves et al., 2001), na kojima se dalje razmnožavaju, hrane i ostvaruju nove zaraze u toku vegetacije (Momol et al., 2004). U zimskom periodu virus se može održati u velikom broju korovskih i ukrasnih biljaka, koje predstavljaju značajan izvor inokuluma za narednu vegetaciju (Mertelik and Mokra, 1999; Finetti Sialer et al., 2000, 2002).

U zavisnosti od biljke domaćina, vrste izolata, kao i geografskog porekla, različite vrste tripsa pokazuju različitu efikasnost u prenošenju TSWV (Peters and Goldbach, 1995). U proizvodnji ukrasnih i povrtarskih biljaka u zatvorenom prostoru, kao najznačajniji vektor TSWV ističe se *F. occidentalis*. Za tripse *F. schultzei* i *T. tabaci* dokazano je da veoma efikasno prenose TSWV (de Borbón et al., 2006), ali isto tako u okviru istraživanja koja su sprovedeli Nagata et al. (2004) utvrđeno je da ove vrste nisu prenosile ispitivane izolate ovog virusa. U odnosu na *F. occidentalis* i *T. tabaci*,

F. fusca se pokazao kao efikasniji prenosilac dva kanadska izolata TSWV (Cho et al., 1998), a Jain et al. (1998) su utvrdili da su u Džordžiji najefikasniji vektori TSWV *F. occidentalis* i *F. fusca*. Ekspanzija određene vrste vektora u određenom području utiče na pojavu TSWV u istom. Tako je tokom ranih 80-ih godina prošlog veka kao posledica prenamnoženja *F. occidentalis* došlo do nagle pojave TSWV u južnom delu Severne Amerike, odakle se proširio u zemlje Zapadne Evrope (Culbreath et al., 2003). Napuštanje proizvodnje duvana u mnogim regionima Zapadne Evrope nakon Drugog svetskog rata dovelo je do stvaranja jedinki *T. tabaci* bez vektorske aktivnosti (OEPP/EPP, 1999), što je imalo uticaj na to da virus u ovom području praktično nestane. Za epidemijsko širenje TSWV u Grčkoj, odgovornom i najefikasnijom vrstom vektora smatra se *T. tabaci* (Tsakiridis and Gooding, 1972), dok se za područje Evrope i Severne Amerike kao najefikasniji vektor navodi vrsta *F. occidentalis* (Nagata et al., 2004).

Drugi veoma značajan način širenja TSWV jeste međunarodna trgovina biljnim materijalom u vidu rasada i reznica, koje mogu biti zaražene virusom ili infestirane zaraženim tripsima (Hausbeck et al., 1992). Prenošenje virusa zaraženim lukovicama i krtolama je retko i manje značajno (Robb et al., 1998; Kucharek et al., 2000). Međutim, prenošenje TSWV zaraženim krtolama krompira može imati veliki značaj, imajući u vidu da se u zavisnosti od sorte beleži prenosivost u iznosu od 5 do čak 84%. Zaražene krtole koje ne ispoljavaju simptome zaraze ili ispoljavaju simptome koji podsećaju na one prouzrokovane drugim patogenima, takođe mogu predstavljati značajan izvor zaraze. Takođe, reznice uglavnom ne ispoljavaju simptome virusne zaraze, a kod pojedinih ukrasnih biljaka poput hrizanteme i dalje česte su latentne zaraze ili do ispoljavanja simptoma infekcije dolazi tek dva meseca od njenog nastupanja (Peters and Goldbach, 1995; Krstić i Bulajić, 2007).

Veoma značajan izvor inokuluma u prirodi predstavljaju zaražene korovske vrste u kojima se TSWV održava tokom zimskog perioda i dalje prenosi na osetljive biljke (Groves et al., 2001). Osim toga, one imaju i ulogu reproduktivnog domaćina kada su u pitanju vektori ovog virusa. Takođe, prenošenje TSWV moguće je i mehaničkim putem i kalemljenjem. Virus se lako prenosi sokom prirodno zaraženih biljaka na test-biljke, ali većina istraživača (Best, 1968; Brunt et al., 1995; Peters and Goldbach, 1995) smatra da mehaničko prenošenje ima samo eksperimentalni značaj.

Groves et al. (2016) dokazali su da se *Soybean vein necrosis orthospovirus* (SVNV) prenosi semenom u niskom procentu, što ujedno predstavlja i jedini podatak za ovakav vid transmisije u prirodi kada su u pitanju *Orthospovirus*-i. Osim prenošenja semenom, ni prenošenje polenom biljaka domaćina nije zabeleženo kod TSWV i drugih *Orthospovirus*-a (Reddy and Wightman, 1988; Jones et al., 2014).

2.8. Morfologija virusnih čestica i organizacija genoma

Na osnovu morfologije, čestice TSWV klasifikuju se kao čestice kvazisferičnog oblika i okruglog izgleda, bez vidljivih kapsomera, a njihov prečnik iznosi 80-120 nm. Proces formiranja virusne čestice odvija se unutar ćelije domaćina gde se virusni nukleoprotein lokalizuje unutar citoplazme, duž mreže koju formiraju aktinski filamenti i endoplazmatični retikulum (Ribeiro et al., 2009; Montero-Astua, 2012; Dietzgen et al., 2012). Zatim, virusni nukleoprotein stupa u interakciju sa genomom RNK i tokom procesa formiranja čestica ribonukleoproteini, sačinjeni od RNK zavisne RNK polimeraze, nukleoproteina i genomne RNK, bivaju obavijeni dvostrukom lipoproteinskim omotačem poreklom od membrane Goldžijevog aparata iz koje u vidu šiljaka vire dva virusno kodirana glikoproteina Gn i Gc (Kikkert et al., 1999; Ribeiro et al., 2009, 2013; Li et al., 2015). U završnoj fazi morfogeneze čestica formiraju se velike vezikule u kojima se akumuliraju zrele virusne čestice omotane jednostrukim omotačem koji nastaje međusobnom fuzijom dvostrukog omotača poreklom od membrana Goldžijevog aparata ili fuzijom dvostrukog omotača sa membranama endoplazmatičnog retikuluma. Ovako formirane virusne čestice omotane jednim omotačem ostaju u vezikulama u kojim su dostupne za usvajanje od strane vektora tripsa (Kikkert et

al., 1997, 1999, 2001). Pretpostavlja se da je za prenošenje virusa tripsima neophodno da virusna čestica sadrži omotač, dok to nije preduslov kada je u pitanju zaražavanje biljke domaćina (**Sin et al., 2005**). U građu virusa uključene su različite komponente, od kojih udeo od po 5% imaju RNK i ugljeni hidrati, 20% čine lipidi, dok udeo proteina iznosi 70% (**Brunt et al., 1996; Anonymus, 2002**).

Genom virusa sastoji se od tri linearne jednolančane RNK (*single stranded RNAs*, ssRNAs), označene kao S RNK (*short* 2,9 kbp), M RNK (*middle* 4,8 kbp) i L RNK (*large* 8,9 kbp). U zavisnosti od polarnosti one mogu biti: neinfektivne, odnosno negativne polarnosti [(-) ssRNA] ili „ambisense”, odnosno ambiinformacione [(+/-) ssRNA]. Otvoreni okviri čitanja (*open reading frame*, ORF) mogu biti: virusni (*viral sense* ORF) i virusno komplementarni (*viral complementary sense* ORF) (**Qiu et al., 1998; Pappu et al., 2000; Silva et al., 2001**). S i M RNK sadrže oba tipa ORF, dok je kod L RNK prisutan samo virusno komplementarni ORF (**Pappu et al., 2000**). Virion sačinjen od trodelnog genoma i brojnih kopija proteinskih subjedinica N proteina, poprima pseudocirkularne konformacije (ili konformacije tipa ukosnice-*hairpar*), odnosno formira kružne (pseudocirkularne) ribonukleoproteine koji su povezani sa 10-20 kopija L proteina (RNK zavisna RNK polimeraza). U česticama TSWV nalaze se i virusno-komplementarni lanci S i M RNK, čiji se odnos može izraziti u vidu 10 virusnih lanaca po jednom virusno-komplementarnom lancu (**Mumford et al., 1996b; Soellick et al., 2000; Silva et al., 2001; Prins and Komerlink, 2004a**). Konzervativna sekvenca od osam nukleotida (5'-AGAGCAAU-3'), karakteristična za sve *Orthotospovirus*-e (**Moyer, 1999**), prisutna je u terminalnim regionima sve tri RNK.

Otvorene okvire čitanja kod ambiinformacionih S i M RNK razdvajaju intergenski regioni (*intergenic regions*, IGR), koji predstavljaju najvarijabilnije delove genoma TSWV i imaju ulogu u procesu dvosmerne transkripcije (**Geerts-Dimitriadou et al., 2012**). Osim toga, intergenski regioni sadrže visok procenat adenina i uracila, i imaju sposobnost formiranja konformacija tipa ukosnice (**Heinze et al., 2003**). Prisustvo ovih konformacija na 3' kraju netraslirajućeg regiona (*untranslated region*, UTR) TSWV iRNK upućuje na moguću ulogu intergenskih regiona u procesu translacije (**Geerts-Dimitriadou et al., 2012**). Prisustvo viriona TSWV primećeno je u citoplazmi ćelija svih delova zaražene biljke. U takvim ćelijama dolazi do formiranja inkluzija neobičnog oblika (**Brunt et al., 1995**), a formiranje različitih struktura u citoplazmi, poput viroplazme i dugačkih filamenata, zavisi od faze replikacije TSWV (**Silva et al., 2001**). Grupisanje viriona primećeno je u vakuolama za koje se pretpostavlja da nastaju usled ispupčenja na određenim delovima endoplazmatičnog retikuluma.

Do sada je u prirodi utvrđeno postojanje dve različite vrste defektnih formi TSWV: morfološki defektne forme (**Verkleij and Peters, 1983; Ie, 1982**) i defektne ometajuće RNK (*defective interfering RNAs*, DI RNAs) (**Resende et al., 1991**). Morfološki defektne forme karakteriše odsustvo omotača virusne čestice i na preparatima za elektronsku mikroskopiju imaju izgled amorfnih tamnih agregata u citoplazmi biljnih ćelija. U ćelijama biljaka zaraženim ovakvim formama virusa nije moguće detektovati glikoproteine. S obzirom da ovakve forme mogu nastati nakon serije mehaničkih inokulacija biljaka *Nicotiana benthamiana*, ali ne i *N. rustica*, zaključuje se da je uloga biljke domaćina u procesu stvaranja ovakvih mutanata izuzetno važna. Iako mehanizam nastanka ovih defektnih formi nije u potpunosti jasan, ustanovljeno je da pojava delecija u okviru ORF za glikoproteine predstavlja uzrok ove pojave. Kao posledica ovih delecija, dolazi do izostanka formiranja bar jednog od glikoproteina, kao i okupljanja lipoproteinskog omotača oko virusne čestice, što ometa prenosivost virusa tripsima, a takođe ometa i sakupljanje virusnih čestica. Delecijom L RNK, koja bude za oko 5 kbp kraća od L RNK normalnih čestica TSWV na kojoj se nalaze geni za polimerazu, nastaju defektne ometajuće (DI) RNK. Tačan mehanizam nastanka ovih formi nije utvrđen, ali je poznato da su povezane sa oslabljenom infektivnošću i da dovode do slabijeg ispoljavanja simptoma. **Margarita et al. (2014)** uočili su prisustvo delecija u NSs proteinu, ali i izostanak prekursora za glikoproteine, kao i lipoproteinskog omotača oko virusne čestice defektne forme (p202/3RB) TSWV izolata p202/3WT, navodeći da je ovo prvi zabeleženi slučaj da neki od izolata virusa iz familije *Tospoviridae* i pored ovih nedostataka nije izgubio sposobnost ostvarivanja infekcije.

2.9. Funkcije proteina

Najveća L RNK je neinfektivna (–), monocistronska i kodira jedan protein, dok su M RNK i S RNK ambiinformacione (+/–), bicistronske i kodiraju po dva proteina. Genom TSWV sastoji se od ukupno pet gena koji kodiraju pet proteina: (i) RNK zavisna RNK polimeraza (*RNA-dependent RNA polymerase, RdRp protein*) ili L protein; (ii) nestrukturani NSm protein (*non-structural protein*); (iii) Gn i Gc glikoproteini (*glycoproteins*); (iv) nestrukturani NSs protein (*non-structural protein*); (v) strukturani N protein (*nucleocapsid protein*; protein nukleokapsida).

Fragment L RNK (8897 nt), negativne polarnosti (–), na otvorenom okviru čitanja (*viral complementary sense ORF*) kodira L protein (332 kDa) koji predstavlja enzim tipa transkriptaze i obavlja ulogu virusne RNK zavisne RNK polimeraze, koja prepisuje negativni (–) lanac L RNK u iRNK (**de Haan et al., 1991; Pappu et al., 2000; Silva et al., 2001**). Na krajevima L RNK prisutne su komplementarne sekvence (dužine 62-65 nt) koje omogućavaju RNK da formira konformacije tipa ukosnice, koje učestvuju u stvaranju kružnih nukleokapsida u okviru virusne čestice. Osim toga, terminalne sekvence sadrže početni signal za enkapsidaciju i sintezu RNK, što ih čini veoma značajnim kada su u pitanju procesi transkripcije i replikacije (**de Haan et al., 1991**).

Fragment M RNK (4821 nt) odlikuje polarnost tipa „*ambisense*“ (+/–). Na 5' kraju M RNK nalazi se virusni ORF (*viral sense ORF*) koji kodira NSm protein (33,6 kDa), dok se na 3' kraju nalazi virusno-komplementarni ORF koji kodira prekursore glikoproteina Gn i Gc (127,4 kDa) (**Qiu et al., 1998**). S obzirom na to da su čestice TSWV veće od prečnika plazmodezmi, ne postoji mogućnost prenošenja celokupne, formirane virusne čestice, već mogućnost prenošenja ima samo infektivni nukleokapsid (subvirusna čestica), tj. kompleks izgrađen od virusne genomne RNK, nukleokapsidnog proteina i virusno kodirane polimeraze. Postojanje ovog kompleksa je važno, jer da bi uopšte došlo do procesa transkripcije i replikacije, odnosno infekcije, neophodno je da RNK zavisna RNK polimeraza bude transportovana u novu ćeliju zajedno sa virusnom RNK (**Soellick et al., 2000**). Ključnu ulogu u transportu ovog kompleksa iz ćelije u ćeliju obavlja NSm protein, koji se zbog svoje uloge naziva još i „transportni protein“. Tubularne strukture koje formira ovaj protein zapravo omogućavaju međućelijsko prenošenje infektivnih nukleokapsida, odnosno pomenutog kompleksa. NSm protein odlikuju karakteristike tipične za virusne transportne proteine: ekspresija samo u ranim fazama infekcije, povezanost sa plazmodezmama i nukleokapsidnim agregacijama u citoplazmi, i mogućnost formiranja tubularnih struktura. Za kodiranje ovog proteina, NSm gen koristi strategiju koja je drugačija u odnosu na strategije zabeležene kod animalnih i humanih virusa familije *Tospoviridae* (**Soellick et al., 2000**), pa se pretpostavlja da je došlo do evolutivne promene, odnosno adaptacije roda *Orthotospovirus* na biljke kao domaćine (**Goldbach and Peters, 1994**). Evolucija NSm proteina dovela je do još jedne njegove značajne adaptacije, odnosno do promena na pojedinim kodonima njegove aminokiselinske sekvence, koje omogućavaju ovom virusu da prevaziđe otpornost biljaka paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti (**Hallwas et al., 2014**). Osim njegove glavne uloge u transportu virusa od ćelije do ćelije, kao i uloge u prevazilaženju otpornosti paradajza, pretpostavlja se da NSm protein ima uticaj i na određivanje kruga domaćina i ekspresiju simptoma (**Tsompana et al., 2005**), ali i na stvaranje cevastih (tubularnih) struktura u protoplastu biljnih ćelija i ćelijama tripsa (**Silva et al., 2001; Fauquet et al., 2005; Tsompana et al., 2005**). Takođe, potvrđeno je da sekvenca NSm gena može poslužiti kao dodatni kriterijum za klasifikaciju različitih virusa u okviru roda *Orthotospovirus* (**Goldbach and Peters, 1994**). Glikoproteini, Gn i Gc, obavljaju značajnu ulogu u interakciji virus-vektor (**Fauquet et al., 2005**). Smatra se da su ovi proteini neophodni u procesu usvajanja čestica TSWV od strane larvi tripsa, koordinirajući njihovu cirkulaciju kroz telo vektora (**Margarita et al., 2014**). Poznato je da glikoprotein Gn omogućava vezivanje čestica TSWV za epitelne ćelije srednjeg creva kao prvog mesta infekcije u tripsu (**Whitfield et al., 2004**).

Fragment S RNK (2916 nt) je najkraći i, kao i M RNK, odlikuje se „*ambisense*“ polarnošću sa dva otvorena okvira čitanja (*viral sense ORF* i *viral complementary sense ORF*). Na 5' kraju S RNK virusni ORF kodira nestrukturani NSs protein (52,4 kDa), dok na 3' kraju virusno-

komplementarni ORF kodira N strukturni protein, odnosno nukleokapsid (28,8 kDa) (**Peters and Goldbach, 1995; Elliott and Richard, 1996; Qiu et al., 1998**). U ćelijama zaraženim TSWV, NSs protein izaziva formiranje agregata ili filamenata, dok u ćelijama zaraženim INSV dovodi do formiranja parakristalnih struktura (**Kormelink et al., 1991**). NSs protein ima ulogu u ekspresiji simptoma i ispoljava supresorsku aktivnost u procesu „utišavanja gena“ (*gene silencing*) od strane biljke domaćina (**Takeda et al., 2002; Sonoda, 2003; Sonoda et al., 2005**). Prema navodima **Margarita et al. (2014)**, ovakva supresorska aktivnost NSs proteina uočena je i u samom vektoru, tripsu *F. occidentalis*. Osim toga, literaturni podaci upućuju na ulogu NSs proteina i u procesu translacije (**Geerts-Dimitriadou et al., 2012**). U odnosu na glikoproteine (Gn-Gc) koji su neophodni pri usvajanju čestica TSWV od strane larvi tripsa, NSs protein nije neophodan, ali je njegova uloga od presudnog značaja kada je u pitanju nagomilavanje virusnih čestica u tkivu pljuvačnih žlezda vektora (**Wijkamp et al., 1993**), što omogućava uspešno prenošenje virusa od strane adulta (**Margarita et al., 2014**). Međutim, kada su u pitanju NSs-defektne forme izolata TSWV, uočeno je da ovakvi izolati mogu biti usvojeni od strane larve tripsa, ali usled vrlo niske koncentracije, odnosno niske akumulacije virusa u adultu, dolazi do odsustva transmisije ovakvih izolata (**Margarita et al., 2014**). Nedavna istraživanja ukazala su na to da se NSs protein može ponašati kao inhibitor biosinteze pojedinih isparljivih biljnih monoterpena, koji imaju repelentno dejstvo na vektora-tripsa *F. occidentalis*, što govori o sinergističkom odnosu TSWV i vektora-tripsa (**Wu et al., 2019**). Kao i NSm protein, i NSs protein podlegao je evolutivnim promenama, koje su imale za posledicu nekoliko promena u aminokiselinskoj sekvenci ovog proteina kod „*resistance-breaking*“ (RB) izolata TSWV koji imaju sposobnost zaražavanja komercijalnih sorti paprike sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti na TSWV (**de Ronde et al., 2013**). N protein učestvuje u formiranju proteinskog omotača, koji predstavlja zaštitni sloj oko virusnih RNK, a osim toga kontroliše i procese transkripcije i replikacije virusne RNK (**Li et al., 2015**).

2.10. Filogenetska ispitivanja

Zbog postojanja trodelnog genoma, raznovrsnost sojeva ovog virusa uslovljena je ne samo mutacijama i rekombinacijama, već i pseudorekombinacijama koje podrazumevaju preraspodelu između samih genomnih segmenata (**Qiu et al., 1998**). Heterogenost populacije ovog virusa u prirodi (pojedinačni izolati) ogleda se u postojanju jednog ili dva dominantna haplotipa i većeg broja haplotipova znatno niže učestalosti (**Moyer et al., 2006**). Proučavajući populacije TSWV različitog geografskog porekla, **Tsompana et al. (2005)** su ustanovili da je u većini slučajeva vrednost parametara koji određuju diverzitet haplotipa visoka, a diverziteta nukleotidne sekvence jako niska, tj. da je raznolikost haplotipa izražena, dok su nukleotidne sekvence izolata sa visokim stepenom homologije. Raznolikost izolata ovog virusa odražava se i na ekspresiju simptoma na različitim domaćinima, serološke osobine, kao i adaptibilnost virusa na nove domaćine i nova geografska područja. Zbog toga se smatra da su brojne epidemije širom sveta nastale širenjem takozvanih „starih“ varijanti virusa na nove biljne vrste (**Hull, 2009**). U literaturnim podacima autora **Margarita et al. (2007)** saopšteno je postojanje razlika u simptomima na biljkama *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *Datura stramonium*, *Solanum lycopersicum*, *Ocimum basilicum* i *Emilia sonchifolia*, koje su prouzrokovali različiti sojevi ovog virusa.

Chatzivassiliou et al. (2000b) su na osnovu rezultata dobijenih pomoću ELISA testa uz upotrebu poliklonalnih i monoklonalnih antitela specifičnih za protein nukleokapsida (N protein) i dva glikoproteina (Gn i Gc), ustanovili serološku varijabilnost TSWV i izvršili grupisanje *Orthospovirus*-a u pet različitih serogrupa i serotipova. Na osnovu reakcije sa monoklonalnim antitelima za N protein, kao jedini član serogrupe I navodi se TSWV, dok se u serogrupu III svrstao *Impatiens necrotic spot orthospovirus* (INSV) (**Soler et al., 2003**). Na isti način, virusi *Tomato chlorotic spot orthospovirus* (TCSV) i *Groundnut ringspot orthospovirus* (GRSV) svrstali su se u okviru serogrupe II (**Soler et al., 2003**), za koju je ustanovljeno da se sastoji od dva serotipa

formirana na osnovu reakcije virusa sa monoklonalnim antitelima specifičnim za TSWV glikoproteine Gn i Gc (Peters and Goldbach, 1995). Sličnost između *Orthotospovirus*-a prve tri serogrupe ogleđa se u postojanju određene homologije u sekvencama glikoproteina Gc, dok su razlike među njima ustanovljene u okviru veličine sekvenci glikoproteina Gn (Soler et al., 2003). Takođe, na osnovu analize sekvenci N proteina zabeležene su značajne razlike između serogrupa I i III, dok serogrupa II pokazuje 75% sličnosti sa izolatima serogrupe I i 57% sličnosti sa izolatima serogrupe III (de Avila et al., 1993). U serogrupu IV svrstani su virusi *Watermelon silver mottle orthotospovirus* (WSMoV), *Groundnut bud necrosis orthotospovirus* (GBNV) i *Watermelon bud necrosis orthotospovirus* (WBNV), za čiji je N protein utvrđeno da se serološki razlikuje od N proteina prve tri serogrupe. Za serogrupu V, ustanovljen je nizak stepen serološke sličnosti sa drugim serogrupama, a kao član ove serogrupe navodi se *Groundnut yellow spot orthotospovirus* (GYSV). Otkriće novog virusa i novog člana *Orthotospovirus* roda, *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSV), doprinelo je formiranju nove serogrupe, prvenstveno zbog niskog stepena sličnosti sa drugim *Orthotospovirus*-ima kada se posmatra NSs protein. Ovaj virus pokazao je najveću sličnost (44%) sa virusima serogrupe IV (Soler et al., 2003). Pojedini *Orthotospovirus*-i, kao što su *Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* (ZLCV) i *Melon yellow spot orthotospovirus* (MYSV), nisu svrstani ni u jednu od postojećih pet serogrupa (Soler et al., 2003).

Molekularne analize i rezultati filogenetskih analiza doveli su do podele *Orthotospovirus*-a u pet filogenetski različitih grupa (i) *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV); (ii) *Soybean vein necrosis orthotospovirus* (SVNV); (iii) *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSV); (iv) *Watermelon silver mottle orthotospovirus* (WSMoV); (v) *Groundnut yellow spot orthotospovirus* (GYSV) (Oliver and Whitfield, 2016). Geografska rasprostranjenost ovih grupa dovodi se u vezu sa poreklom, pa se izolati virusa iz WSMoV i GYSV grupe svrstavaju u azijsku grupu, TSWV i SVNV grupe klasifikuju se kao američka grupa, dok se IYSV grupa klasifikuje kao evroazijska grupa (Silva et al., 2001; Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008; Oliver and Whitfield, 2016; Turina et al., 2016). Virus bronzavosti paradajza pripada „američkoj“ grupi *Orthotospovirus*-a (Silva et al., 2001). Filogenetske analize na osnovu kodirajućih (N, NSs i NSm) i nekodirajućih (IGR na S i M RNK) sekvenci omogućavaju otkrivanje sličnosti i razlika 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). Sivparsad and Gubba (2008) su tokom poređenja sekvenci N gena izolata TSWV različitog geografskog porekla utvrdili da njihova međusobna sličnost iznosi više od 90%. U pionirskom radu grupe autora Tsompana et al. (2005), u kom je izvršena rekonstrukcija filogenetskih stabala na osnovu sekvenci NSs, N, NSm i Gn-Gc gena, ustanovljeno je razdvajanje prirodne populacije TSWV na osnovu geografskog porekla, što je potvrđeno i u drugim istraživanjima (Dietzgen et al., 2005; Persley et al., 2006; Sivparsad and Gubba, 2008). U istom radu Tsompana et al. (2005) zabeležena su i odstupanja u načinu grupisanja izolata, koje nije u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom. Ta odstupanja odnose se na nekoliko izolata TSWV poreklom iz Južne Afrike i Severne Karoline, koji su se grupisali sa evropskim izolatima, ali se odnose i na izdvajanje izolata iz Španije od ostalih evropskih izolata. Izolati TSWV iz Južne Afrike i iz Severne Karoline pokazali su genetičku sličnost sa izolatima iz Holandije, što ukazuje na protok gena, tkz. „gene flow“, iz Evrope u Južnu Afriku i iz Evrope u Severnu Karolinu, koji je zabeležen i kod nekih drugih *Orthotospovirus*-a (Nischwitz et al., 2007). Pretpostavlja se da je međunarodna trgovina biljnim materijalom, odnosno uvoz zaraženog biljnog materijala iz Holandije, koja predstavlja centar propagacije biljnog materijala, doprineo introdukciji ovih izolata u druge zemlje ili kontinente (Tsompana et al., 2005). Iako od strane Tsompana et al. (2005) nije dato objašnjenje zbog čega je došlo do izdvajanja španskih izolata, ova pojava se može posmatrati kao posledica dve nezavisne introdukcije TSWV u Evropu, pri čemu ovi izolati imaju bližeg zajedničkog evolutivnog pretka sa izolatima sa američkog kontinenta. Istraživanja koja su sprovedi Tentchev et al. (2011) obuhvatila su veliki broj izolata TSWV različitog geografskog porekla i u odnosu na istraživanja koja su sprovedi Tsompana et al. (2005), uključila su i izolate TSWV poreklom sa azijskog kontinenta. Rezultati ovih istraživanja potvrdili su prethodne tvrdnje koje se odnose na grupisanje izolata TSWV na osnovu

geografskog porekla. Osim toga, **Tentchev et al. (2011)** došli su do zaključka da postoji veći broj izolata TSWV, čije grupisanje odstupa od ovakvog načina grupisanja, ukazujući na više puteva introdukcije izolata ovog virusa. Tako je uočeno da su se pojedini francuski izolati TSWV grupisali zajedno sa azijskim izolatima ovog virusa. Pojavu ovakvih odstupanja, **Tentchev et al. (2011)** objasnili su kroz dva moguća scenarija: (i) „*emergence*“ scenario podrazumeva zajedničko rasprostranjenje širom sveta tripsa *F. occidentalis* i populacije TSWV poreklom iz zapadnog dela Severne Amerike, koje je dalje omogućilo lokalnu ekspanziju dospele populacije virusa u novim geografskim područjima; (ii) „*re-emergence*“ scenario koji se odnosi se na to da introdukcija *F. occidentalis* u određeno područje podstiče ponovnu ekspanziju već prisutne lokalne populacije TSWV na tom području. Takođe, ukazali su i da nije isključena mogućnost istovremenog ostvarenja oba scenarija u određenim područjima. Sagledavanjem filogenetskog stabla, koje su **Tsompana et al. (2005)** rekonstruisali na osnovu N gena, uočava se da se jedan izolat TSWV poreklom iz Brazila izdvaja u odnosu na ostale izolate uključene u analizu, tj. može se smatrati podgrupom jednog velikog klastera u kome se nalaze izolati iz SAD (Kalifornija, Džordžija, Severna Karolina, Havaji i Kolorado), Španije i Italije. Uključivanjem tri izolata TSWV iz Brazila u analizu, **Tentchev et al. (2011)** rekonstruisali su filogenetsko stablo na osnovu N gena koje pokazuje izdvajanje ovih izolata u poseban klaster, pri čemu se takođe može uočiti njihova povezanost sa evropskim i američkim izolatima ovog virusa. Filogenetske analize na osnovu RdRp, N i NSs gena pokazale su da četiri izolata TSWV iz Irana formiraju zaseban klaster u odnosu na ostale izolate ovog virusa uključene u analizu (**Abadkhah et al., 2018**). Iranski izolati pokazali su veću bliskost sa izolatima TSWV iz jugozapadne Evrope (Italija, Španija, Francuska) nego sa azijskim i američkim izolatima, pa se pretpostavlja da su ovi izolati introdukovani iz Evrope, obzirom na intenzivnu evroazijsku trgovinu biljnim materijalom (**Abadkhah et al., 2018**).

2.11. Varijabilnost virusa

Raznovrsnost izolata TSWV posledica je promena koje se dešavaju u okviru trodelnog genoma ovog virusa, odnosno brojnih mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija (**Qiu et al., 1998; Bhat et al., 1999; Kaye, 2009**). Mutacije su promene koje se obično dešavaju tokom procesa replikacije nukleinskih kiselina i ispoljavaju se u vidu delecija (gubljenje) i insercija (dodavanje) nukleotida ili supstitucija (zamena) jednog nukleotida drugim, što za posledicu može imati promene u strukturi proteina. Ukoliko se delecije, insercije i supstitucije odnose na delove gena, onda se te genetičke promene označavaju kao rekombinacije, dok se preraspodele celih genomnih segmenata trodelnog genoma TSWV označavaju kao pseudorekombinacije (**Qiu et al., 1998; Qiu and Moyer, 1999**). Upravo zbog ovih osobina, TSWV predstavlja dobar model za proučavanje evolutivnih pitanja poput definisanja genetičke strukture u populaciji virusa i parametara koji je određuju (**Tsompana et al., 2005**). Kao glavne parametre za merenje genetičkog diverziteta unutar populacije virusa, **Moury et al. (2006)** navode broj, frekventnost i diverzitet haplotipova, ali i genetičke razlike unutar i između sekvenci virusa. **Tsompana et al. (2005)** prvi su istraživali ove parametre kod TSWV, dok su se sva pređašnja evolutivna proučavanja kako ovog virusa, tako i drugih članova roda *Orthospovirus* i familije *Tospoviridae*, zasnivala pre svega na filogenetskoj/taksonomskoj analizi ili utvrđivanju genetičkih razlika (**de Avila et al., 1993; Dewey et al., 1997; Pappu et al., 1998; Heinze et al., 2001**). Tokom tih istraživanja ustanovljeno je da su pojedini virusi familije *Tospoviridae* nastali kao posledica mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija (**Plyusnin, 2002**), kao i širenja na nove biljne vrste (**Bohlman et al., 2002**). Stoga, za uspešno proučavanje evolucije različitih izolata TSWV, neophodno je sprovođenje statističke analize parametara genetičke strukture populacije virusa. Istraživanja koja su sprovedeli **Qiu and Moyer (1999)** ukazala su na zastupljenost TSWV u prirodi u vidu kompleksa haplotipova koji odlikuje visok nivo adaptibilnosti. Analiza strukture populacije, genetičkog diverziteta i izvora genetičke varijabilnosti izolata TSWV porekom iz Severne Karoline i Virdžinije, pokazala je da haplotipsku strukturu svakog gena čini jedan ili dva preovlađujuća

haplotipa i više od 100 haplotipova predstavljenih jednim izolatom (Kaye, 2009). Strukture populacije slične ovoj zabeležene su i kod drugih jednolančanih RNK virusa (García-Arenal et al., 2001). Istraživanja sprovedena od strane Kaye (2009) pokazala su da RdRp gen pokazuje veći diverzitet na osnovu broja haplotipova, njihove frekventnosti u populaciji virusa i proračuna genetičke udaljenosti, nego što to čine N i NSm gen. Kada je u pitanju prisustvo rekombinacija ili pseudorekombinacija kod izolata TSWV u prirodi, prva istraživanja koja su sprovedeli Tsompana et al. (2005) nisu pružila dokaze o njihovom prisustvu, iako su do tada postojale tvrdnje koje su na osnovu laboratorijskih eksperimenata ukazale da izolati TSWV ispoljavaju veliki potencijal za međusobnu razmenu genetičkog materijala, naročito kada su biljke zaražene mešavinom različitih izolata ovog virusa (Qiu et al., 1998; Qiu and Moyer, 1999; Jahn et al., 2000; Hoffmann et al., 2001; Margaria et al., 2007). Kao mogući razlog za izostanak detekcije pseudorekombinacija u prirodnoj populaciji TSWV, navodi se tadašnji mali broj dostupnih sekvenci, naročito za L RNK (Tentchev et al., 2011). Prema ranijim istraživanjima, smatralo se da rekombinacije predstavljaju glavni evolutivni mehanizam kod virusa sa jednolančanom RNK i sporedni evolutivni mehanizam kod RNK virusa sa višedelnim genomom (Pressing and Reaney, 1984; Chao, 1988), što je i potvrđeno u saopštenjima za dva biljna virusa, kao što su *Soybean mosaic virus* (SMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Fraile et al., 1997; Gagarinova et al., 2008; Seo et al., 2009). Kasnija istraživanja pokazala su da i rekombinacije i pseudorekombinacije predstavljaju značajne evolutivne mehanizme kod RNK virusa sa višedelnim genomom, što je i dokazano kada je u pitanju *Brome mosaic virus* (BMV) (Bruyere et al., 2000). Stopa pojave rekombinacija i pseudorekombinacija može biti povezana sa genetičkom strukturom i životnim ciklusom nekog virusa (Simon-Loriere and Holmes, 2011). Dosadašnja saopštenja pokazala su da su u prirodi zastupljena upravo ova dva tipa promena kada su u pitanju sva tri genomna segmenta (S, M i L RNK) izolata TSWV (Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Zhang et al., 2016). U literaturi se navodi da su gotovo sva mesta rekombinacija detektovana pretežno na 5' kraju RNK lanca sve tri genomne RNK (S, M i L RNK) (Zhang et al., 2016). Pretpostavlja se da na ovu pojavu utiče način replikacije svakog od ova tri genomna segmenta, kao i njihova genetička struktura, ali to još uvek nije zvanično potvrđeno. Iako su istraživanja koja su sprovedeli Lian et al. (2013) ukazala na nižu stopu pojave rekombinacija u odnosu na stopu pseudorekombinacija kod izolata TSWV, Zhang et al. (2016) su analizirajući kompletne sekvence izolata TSWV poreklom iz Kine, ali i iz drugih delova sveta, osim pseudorekombinacija, detektovali i 88 mesta rekombinacija kod 27 sekvenci L segmenta, 143 mesta kod 56 sekvenci M segmenta i čak 174 mesta rekombinacija kod 61 sekvence S segmenta. Ovi podaci ukazuju na značajno prisustvo ne samo pseudorekombinacija, već i rekombinacija u populaciji TSWV. Pretpostavlja se da i rekombinacije i pseudorekombinacije dobijaju na značaju kada dođe do introdukcije nekog izolata TSWV u novo područje gde su potencijalni domaćini već zaraženi nekim drugim izolatom ovog virusa (Lian et al., 2013). Osim toga, isti autori smatraju da broj mesta rekombinacija može biti u korelaciji sa veličinom analiziranog genomnog segmenta izolata TSWV uključenih u analizu. Međutim, isto tako ukazuju na to da analiza većeg broja izolata nema uvek za posledicu detekciju većeg broja rekombinacija i navode primer S RNK, kod koje su detektovana samo dva mesta rekombinacija na osnovu analize sekvenci 53 izolata TSWV. Takođe, mali broj sekvenci nekog genomnog segmenta, u ovom slučaju sekvenci L RNK izolata TSWV uključenih u analizu, može imati uticaj na krajnji ishod rezultata analize, odnosno može da utiče na to da li će određena mesta rekombinacija biti uzeta u obzir ili ne, što se postiže upotrebom više različitih metoda za detekciju rekombinacija (Lian et al., 2013). Literaturni navodi nekoliko grupa autora upućuju na veoma izraženu genetičku varijabilnost i postojanje rekombinacionih mesta u okviru RdRp gena različitih biljnih virusa (Teycheney et al., 2005; Turturo et al., 2005; Jonson et al., 2009; Elsayed et al., 2012). Proučavanjem 13 izolata TSWV iz Koreje, ustanovljene su određene razlike u nukleotidnim sekvencama pojedinih izolata na nivou L RNK, odnosno kompletnog RdRp gena, iako je među ovim izolatima uočena izražena konzervativnost nukleotidnih sekvenci na osnovu kompletnih S i M RNK (Lian et al., 2013). Filogenetskim analizama ovi autori pokazali su da sekvence L i M RNK većine korejskih izolata vode poreklo iz zemalja Zapadne Evrope ili Severne Amerike, a da sekvence S RNK svih analiziranih korejskih izolata vode poreklo iz Azije. Oni su,

takođe, uočili i razmenu celih genskih regiona kod pojedinih korejskih izolata, što objašnjava njihovo različito poreklo i upućuje na to da su ovi izolati podlegli procesima pseudorekombinacija. Dosadašnji literaturni podaci govore i o varijabilnosti u okviru TSWV S RNK. Tako su **Qiu et al. (1998)** opisali međusobnu razmenu genomnih segmenata tri izolata TSWV, pri čemu su ustanovili izraženu dominantnost S RNK izolata TSWV-D u odnosu na S RNK izolata TSWV-10, pod pretpostavkom da je tome doprinelo dupliranje određenog broja nukleotida u IGR RNK S izolata TSWV-10. U pojedinim specifičnim uslovima, S RNK ovog virusa pokazuje izraženu dominantnost kada je biljka domaćin otporna na TSWV usled transgene ekspresije N proteina (**Qiu and Moyer, 1999**). Međutim, novija istraživanja pokazala su da se S RNK ovog virusa odlikuje slabom kompetitivnošću i lako biva zamenjena tokom evolucije virusa (**Tentchev et al., 2011**). Pretpostavlja se da IGR S RNK ima određenu ulogu u regulisanju procesa preraspodele genomnih segmenata, odnosno procesa pseudorekombinacija (**Qiu et al., 1998**). U istraživanjima **Zhang et al. (2016)** navodi se da različiti izolati TSWV kod kojih je detektovano prisustvo rekombinacija na nekom od tri genomna segmenta, pokazuju međusobnu bliskost, koja se odražava na njihovo blisko grupisanje u filogenetskom stablu.

Prva istraživanja o uticaju evolutivnih parametara na populaciju TSWV, sprovedena od strane **Tsompana et al. (2005)**, pokazala su da pozitivna selekcija favorizuje razlikovanje vrsta u okviru *Orthotospovirus* roda. U brojnim publikacijama navodi se da na svih pet genskih regiona TSWV dominantan uticaj ima negativna (*purifying*) selekcija, uprkos uticaju pozitivne selekcije na pojedine kodone genskih regiona ovog virusa (**Tsompana et al., 2005; Kaye et al., 2011; Tentchev et al., 2011; Sundaraj et al., 2014; Lai et al., 2021**). Iako **Tsompana et al. (2005)** nisu zabeležili uticaj pozitivne selekcije samo kod NSm gena, kasnija istraživanja koja su obuhvatila izolate TSWV poreklom iz osetljivih i otpornih sorti kikirikija potvrdila su da je NSm gen analiziranih izolata bio pod uticajem pozitivne selekcije (**Lai et al., 2021**). Imajući u vidu uloge NSm gena kao transportnog proteina (**Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995; Soellick et al., 2000**) i avirulentnog faktora u prevazilaženju otpornosti komercijalnih sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti (**Hoffmann et al., 2001; Peiró et al., 2014**), ustanovljeno je da je nesinonimna supstitucija na poziciji 118 (C118Y) NSm proteina, koja je jedna od dve odgovorne supstitucije za prevazilaženje otpornosti kod paradajza, pod uticajem pozitivne selekcije (**López et al. 2011**). S druge strane, pokazalo se da se 11 kodona NSs proteina, koji ima ulogu avirulentnog faktora u prevazilaženju otpornosti komercijalnih sorti paprike sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti (**Margarita et al., 2007; de Ronde et al., 2013, 2014**), kao i ulogu supresora u „utišavanju gena“ od strane biljke domaćina (**Takeda et al., 2002**), nalaze pod uticajem pozitivne selekcije (**Tentchev et al., 2011**), dok je za N gen uglavnom utvrđen nešto manji broj kodona (**Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011; Kaye et al., 2011; Lai et al., 2021**).

Varijabilnost u osobinama i različitim delovima genoma uočena je i kod drugih *Orthotospovirus*-a, što ukazuje na mogući protok gena iz udaljenih ili bliskih geografskih regiona, kao i višestruku introdukciju u isti region usled razvijene međunarodne ili interkontinentalne razmene biljnog materijala (**Kritzman et al., 2001; Smith et al., 2006; Nischwitz et al., 2007; Bulajić et al., 2009**).

2.12. „Resistance-breaking“ izolati TSWV

Dosadašnja istraživanja doprinela su pronalasku nekoliko izvora otpornosti prema TSWV u divljim vrstama *Lycopersicon pimpinellifolium* (**Samuel et al., 1930**) i *L. esculentum* (**Holmes, 1948**), koje su korišćene kao genetski resursi za dobijanje otpornih linija paradajza. Tom prilikom dobijena su dva dominantna, *Sw-1a* i *Sw-1b*, i tri recesivna gena *sw-2*, *sw-3* i *sw-4*, čija je otpornost vrlo brzo prevaziđena od strane TSWV (**Finlay, 1953; Stevens et al., 1992; Price et al., 2007; Stevens et al., 2007; Saidi and Warade, 2008**). Kasnije je divlja vrsta *Lycopersicon peruvianum* (sinonim *Solanum peruvianum*), koja je u prirodi rasprostranjena u Južnoj Americi (**Nakazato et al.,**

2012), zbog svoje genetičke sličnosti sa gajenim paradajzom (Nesbitt and Tanksley, 2002), postala predmet daljih istraživanja u cilju iznalaženja novih gena otpornosti prema TSWV. To je doprinelo identifikaciji još jednog dominantnog gena *Sw-5* (Smith, 1944), za koji je dokazano da pokazuje otpornost prema velikom broju izolata *Orthotospovirus*-a u SAD (Stevens et al., 1992) i Brazilu (Boiteux and Giordano, 1993). Osim ovog gena, identifikovana su još dva gena, *Sw-6* i *Sw-7*, za koje je utvrđeno da pružaju samo delimičnu otpornost prema manjem broju izolata TSWV (Rosello et al., 1998; Rosello et al., 2001). Od svih osam opisanih gena kod paradajza (*Sw-1a*, *Sw-1b*, *sw-2*, *sw-3*, *sw-4*, *Sw-5*, *Sw-6* i *Sw-7*), koji pružaju otpornost na TSWV, pokazalo se da je *Sw-5* gen najstabilniji, pa je samim tim i najviše proučavan. Ustanovljeno je da postoji pet paraloga *Sw-5* gena (*Sw-5a*, *Sw-5b*, *Sw-5c*, *Sw-5d* i *Sw-5e*), od kojih je *Sw-5b* gen jedini komercijalno iskorišćen, obzirom da se pokazao efikasnim i dovoljno stabilnim da pruži otpornost ne samo prema TSWV, već i prema drugim *Orthotospovirus*-ima, kao što su: *Tomato chlorotic spot orthotospovirus* (TCSV), *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus* (CSNV), *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV) i *Alstroemeria necrotic spot orthotospovirus* (ANSV) (Turina et al., 2016). Drugi dominantni gen otpornosti je *Tsw* gen, koji je identifikovan u divljoj vrsti *Capsicum chinense* (Boiteux, 1995). U odnosu na *Sw-5b* gen, *Tsw* gen pokazuje efikasnu otpornost paprike samo ka većem broju izolata TSWV, ali ne i prema drugim biljnim virusima (Boiteux, 1995).

Uvođenje *Sw-5b*, odnosno *Tsw* gena u komercijalne sorte paradajza i paprike (Turina et al., 2016; Ferrand et al., 2019) doprinelo je uspešnoj kontroli ovog oboljenja. Međutim, višegodišnja i ekstenzivna upotreba otpornih sorti paradajza i paprike vrlo brzo je u različitim delovima sveta, pod uticajem selekcionog pritiska, dovela do pojave RB izolata TSWV sposobnih da prevaziđu otpornost kako paradajza, tako i paprike (Latham and Jones, 1998; de Ronde et al., 2013). Do prvog sloma otpornosti, izazvanog pojavom RB izolata TSWV kod biljaka paradajza sa *Sw-5b* genom, došlo je najpre u Južnoafričkoj Republici (Thompson and Van Zijl, 1996), dok je u Evropi prva pojava ovih izolata zabeležena u Španiji (Aramburu and Martí, 2003), a zatim i u Italiji (Ciuffo et al., 2005). RB izolati TSWV, koji su uspeli da prevaziđu otpornost *Tsw* gena u paprici, prvi put su detektovani u Brazilu (Boiteux and Nagata, 1993), a kasnije i u Italiji (Roggero et al., 2002). Nakon toga, došlo je praktično do ekspanzije RB (*resistance-breaking*) izolata TSWV u mnogim zemljama u kojima se na velikim površinama intenzivno gaje otporni hibridi paradajza, odnosno paprike (Cho et al., 1996; Latham and Jones, 1998; Thomas-Carrol and Jones, 2003; Ciuffo et al., 2005; Gordillo et al., 2008; Deligoz et al., 2014; Almási et al., 2015; Batuman et al., 2017; Jiang et al., 2017; Ferrand et al., 2019). Na osnovu sposobnosti TSWV da prevaziđe otpornost kod paradajza i paprike, uspostavljena su dva tipa izolata TSWV: (i) izolati koji podstiču otpornost, odnosno podstiču hipersenzitivni odgovor otpornih biljaka i označavaju se kao „*resistance-inducing*“ (RI) izolati ili kao „*non-resistance-breaking*“ (NRB) izolati i (ii) „*resistance-breaking*“ (RB) izolati, koji su sposobni da prevaziđu otpornost biljaka (Peiró et al., 2014; Ferrand et al., 2019).

Najpre su Hoffmann et al. (2001) saopštili da se genetički faktor TSWV odgovoran za prevazilaženje otpornosti kod sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom, nalazi u okviru M RNK, a kasnije su ove tvrdnje eksperimentalno potvrđene i dokazano je da protein NSm gena predstavlja avirulentni faktor za *Sw-5b* gen (Hallwass et al., 2014; Debreczeni et al., 2015). Kod RB izolata TSWV uočene su aminokiselinske supstitucije na dve pozicije u okviru NSm proteina, pri čemu na poziciji 118 dolazi do zamene cisteina (C) tirozinom (Y), dok na poziciji 120 treonin (T) biva zamenjen asparaginom (N) (López et al., 2011). Osim toga, rezultati istraživanja koja su sprovedeli Peiró et al. (2014), ukazali su na to da bi RB izolati TSWV mogli uspešno da obavljaju svoju ulogu, neophodno je da postoji i supstitucija aminokiselina na poziciji 130, gde se izoleucin (I) nalazi umesto valina (V). Ova promena ima značaj u sistemskom (*cell-to-cell*) transportu virusa i prisutna je kod većine izolata TSWV koji su dostupni u GenBank bazi podataka. Za većinu kodona u NSm proteinu utvrđeno je da su pod uticajem neutralne ili negativne (*purifying*) selekcije, dok za kodon na poziciji 118 ustanovljeno je da je pod uticajem pozitivne selekcije, upravo zbog svoje adaptacije na

prevazilaženje otpornosti *Sw-5b* gena (López et al., 2011). Do istog zaključka došli su i Peiró et al. (2014), kada su u pitanju kodoni na pozicijama 120 i 130.

Rezultati istraživanja koja su sproveli Jahn et al. (2000), a koja su se odnosila na otpornost paprike kontrolisane *Tsw* genom, doveli su do zaključka da je za njenu aktivaciju odgovoran genetički faktor u okviru TSWV S RNK. Nakon izvesnog vremena dokazano je da protein kodiran NSs genom ovog virusa predstavlja avirulentni faktor za *Tsw* gen (de Ronde et al., 2013). Više autora zabeležilo je postojanje različitih međusobno nezavisnih promena u okviru NSs proteina kod analiziranih RB izolata TSWV (Margaria et al., 2007; Tentchev et al., 2011; de Ronde et al., 2014). Pa tako Tentchev et al. (2011) navode da su pojedine aminokiselinske supstitucije na različitim pozicijama (38, 79, 130, 138, 262, 264, 288, 389, 390, 438, 459 i 462) u NSs proteinu RB izolata TSWV pod uticajem pozitivne selekcije. Takođe, isti autori ukazali su na to da je fenotip RB izolata TSWV pod uticajem višestrukih nezavisnih evolutivnih događaja, što je potvrđeno i od strane drugih autora (Almási et al., 2015; Jiang et al., 2017; de Ronde et al., 2019).

2.13. Kontrola

Kontrola oboljenja koje prouzrokuje virus bronzavosti paradajza otežana je pre svega zbog njegove brze adaptibilnosti na nove domaćine i nova geografska područja, kao i velike varijabilnosti izolata koja im omogućava brzo prevazilaženje konvencionalne i transgenetičke otpornosti (Cho et al., 1996; Mandal et al., 2006). Osim toga, visoka efikasnost prenošenja virusa vektorima-tripsima, kao i teškoće u kontroli vektora usled njegovih bioloških karakteristika i brzog razvijanja rezistentnosti, čine ovaj virus jednim od najopasnijih, naročito u proizvodnji povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru, ali i na otvorenom polju.

Do sada je bilo nekoliko uspešnih pokušaja primene supstanci sa antivirusnim dejstvom, kao što je virazol (ribavirin), koji utiče na sprečavanje ispoljavanja sistemичne infekcije u biljkama paradajza i duvana (de Fazio et al., 1980). Međutim, u praksi za sada ne postoje dovoljno efikasne direktne mere koje omogućavaju uspešnu kontrolu TSWV. Sprovođenje integralnog programa zaštite, koji podrazumeva kombinaciju određenih fizičkih, agrotehničkih i hemijskih mera, predstavlja najbolji vid kontrole ovog virusa (Culbreath et al., 2003; Coutts et al., 2004; Krstić i sar., 2006d). Ove mere odnose se na rano uništavanje zaraženih biljaka u usevu, kao i korovskih biljaka, prostornu izolaciju osetljivih biljnih vrsta i korišćenje otpornih sorti, koje za cilj imaju smanjenje izvora zaraze i populacije vektora (Culbreath et al., 2003; Peters and Goldbach, 1995). Imajući u vidu da TSWV ima izrazito širok krug domaćina, preporučuje se prostorna izolacija proizvodnje rasada povrtarskih biljaka (paradajz, paprika, salata), rasada duvana od proizvodnje cveća, kao i već posađenih reznica od rasada cveća (Kucharek et al., 2000; Hartman et al., 2005).

Imajući u vidu da su prenošenje propagativnim materijalom i prenošenje vektorima-tripsima osnovni načini širenja ovog virusa, kao glavne preventivne mere kontrole navode se upotreba bezvirusnog ili na viruse testiranog propagativnog materijala i suzbijanje vektora. Zbog toga je neophodno posvetiti posebnu pažnju i graničnom pregledu pošiljki cveća, rasada i sadnog materijala pre svega paradajza i paprike iz uvoza, koji predstavljaju najčešći put introdukcije kako virusa, tako i vektora u zemlju. Da bi kontrola TSWV bila uspešna, neophodno je izvršiti ranu detekciju i suzbijanje vektora virusa (OEPP/EPPO, 1999), koja je poprilično otežana obzirom na to da *F. occidentalis* raspolaže višestrukim rezistentnim mehanizmom, razvijajući rezistentnost ne samo na insekticide sa istim, već i na insekticide sa različitim aktivnim materijama (Momol et al., 2004). Imajući u vidu da virus zaražava veliki broj biljnih vrsta u prirodi, pokazalo se da suzbijanje tripsa u plasteničko-stakleničkoj proizvodnji daje bolje rezultate u odnosu na suzbijanje na otvorenom polju (Peters and Goldbach, 1995). Ono što dodatno otežava suzbijanje vektora jeste kratak period razvoja jedinki, visok nivo reproduktivnosti, kao i veliki broj generacija koje se preklapaju tokom vegetacije (Hatala-Zseller and Kiss, 1999). Takođe, otežanom suzbijanju vektora dosprinosi i njegove

biološke karakteristike, odnosno „skriveni“ način života gde su jaja prisutna u lisnom tkivu ili cvetnoj loži, nimfe u zemljištu, a larve u cvetnim i lisnim pupoljcima, što im omogućava zaštitu od delovanja insekticida. U cilju praćenja populacije tripsa preporučuje se postavljanje lepljivih klopki na više mesta u zasadu, blizu ulaznih vrata u staklenicima i plastenicima, kao i blizu ventilacionih otvora. Korisne su i biljke *Petunia x hybrida*, koje mogu poslužiti kao biološki indikatori prisustva zaraženih tripsa. Nakon inokulacije one brzo ispoljavaju tipične lokalne srebrnkaste ili smeđe nekrotične pege, koje se javljaju nakon 3-7 dana (McDonough et al., 2005), pa ih treba postaviti na plavu podlogu koja privlači tripse. Kao dopunske mere koje daju dobre efekte u smanjenju brojnosti i migracije tripsa u zaštićeni prostor, jesu primena aluminijumskih folija oko ventilacionih otvora (Zitter et al., 1989) i UV apsorbujuće plastične pokrivke (Antignus et al., 1996). U svetu se primenjuju i biološke mere korišćenjem predatorskih insekata (*Orius* spp.), predatorskih grinja (*Amblyseius* (*Neoseiulus*) *cucumeris* i druge), parazitoida, nematoda, i gljiva (Higgins, 1992; Bennison et al., 2001). Do sada su najviše korišćeni komercijalno dostupni *Amblyseius cucumeris* i *Orius* (Mumford et al., 1996b; Bennison et al., 2001). Međutim, pokazalo se da je biološka kontrola efikasna jedino ako se primenjuje u sklopu svih drugih preventivnih mera.

Uvođenje *Sw-5b* i *Tsw* gena otpornosti u komercijalne sorte paradajza i paprike (Turina et al., 2016; Ferrand et al., 2019), doprinelo je uspešnoj kontroli ovog oboljenja. Međutim, višegodišnja i ekstenzivna upotreba otpornih sorti paradajza i paprike vrlo brzo je u različitim delovima sveta, pod uticajem selekcionog pritiska, dovela do pojave RB izolata TSWV sposobnih da prevaziđu otpornost kako paradajza, tako i paprike (Latham and Jones, 1998; de Ronde et al., 2013). Pretpostavlja se da bi RB izolati TSWV pod selekcionim pritiskom, usled ekstenzivnog gajenja otpornih hibrida paradajza u glavnim proizvodnim područjima, mogli veoma brzo da postanu prevalentni u odnosu na RI izolate (Finetti Sialer et al., 2002). Upravo zbog brze adaptacije virusa na otporne sorte i mogućnosti za širenje RB izolata, neophodno je konstantno proučavanje prirodne populacije ovog virusa, naročito u značajnim proizvodnim područjima, u cilju selekcije novih sorti sa dugotrajnom otpornošću.

Zbog složene kontrole TSWV i njegovih vektora svim navedenim merama, ukazala se potreba za iznalaženje novih vidova otpornosti putem genetičkog inženjerstva. Transgenetička otpornost na TSWV postignuta je najpre kod biljaka duvana (Peters and Goldbach, 1995; Hoffman et al., 2001), a kasnije i kod salate, paradajza, paprike i hrizanteme (Kim et al., 1994; Boiteux, 1995; Pang et al., 1996; Sherman et al., 1998).

Sprovođenje svih navedenih mera u kontroli oboljenja koje izaziva TSWV mora biti istovremeno, sveobuhvatno i dosledno. Pojedinačnim merama ili primenom mera samo određene grupe ne mogu se rešiti problemi koje ovaj virus izaziva u stakleničko-plasteničkoj proizvodnji ukrasnih biljaka, povrća i rasada duvana.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Virus bronzavosti paradajza prouzrokuje jedno od najštetnijih oboljenja povrtarskih, industrijskih i ukrasnih biljaka širom sveta, koje se u mnogim područjima često javlja u epidemijskim razmerama. Dosadašnja proučavanja pojave, prisustva i rasprostranjenosti TSWV u Srbiji ukazala su na ekonomski značaj ovog virusa čije je prisustvo u našoj zemlji utvrđeno na važnim poljoprivrednim kulturama, kao što su duvan, paradajz i paprika, ali i na brojnim vrstama ukrasnih biljaka. Obzirom na veliki ekonomski značaj TSWV i njegovu izraženu varijabilnost, povećanu međunarodnu razmenu biljnog materijala i mogućnost introdukcije ovog virusa uvozom zaraženog ili tripsima infestiranog vegetativnog propagativnog materijala, molekularna istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, ukazaće na načine i puteve širenja ovog virusa i omogućiti će dalja molekularna epidemiološka istraživanja koja će imati za cilj razvoj strategije koja uključuje primenu efikasnijih mera kontrole ovog virusa u našoj zemlji. Osim filogenetskih analiza, disertacija će dati uvid u genetičku strukturu populacije TSWV kroz analizu određenih statističkih parametara populacione genetike, koji će omogućiti utvrđivanje izvora genetičkog variranja na osnovu kog će biti moguće dalje razumevanje faktora koji utiču na evolutivne promene i oblikuju prirodnu populaciju ovog virusa u Srbiji. Na ovaj način utvrdiće se genetička varijabilnost izolata poreklom iz Srbije, njihova međusobna evolutivna povezanost, kao i povezanost sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta. Saznanja o strukturi populacije TSWV doprineće, ne samo boljem poznavanju ovog virusa, već i razumevanju važnih epidemioloških aspekata koji utiču na njegovu rasprostranjenost i štetnost u našoj zemlji.

Kako bi se dobio uvid u strukturu prirodne populacije ovog virusa u našoj zemlji, neophodno je izvršiti detaljnu molekularnu karakterizaciju velikog broja izolata TSWV poreklom iz različitih biljaka domaćina, sa različitih lokaliteta iz različitog vremenskog perioda, te stoga osnovne ciljeve ove disertacije predstavljaju:

- amplifikacija svih pet genskih regiona i njihovo sekvenciranje u cilju dalje molekularne identifikacije odabranih izolata TSWV kroz proračun genetičkog diverziteta;
- proučavanje evolutivne povezanosti odabranih izolata TSWV rekonstrukcijom filogenetskih stabala korišćenjem delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona;
- rekonstrukcija mreže haplotipova na osnovu delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona, koja omogućava vizuelizaciju njihovih međusobnih genealoških odnosa;
- ispitivanje postojanja rekombinantnih izolata TSWV poreklom iz Srbije korišćenjem RDP softvera;
- utvrđivanje tipa selekcije pod kojom se nalaze sekvence svih pet gena odabranih izolata, koja utiče na oblikovanje i sastav prirodne populacije TSWV u Srbiji;
- određivanje fenotipa (RI ili RB) odabranih izolata TSWV poreklom iz paradajza, tj. njihove sposobnosti da prevaziđu otpornost i ostvare infekciju otpornih komercijalnih sorti paradajza i/ili paprike.

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije daće nova saznanja o genetičkoj strukturi prirodne populacije TSWV, ali i prve podatke o faktorima koji oblikuju populaciju ovog virusa u našoj zemlji.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Poreklo odabranih izolata TSWV

U cilju analize genetičke strukture populacije TSWV u Srbiji, a kako bi se obuhvatio što veći broj biljaka domaćina ili istih domaćina sa različitim simptomima prirodne zaraze poreklom sa što većeg broja lokaliteta na teritoriji naše zemlje, sakupljenih u različitom vremenskom periodu, u istraživanja je uključen 41 izolat dobijen iz najznačajnijih domaćina ovog virusa u našoj zemlji, uključujući: paradajz, papriku, duvan i različite vrste ukrasnih biljaka. Osim 12 izolata iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Instituta za fitomedicinu, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog fakulteta) sakupljenih u periodu od 2005. do 2014. godine poreklom iz različitih biljaka domaćina (paradajza-tri izolata, paprike-tri izolata i ukrasnih biljaka-šest izolata) poreklom sa sedam lokaliteta (Tabela 1), u istraživanja je uključeno i 20 izolata sakupljenih u periodu od 2015. do 2017. godine sa devet različitih lokaliteta, poreklom iz paradajza (devet izolata), paprike (dva izolata), duvana (dva izolata) i različitih vrsta ukrasnih biljaka (sedam izolata) (Tabela 1). Takođe, u istraživanja su uključena i tri izolata iz paradajza, 646-11, 45-12 i 555-12 (Tabela 1), koja su prethodno okarakterisana na osnovu sekvence N gena (**Nikolić, 2018**).

U proleće 2019. godine, u proizvodnji otpornog hibrida paradajza 'Wrestler F1' u zaštićenom prostoru na dva lokaliteta, Bošnjace i Veliko Vojlovce po prvi put je uočena pojava simptoma tipa bronzavosti, nekroze lisnih peteljki, grana i stabla, kao i nekrotičnih koncentričnih pega na mladim plodovima, koji su upućivali na moguću zarazu TSWV. Zbog toga su u istraživanja uključena i po tri izolata dobijena iz otpornog hibrida paradajza 'Wrestler F1' sakupljenih na ovim lokalitetima (Tabela 1).

Tabela 1. Poreklo i simptomi na prirodno zaraženim biljkama iz kojih potiču odabrani izolati virusa bronzavosti paradajza (TSWV) (deo 1)

Biljka domaćin	Oznaka izolata	Godina sakupljanja	Lokalitet	Simptomi
<i>Solanum lycopersicum</i>	646-11 ^b	2011	Navalin	Bronzavost lišća
	45-12 ^b	2012	Novi Kneževac	Bronzavost lišća
	555-12 ^b		Subotica	Bronzavost lišća
	169-13 ^a	2013	Togočevce	Bronzavost lišća, hlorotične i nekrotične koncentrične zone i deformacija plodova
	170-14 ^a	2014	Cekavica	Bronzavost lišća, hlorotične koncentrične zone na zrelih plodovima
	177-14 ^a		Bogojevce	Bronzavost lišća, hlorotične i nekrotične koncentrične zone i deformacija plodova
	58-15	2015	Mužlja	Nekrotične pege na lišću
	71-15			Nekrotične pege na lišću
	179-15		Veliko Vojlovce	Nekrotične pege na lišću, hlorotične i nekrotične koncentrične zone i deformacija plodova
	181-15			Bronzavost lišća
	185-15			Bronzavost lišća, hlorotične i nekrotične koncentrične zone i deformacija plodova
	186-16	2016	Kupusina	Mozaik i nekrotične pege na lišću, deformacija mladih plodova
	335-16			Prugasta nekroza stabla, nekrotične zone i deformacija mladih plodova
	147-17	2017	Cekavica	Mozaik i nekroza lišća, nekrotične zone na mladim plodovima
	108-17		Veliko Vojlovce	Nekrotične zone i deformacija mladih plodova
	108-19 ^c	2019		Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Tabela 1. Poreklo i simptomi na prirodno zaraženim biljkama iz kojih potiču odabrani izolati virusa bronzavosti paradajza (TSWV) (deo 2)

Biljka domaćin	Oznaka izolata	Godina sakupljanja	Lokalitet	Simptomi
<i>Solanum lycopersicum</i>	109-19 ^c	2019	Veliko Vojlovce	Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova
	110-19 ^c			Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova
	111-19 ^c		Bošnjace	Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova
	112-19 ^c			Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova
	113-19 ^c			Bronzavost lišća, nekrotične pege na lišću, nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla, nekrotične koncentrične zone i deformacija mladih plodova
<i>Capsicum annuum</i>	437-10 ^a	2010	Rača Kragujevačka	Mozaik i deformacija lišća
	512-11 ^a	2011	Kupusina	Nekrotične zone na plodovima
	525-11 ^a			Mozaik i hlorotične pestenaste pege na lišću, zaostajanje u porastu
	343-15	2015	Buđanovci	Blagi mozaik i naborano lišće sa zadebljalim nervima, hlorotične koncentrične zone na zrelih plodovima
	345-15		Leskovac	Hlorotične prstenaste pege na lišću, nekrotične pege na zelenim plodovima
<i>Nicotiana tabacum</i>	259-15		Hrtkovci	Hlorotične prstenaste pege na lišću
	260-15		Golubinci	Hlorotične prstenaste pege, hrastoliki mozaik i pucanje listova
<i>Amarilis</i> sp.	147-05 ^a	2005	Vranjska Banja	Mozaik
<i>Gloxinia</i> sp.	303-05 ^a		Rača Kragujevačka	Hlorotične i nekrotične prstenaste pege na lišću

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Tabela 1. Poreklo i simptomi na prirodno zaraženim biljkama iz kojih potiču odabrani izolati virusa bronzavosti paradajza (TSWV) (deo 3)

Biljka domaćin	Oznaka izolata	Godina sakupljanja	Lokalitet	Simptomi
<i>Gerbera hybrida</i>	156-07 ^a	2007	Vranjska Banja	Hlorotične koncentrične pege, hrastolike šare, nekroza i deformacija lišća
<i>Vinca</i> sp.	435-10 ^a	2010	Rača Kragujevačka	Mozaik
<i>Chrysanthemum</i> sp.	526-11 ^a	2011	Kupusina	Hlorotične prstenaste pege i linijske šare na lišću
<i>Brugmansia</i> sp.	42-12 ^a	2012	Mačkovac	Mozaik
<i>Begonia</i> sp.	212-15	2015	Rača Kragujevačka	Nekrotične pege na lišću, nekroza cvetova
<i>Fuchsia</i> sp.	228-15			Nekrotične pege na lišću, nekroza cvetova
<i>Dahlia</i> sp.	220-16	2016		Hlorotične koncentrične pege na lišću, nekrotične zone na granama i stablu
<i>Cinia</i> sp.	224-16			Hlorotične koncentrične zone na lišću i mozaik
<i>Impatiens hawkeri</i>	192-17	2017		Hlorotične i nekrotične prstenaste pege na lišću
<i>Pelargonium</i> sp.	230-17			Hlorotične prstenaste i linijske šare na lišću i mozaik
<i>Osteospermum</i> sp.	232-17			Hlorotične koncentrične zone na lišću i mozaik

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (**Nikolić, 2018**);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

4.2. Utvrđivanje prisustva TSWV u odabranim uzorcima primenom DAS-ELISA testa

U cilju potvrde prisustva pojedinačne TSWV infekcije u uzorcima različitih biljaka domaćina odabranih za ova istraživanja, primenjena je imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA) uz korišćenje komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba, AG, Reinach, Švajcarska) specifičnih za detekciju deset virusa, uključujući: TSWV, virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), Y virus krompira (*Potato virus Y*, PVY), virus mozaika paradajza (*Tomato mosaic virus*, ToMV), virus mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus*, TMV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), virus mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*, PepMV), virus žute uvijenosti lista paradajza (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), M virus krompira (*Potato virus M*, PVM) i virus nekrotične pegavosti impatiensa (*Impatiens necrotic spot orthospovirus*, INSV).

Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:6.

DAS-ELISA izvedena je po sledećem postupku: polistirenske ploče obložene su unošenjem u svaki bunarčić po 200 μ l razređenja antitela u puferu za prekrivanje i inkubirane 4 h na 37°C, a potom isprane 4 puta puferom za ispiranje. Nakon toga u bunarčiće je dodato po 200 μ l pripremljenog ekstrakta ispitivanih uzoraka, kao i komercijalne negativne i pozitivne kontrole i inkubirano na 4°C preko noći. Posle ispiranja, u bunarčiće je uneto po 200 μ l antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (antibody-AP-conjugate) u konjugatnom puferu razređenja preporučenog od strane proizvođača, a ploče su inkubirane 4 h 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) rastvorenog u supstratnom puferu (20 μ l/20 ml). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju 1-2 h, primenom spektrofotometra (ELISA microplate reader-DAS srl, Italy) izvršeno je merenje apsorpcije svetlosti talasne dužine vrednosti od 405 nm. Uzorci su smatrani pozitivnim ukoliko je njihova vrednost apsorpcije na 405 nm bila dva puta veća u odnosu na srednju vrednost apsorpcije negativne kontrole.

Za svaki test upotrebljene su odgovarajuće komercijalne pozitivne i negativne kontrole (Bioreba, AG, Reinach, Švajcarska).

Za izvođenje ove metode korišćeni su sledeći puferi:

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

NaCO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,20 g
dH ₂ O	11

2. Pufer za ispiranje (Wash buffer), pH 7,4

NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	51

3. Ekstrakcioni pufer (Extraction buffer), pH 7,4

TRIS	2,4 g
NaCl	8,0 g
PVP (viscosity K25)	20 g
NaN ₃	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	11

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

PVP (viscosity K25)	20 g
bovine serum albumin	2 g
NaN ₃	0,2 g
NaCl	8,0 g
TRIS	2,4 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
dH ₂ O	11

5. Supstratni pufer (Substrate buffer), pH 9,8

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
dH ₂ O	125 ml

4.3. Amplifikacija različitih gena odabranih izolata TSWV

Kako su dosadašnja istraživanja pokazala da je molekularna karakterizacija TSWV najčešće bazirana na analizi sekvence N gena (Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Abadkhah et al., 2018; Ferrand et al., 2019; Fontana et al., 2020), istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su analizu sekvenci N gena 41 odabranog izolata, dok je molekularna karakterizacija na osnovu analize sekvenci NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp gena obuhvatila 34 izolata u kojima je prisustvo virusa prethodno potvrđeno primenom DAS-ELISA testa (Tabela 2).

U cilju umnožavanja različitih genskih regiona u okviru S, M i L RNK odabranih izolata TSWV iz različitih domaćina poreklom iz Srbije korišćena je metoda reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) uz korišćenje odgovarajućih prajmera prethodno opisanih u literaturi.

Ekstrakcija ukupnih RNK iz zaraženog biljnog materijala obavljena je primenom cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protokola (Li et al., 2008). Nakon usitnjavanja 100 mg zaraženog lišća ili plodova odabranih uzoraka u avanu sa tučkom uz dodavanje tečnog azota, usitnjenom biljnom materijalu dodat je 1 ml ekstrakcionog pufera (2 g CTAB, 12,11 g TRIS, 8,18 g NaCl, 4,0,744 ml EDTA, 2 g PVP-40, pH 8,0) sa 0,01% β -merkaptetanolom i prebačen je u RNase-free mikrotube (Eppendorf, Germany) zapremine 2 ml. Mikrotube su zatim inkubirane u termošejkeru (ThermoShaker, Biometra, UK) na 65°C u trajanju od 15 min. Nakon inkubacije, mikrotube su centrifugirane na 4°C u trajanju od 5 min na 10 400 rpm. Zatim je u novu mikrotubu od 2 ml pipetirano 650 μ l izdvojene tečne faze i u istoj količini dodata je smeša hloroforma i izoamil alkohola u odnosu 24:1, a zatim izmešano na vorteksu. Centrifugiranjem mikrotuba 10 min na 12 800 rpm, formirale su se tri faze. Gornja faza, u kojoj se nalazi RNK, prebačena je u novu mikrotubu od 2 ml i dodato je 350 μ l izopropil alkohola. Uzorak je ponovo vorteksovao i centrifugiran 10 min na 12 800 rpm u cilju taloženja RNK. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a talog je ispran dodavanjem 1 ml 70% etanola i ponovno centrifugiran u trajanju od 5 min na 12 800 rpm. Supernatant je ponovo odbačen, a talog je prosušen na vazduhu. RNK je rastvorena u 100 μ l 20 mM Tris HCl (pH 8,0), pipetiranjem sadržaja mikrotube više puta. Tako dobijena RNK čuvana je na -80°C za dalji rad.

Umnožavanje fragmenata svih pet genskih regiona, uključujući N i NSs gene u okviru S RNK, NSm i Gn-Gc gene u okviru M RNK i RdRp gen u okviru L RNK, obavljeno je primenom „One-step“ RT-PCR kita (Qiagen, GmbH, Germany) uz upotrebu specifičnih parova prajmera koji omogućavaju amplifikaciju dela navedenih gena (Tabela 3).

RT-PCR smeša sadržala je: 5 μ l 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera, 400 μ M svakog dNTP, 1 μ l Qiagen OneStep RT-PCR enzimskog miksa, 1,5 μ l prajmera koncentracije 0,6 μ M izuzev TSWVCP-r, koji je zbog postojanja degenerativnih mesta korišćen u koncentraciji 1,2 μ M, 1 μ l izolovanih ukupnih RNK i RNase-free vode do ukupne zapremine od 25 μ l. Reakcije umnožavanja izvedene su u termosajkleru (Biometra, T-1 Thermocycler, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C, zatim trostruki korak ciklusa koji uključuje denaturaciju, hibridizaciju prajmera i elongaciju i ponavlja se u više ciklusa određeni vremenski period na određenoj temperaturi preporučenoj za svaki od korišćenih prajmera (Tabela 3), i finalna elongacija 10 min na 72°C.

Tabela 2. Pregled izolata i GenBank pristupnih brojeva izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima (deo 1)

Oznaka Izolata	Biljka domaćin	Godina sakupljanja	Lokalitet	GenBank pristupni broj				
				N gen	NSs gen	NSm gen	Gn-Gc gen	RdRp gen
646-11 ^b	<i>Solanum</i>	2011	Navalin	KF184652	OL672641	MW039605	OL672573	OL672674
45-12 ^b	<i>lycopersicum</i>	2012	Novi Kneževac	MG922823	OL672634	MW039608	OL672698	OL672671
555-12 ^b			Subotica	MG922824	OL672631	MW039607	OL672557	OL672689
169-13 ^a		2013	Togočevce	MW067014	OL672639	MW039614	OL672579	OL672690
170-14 ^a		2014	Cekavica	MW067018	OL672633	MW039613	OL672578	OL672667
177-14 ^a	Bogojevce		MW067019	OL672632	MW039612	OL672577	OL672691	
58-15		2015	Mužlja	MW067021	OL672652	MW039606	OL672699	OL672676
71-15				MW067020	OL672658	MW039617	OL672700	OL672682
179-15			Veliko Vojlovce	MW067017	OL672642	MW039611	OL672576	OL672683
181-15				MW067016	OL672643	MW039610	OL672554	OL672696
185-15				MW067023	OL672644	MW039609	OL672570	OL672697
186-16		2016		OL672616	/	/	/	/
335-16			Kupusina	OL672605	OL672645	OL672593	OL672567	OL672681
147-17		2017	Cekavica	OL672615	/	/	/	/
108-17			Veliko Vojlovce	OL672614	/	/	/	/
108-19 ^c		2019		MW067013	OL672653	MW039616	OL672555	OL672687
109-19 ^c			MW067015	OL672655	MW039604	OL672572	OL672684	
110-19 ^c				OL672619	OL672660	OL672602	OL672581	OL672693
111-19 ^c			Bošnjace	MW067022	OL672654	MW039615	OL672553	OL672688
112-19 ^c				OL672617	OL672661	OL672600	OL672552	OL672694
113-19 ^c				OL672618	OL672662	OL672601	OL672580	OL672695
437-10 ^a	<i>Capsicum annuum</i>	2010	Rača Kragujevačka	OL672609	OL672650	OL672599	OL672558	OL672678
512-11 ^a		2011	Kupusina	OL672604	OL672647	OL672592	OL672556	OL672679
525-11 ^a				OL672607	OL672648	OL672583	OL672568	OL672680

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV;

/-Nije sekvencirano.

Tabela 2. Pregled izolata i GenBank pristupnih brojeva izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima (deo 2)

Oznaka Izolata	Biljka domaćin	Godina sakupljanja	Lokalitet	GenBank pristupni broj				
				N gen	NSs gen	NSm gen	Gn-Gc gen	RdRp gen
343-15	<i>Capsicum</i>	2015	Buđanovci	OL672620	OL672646	OL672591	OL672569	OL672677
345-15	<i>annuum</i>		Leskovac	OL672628	OL672649	OL672595	OL672582	OL672685
259-15	<i>Nicotiana</i>	2005	Hrtkovci	OL672611	OL672656	OL672597	OL672575	OL672692
260-15	<i>tabacum</i>		Golubinci	OL672613	OL672635	OL672589	OL672574	OL672673
147-05 ^a	<i>Amarilis</i> sp.	2005	Vranjska Banja	OL672606	OL672657	OL672584	OL672571	OL672665
303-05 ^a	<i>Gloxinia</i> sp.		Rača Kragujevačka	OL672608	OL672640	OL672586	OL672562	OL672666
156-07 ^a	<i>Gerbera hybrida</i>	2007	Vranjska Banja	OL672603	OL672630	OL672585	OL672565	OL672701
435-10 ^a	<i>Vinca</i> sp.	2010	Rača Kragujevačka	OL672610	/	/	/	/
526-11 ^a	<i>Chrysanthemum</i> sp.	2011	Kopusina	OL672612	/	/	/	/
42-12 ^a	<i>Brugmansia</i> sp.	2012	Mačkovac	OL672627	OL672651	OL672596	OL672566	OL672686
212-15	<i>Begonia</i> sp.	2015	Rača Kragujevačka	OL672621	OL672636	OL672590	OL672563	OL672668
228-15	<i>Fuchsia</i> sp.			OL672623	/	/	/	/
220-16	<i>Dahlia</i> sp.	2016		OL672625	/	/	/	/
224-16	<i>Cinia</i> sp.			OL672626	OL672637	OL672598	OL672559	OL672669
192-17	<i>Impatiens</i> <i>hawkeri</i>	2017		OL672629	OL672659	OL672594	OL672564	OL672675
230-17	<i>Pelargonium</i> sp.			OL672624	OL672663	OL672587	OL672560	OL672670
232-17	<i>Osteospermum</i> sp.			OL672622	OL672638	OL672588	OL672561	OL672672

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV;

/-Nije sekvencirano.

Za sve RT-PCR reakcije kao pozitivna kontrola korišćen je srpski izolat ovog virusa 53-05 (GenBank Acc. No. GQ373173) (**Đekić, 2009**), dok je kao negativna kontrola korišćena PCR smeša sa RNase-free vodom umesto izolovane RNK.

Vizuelizacija umnoženih RT-PCR produkata izvršena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu, bojenjem gela u rastvoru etidijum bromida i posmatranjem pod UV-svetlom. Gel je pripremljen rastvaranjem 0,4 g agaroze u 40 ml 1x TBE pufera (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂ EDTA), zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici do temperature ključanja. Gel prohladen do temperature od 60°C, razliven je u kalup za horizontalnu elektroforezu sa postavljenim češljevima. Nakon potpunog hlađenja i očvršćavanja gela, uklonjeni su češljevi i kalup je uronjen u 1x TBE puffer, koji je prethodno dodat u kadicu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). RT-PCR produkti u količini od 5 µl pomešani su sa 1 µl boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i zatim pipetirani u bunarčice u gelu, nakon čega su podvrgnuti elektroforezi pri konstantnoj struji od 40 mA u trajanju od 45 min.

Po završetku elektroforeze, izvršena je inkubacija i bojenje gela u rastvoru etidijum bromida i destilovane vode, u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml, u trajanju od 15 min. Amplifikovani fragmenti posmatrani su pod UV-transiluminatorom, a za određivanje veličine amplifikovanih RT-PCR produkata korišćen je marker MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pojava traka odgovarajuće veličine za svaki od korišćenih parova prajmera smatrana je pozitivnom reakcijom. Dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela uz upotrebu žutog filtera.

Tabela 3. Prajmeri i uslovi trostrukog koraka korišćeni za amplifikaciju pet genskih regiona odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV)

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Uslovi trostrukog koraka (temperatura/vreme)			Broj ciklusa	Veličina amplikona (bp)	Literaturni izvor
N gen	TSWVCP-f	GGTTAAGCTCACTAAGAAAR CA	94°C/60 s	53°C/60 s	72°C/60 s	40	738	Vučurović et al., 2012
	TSWVCP-r	TTTAACYCCRAACATTTCATA GA						
NSs gen	S70	CACAGTACCAATAACC	94°C/60 s	55°C/60 s	72°C/120 s	35	833	Qiu et al., 1998
	S890	CATCTCCTGCAACCTTGAAC						
NSm gen	M66	CACAAGCTCCTCTACCTTAGG C	94°C/60 s	55°C/60 s	72°C/120 s	35	897	Qiu et al., 1998
	M962	CCTCTTCCTCTTCAACTGATC TCTC						
G1-G2 gen	M3050	CCTGTATAATCCGAAAACCC	94°C/60 s	55°C/60 s	72°C/120 s	40	987	Qiu et al., 1998
	M4037	CCTATACTGTAAGCATCACTA GCC						
RdRp gen	L2 TSWV F L1 TSWV R	ATCAGTCGAAATGGTCGGCA AGGAATTGCCTTGCAACCAA TTC	94°C/60 s	55°C/60 s	72°C/60 s	30	276	Mumford et al., 1996a

4.4. Sekvenciranje delova genoma odabranih izolata TSWV

Nakon uspešne amplifikacije pet genskih regiona, a u cilju dobijanja sekvenci odabranih izolata TSWV, RT-PCR produkti svih pojedinačnih gena odabranih izolata poslani su na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje u MacroGen, Inc., Holandija (<https://dna.macrogen-europe.com>). Umnoženi PCR produkti odabranih izolata sekvencirani su u oba pravca korišćenjem istih prajmera kao u RT-PCR reakciji. Dobijene sekvence odabranih izolata obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0, a dobijanje konsenzus sekvenci ostvareno je međusobnim poređenjem obrađenih sekvenci uzvodnog i nizvodnog prajmera u CLUSTAL W programu (Thompson et al., 1994), integrisanom unutar programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Nakon obrade, sekvence su prijavljene u GenBank bazu podataka i tom prilikom su im dodeljeni pristupni brojevi (*GenBank Accession Number*, GenBank Acc. No.).

Molekularna identifikacija dobijenih konsenzus sekvenci obavljena je pomoću BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) analize, poređenjem sekvenci svih pet genskih regiona odabranih izolata poreklom iz Srbije sa sekvencama odgovarajućih regiona dostupnih u svetskoj bazi podataka GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Osim toga, izvršen je i proračun međusobne nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranih izolata ovog virusa poreklom iz Srbije. Za poređenje sekvenci, kao i za filogenetske analize upotrebljen je program MEGA 6.0.

Kako odabrani izolati iz paradajza potiču iz osetljivih i otpornih hibrida, u cilju utvrđivanja postojanja promena u aminokiselinskoj sekvenci NSm proteina karakterističnih za pojavu RB izolata TSWV obavljena je i analiza aminokiselinskih sekvenci NSm proteina poređenjem sekvenci 12 potencijalno RI i šest potencijalno RB izolata TSWV poreklom iz paradajza sa sekvencama izolata prethodno okarakterisanog fenotipa, i to: RI izolat LL-N.05 (Acc. No. FM163373) (Aramburu et al., 2010) i RB izolati Llo2TL3 (Acc. No. HM015518) i GRAU (Acc. No. FM163370) (López et al., 2011), koji vode poreklo iz paradajza iz Španije.

4.5. Filogenetske analize

U cilju proučavanja evolutivne povezanosti odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije, kako međusobno tako i sa izolatima iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka, obavljene su filogenetske analize rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp), ali i delova S i M segmenata dobijenih spajanjem sekvenci N i NSs, odnosno NSm i Gn-Gc gena (*concatenated trees*). Rekonstrukcija filogenetskih stabala obavljena je korišćenjem sekvenci dobijenih tokom ovih istraživanja i različitog broja sekvenci izolata ovog virusa, u zavisnosti od analiziranog gena i njihove dostupnosti u GenBank bazi podataka, prikazanih u PRILOGU 1-4. Rekonstrukcija filogenetskih stabala na osnovu sekvenci N i NSs gena, kao i dela S segmenta obavljena je upotrebom maximum parsimony metode, dok je filogenetsko stablo na osnovu sekvenci NSm i Gn-Gc gena, kao i dela M segmenta rekonstruisano upotrebom neighbour-joining metode. Stablo na osnovu sekvenci RdRp gena rekonstruisano je upotrebom maximum likelihood metode. Provera pouzdanosti rekonstruisanih stabala obavljena je korišćenjem *bootstrap* analize sa 1000 ponavljanja, a kao *outgroup* korišćena je sekvenca odgovarajućeg genskog regiona izolata virusa hlorotične pegavosti paradajza (*Tomato chlorotic spot orthotospovirus*, TCSV). Izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između grupa koje su se izdvojile u filogenetskim stablima, obavljeno je primenom parametra određenog pomoću metode maksimalne verodostojnosti na osnovu najniže vrednosti BIC (*Bayesian Information Criterion*) za ispitivani set sekvenci. Kao najpogodniji model za rekonstrukciju stabala svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) pokazao se Tamura 3-parametar sa Gamma distribucijom (T92+G), a sličnost na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou izražena je na osnovu vrednosti prosečne stope genetičkog diverziteta primenom p-distance parametra.

U cilju potvrde rezultata dobijenih filogenetskim analizama, izvršena je i rekonstrukcija mreže haplotipova na osnovu delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona, koja omogućava vizuelizaciju njihovih međusobnih genealoških odnosa. Rekonstrukcija haplotipske mreže za svaki genski region TSWV obavljena je pomoću median-joining network algoritma (**Bandelt et al. 1999**), koji je implementiran u Network v.4.6.1.6 softver (Fluxus Engineering, <http://www.fluxusengineering.com>). Mreža haplotipova, odnosno primenjeni median-joining network algoritam zasniva se na kombinaciji karakteristika kratkih veza između izolata (*minimum spanning trees*) i maximum-parsimony heurističkog algoritma, uključujući noduse (*median vectors/ancestral nodes*), koji predstavljaju predačke izolate od kojih ostali izolati vode poreklo. Broj haplotipova svakog genskog regiona (Tabele 4-8) utvrđen je primenom DnaSP verzija 6.0 programa (**Rozas et al. 2017**), nakon čega su podaci o sastavu haplotipova i njihovoj učestalosti ubačeni u Network v.4.6.1.6 softver.

4.6. Analiza rekombinacija

Na raznovrsnost izolata TSWV utiču pre svega brojne mutacije, ali i rekombinacije i pseudorekombinacije (**Qiu et al., 1998; Bhat et al., 1999; Kaye, 2009**) koje se dešavaju u okviru trodelnog genoma ovog virusa. Potvrda postojanja rekombinantnih izolata TSWV poreklom iz Srbije, za koje je utvrđeno da se na osnovu filogenetskih analiza grupišu u različite grupe, odnosno podgrupe, obavljena je primenom RDP (*Recombination Detection Program*) v.4.101 softvera (**Martin et al., 2015**), koji istovremeno koristi više različitih programa koji detektuju postojanje rekombinacija u analiziranim sekvencama: RDP (**Martin and Rybicki, 2000**), BOOTSCAN/RECSCAN (**Martin et al., 2005**), GENECONV (**Padidam et al., 1999**), MAXCHI (**Maynard Smith, 1992**), CHIMAERA (**Posada and Crandall, 2001**), SISCAN (**Gibbs et al., 2000**) i 3SEQ (**Lam et al., 2018**). Za analizu prisustva rekombinacija korišćeni su setovi sekvenci S i M segmenata 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije (Tabela 2) ukupne dužine 1204 nt za S, odnosno 1591 nt za M segment, koje su dobijene spajanjem sekvenci N (557 nt) i NSs (647 nt) gena, odnosno NSm (720 nt) i Gn-Gc (871 nt) gena, prethodno skraćenih na dužinu najkraće sekvence za svaki gen posebno, kao i 22 sekvence S segmenta i 56 sekvenci M segmenta izolata TSWV iz različitih delova sveta.

Izolat je smatran rekombinantnim, ukoliko postojanje rekombinacije detektuje četiri ili više programa sa P vrednošću koja je manja od $1,0 \times 10^{-2}$ (**Tomitaka and Ohshima, 2006; Nouri et al., 2014**).

4.7. „Codon-based“ Z-test selekcije

U cilju utvrđivanja tipa selekcije (pozitivna, negativna ili neutralna) pod kojom se nalaze sekvence svih pet gena odabranih izolata, koja utiče na oblikovanje i sastav populacije TSWV u Srbiji, primenjen je „codon-based“ Z-test selekcije implementiran u program MEGA 6.0. Poređenjem broja sinonimnih supstitucija po sinonimnom mestu (dS) i broja nesinonimnih supstitucija po nesinonimnom mestu (dN), kao i njihovih varijansi $\text{Var}(dS)$ i $\text{Var}(dN)$, korišćenjem Nei-Gojobori supstitucionog modela i *bootstrap* analize sa 1000 ponavljanja (**Nei and Kumar, 2000**), izračunata je Z vrednost po formuli $Z = (dN - dS) / \text{SQRT}(\text{Var}(dS) + \text{Var}(dN))$ (**Tamura et al., 2011**). Osim Z vrednosti, pri određivanju uticaja selekcije određuje se i statistički parametar p, koji predstavlja verovatnoću nastanka greške prve vrste, odnosno verovatnoću odbacivanja postavljene nulte hipoteze $H_0: dN = dS$ nasuprot alternativne hipoteze $H_a: dN < dS$ (**Nei and Kumar, 2000**). Ukoliko je vrednost $Z > 1$ i $p < 0,05$ gen se nalazi pod uticajem pozitivne selekcije, ukoliko je $Z < 1$ i $p > 0,05$ gen je pod uticajem negativne (*purifying*) selekcije, a ako je $Z = 1$ i $p = 0,05$ u pitanju je neutralna selekcija (**Hall, 2008**).

„Codon-based“ Z-test selekcije primenjen je kako na ukupnom setu sekvenci izolata za svaki gen, tako i na pojedinačnim parovima sekvenci gena odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije.

4.8. Mehaničke inokulacije test biljaka RI i RB izolatima TSWV poreklom iz paradajza

U cilju određivanja sposobnosti ostvarenja infekcije otpornih i/ili osetljivih komercijalnih hibrida paradajza i paprike odabranih izolata TSWV, poreklom iz osetljivih i otpornih hibrida paradajza, obavljena je mehanička inokulacija biljaka rasada različitih otpornih (*Sw-5b*⁺, hibridi sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti) i osetljivih (*Sw-5b*⁻, hibridi bez *Sw-5b* gena otpornosti) hibrida paradajza, kao i otpornih (*Tsw*⁺, hibridi sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti) i osetljivih (*Tsw*⁻, hibridi bez *Tsw* gena otpornosti) hibrida paprike. Mehaničke inokulacije uključile su set od pet otpornih (‘Matissimo F1’, ‘Wrestler F1’, ‘Svth0121’, ‘Runner F1’ i ‘Attiya RZ F1’) i četiri osetljiva (‘Partova F1’, ‘Novosadski jabučar’, ‘Volovsko srce’ i ‘Saint Pierre’) hibrida paradajza, odnosno tri otporna (‘SV1163PB’, ‘SV0102PP’ i ‘Ariadni F1’) i dva osetljiva (‘Margarita’ i ‘Kurtovska kapija’) hibrida paprike. Za ova istraživanja odabrana su tri izolata (108-19, 109-19 i 111-19) poreklom iz prirodno zaraženih biljaka paradajza hibrida ‘Wrestler F1’ nosioca *Sw-5b* gena otpornosti, kao i dva izolata (45-12 i 170-14) poreklom iz zaraženih biljaka paradajza sorti Magnus i Buran koje ne sadrže *Sw-5b* gen otpornosti.

Inokulum za mehaničke inokulacije pripremljen je maceracijom prirodno zaraženog lišća paradajza odabranih izolata TSWV u prisustvu ledeno hladnog 0,01 M fosfatnog pufera (pH 7) i 1% natrijum sulfita (Na₂SO₃). Nakon toga, pripremljeni inokulum za svaki od odabranih izolata TSWV korišćen je za mehaničke inokulacije po pet biljaka rasada pet otpornih i četiri osetljive sorte paradajza, kao i tri otporne i dve osetljive sorte paprike u fenofazi 2-3 stalna lista. Inokulisane biljke čuvane su u stakleniku pri uslovima od 24°C uz fotoperiod od 16 h svetla i 8 h mraka (Nachappa et al., 2020) i praćene u periodu do četiri nedelje po obavljenoj inokulaciji. U cilju utvrđivanja prisustva ili odsustva TSWV u inokulisanim biljkama sa i bez simptoma, korišćena je DAS-ELISA (Bioreba, AG, Reinach, Švajcarska).

5. REZULTATI

5.1. Simptomi na prirodno zaraženim biljkama

Odabir izolata za ova istraživanja izvršen je tako da se obuhvate izolati poreklom iz različitih biljaka domaćina ili istih domaćina sa različitim simptomima prirodne zaraze poreklom sa što većeg broja različitih lokaliteta na teritoriji naše zemlje, sakupljenih tokom različitih godina.

Biljke osetljivih hibrida paradajza iz kojih potiče 15 izolata odabranih za ova istraživanja, ispoljile su raznovrsne simptome u zavisnosti od faze razvoja biljke u kojoj je došlo do infekcije (Tabela 1). Na listovima simptomi su varirali od tipične bronzavosti (Slika 1) do pojave blago ili jako izraženog mozaika, koji je u nekim slučajevima praćen nekrozom (Slika 2), kao i okruglim ili prstenastim nekrotičnim pegama koje su u pojedinim slučajevima zahvatale skoro čitavu površinu lista. U poodmakloj fazi zaraze, listovi su bili uvijeni, naborani i sa zadebljalim nervima. Na pojedinim biljkama zabeležena je pojava prugaste nekroze lisnih peteljki i stabla (Slika 3), što je ometalo rast i dovodilo do propadanja čitavih biljaka. Na zelenim plodovima uočena je pojava hlorotičnih i/ili nekrotičnih koncentričnih zona, čija je pojava zabeležena i na zrelim plodovima koji su na mestu pojave nekrotičnih koncentričnih zona zadržavali zelenu boju (Slika 4). Osim toga, kao čest simptom zabeleženo je i šarenilo i neravnomerno sazrevanje plodova.



Slika 1. Bronzavost lista paradajza



Slika 2. Mozaik i nekroza lišća paradajza



Slika 3. Prugasta nekroza stabla paradajza



Slika 4. Nekrotične koncentrične zone na zelenim i zrelim plodovima paradajza

Na biljkama hibrida paradajza ‘Wrestler F1’ sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV, sakupljenim tokom 2019. godine na dva lokaliteta, iz kojih potiče šest izolata odabranih za ova istraživanja, po prvi put uočena je pojava simptoma koji upućuju na zarazu TSWV. Na lišću mladih biljaka uočena je pojava mozaika praćenog hlorotičnim pegama, kao i tipična bronzavost na lišću (Slika 5A). Sa razvojem bolesti javljala se i nekroza vrha biljke, prugasta nekroza grana i stabla (Slika 5B), kao i deformacija zelenih plodova praćena nekrotičnim prstenastim pegama (Slika 5C). Osim toga, primećeno je i značajno zaostajanje zaraženih biljaka u porastu (Slika 5D).



Slika 5. Simptomi na biljkama otpornog hibrida paradajza ‘Wrestler F1’: bronzavost lišća (A), nekroza grana (B), nekrotične prstenaste pege na mladim plodovima (C) i zaostajanje biljaka u porastu (D).

Biljke paprike iz kojih potiče pet odabranih izolata ispoljile su simptome u vidu hlorotičnih prstenastih pega (Slika 6), praćenih pojavom mozaika i deformacije listova (Slika 7). Osim toga, na zelenim plodovima uočena je pojava nekrotičnih prstenastih pega (Slika 8) koje su svojim širenjem i spajanjem dovodile do pojave velikih nekrotičnih površina, dok su na zrelim plodovima uočene hlorotične koncentrične zone i šarenilo ploda (Slika 9). Osim toga, zabeleženo je i značajno zaostajanje u porastu pojedinih biljaka.



Slika 6. Hlorotične prstenaste pege na lišću paprike



Slika 7. Mozaik i deformacija lišća paprike



Slika 8. Nekrotične prstenaste pege na zelenom plodu paprike



Slika 9. Hlorotične koncentrične zone i šarenilo zrelog ploda paprike

Biljke duvana iz kojih potiču dva odabrana izolata ispoljile su simptome u vidu hlorotičnih i/ili nekrotičnih prstenastih pega (Slika 10), kao i hrastolikog mozaika na lišću, beličastih nekrotičnih pega u okviru kojih je tkivo pucalo usled neravnomernog porasta (Slika 11).



Slika 10. Hlorotične prstenaste pege na lišću duvana



Slika 11. Beličaste nekroze i šupljikavost na lišću duvana

Različite vrste ukrasnih biljaka (*Amarilis* sp., *Gloxinia* sp., *Gerbera hybrida*, *Vinca* sp., *Chrysanthemum* sp., *Brugmansia* sp., *Fuchsia* sp. i *Cinia* sp.) iz kojih potiče 13 odabranih izolata ispoljile su različite simptome uključujući hlorotične (Slika 12 i 13) i nekrotične (Slika 14) koncentrične pege i šare, mozaik (Slika 15), hrastolike šare, nekrozu i deformaciju lišća i nekrozu cvetova. Na biljkama iz roda *Pelargonium* zabeležena je pojava hlorotičnih prstenastih (Slika 16) i linijskih šara praćenih pojavom mozaika (Slika 17). Biljke *Impatiens hawkeri* ispoljile su simptome u vidu hlorotičnih (Slika 18) i nekrotičnih prstenastih pega (Slika 19) na lišću, dok su na biljkama iz roda *Dahlia* zabeleženi simptomi u vidu hlorotičnih koncentričnih pega na lišću (Slika 20) i nekrotičnih zona na granama i stablu (Slika 21). Na biljkama *Begonia* sp. zabeležena je pojava nekrotičnih pega na lišću i nekroze i propadanja cvetova (Slika 22), dok su biljke *Osteospermum* sp. ispoljile simptome u vidu hlorotičnih koncentričnih zona na lišću praćenih mozaikom (Slika 23).



Slika 12. Hlorotične koncentrične pege na lišću *Gerbera hybrida*



Slika 13. Hlorotične koncentrične pege i šare na lišću *Chrysanthemum* sp.



Slika 14. Nekrotične koncentrične pege i šare na lišću *Gloxinia* sp.



Slika 15. Mozaik na lišću *Vinca* sp.



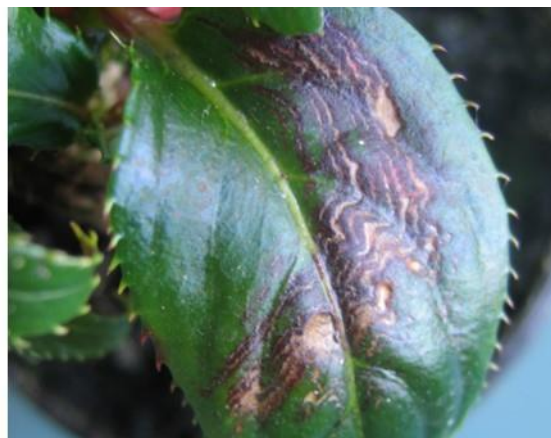
Slika 16. Hlorotične prstenaste šare na lišću *Pelargonium* sp.



Slika 17. Mozaik na lišću *Pelargonium* sp.



Slika 18. Hlorotične i nekrotične prstenaste pege na lišću *Impatiens hawkeri*



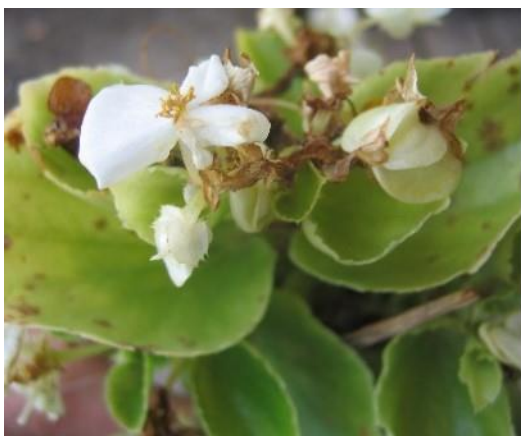
Slika 19. Nekrotične prstenaste pege na lišću *Impatiens hawkeri*



Slika 20. Hlorotične koncentrične pege na lišću *Dahlia* sp.



Slika 21. Nekrotične zone na stablu *Dahlia* sp.



Slika 22. Nekrotične pege na lišću, nekroza i propadanje cvetova *Begonia* sp.



Slika 23. Hlorotične koncentrične zone i mozaik na lišću *Osteospermum* sp.

5.2. DAS-ELISA test

U cilju potvrde pojedinačne zaraze TSWV u uzorcima različitih biljaka domaćina odabranim za ova istraživanja, primenjen je DAS-ELISA test korišćenjem komercijalnih antiseruma specifičnih za detekciju deset virusa: TSWV, CMV, PVY, ToMV, TMV, AMV, PepMV, TYLCV, PVM i INSV. Rezultati DAS-ELISA testa, ukazali su na prisustvo pojedinačne infekcije TSWV kod svih odabranih izolata. Prisustvo nijednog drugog testiranog virusa nije detektovano u odabranim izolatima.

5.3. Analiza sekvenci i molekularna karakterizacija odabranih izolata TSWV

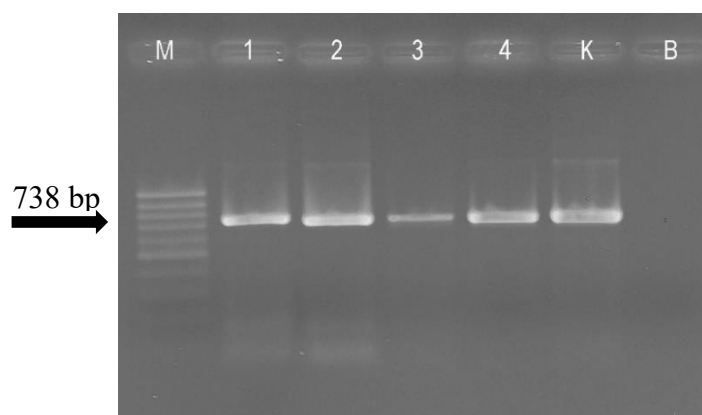
U cilju detaljne molekularne karakterizacije, a nakon izvršene uspešne amplifikacije svih pet genskih regiona odabranih izolata TSWV, dobijeni amplikoni su sekvencirani. Nakon obrade i dobijanja konsenzus sekvence za svaki ispitivani region genoma, sekvence su prijavljene u GenBank bazu podataka gde im je dodeljen pristupni broj. U Tabeli 2 prikazani su GenBank Acc. No. za sve sekvence izolata TSWV poreklom iz Srbije dobijene tokom ovih istraživanja.

Dobijene sekvence najpre su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma dostupnih u GenBank bazi podataka korišćenjem BLAST analize, a zatim je izvršen proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti izolata dobijenih tokom ovih istraživanja.

Nakon obavljene molekularne identifikacije odabranih izolata, usledila je njihova molekularna karakterizacija koja se zasnivala na rekonstrukciji filogenetskih stabala na osnovu sekvenci svih pet analiziranih genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) ovog virusa, kao i na osnovu kombinacije sekvenci N i NSs gena u okviru S segmenta i NSm i Gn-Gc gena u okviru M segmenta. U cilju ispitivanja međusobnih genealoških odnosa ispitivanih izolata i potvrde rezultata dobijenih filogenetskim analizama, izvršena je i rekonstrukcija mreže haplotipova na osnovu delimičnih sekvenci srpskih izolata svih pet genskih regiona korišćenjem median-joining network algoritma.

5.3.1. Analiza sekvenci N gena

Primenom prajmera TSWVCP-f/TSWVCP-r obavljena je uspešna amplifikacija dela N gena dužine 738 bp kod svih 38 odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije. Deo amplifikovanih fragmenata N gena prikazan je na Slici 24.



Slika 24. Vizuelizacija amplicona N gena dela odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) u 1% agaroznom gelu dobijenih primenom „One-step“ RT-PCR i specifičnih prajmera TSWVCP-f/TSWVCP-r. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Low Range (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 169-13 iz *Solanum lycopersicum*; 2-izolat 170-14 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat 177-14 iz *Solanum lycopersicum*; 4-izolat 58-15 iz *Solanum lycopersicum*; K-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz *Nicotiana tabacum*); B-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvenciranja amplicona umnoženih u RT-PCR reakciji, dobijene su delimične sekvence N gena ispitivanih izolata. Rezultati BLAST analize pokazali su da odabrani izolati TSWV poreklom iz Srbije, identifikovani tokom ovih istraživanja, pokazuju najveću nukleotidnu (nt) sličnost od 99,12% do 100% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka.

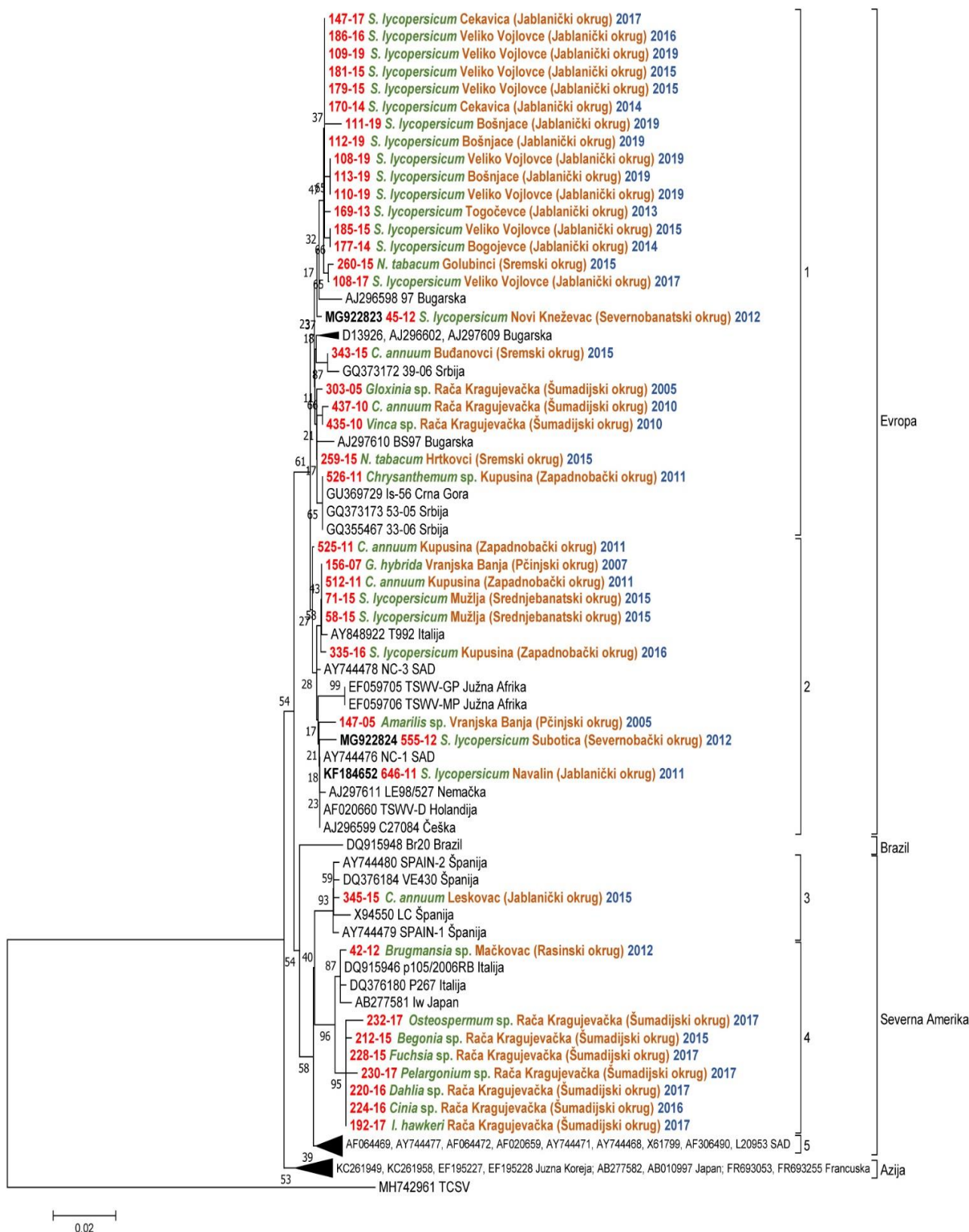
Dalja molekularna identifikacija dobijenih sekvenci dela N gena 41 odabranog izolata TSWV, uključujući i sekvence tri prethodno okarakterisana izolata iz Srbije poreklom iz paradajza (**Nikolić, 2018**), obavljena je na osnovu međusobnog poređenja njihove nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0. Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence od 557 nt, dobijena nt sličnost između sekvenci ispitivanih izolata iznosila je od 96,4% (20 nt razlike) do 100%, dok se aminokiselinska (aa) sličnost kretala od 90,7% (15 aa razlike) do 100%, ukazujući na nizak stepen genetičke varijabilnosti izolata iz Srbije (PRILOG 5).

Molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu 83 sekvence N gena dužine 557 nt, uključujući 41 sekvencu izolata odabranih za ova istraživanja (Tabela 2) i tri ranije okarakterisana izolata TSWV iz Srbije poreklom iz duvana (**Đekić, 2009**), kao i 39 sekvenci izolata TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 1) primenom maximum parsimony metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 25 prikazano je konsenzus stablo koje je ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u četiri klastera: Evropa, Brazil, Severna Amerika i Azija, na osnovu njihovog geografskog porekla, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera kretao se od $0,026 \pm 0,006$ do $0,039 \pm 0,007$, a unutrašnji diverzitet za svaki klaster bio je: $0,009 \pm 0,002$ (Evropa), $0,016 \pm 0,003$ (Severna Amerika) i $0,019 \pm 0,004$ (Azija). Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,020 \pm 0,003$. Evropski klaster dalje se može podeliti na dve geografske subpopulacije: podgrupa 1 i 2. Podgrupu 1 čine izolati poreklom iz Srbije (26 izolata), Bugarske (pet izolata) i Crne Gore (jedan izolat), dok se u podgrupu 2 svrstavaju izolati iz Italije (jedan izolat), Nemačke (jedan izolat), Holandije (jedan izolat), Češke (jedan izolat), Srbije (devet izolata), kao i po dva izolata iz SAD (Severna Karolina) i Južne Afrike, što predstavlja izuzetak u odnosu na geografsko poreklo. Genetički diverzitet između ove dve podgrupe iznosio je $0,011 \pm 0,003$, dok je unutrašnji diverzitet u okviru podgrupe 1 bio $0,007 \pm 0,002$, odnosno $0,005 \pm 0,001$ u okviru podgrupe 2. Brazilski klaster obuhvatio je samo jedan izolat, dok se severnoamerički klaster dalje deli na tri podgrupe (3, 4

i 5) u odnosu na geografsko poreklo. Podgrupa 3 obuhvatila je izolate iz Španije (četiri izolata) i Srbije (jedan izolat) sa unutrašnjim diverzitetom $0,005 \pm 0,002$. Podgrupu 4 čine izolati iz Italije (dva izolata), Japana (jedan izolat) i Srbije (osam izolata) sa unutrašnjim diverzitetom $0,006 \pm 0,002$, dok je podgrupa 5 obuhvatila izolate iz SAD (devet izolata) sa unutrašnjim diverzitetom $0,014 \pm 0,003$. Genetički diverzitet između ove tri podgrupe kretao se od $0,019 \pm 0,004$ do $0,021 \pm 0,004$. Azijski klaster obuhvatio je izolate iz Južne Koreje (četiri izolata) i Japana (dva izolata), sa izuzetkom dva izolata iz Francuske. Bez obzira na visok stepen nt i aa sličnosti izolata poreklom iz Srbije, filogenetske analize ukazale su na izrazitu varijabilnost srpskih izolata TSWV koji se grupišu u četiri različite podgrupe. Većina srpskih izolata, uzimajući u obzir i tri ranije okarakterisana izolata poreklom iz duvana, grupisala se u klaster evropskih izolata, ali u dve odvojene subpopulacije. U podgrupu 1 grupisala su se 23 izolata iz ovih istraživanja (147-17, 186-16, 109-19, 181-15, 179-15, 170-14, 111-19, 112-19, 108-19, 113-19, 110-19, 169-13, 185-15, 177-14, 260-15, 108-17, 45-12, 343-15, 303-05, 437-10, 435-10, 259-15 i 526-11), kao i tri ranije okarakterisana izolata poreklom iz duvana (39-06, 53-05 i 33-06), dok se u podgrupu 2 grupisalo devet izolata (525-11, 156-07, 512-11, 71-15, 58-15, 335-16, 147-05, 555-12 i 646-11). Preostalih devet izolata grupisali su se u severnoamerički klaster i to jedan izolat u podgrupu 3 (345-15), a osam u podgrupu 4 (42-12, 232-17, 212-15, 228-15, 230-17, 220-16, 224-16 i 192-17).

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u podgrupi 1 evropskog klastera nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Osim toga, većina srpskih izolata poreklom iz paradajza (147-17, 186-16, 109-19, 181-15, 179-15, 170-14, 111-19, 112-19, 108-19, 113-19, 110-19, 169-13, 185-15, 177-14, 108-17 i 45-12) grupisala se u evropsku podgrupu 1, dok se preostalih pet izolata grupisalo u evropsku podgrupu 2 (71-15, 58-15, 335-16, 555-12 i 646-11). Većina srpskih izolata poreklom iz paprike, takođe se grupisala u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (343-15 i 437-10 podgrupa 1; 525-11 i 512-11 podgrupa 2), dok se samo jedan izolat (345-15) grupisao odvojeno u podgrupu 3 severnoameričkog klastera. Srpski izolati poreklom iz duvana (260-15 i 259-15) grupisali su se u okviru podgrupe 1 evropskog klastera. Većina srpskih izolata poreklom iz 13 vrsta ukrasnih biljaka (42-12, 232-17, 212-15, 228-15, 230-17, 220-16, 224-16 i 192-17) grupisala se u okviru podgrupe 4 severnoameričkog klastera, dok se manji broj izolata grupisao u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (303-05, 435-10 i 526-11 podgrupa 1; 156-07 i 147-05 podgrupa 2).



Slika 25. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci N gena dužine 557 nt 83 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem maximum parsimony metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742961). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci N gena, 41 odabrani izolat TSWV poreklom iz Srbije grupiše u 26 haplotipova (Tabela 4). Haplotip H_1 detektovan je kod dva izolata (177-14 i 185-15) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Bogojevce i Veliko Vojlovce) na jugu Srbije, dok su haplotipovi H_2, H_5, H_9 i H_19 zabeleženi svaki pojedinačno kod jednog od četiri izolata (111-19, 169-13, 45-12, odnosno 108-17) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na jednom lokalitetu (Novi Kneževac) na severu i na tri lokaliteta (Bošnjace, Togočevce i Veliko Vojlovce) na jugu naše zemlje. Haplotip H_3 zastupljen je kod četiri izolata (156-07, 512-11, 58-15 i 71-15), od kojih jedan vodi poreklo iz ukrasne biljke *Gerbera hybrida*, jedan iz paprike i dva iz paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Kupusina i Mužlja) na severu i jednom lokalitetu (Vranjska Banja) na jugu Srbije. Haplotip H_4 predstavlja najučestaliji haplotip i detektovan je kod sedam izolata (170-14, 179-15, 181-15, 186-16, 147-17, 109-19 i 112-19) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na tri lokaliteta (Cekavica, Veliko Vojlovce i Bošnjace) na jugu Srbije, dok je haplotip H_6 zabeležen kod tri izolata (108-19, 110-19 i 113-19), takođe, poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Veliko Vojlovce i Bošnjace) na jugu naše zemlje. Haplotipovi H_7, H_8 i H_10 zabeleženi su svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (555-12, 646-11, odnosno 335-16) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Subotica i Kupusina) na severu i na jednom lokalitetu (Navalin) na jugu naše zemlje. Haplotip H_11 detektovan je kod jednog izolata (147-05) poreklom iz ukrasne biljke *Amarilis* sp. sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu Srbije, dok je haplotip H_12 zabeležen kod jednog izolata (525-11) poreklom iz paprike sakupljene u Kupusini na severu naše zemlje. Haplotipovi H_13, H_15 i H_17 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (303-05, 435-10, odnosno 526-11) poreklom iz tri različite ukrasne biljke (*Gloxinia* sp., *Vinca* sp. i *Chrysanthemum* sp.) sakupljene na jednom lokalitetu na severu (Kupusina) i jednom lokalitetu (Rača Kragujevačka) u centralnom delu Srbije. Haplotipovi H_14 i H_20 primećeni su svaki pojedinačno kod jednog od dva izolata (437-10, odnosno 343-15) poreklom iz biljaka paprike sakupljenih u Buđanovcu u severnom i Rači Kragujevačkoj u centralnom delu Srbije, dok su haplotipovi H_16 i H_18 prisutni svaki pojedinačno u jednom od dva izolata (259-15, odnosno 260-15) poreklom iz biljaka duvana sakupljenih na dva lokaliteta (Hrtkovci i Golubinci) na severu Srbije. Haplotipovi H_21, H_22, H_24 i H_25 zabeleženi su svaki pojedinačno kod jednog od četiri izolata (212-15, 232-17, 230-17, odnosno 42-12) poreklom iz četiri različite ukrasne biljke (*Begonia* sp., *Osteospermum* sp., *Pelargonium* sp. i *Brugmansia* sp.) sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom i Mačkovcu u južnom delu Srbije. Haplotip H_23 detektovan je kod četiri izolata (192-17, 228-15, 220-16 i 224-16) poreklom iz četiri različite ukrasne biljke (*Impatiens hawkeri*, *Fuchsia* sp., *Dahlia* sp. i *Cinia* sp.) sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu Srbije, dok je haplotip H_26 zabeležen kod jednog izolata (345-15) poreklom iz paprike sakupljene u Leskovcu na jugu Srbije.

Tabela 4. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence N gena (deo 1)

Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_1	177-14 ^a	2014	<i>Solanum</i>	Bogojevce	Južna Srbija
	185-15	2015	<i>lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	
H_2	111-19 ^c	2019		Bošnjace	
H_3	156-07 ^a	2007	<i>Gerbera hybrida</i>	Vranjska Banja	Severna Srbija
	512-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	
	58-15	2015	<i>Solanum</i>	Mužlja	
	71-15		<i>lycopersicum</i>		
H_4	170-14 ^a	2014		Cekavica	Južna Srbija
	179-15	2015		Veliko Vojlovce	
	181-15				
	186-16	2016			
	147-17	2017		Cekavica	
	109-19 ^c	2019		Veliko Vojlovce	
	112-19 ^c			Bošnjace	
H_5	169-13 ^a	2013		Togočevce	
H_6	108-19 ^c	2019		Veliko Vojlovce	
	110-19 ^c				
	113-19 ^c			Bošnjace	
H_7	555-12 ^b	2012		Subotica	Severna Srbija
H_8	646-11 ^b	2011		Navalin	Južna Srbija
H_9	45-12 ^b	2012		Novi Kneževac	Severna Srbija
H_10	335-16	2016		Kupusina	
H_11	147-05 ^a	2005	<i>Amarilis</i> sp.	Vranjska Banja	Južna Srbija
H_12	525-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
H_13	303-05 ^a	2005	<i>Gloxinia</i> sp.	Rača	Centralna
H_14	437-10 ^a	2010	<i>Capsicum annuum</i>	Kragujevačka	Srbija
H_15	435-10 ^a		<i>Vinca</i> sp.		
H_16	259-15	2015	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hrtkovci	Severna Srbija
H_17	526-11 ^a	2011	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Kupusina	
H_18	260-15	2015	<i>Nicotiana tabacum</i>	Golubinci	
H_19	108-17	2017	<i>Solanum</i>	Veliko Vojlovce	Južna Srbija
			<i>lycopersicum</i>		
H_20	343-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Buđanovci	Severna Srbija
H_21	212-15		<i>Begonia</i> sp.	Rača	Centralna
H_22	232-17	2017	<i>Osteospermum</i> sp.	Kragujevačka	Srbija
H_23	228-15	2015	<i>Fuchsia</i> sp.		
	220-16	2016	<i>Dahlia</i> sp.		

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet); ^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018); ^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Tabela 4. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence N gena (deo 2)

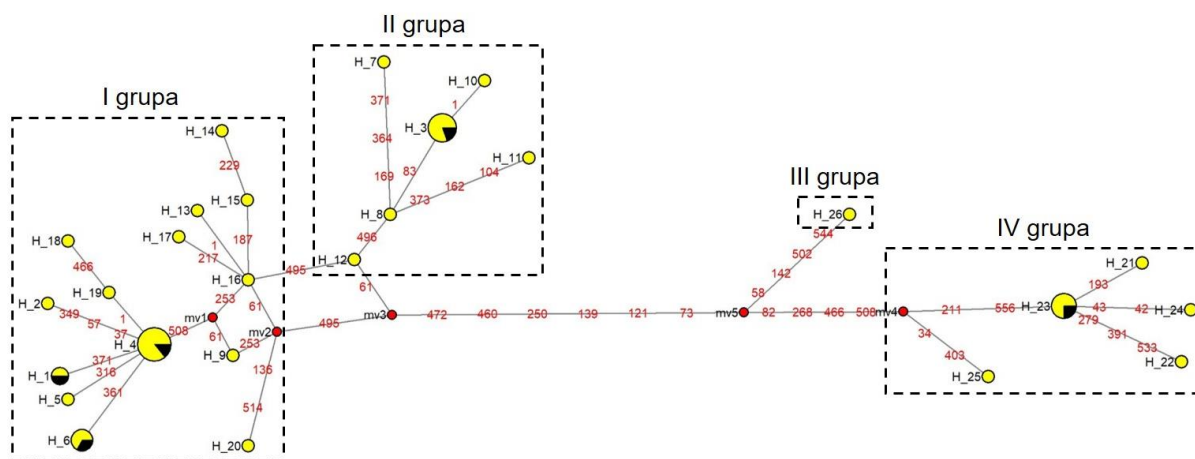
Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_23	224-16	2016	<i>Cinia</i> sp.	Rača	Centralna Srbija
	192-17	2017	<i>Impatiens hawkeri</i>	Kragujevačka	
H_24	230-17		<i>Pelargonium</i> sp.		
H_25	42-12 ^a	2012	<i>Brugmansia</i> sp.	Mačkovac	Južna Srbija
H_26	345-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Leskovac	

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedcinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

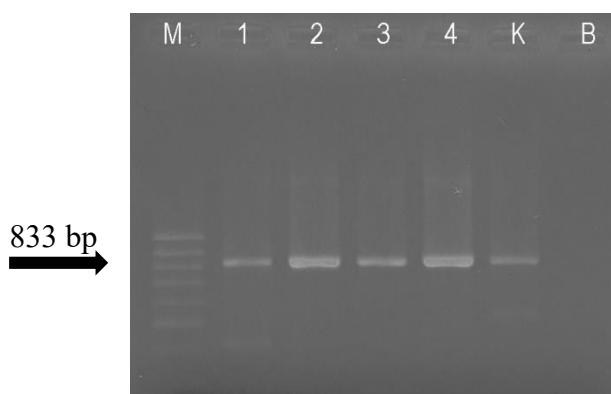
Mreža haplotipova rekonstruisana pomoću median-joining networks algoritma na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji pokazala je da se 26 haplotipova na osnovu delimične sekvence N gena grupišu u četiri grupe (I, II, III i IV) (Slika 26). Grupa I sa 14 haplotipova (H_1, H_2, H_4, H_5, H_6, H_9, H_13, H_14, H_15, H_16, H_17, H_18, H_19 i H_20) obuhvata 23 sekvenci koje se u filogenetskom stablu grupišu u evropsku podgrupu 1, dok grupa II sa šest haplotipova (H_3, H_7, H_8, H_10, H_11 i H_12) obuhvata devet sekvenci koje se grupišu u evropsku podgrupu 2 na osnovu filogenetske analize. Grupa III sa jednim haplotipom (H_26) obuhvata jednu sekvencu koja se grupiše u severnoameričku podgrupu 3, dok grupa IV sa pet haplotipova (H_21, H_22, H_23, H_24 i H_25) obuhvata osam sekvenci koje se grupišu u severnoameričku podgrupu 4 na osnovu filogenetske analize. Centralni ili predački haplotip nije otkriven za grupu I, III i IV, već su haplotipovi TSWV pronađeni u Srbiji činili pericentralne haplotipove u obe grupe, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima. U grupi I haplotip H_4 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_1, H_2, H_5, H_6 i H_19, odnosno haplotip H_16 ka haplotipovima H_13, H_15 i H_17. Centralni haplotip za grupu II predstavlja haplotip H_12, dok haplotip H_8 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_3, H_7 i H_11. U grupi IV haplotip H_23 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_21, H_22 i H_24.



Slika 26. Mreža haplotipova rekonstruisana na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci N gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije korišćenjem median-joining networks algoritma. Svaki kružić obojen žutom bojom predstavlja jedinstveni haplotip, pri čemu je njegov prečnik proporcionalan broju sekvenci sadržanom u haplotipu. Celi brojevi prikazani na linijama označavaju poziciju nukleotida u sekvenci koji se razlikuje između haplotipova, a puni kružići crvene boje predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani.

5.3.2. Analiza sekvenci NSs gena

Primenom prajmera S70/S890 obavljena je uspešna amplifikacija dela NSs gena dužine 833 bp kod sva 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije (Tabela 2). Deo amplifikovanih fragmenata NSs gena prikazan je na Slici 27.



Slika 27. Vizuelizacija amplikona NSs gena dela odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) u 1% agaroznom gelu dobijenih primenom „One-step“ RT-PCR i specifičnih prajmera S70/S890. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Low Range (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 212-15 iz *Begonia* sp.; 2-izolat 228-15 iz *Fuchsia* sp.; 3-izolat 220-16 iz *Dahlia* sp.; 4-izolat 224-16 iz *Cinia* sp.; K-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz *Nicotiana tabacum*); B-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvenciranja amplikona umnoženih u RT-PCR reakciji, dobijene su delimične sekvence NSs gena ispitivanih izolata. Rezultati BLAST analize pokazali su da odabrani izolati TSWV poreklom iz Srbije, identifikovani tokom ovih istraživanja, pokazuju najveću nt sličnost od 99,07% do 99,88% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka.

Dalja molekularna identifikacija dobijenih sekvenci dela NSs gena 34 odabrana izolata TSWV obavljena je na osnovu međusobnog poređenja njihove nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0. Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence od 647 nt, dobijena nt sličnost između sekvenci ispitivanih izolata TSWV iznosila je od 94,4% (34 nt razlike) do 100%, dok se aminokiselinska (aa) sličnost kretala od 87,7% (24 aa razlike) do 100% (PRILOG 6).

Molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu 66 sekvenci NSs gena dužine 647 nt, uključujući 34 sekvence TSWV dobijene tokom ovih istraživanja (Tabela 2) i 32 sekvence izolata TSWV preuzete iz GenBank baze podataka (PRILOG 2) primenom maximum parsimony metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 28 prikazano je konsenzus stablo koje je ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u dva klastera (I i II) u okviru kojih se može izdvojiti nekoliko grupa izolata na osnovu geografskog porekla, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera bio je $0,042 \pm 0,006$, dok je unutrašnji diverzitet za klaster I iznosio $0,014 \pm 0,002$, odnosno $0,013 \pm 0,002$ za klaster II. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,020 \pm 0,003$. Kako se i NSs i N gen nalaze na S RNK, u cilju poređenja stabla dobijenog na osnovu sekvenci NSs gena sa stablom dobijenim na osnovu sekvenci N gena, grupe izolata u okviru glavnih klastera obeležene su kao kod prethodnog filogenetskog stabla. U okviru klastera I izdvajaju se dve grupe: evropska i azijska, dok se u okviru klastera II izdvajaju brazilska i severnoamerička grupa. Genetički diverzitet između grupa kretao se od $0,022 \pm 0,005$ do $0,042 \pm 0,006$, a unutrašnji diverzitet za svaku grupu bio je: $0,011 \pm 0,002$ (Evropa), $0,005 \pm 0,002$ (Azija) i $0,012 \pm 0,002$ (Severna Amerika). Evropska grupa dalje se može podeliti na dve geografske subpopulacije: podgrupa 1 i 2. Podgrupu 1 čine izolati iz Srbije (20 izolata), Bugarske (tri izolata) i Crne Gore (jedan izolat), dok se u podgrupu 2 svrstavaju izolati iz Italije (tri izolata), Španije (jedan izolat), Nemačke (jedan izolat), Holandije (jedan izolat), Srbije (sedam izolata), kao i po dva izolata iz SAD i Južne Koreje, što predstavlja izuzetak u odnosu na geografsko poreklo. Genetički diverzitet između ove dve podgrupe iznosio je $0,013 \pm 0,004$, dok je unutrašnji diverzitet u okviru podgrupe 1 bio $0,006 \pm 0,001$, odnosno $0,007 \pm 0,001$ u okviru podgrupe

2. Azijska grupa obuhvatila je izolate iz Južne Koreje (dva izolata) i Francuske (dva izolata). Brazilska grupa obuhvatila je samo jedan izolat, dok se severnoamerička grupa dalje deli na tri podgrupe (3, 4 i 5) u odnosu na geografsko poreklo. Podgrupa 3 obuhvatila je izolate iz Španije (pet izolata), SAD (jedan izolat) i Srbije (jedan izolat) sa unutrašnjim diverzitetom $0,006\pm 0,002$. Podgrupu 4 čine izolati iz SAD (dva izolata), Italije (dva izolata) i Srbije (šest izolata) sa unutrašnjim diverzitetom $0,008\pm 0,002$, dok podgrupu 5 čine izolati iz SAD (tri izolata) sa unutrašnjim diverzitetom $0,007\pm 0,003$. Genetički diverzitet između ove tri podgrupe kretao se od $0,012\pm 0,003$ do $0,018\pm 0,004$. Kao i kod stabla na osnovu N sekvenci, bez obzira na visok stepen nt i aa sličnosti izolata poreklom iz Srbije, filogenetsko stablo na osnovu NSs sekvenci ukazuje na izrazitu varijabilnost srpskih izolata TSWV koji se grupišu u četiri različite podgrupe. Većina srpskih izolata ponovo se grupisala u evropsku grupu, ali u dve odvojene subpopulacije. U podgrupu 1 grupisalo se 20 izolata (109-19, 260-15, 108-19, 185-15, 181-15, 110-19, 113-19, 169-13, 170-14, 179-15, 112-19, 111-19, 646-11, 259-15, 177-14, 525-11, 437-10, 303-05, 45-12 i 343-15), a u podgrupu 2 sedam izolata (147-05, 335-16, 156-07, 512-11, 71-15, 58-15 i 555-12). Preostalih sedam izolata grupisalo se u severnoameričku grupu i to jedan izolat (345-15) u podgrupu 3, a šest izolata (42-12, 212-15, 224-16, 230-17, 192-17 i 232-17) u podgrupu 4. Osim toga, filogenetske analize na osnovu NSs gena ukazale su i na različito grupisanje dva izolata 525-11 poreklom iz paprike i 646-11 poreklom iz paradajza u odnosu na filogenetske analize na osnovu N gena. Naime, ova dva izolata grupisala su se u evropsku podgrupu 2 na osnovu sekvenci N gena, dok su se na osnovu sekvence NSs gena grupisala u evropsku podgrupu 1 i predstavljaju potencijalne rekombinante.

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u podgrupi 1 evropskog klastera nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Većina srpskih izolata poreklom iz paradajza (109-19, 108-19, 185-15, 181-15, 110-19, 113-19, 169-13, 170-14, 179-15, 112-19, 111-19, 646-11, 177-14 i 45-12) grupisala se u evropsku podgrupu 1, dok su se preostala četiri izolata grupisala u evropsku podgrupu 2 (335-16, 71-15, 58-15 i 555-12). Srpski izolati poreklom iz paprike, takođe su se grupisali u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (525-11, 437-10 i 343-15 podgrupa 1; 512-11 podgrupa 2), pri čemu se samo jedan izolat (345-15) grupisao odvojeno u podgrupu 3 severnoameričkog klastera. Srpski izolati poreklom iz duvana (260-15 i 259-15) grupisali su se u okviru podgrupe 1 evropskog klastera. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (42-12, 212-15, 224-16, 230-17, 192-17 i 232-17) grupisala se u okviru podgrupe 4 severnoameričkog klastera, dok su se preostala tri izolata grupisala u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (303-05 podgrupa 1; 147-05 i 156-07 podgrupa 2).



Slika 28. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci NSs gena dužine 647 nt 66 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem maximum parsimony metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742961). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci NSs gena 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije grupišu u 19 haplotipova (Tabela 5). Haplotip H_1 detektovan je kod jednog izolata (147-05) poreklom iz ukrasne biljke *Amarilis* sp. sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu Srbije, dok je haplotip H_2 zabeležen kod pet izolata (192-17, 212-15, 224-16, 230-17 i 232-17) poreklom iz pet različitih ukrasnih biljaka (*Impatiens hawkeri*, *Begonia* sp., *Cinia* sp., *Pelargonium* sp. i *Osteospermum* sp.) sakupljenih u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu naše zemlje. Haplotipovi H_3, H_7, H_9 i H_10 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od četiri izolata (303-05, 343-15, 437-10, odnosno 259-15), od kojih je jedan poreklom iz ukrasne biljke *Gloxinia* sp. sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu Srbije, dok su dva poreklom iz paprike i jedan iz duvana sakupljenih na severu zemlje na tri lokaliteta (Buđanovci, Kupusina i Hrtkovci). Haplotip H_4 zastupljen je kod jednog izolata (42-12) poreklom iz ukrasne biljke *Brugmansia* sp. sakupljene u Mačkovcu na jugu Srbije. Haplotip H_5 prisutan je kod pet izolata (58-15, 71-15, 335-16, 512-11 i 156-07), od kojih su tri poreklom iz biljaka paradajza i jedan iz paprike sakupljenih na dva lokaliteta (Mužlja i Kupusina) na severu Srbije, dok jedan potiče iz ukrasne biljke *Gerbera hybrida* sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu naše zemlje. Haplotip H_6 detektovan je kod jednog izolata (345-15) poreklom iz paprike sakupljene u Leskovcu na jugu Srbije, dok je haplotip H_8 zastupljen kod dva izolata (177-14 i 525-11), od kojih jedan vodi poreklo iz paradajza sakupljenog na lokalitetu Bogojevce na jugu Srbije, dok drugi potiče iz paprike sakupljene u Kupusini na severu naše zemlje. Haplotip H_11 predstavlja najučestaliji haplotip i zabeležen je kod sedam izolata (108-19, 109-19, 110-19, 113-19, 181-15, 185-15 i 260-15), od kojih šest vodi poreklo iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Veliko Vojlovce i Bošnjace) na jugu Srbije, dok jedan potiče iz duvana sakupljenog u Golubincima na severu naše zemlje. Haplotipovi H_12, H_13, H_14, H_15, H_17, H_18 i H_19 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od sedam izolata (111-19, 179-15, 112-19, 169-13, 646-11, 45-12, odnosno 170-14) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih u Novom Kneževcu na severu i na pet lokaliteta (Bošnjace, Veliko Vojlovce, Togočevce, Navalin i Cekavica) na jugu Srbije, dok je haplotip H_16 zabeležen kod jednog izolata (555-12) poreklom iz paradajza sakupljenog u Subotici na severu naše zemlje.

Tabela 5. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence NSs gena

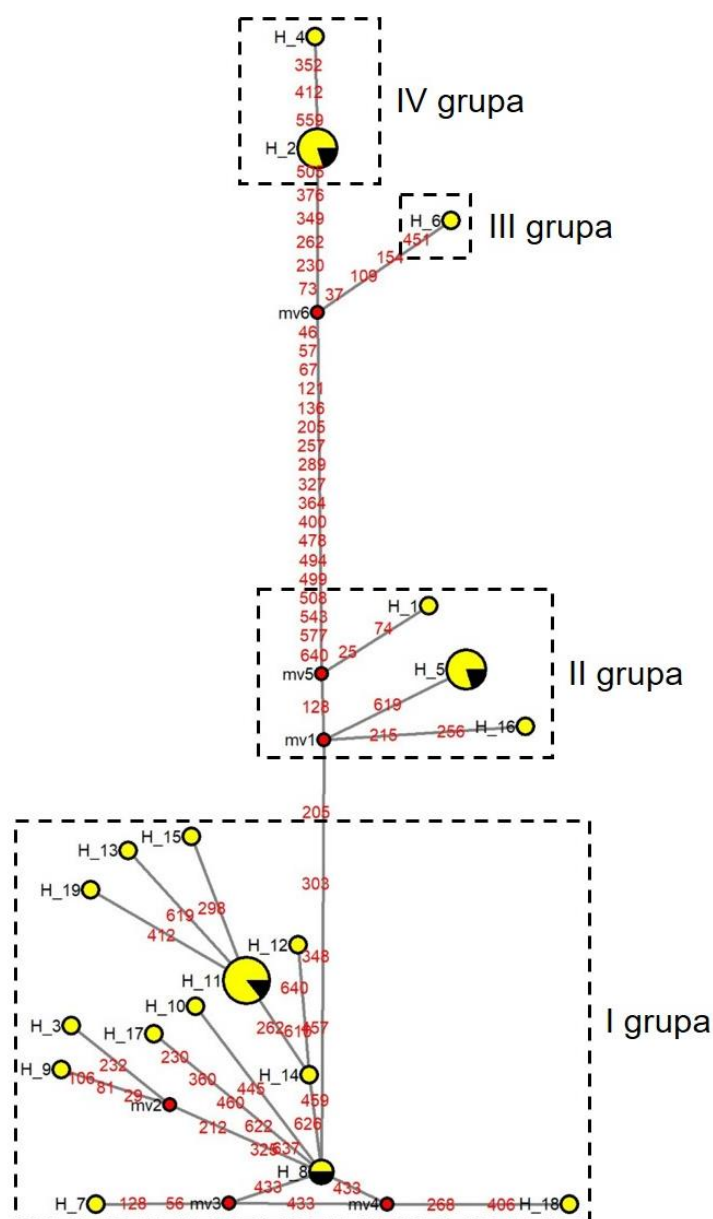
Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_1	147-05 ^a	2005	<i>Amarilis</i> sp.	Vranjska Banja	Južna Srbija
H_2	212-15	2015	<i>Begonia</i> sp.	Rača	Centralna Srbija
	224-16	2016	<i>Cinia</i> sp.	Kragujevačka	Srbija
	192-17	2017	<i>Impatiens hawkeri</i>		
	230-17		<i>Pelargonium</i> sp.		
	232-17		<i>Osteospermum</i> sp.		
H_3	303-05 ^a	2005	<i>Gloxinia</i> sp.		
H_4	42-12 ^a	2012	<i>Brugmansia</i> sp.	Mačkovac	Južna Srbija
H_5	156-07 ^a	2007	<i>Gerbera hybrida</i>	Vranjska Banja	
	512-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
	58-15	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mužlja	
	71-15				
	335-16			Kupusina	
H_6	345-15		<i>Capsicum annuum</i>	Leskovac	Južna Srbija
H_7	343-15			Buđanovci	Severna Srbija
H_8	525-11 ^a	2011		Kupusina	Srbija
	177-14 ^a	2014	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bogojevce	Južna Srbija
H_9	437-10 ^a	2010	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
H_10	259-15	2015	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hrtkovci	Srbija
H_11	181-15		<i>Solanum lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	Južna Srbija
	185-15				
	260-15		<i>Nicotiana tabacum</i>	Golubinci	Severna Srbija
H_12	108-19 ^c	2019	<i>Solanum lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	Južna Srbija
	109-19 ^c				
	110-19 ^c				
	113-19 ^c			Bošnjace	
H_13	179-15	2015		Veliko Vojlovce	
H_14	112-19 ^c	2019		Bošnjace	
H_15	169-13 ^a	2013		Togočevce	
H_16	555-12 ^b	2012		Subotica	Severna Srbija
H_17	646-11 ^b	2011		Navalin	Južna Srbija
H_18	45-12 ^b	2012		Novi Kneževac	Severna Srbija
H_19	170-14 ^a	2014		Cekavica	Južna Srbija

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Mreža haplotipova rekonstruisana pomoću median-joining networks algoritma na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji pokazala je da se 19 haplotipova na osnovu delimične sekvence NSs gena grupišu u četiri grupe (I, II, III i IV) (Slika 29). Grupa I sa 13 haplotipova (H_3, H_7, H_8, H_9, H_10, H_11, H_12, H_13, H_14, H_15, H_17, H_18 i H_19) obuhvata 20 sekvenci koje se u filogenetskom stablu grupišu u evropsku podgrupu 1, dok grupa II sa tri haplotipa (H_1, H_5 i H_16) obuhvata sedam sekvenci koje se grupišu u evropsku podgrupu 2 na osnovu filogenetske analize. Grupa III sa jednim haplotipom (H_6) obuhvata jednu sekvencu koja se grupiše u severnoameričku podgrupu 3, dok grupa IV sa dva haplotipa (H_2 i H_4) obuhvata šest sekvenci koje se grupišu u severnoameričku podgrupu 4 na osnovu filogenetske analize. Centralni ili predački haplotip za grupu I predstavlja haplotip H_8, dok haplotip H_11 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_13, H_15 i H_19. Centralni haplotipovi nisu otkriveni za grupu II i III, dok za grupu IV centralni haplotip predstavlja haplotip H_2.



Slika 29. Mreža haplotipova rekonstruisana na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci NSs gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije korišćenjem median-joining networks algoritma. Svaki kružić obojen žutom bojom predstavlja jedinstveni haplotip, pri čemu je njegov prečnik proporcionalan broju sekvenci sadržanom u haplotipu. Celi brojevi prikazani na linijama označavaju poziciju nukleotida u sekvenci koji se razlikuje između haplotipova, a puni kružići crvene boje predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani.

5.3.3. Filogenetska analiza na osnovu sekvenci S segmenta

Osim filogenetskih analiza na osnovu sekvenci N i NSs gena, obavljena je i filogenetska analiza rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu dela sekvenci S segmenta dužine 1204 nt dobijenih spajanjem delimičnih sekvenci N i NSs gena, prethodno skraćenih na dužinu najkraće sekvence za svaki gen posebno, uključujući sekvence 34 izolata TSWV poreklom iz Srbije (Tabela 2) i 22 sekvence izolata TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 1 i 2) primenom maximum parsimony metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 30 prikazano je konsenzus stablo koje je, kao i kod filogenetskih stabala na osnovu sekvenci N i NSs gena, ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u četiri klastera na osnovu njihovog geografskog porekla: Evropa, Brazil, Severna Amerika i Azija, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera kretao se od $0,025 \pm 0,004$ do $0,038 \pm 0,006$, a unutrašnji diverzitet za svaki klaster bio je: $0,009 \pm 0,001$ (Evropa), $0,014 \pm 0,002$ (Severna Amerika) i $0,008 \pm 0,002$ (Azija). Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,023 \pm 0,002$. Evropski klaster dalje se može podeliti na dve geografske subpopulacije: podgrupa 1 i 2. Podgrupu 1 čine izolati poreklom iz Srbije (20 izolata), Bugarske (tri izolata) i Crne Gore (jedan izolat), dok se u podgrupu 2 svrstavaju izolati iz Holandije (jedan izolat), Nemačke (jedan izolat), Srbije (sedam izolata), kao i dva izolata iz SAD, što predstavlja izuzetak u odnosu na geografsko poreklo. Genetički diverzitet između ove dve podgrupe iznosio je $0,012 \pm 0,002$, dok je unutrašnji diverzitet u okviru podgrupe 1 bio $0,006 \pm 0,001$, odnosno $0,004 \pm 0,001$ u okviru podgrupe 2. Brazilski klaster obuhvatio je samo jedan izolat, dok se severnoamerički klaster dalje deli na tri podgrupe (3, 4 i 5) u odnosu na geografsko poreklo. Podgrupa 3 obuhvatila je izolate iz Španije (tri izolata) i Srbije (jedan izolat) sa unutrašnjim diverzitetom $0,005 \pm 0,001$. Podgrupu 4 čine izolati iz Italije (dva izolata) i Srbije (šest izolata) sa unutrašnjim diverzitetom $0,005 \pm 0,001$, dok je podgrupa 5 obuhvatila četiri izolata iz SAD sa unutrašnjim diverzitetom $0,014 \pm 0,002$. Genetički diverzitet između ove tri podgrupe kretao se od $0,016 \pm 0,003$ do $0,020 \pm 0,003$. Azijski klaster obuhvatio je izolate iz Južne Koreje (dva izolata), sa izuzetkom dva izolata iz Francuske. Bez obzira na visok stepen nt i aa sličnosti izolata poreklom iz Srbije, filogenetske analize ukazale su na izrazitu varijabilnost srpskih izolata TSWV koji se grupišu u četiri različite podgrupe. Većina srpskih izolata grupisala se u klaster evropskih izolata, ali u dve odvojene subpopulacije. U podgrupu 1 grupisalo se 20 izolata (110-19, 108-19, 113-19, 181-15, 109-19, 169-13, 170-14, 185-15, 179-15, 260-15, 112-19, 111-19, 177-14, 259-15, 437-10, 303-05, 45-12, 343-15), uključujući i dva izolata (646-11 i 525-11) koja su se na osnovu N gena grupisala u podgrupu 2, a na osnovu NSs gena u podgrupu 1, dok se sedam izolata (147-05, 555-12, 335-16, 58-15, 71-15, 512-11 i 156-07) svrstalo u podgrupu 2. Imajući u vidu da ovi izolati na osnovu analize sekvenci N i NSs gena pripadaju evropskom klasteru, dva potencijalno rekombinantna izolata (646-11 i 525-11) grupisala su se na zasebnoj grani u okviru evropske podgrupe 1. Preostalih sedam izolata grupisali su se u severnoamerički klaster, i to jedan izolat (345-15) u podgrupu 3, a šest izolata (42-12, 232-17, 224-16, 192-17, 212-15 i 230-17) u podgrupu 4.

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u podgrupi 1 evropskog klastera nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Većina srpskih izolata poreklom iz paradajza (110-19, 108-19, 113-19, 181-15, 109-19, 169-13, 170-14, 185-15, 179-15, 112-19, 111-19, 177-14, 45-12 i 646-11) grupisala se u evropsku podgrupu 1, dok su se preostala četiri izolata grupisala u evropsku podgrupu 2 (555-12, 335-16, 58-15 i 71-15). Srpski izolati poreklom iz paprike, takođe su se grupisali u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (437-10, 343-15 i 525-11 podgrupa 1; 512-11 podgrupa 2), pri čemu se samo jedan izolat (345-15) grupisao odvojeno u podgrupu 3 severnoameričkog klastera. Srpski izolati poreklom iz duvana (260-15 i 259-15) grupisali su se u okviru podgrupe 1 evropskog klastera. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (42-12, 232-17, 224-16, 192-17, 212-15 i 230-17) grupisala se u okviru

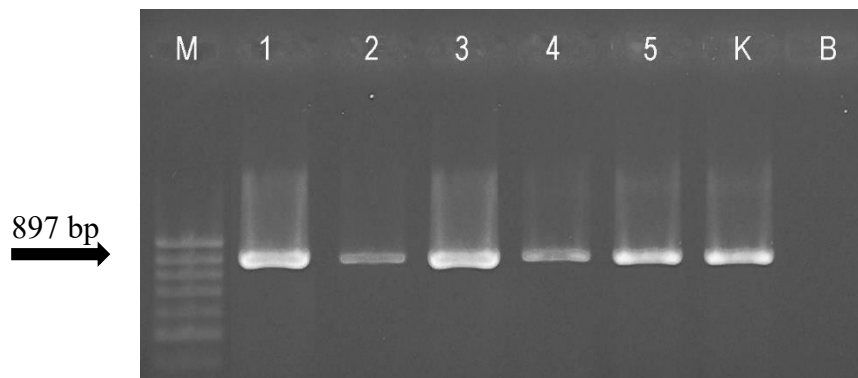
podgrupe 4 severnoameričkog klastera, dok su se preostala tri izolata grupisala u okviru podgrupe 1 i 2 evropskog klastera (303-05 podgrupa 1; 147-05 i 156-07 podgrupa 2).



Slika 30. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci S segmenta dužine 1204 nt 56 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem maximum parsimony metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742961). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

5.3.4. Analiza sekvenci NSm gena

Primenom prajmera M66/M962 obavljena je uspešna amplifikacija dela NSm gena dužine 897 bp kod sva 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije. Deo amplifikovanih fragmenata NSm gena prikazan je na Slici 31.



Slika 31. Vizuelizacija amplikona NSm gena dela odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) u 1% agaroznom gelu dobijenih primenom „One-step“ RT-PCR i specifičnih prajmera M66/M962. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Low Range (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 437-10 iz *Capsicum annuum*; 2-izolat 512-11 iz *Capsicum annuum*; 3-izolat 525-11 iz *Capsicum annuum*; 4-izolat 343-15 iz *Capsicum annuum*; 5-izolat 345-15 iz *Capsicum annuum*; K-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz *Nicotiana tabacum*); B-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvenciranja amplikona umnoženih u RT-PCR reakciji dobijene su delimične sekvence NSm gena ispitivanih izolata TSWV. Rezultati BLAST analize pokazali su da odabrani izolati TSWV poreklom iz Srbije, identifikovani tokom ovih istraživanja, pokazuju najveću nt sličnost od 97,28% do 100% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka.

Dalja molekularna identifikacija dobijenih sekvenci dela NSm gena 34 odabranih izolata TSWV obavljena je na osnovu međusobnog poređenja njihove nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0. Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence od 720 nt, dobijena nt sličnost između sekvenci ispitivanih izolata TSWV iznosila je od 91,7% (60 nt razlike) do 100%, dok se aminokiselinska (aa) sličnost kretala od 95% (12 aa razlike) do 100%, ukazujući na nizak stepen genetičke varijabilnosti izolata iz Srbije (PRILOG 7).

Osim toga, kako izolati TSWV poreklom iz paradajza, odabrani za ova istraživanja, potiču iz biljaka paradajza koje ne sadrže *Sw-5b* gen otpornosti (12 potencijalno RI izolata TSWV), tako i iz biljaka paradajza nosioca *Sw-5b* gena otpornosti (šest potencijalno RB izolata TSWV), obavljena je i detaljnija molekularna identifikacija i proračun nt i aa sličnosti ove dve grupe izolata kako međusobno, tako i sa RI i RB izolatima TSWV iz drugih delova sveta dostupnih u GenBank bazi podataka. Rezultati BLAST analize pokazali su da potencijalno RI i RB izolati TSWV poreklom iz Srbije, pokazuju najveću nt sličnost od 98,65 do 99,46%, odnosno 97,45-98,79% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka bez obzira na njihov fenotip (RI ili RB izolati). Međusobnim poređenjem svih 18 izolata poreklom iz paradajza i proračunom nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0, nt sličnost kretala se od 97,4% do 100% (19 nt razlike), dok je aa sličnost varirala od 95,8% do 100% (10 aa razlike) (PRILOG 8). Nukleotidna sličnost potencijalno RI izolata kretala se od 98,3% do 100% (12 nt razlike), odnosno od 97,3% do 99,4% (22 nt razlike) između potencijalno RB izolata, dok je aa sličnost varirala od 98,7% do 100% (3 aa razlike) kod potencijalno RI izolata, odnosno od 94,9% do 98,5% (14 aa razlike) kod potencijalno RB izolata. Takođe, nt sličnost između pojedinih srpskih potencijalno RI izolata

(npr. 45-12, 555-12, 71-15 i 335-16 sa 185-15; 98,3% nt sličnosti) bila je niža u odnosu na nt sličnost između pojedinih potencijalno RI i RB izolata (npr. 169-13, 170-14, 177-14 i 179-15 sa 109-19 i 110-19; 99,9% nt sličnosti).

U cilju utvrđivanja postojanja promena u aminokiselinskoj sekvenci NSm proteina odgovornih za pojavu RB izolata TSWV, obavljeno je i poređenje aminokiselinske sekvence NSm proteina 12 potencijalno RI i šest potencijalno RB izolata TSWV iz Srbije poreklom iz paradajza sa sekvencama prethodno okarakterisanih RI i RB izolata ovog virusa poreklom iz paradajza iz Španije (Aramburu et al., 2010; López et al., 2011). Prisustvo promena aminokiselina na pozicijama 118 ili 120, karakterističnih za RB izolate TSWV, utvrđeno je kod šest izolata koji vode poreklo iz otporne sorte paradajza, ali ne i kod 12 izolata ovog virusa izolovanih iz osetljivih sorti paradajza u koje nije ugrađen *Sw-5b* gen otpornosti (Slika 32). Kod izolata 108-19, 109-19, 110-19, 112-19 i 113-19 utvrđena je supstitucija cisteina tirozinom na poziciji 118 (C118Y), dok je kod izolata 111-19 na poziciji 120 (T120N) prisutan asparagin umesto treonina. Kod svih šest izolata utvrđeno je i prisustvo izoleucina na poziciji 130 (I130I). Prisustvo ovih aminokiselinskih supstitucija u sekvencama NSm proteina, koje su neophodne za prevazilaženje otpornosti dobijene ugrađivanjem *Sw-5b* gena u komercijalne sorte paradajza, klasifikuje ovih šest izolata kao RB izolate TSWV.

	100	110	120	130	140
646-11	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
45-12	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
555-12	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
169-13	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
170-14	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
177-14	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
58-15	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
71-15	TNHHISNWKNDL	LVGSGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
179-15	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
181-15	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
185-15	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
335-16	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
108-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
109-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
110-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
111-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICFNWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
112-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
113-19	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
GRAU_RB	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICFNWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
L1o2TL3_RB	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKIYPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	
LL-N.05_RI	TNHHISNWKNDL	LVGNGKQNANKV	IKICPTWDSRKQYMMI	SRIVIWVCPTIPNPTGKLVV	

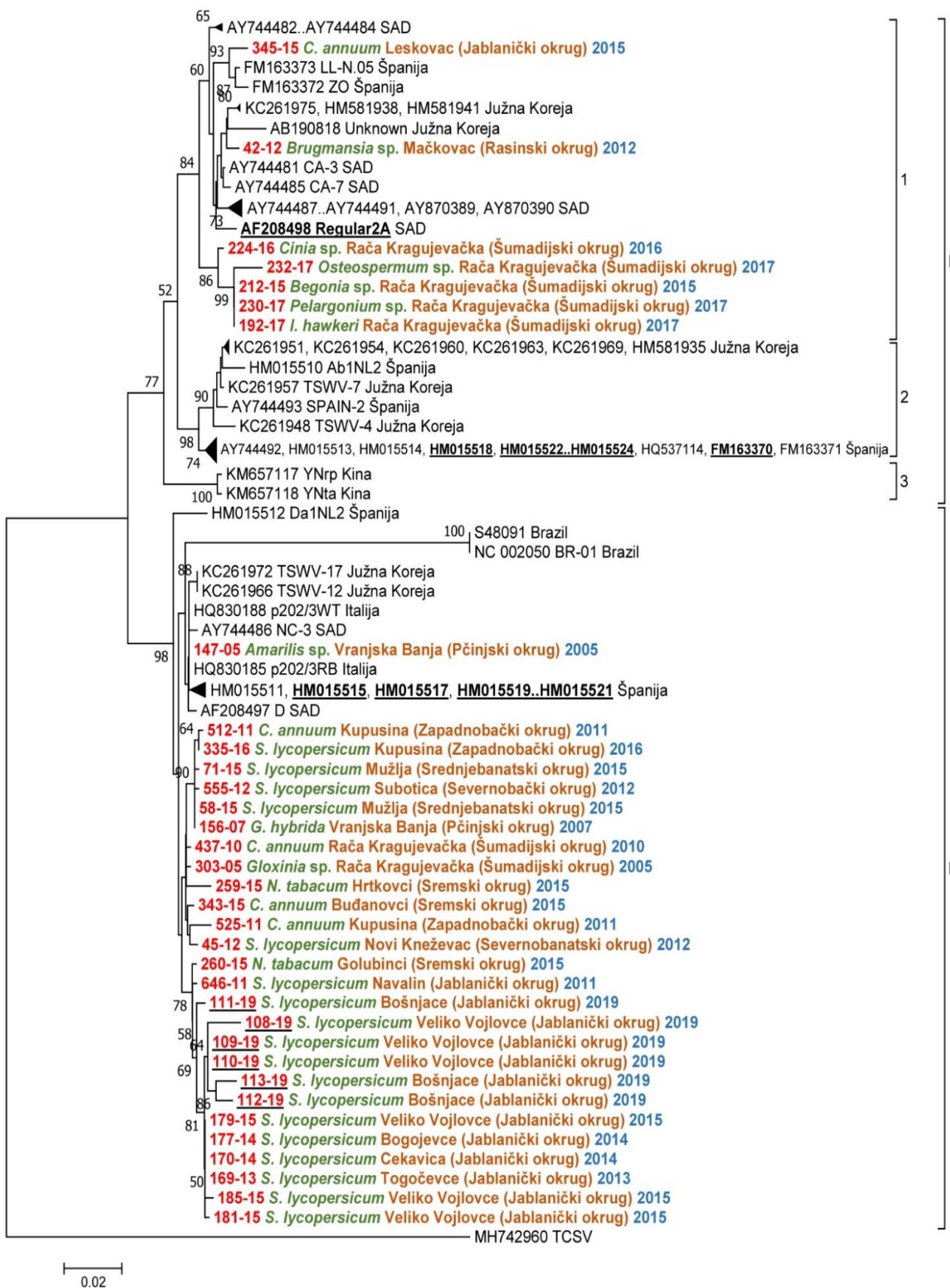
Slika 32. Višestruko uparivanje aminokiselinskih sekvenci NSm proteina izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) iz Srbije poreklom iz paradajza sa prethodno okarakterisanim RB (L1o2TL3 i GRAU) i RI (LL-N.05) izolatima poreklom iz paradajza. Aminokiselinske supstitucije karakteristične za RB izolate TSWV koji imaju sposobnost prevazilaženja otpornosti kod komercijalnih sorti sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti naglašene su plavom (C118Y), odnosno žutom (T120N) bojom.

Molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu 90 sekvenci NSm gena dužine 720 nt, uključujući 34 sekvence TSWV dobijene tokom ovog istraživanja (Tabela 2) i 56 sekvenci izolata TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 3) primenom neighbor-joining metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 na osnovu Tamura-3 parametar modela sa Gamma distribucijom (T92+G) i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 33 prikazano je filogenetsko stablo koje je ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u dva glavna klastera: klaster I i II, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera bio je $0,064 \pm 0,007$, dok je unutrašnji diverzitet za klaster I iznosio $0,026 \pm 0,003$, odnosno $0,021 \pm 0,002$ za klaster II. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,044 \pm 0,004$. U

okviru klastera I mogu se izdvojiti tri podgrupe: podgrupa 1, 2 i 3. Genetički diverzitet između podgrupa kretao se od $0,034 \pm 0,006$ do $0,043 \pm 0,007$, a unutrašnji diverzitet za svaku podgrupu bio je: $0,017 \pm 0,002$ (podgrupa 1), $0,012 \pm 0,002$ (podgrupa 2) i $0,003 \pm 0,002$ (podgrupa 3). Podgrupu 1 čini 25 RI izolata iz SAD (12 izolata), Španije (dva izolata), Južne Koreje (četiri izolata) i Srbije (sedam izolata), kao i jedan RB izolat iz SAD. Podgrupu 2 čini 15 RI izolata iz Južne Koreje (osam izolata) i Španije (sedam izolata), kao i pet RB izolata iz Španije, dok se u podgrupu 3 grupišu dva RI izolata iz Kine. Klaster II obuhvata 31 RI izolat iz Španije (dva izolata), Brazila (dva izolata), Južne Koreje (dva izolata), Italije (dva izolata), SAD (dva izolata) i Srbije (21 izolat), kao i 11 RB izolata iz Španije (pet izolata) i Srbije (šest izolata). Bez obzira na visok stepen nt i aa sličnosti izolata poreklom iz Srbije, filogenetsko stablo na osnovu NSm sekvenci ukazuje na varijabilnost srpskih izolata TSWV koji se grupišu u dva različita klastera nezavisno od njihovog fenotipa. Većina srpskih izolata grupisala se u klaster II, i to: 21 RI izolat (147-05, 512-11, 335-16, 71-15, 555-12, 58-15, 156-07, 437-10, 303-05, 259-15, 343-15, 525-11, 45-12, 260-15, 646-11, 179-15, 177-14, 170-14, 169-13, 185-15 i 181-15) i šest RB izolata (111-19, 108-19, 109-19, 110-19, 113-19 i 112-19), dok se preostalih sedam izolata (345-15, 42-12, 224-16, 232-17, 212-15, 230-17 i 192-17) grupisalo u klaster I. Takođe, filogenetske analize na osnovu sekvence NSm gena ukazuju da se srpski RB izolati poreklom iz paradajza grupišu u isti klaster nezavisno od aminokiselinske supstitucije prisutne u sekvenci NSm proteina (C118Y ili T120N).

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u klasteru II nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Svi srpski izolati poreklom iz paradajza (335-16, 71-15, 555-12, 58-15, 45-12, 646-11, 111-19, 108-19, 109-19, 110-19, 113-19, 112-19, 179-15, 177-14, 170-14, 169-13, 185-15 i 181-15) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz paprike (512-11, 437-10, 343-15 i 525-11), takođe se grupisala u klaster II, pri čemu se samo jedan izolat (345-15) odvojeno grupisao u okviru podgrupe 1 klastera I. Srpski izolati poreklom iz duvana (259-15 i 260-15) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (42-12, 224-16, 232-17, 212-15, 230-17 i 192-17) grupisala se u okviru podgrupe 1 klastera I, dok su se preostala tri izolata (147-05, 156-07 i 303-05) grupisala u klaster II.



Slika 33. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci NSm gena dužine 720 nt 90 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem neighbor-joining metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742960). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni, dok su svi RB izolati TSWV podvučeni.

Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci NSm gena 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije grupišu u 27 haplotipova (Tabela 6). Haplotip H_1 zabeležen je kod dva izolata (109-19 i 110-19) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih u Velikom Vojlovcu na jugu Srbije, dok su haplotipovi H_2, H_3, H_4, H_5, H_7, H_8, H_9, H_11, H_12, H_13 i H_18 zabeleženi svaki pojedinačno kod jednog od 10 izolata (108-19, 111-19, 112-19, 113-19, 181-15, 185-15, 45-12, 555-12, 646-11, 71-15, odnosno 335-16) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na četiri lokaliteta na severu (Novi Kneževac, Subotica, Mužlja i Kupusina) i na tri lokaliteta na jugu (Veliko Vojlovce, Bošnjace i Navalin) naše zemlje. Haplotip H_6 predstavlja najučestaliji haplotip i detektovan je kod četiri izolata (169-13, 170-14, 177-14 i 179-15) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na četiri lokaliteta (Togočevce, Cekavica, Bogojevce i Veliko Vojlovce) na jugu Srbije. Haplotip H_10 detektovan je kod dva izolata (156-07 i 58-15), od kojih jedan vodi poreklo iz ukrasne biljke *Gerbera hybrida* sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu Srbije, dok drugi potiče iz paradajza sakupljenog u Mužlji na severu naše zemlje. Haplotipovi H_14 i H_15 zastupljeni svaki pojedinačno kod jednog od dva izolata (259-15, odnosno 260-15) poreklom iz biljaka duvana sakupljenih na dva lokaliteta (Hrtkovci i Golubinci) na severu Srbije. Haplotipovi H_16, H_17 i H_19 primećeni su svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (512-11, 437-10, odnosno 343-15) poreklom iz biljaka paprike sakupljenih na severu Srbije na dva lokaliteta (Kupusina i Buđanovci). Haplotip H_20 zabeležen je kod jednog izolata (345-15) poreklom iz paprike sakupljene u Leskovcu na jugu naše zemlje, dok je haplotip H_21 zastupljen kod tri izolata (192-17, 212-15 i 230-17) poreklom iz tri različite ukrasne biljke (*Impatiens hawkeri*, *Begonia* sp. i *Pelargonium* sp.) sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu Srbije. Haplotipovi H_22, H_23 i H_24 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (42-12, 224-16, odnosno 232-17) poreklom iz tri različite ukrasne biljke (*Brugmansia* sp., *Cinia* sp. i *Osteospermum* sp.) sakupljene na lokalitetima Rača Kragujevačka u centralnom i Mačkovac u južnom delu Srbije. Haplotip H_25 zabeležen je kod jednog izolata (525-11) poreklom iz paprike sakupljene u Kupusini na severu Srbije, dok su haplotipovi H_26 i H_27 detektovani svaki pojedinačno kod jednog od dva izolata (147-05, odnosno 303-05) poreklom iz dve različite ukrasne biljke (*Amarilis* sp. i *Gloxinia* sp.) sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom i Vranjskoj Banji u južnom delu naše zemlje.

Tabela 6. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence NSm gena

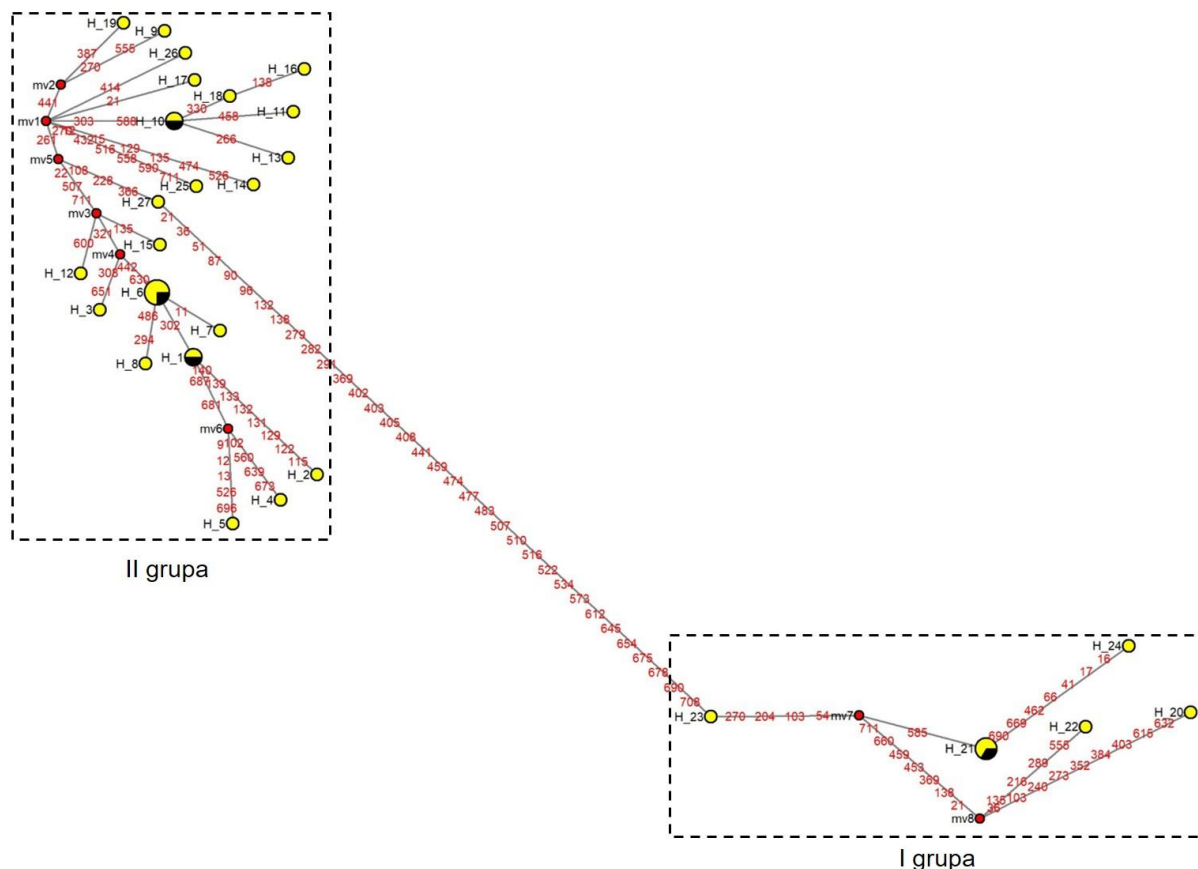
Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_1	109-19 ^c 110-19 ^c	2019	<i>Solanum lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	Južna Srbija
H_2	108-19 ^c			Bošnjace	
H_3	111-19 ^c				
H_4	112-19 ^c				
H_5	113-19 ^c				
H_6	169-13 ^a 170-14 ^a 177-14 ^a 179-15	2013 2014 2015			Togočevce Cekavica Bogojevce Veliko Vojlovce
H_7	181-15				
H_8	185-15				
H_9	45-12 ^b	2012		Novi Kneževac	Severna Srbija
H_10	58-15	2015		Mužlja	
H_11	156-07 ^a	2007	<i>Gerbera hybrida</i>	Vranjska Banja	Južna Srbija
H_12	555-12 ^a	2012	<i>Solanum lycopersicum</i>	Subotica	Severna Srbija
H_13	646-11 ^b	2011		Navalin	Južna Srbija
H_14	71-15	2015		Mužlja	Severna Srbija
H_15	259-15 260-15		<i>Nicotiana tabacum</i>	Hrtkovci Golubinci	
H_16	512-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	
H_17	437-10 ^a	2010		Rača Kragujevačka	Centralna Srbija
H_18	335-16	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kupusina	Severna Srbija
H_19	343-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Buđanovci	
H_20	345-15			Leskovac	Južna Srbija
H_21	212-15 192-17 230-17	2017	<i>Begonia sp.</i> <i>Impatiens hawkeri</i> <i>Pelargonium sp.</i>	Rača Kragujevačka	Centralna Srbija
H_22	42-12 ^a	2012	<i>Brugmansia sp.</i>	Mačkovac	Južna Srbija
H_23	224-16	2016	<i>Cinia sp.</i>	Rača	Centralna Srbija
H_24	232-17	2017	<i>Osteospermum sp.</i>	Kragujevačka	Srbija
H_25	525-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
H_26	303-05 ^a	2005	<i>Gloxinia sp.</i>	Rača Kragujevačka	Centralna Srbija
H_27	147-05 ^a		<i>Amarilis sp.</i>	Vranjska Banja	Južna Srbija

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

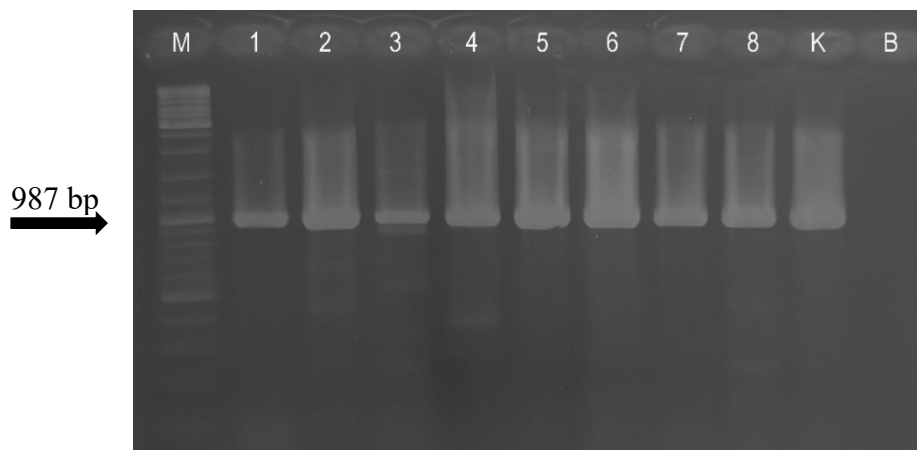
Mreža haplotipova rekonstruisana pomoću median-joining networks algoritma na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji pokazala je da se 27 haplotipova na osnovu delimične sekvence NSm gena grupišu u dve grupe (I i II) (Slika 34). Grupa I sa pet haplotipova (H_20, H_21, H_22, H_23 i H_24) obuhvata sedam sekvenci koje se u filogenetskom stablu grupišu u klaster I, dok grupa II sa 22 haplotipa (H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_10, H_11, H_12, H_13, H_14, H_15, H_16, H_17, H_18, H_19, H_25, H_26 i H_27) obuhvata 27 sekvenci koje se grupišu u klaster II na osnovu filogenetske analize. Centralni ili predački haplotip nije otkriven ni za jednu grupu, već su haplotipovi TSWV pronađeni u Srbiji činili pericentralne haplotipove u obe grupe, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima. U grupi I haplotip H_6 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_1, H_7 i H_8, a haplotip H_10 ka haplotipovima H_11, H_13 i H_18.



Slika 34. Mreža haplotipova rekonstruisana na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci NSm gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije korišćenjem median-joining networks algoritma. Svaki kružić obojen žutom bojom predstavlja jedinstveni haplotip, pri čemu je njegov prečnik proporcionalan broju sekvenci sadržanom u haplotipu. Celi brojevi prikazani na linijama označavaju poziciju nukleotida u sekvenci koji se razlikuje između haplotipova, a puni kružići crvene boje predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani.

5.3.5. Analiza sekvenci Gn-Gc gena

Primenom prajmera M3050/M4037 obavljena je uspešna amplifikacija dela Gn-Gc gena dužine 987 bp kod sva 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije. Deo amplifikovanih fragmenata Gn-Gc gena prikazan je na Slici 35.



Slika 35. Vizuelizacija amplikona Gn-Gc gena dela odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) u 1% agaroznom gelu dobijenih primenom „One-step“ RT-PCR i specifičnih prajmera M3050/M4037. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 147-17 iz *Solanum lycopersicum*; 2-izolat 108-17 iz *Solanum lycopersicum*; 3-izolat 108-19 iz *Solanum lycopersicum*; 4-izolat 109-19 iz *Solanum lycopersicum*; 5-izolat 110-19 iz *Solanum lycopersicum*; 6-izolat 111-19 iz *Solanum lycopersicum*; 7-izolat 112-19 iz *Solanum lycopersicum*; 8-izolat 113-19 iz *Solanum lycopersicum*; K-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz *Nicotiana tabacum*); B-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvenciranja amplikona umnoženih u RT-PCR reakciji, dobijene su delimične sekvence Gn-Gc gena ispitivanih izolata. Rezultati BLAST analize pokazali su da odabrani izolati TSWV poreklom iz Srbije, identifikovani tokom ovih istraživanja, pokazuju najveću nt sličnost od 97,17% do 99,57% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka.

Dalja molekularna identifikacija dobijenih sekvenci dela Gn-Gc gena 34 odabrana izolata TSWV obavljena je na osnovu međusobnog poređenja njihove nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0. Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence od 871 nt, dobijena nukleotidna (nt) sličnost iznosila je od 91% (78 nt razlike) do 100%, dok se aminokiselinska (aa) sličnost kretala od 92,1% (23 aa razlike) do 100% (PRILOG 9).

Molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu 90 sekvenci Gn-Gc gena dužine 871 nt, uključujući 34 sekvence TSWV dobijene tokom ovih istraživanja (Tabela 2) i 56 sekvenci TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 3) primenom neighbor-joining metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 na osnovu Tamura-3 parametar modela sa Gamma distribucijom (T92+G) i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 36 prikazano je filogenetsko stablo koje je ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u dva glavna klastera: klaster I i II, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera bio je $0,068 \pm 0,007$, dok je unutrašnji diverzitet za klaster I iznosio $0,028 \pm 0,003$, odnosno $0,015 \pm 0,002$ za klaster II. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,045 \pm 0,004$. Kao i kod filogenetskog stabla na osnovu sekvenci NSm gena, u okviru klastera I mogu se izdvojiti tri podgrupe: podgrupa 1, 2 i 3. Genetički diverzitet između podgrupa kretao se od $0,032 \pm 0,005$ do $0,042 \pm 0,006$, a unutrašnji diverzitet za svaku podgrupu bio je: $0,024 \pm 0,002$ (podgrupa 1), $0,012 \pm 0,002$ (podgrupa 2) i $0,005 \pm 0,002$ (podgrupa 3). Podgrupu 1 čine izolati iz SAD (13 izolata), Španije (dva izolata), Južne Koreje (četiri izolata) i Srbije (šest izolata). Podgrupu 2 čine izolati iz Južne Koreje (osam izolata) i Španije (12 izolata), dok se u podgrupu 3 grupišu dva izolata iz Kine. Klaster II obuhvata izolate iz Španije (sedam izolata), Brazila (dva izolata), Južne Koreje (dva izolata), Italije (dva izolata), SAD (dva izolata) i Srbije (28 izolata). Većina srpskih izolata se grupisala u klaster II (147-05, 112-19, 113-19, 108-19, 110-19, 109-19, 179-15, 185-15, 181-15, 177-

14, 170-14, 169-13, 646-11, 111-19, 260-15, 156-07, 555-12, 71-15, 335-16, 512-11, 58-15, 303-05, 437-10, 224-16, 259-15, 45-12, 343-15 i 525-11), dok se preostalih šest izolata (345-15, 192-17, 212-15, 232-17, 230-17 i 42-12) grupisalo u klaster I. Osim toga, filogenetske analize na osnovu Gn-Gc gena ukazale su i na različito grupisanje izolata 224-16 poreklom iz ukrasne biljke *Cinia* sp. u odnosu na filogenetske analize na osnovu sekvence NSm gena. Naime, izolat 224-16 grupisao se u klaster I na osnovu sekvenci NSm gena, dok se na osnovu sekvence Gn-Gc gena grupisao u klaster II.

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u klasteru II nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Svi srpski izolati poreklom iz paradajza (112-19, 113-19, 108-19, 110-19, 109-19, 179-15, 185-15, 181-15, 177-14, 170-14, 169-13, 646-11, 111-19, 555-12, 71-15, 335-16, 58-15 i 45-12) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz paprike (512-11, 437-10, 343-15 i 525-11), takođe se grupisala u klaster II, pri čemu se samo jedan izolat (345-15) odvojeno grupisao u okviru podgrupe 1 klastera I. Srpski izolati poreklom iz duvana (260-15 i 259-15) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (192-17, 212-15, 232-17, 230-17 i 42-12) grupisala se u okviru podgrupe 1 klastera I, dok su se preostala četiri izolata (147-05, 156-07, 303-05 i 224-16) grupisala u klaster II.



Slika 36. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci Gn-Gc gena dužine 871 nt 90 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem neighbor-joining metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742960). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci Gn-Gc gena 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije grupišu u 26 haplotipova (Tabela 7). Haplotipovi H_1, H_2, H_5, H_8, H_22, H_23, H_25 i H_26 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od osam izolata (45-12, 58-15, 179-15, 646-11, 555-12, 181-15, 111-19, odnosno 112-19) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na tri lokaliteta na severu (Novi Kneževac, Mužlja i Subotica) i jugu (Veliko Vojlovce, Navalin i Bošnjace) Srbije. Haplotip H_3 zabeležen je kod dva izolata (156-07 i 71-15), od kojih jedan vodi poreklo iz ukrasne biljke *Gerbera hybrida* sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu Srbije, a drugi iz paradajza koji je sakupljen u Mužlji na severu naše zemlje. Haplotip H_4 predstavlja jedan od dva najučestalija haplotipa i detektovan je kod četiri izolata (169-13, 170-14, 177-14 i 185-15) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na četiri lokaliteta (Togočevce, Cekavica, Bogojevce i Veliko Vojlovce) na jugu Srbije. Drugi najučestaliji haplotip jeste haplotip H_9 koji je zastupljen kod, takođe, četiri izolata (108-19, 109-19, 110-19 i 113-19) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (Veliko Vojlovce i Bošnjace), takođe, na jugu naše zemlje. Haplotipovi H_6 i H_7 zastupljeni su svaki pojedinačno u jednom od dva izolata (259-15, odnosno 260-15) poreklom iz biljaka duvana sakupljenih na dva lokaliteta (Hrtkovci i Golubinci) na severu Srbije, dok su haplotipovi H_10, H_17 i H_24 detektovani svaki pojedinačno u jednom od tri izolata (147-05, 303-05, odnosno 224-16) poreklom iz tri različite ukrasne biljke (*Amarilis* sp., *Gloxinia* sp. i *Cinia* sp.) sakupljene na lokalitetima Rača Kragujevačka u centralnom i Vranjska Banja u južnom delu naše zemlje. Haplotipovi H_11, H_12 i H_21 zabeleženi su svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (343-15, 525-11, odnosno 437-10) poreklom iz biljaka paprike sakupljenih na dva lokaliteta (Buđanovci i Kupusina) u severnom i na jednom lokalitetu (Rača Kragujevačka) u centralnom delu Srbije, dok je haplotip H_13 primećen kod dva izolata (512-11 i 335-16), od kojih jedan vodi poreklo iz paprike, a drugi iz paradajza sakupljenih u Kupusini na severu naše zemlje. Haplotipovi H_14, H_15, H_16, H_18 i H_19 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od pet različitih izolata (42-12, 192-17, 212-15, 232-17, odnosno 230-17) poreklom iz pet različitih ukrasnih biljaka (*Brugmansia* sp., *Impatiens hawkeri*, *Begonia* sp., *Osteospermum* sp. i *Pelargonium* sp.) sakupljenih u Rači Kragujevačkoj u centralnom i Mačkovcu u južnom delu Srbije, dok je haplotip H_20 zabeležen kod jednog izolata (345-15) poreklom iz paprike sakupljene u Leskovcu, takođe, u južnom delu naše zemlje.

Tabela 7. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence Gn-Gc gena

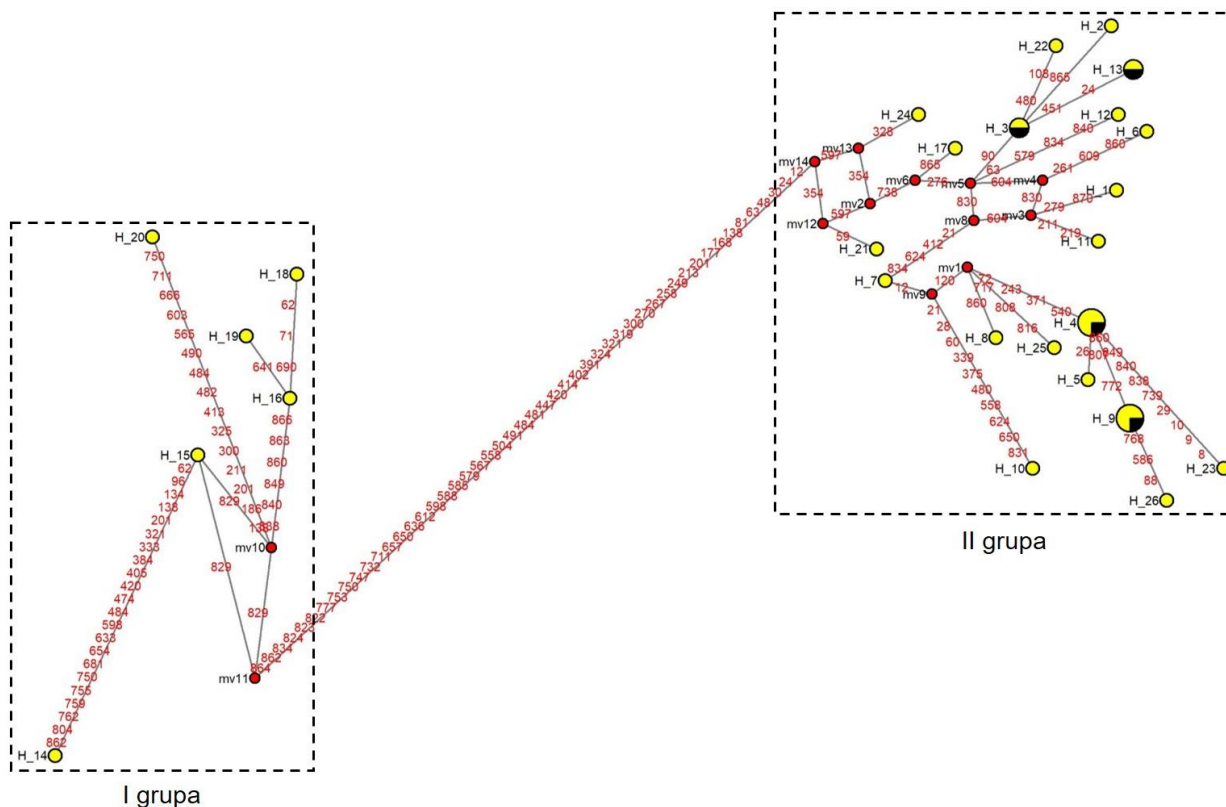
Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_1	45-12 ^b	2012	<i>Solanum</i>	Novi Kneževac	Severna Srbija
H_2	58-15	2015	<i>lycopersicum</i>	Mužlja	
H_3	71-15				
	156-07 ^a	2007	<i>Gerbera hybrida</i>	Vranjska Banja	Južna Srbija
H_4	169-13 ^a	2013	<i>Solanum</i>	Togočevce	
	170-14 ^a	2014	<i>lycopersicum</i>	Cekavica	
	177-14 ^a			Bogojevce	
	185-15	2015		Veliko Vojlovce	
H_5	179-15				
H_6	259-15		<i>Nicotiana tabacum</i>	Hrtkovci	Severna Srbija
H_7	260-15			Golubinci	
H_8	646-11 ^b	2011	<i>Solanum</i>	Navalin	Južna Srbija
H_9	108-19 ^c	2019	<i>lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	
	109-19 ^c				
	110-19 ^c				
	113-19 ^c			Bošnjace	
H_10	147-05 ^a	2005	<i>Amarilis</i> sp.	Vranjska Banja	
H_11	343-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Buđanovci	Severna Srbija
H_12	525-11 ^a	2011		Kupusina	
H_13	335-16	2016	<i>Solanum</i>		
			<i>lycopersicum</i>		
	512-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>		
H_14	42-12 ^a	2012	<i>Brugmansia</i> sp.	Mačkovac	Južna Srbija
H_15	192-17	2017	<i>Impatiens hawkeri</i>	Rača	Centralna Srbija
H_16	212-15	2015	<i>Begonia</i> sp.	Kragujevačka	Srbija
H_17	303-05 ^a	2005	<i>Gloxinia</i> sp.		
H_18	232-17	2017	<i>Osteospermum</i> sp.		
H_19	230-17		<i>Pelargonium</i> sp.		
H_20	345-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Leskovac	Južna Srbija
H_21	437-10 ^a	2010		Rača	Centralna Srbija
				Kragujevačka	Srbija
H_22	555-12 ^a	2012	<i>Solanum</i>	Subotica	Severna Srbija
H_23	181-15	2015	<i>lycopersicum</i>	Veliko Vojlovce	Južna Srbija
H_24	224-16	2016	<i>Cinia</i> sp.	Rača	Centralna Srbija
				Kragujevačka	Srbija
H_25	111-19 ^c	2019	<i>Solanum</i>	Bošnjace	Južna Srbija
H_26	112-19 ^c		<i>lycopersicum</i>		

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Mreža haplotipova rekonstruisana pomoću median-joining networks algoritma na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji pokazala je da se 26 haplotipova na osnovu delimične sekvence Gn-Gc gena grupišu u dve grupe (I i II) (Slika 37). Grupa I sa šest haplotipova (H_14, H_15, H_16, H_18, H_19 i H_20) obuhvata šest sekvenci koje se u filogenetskom stablu grupišu u klaster I, dok grupa II sa 20 haplotipa (H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_10, H_11, H_12, H_13, H_17, H_21, H_22, H_23, H_24, H_25 i H_26) obuhvata 28 sekvenci koje se grupišu u klaster II na osnovu filogenetske analize. Centralni ili predački haplotip nije otkriven ni za jednu grupu, već su haplotipovi TSWV pronađeni u Srbiji činili pericentralne haplotipove u obe grupe, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima. U grupi I haplotip H_16 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipovima H_18 i H_19, dok u grupi II haplotip H_3 predstavlja tranzicioni čvor za haplotipove H_2, H_13 i H_22, a haplotip H_4 za haplotipove H_5, H_9, H_23 i H_26.



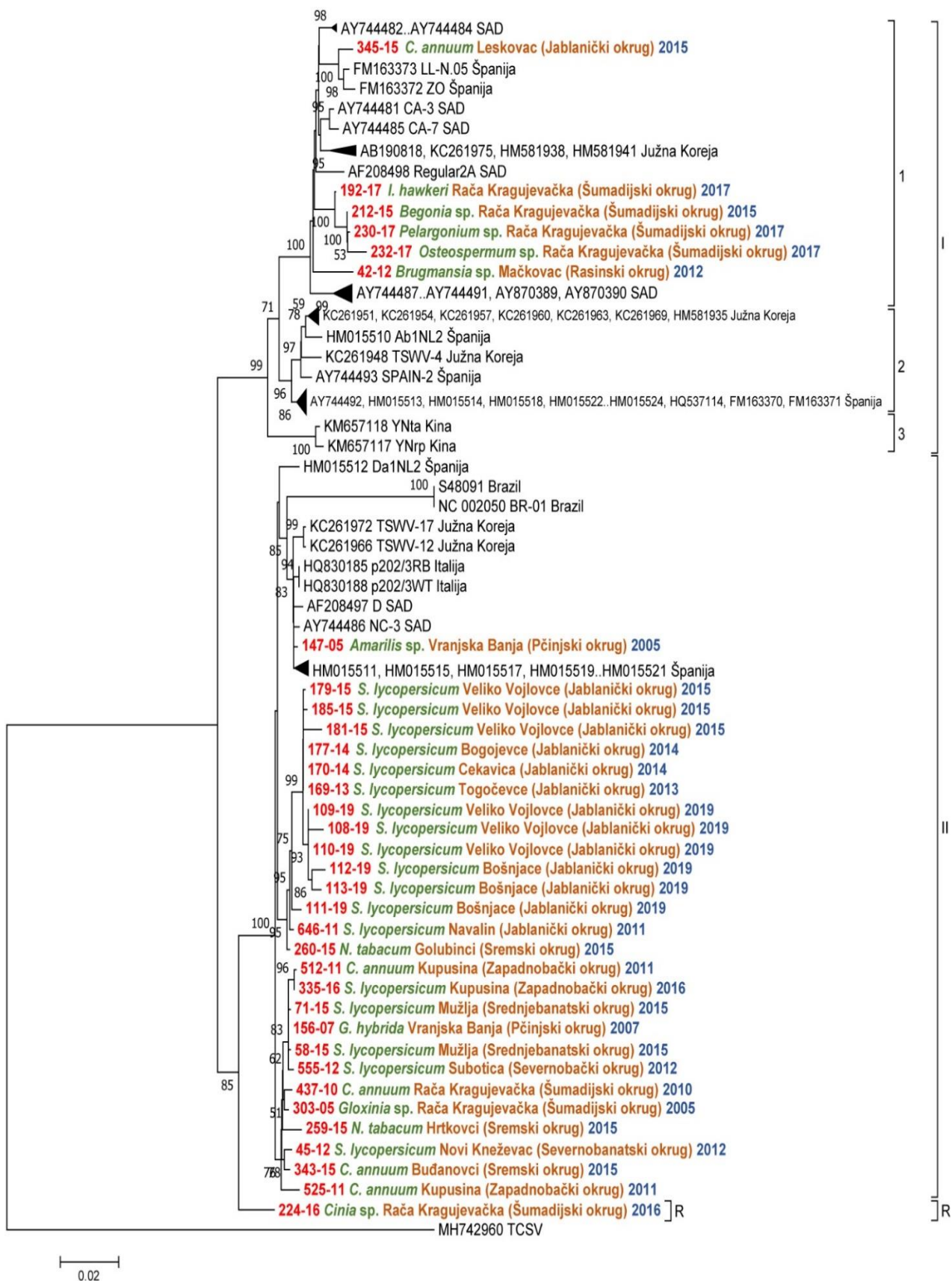
Slika 37. Mreža haplotipova rekonstruisana na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci Gn-Gc gena izolata virusa bronjavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije korišćenjem median-joining networks algoritma. Svaki kružić obojen žutom bojom predstavlja jedinstveni haplotip, pri čemu je njegov prečnik proporcionalan broju sekvenci sadržanom u haplotipu. Celi brojevi prikazani na linijama označavaju poziciju nukleotida u sekvenci koji se razlikuje između haplotipova, a puni kružići crvene boje predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani.

5.3.6. Filogenetska analiza na osnovu sekvenci M segmenta

Osim filogenetskih analiza na osnovu sekvenci NSm i Gn-Gc gena, obavljena je i filogenetska analiza rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu dela sekvenci M segmenta dužine 1591 nt dobijenih spajanjem delimičnih sekvenci NSm i Gn-Gc gena, prethodno skraćenih na dužinu najkraće sekvence za svaki gen posebno, uključujući sekvence 34 izolata TSWV poreklom iz Srbije (Tabela 2) i 56 sekvenci izolata TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 3) primenom neighbor-joining metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 38 prikazano je filogenetsko stablo koje je ukazalo na jasnu podjelu izolata TSWV u dva glavna klastera, klaster I i II, kao i kod stabala na osnovu sekvenci NSm i Gn-Gc gena, ali i izdvajanje klastera označenog sa R (rekombinantni klaster) koji sadrži samo jedan srpski izolat (224-16), koji se na osnovu NSm gena grupisao u podgrupu 1 u okviru klastera I (Slika 31), dok se na osnovu Gn-Gc gena svrstao u klaster II (Slika 34). Ovakva podjela podržana je visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera bio je $0,066 \pm 0,005$, dok je unutrašnji diverzitet za klaster I iznosio $0,027 \pm 0,002$, odnosno $0,019 \pm 0,002$ za klaster II. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,045 \pm 0,003$. U okviru klastera I mogu se izdvojiti tri podgrupe: podgrupa 1, 2 i 3. Genetički diverzitet između podgrupa kretao se od $0,035 \pm 0,004$ do $0,039 \pm 0,004$, a unutrašnji diverzitet za svaku podgrupu bio je: $0,021 \pm 0,002$ (podgrupa 1), $0,012 \pm 0,002$ (podgrupa 2) i $0,004 \pm 0,002$ (podgrupa 3). Podgrupu 1 čine izolati iz SAD (13 izolata), Španije (dva izolata), Južne Koreje (četiri izolata) i Srbije (šest izolata). Podgrupu 2 čine izolati iz Južne Koreje (osam izolata) i Španije (12 izolata), dok se u podgrupu 3 grupišu dva izolata iz Kine. Klaster II obuhvata izolate iz Španije (sedam izolata), Brazila (dva izolata), Južne Koreje (dva izolata), Italije (dva izolata), SAD (dva izolata) i Srbije (27 izolata). Većina srpskih izolata se grupisala u klaster II (147-05, 179-15, 185-15, 181-15, 177-14, 170-14, 169-13, 109-19, 108-19, 110-19, 112-19, 113-19, 111-19, 646-11, 260-15, 512-11, 335-16, 71-15, 156-07, 58-15, 555-12, 437-10, 303-05, 259-15, 45-12, 343-15 i 525-11), dok se preostalih šest izolata (345-15, 192-17, 212-15, 230-17, 232-17 i 42-12) grupisalo u klaster I. U poseban R klaster grupisao se rekombinantni izolat (224-16).

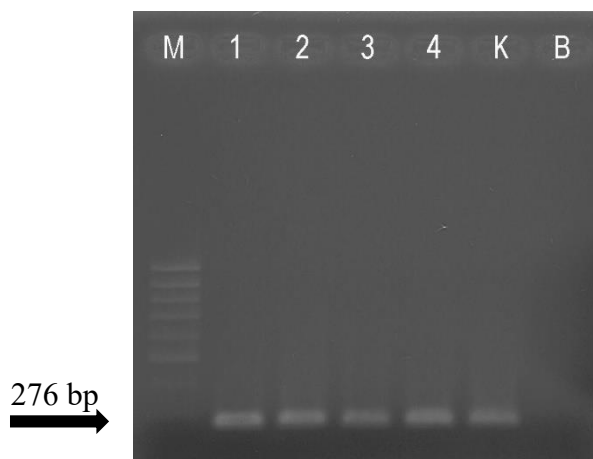
Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u klasteru II nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Svi srpski izolati poreklom iz paradajza (179-15, 185-15, 181-15, 177-14, 170-14, 169-13, 109-19, 108-19, 110-19, 112-19, 113-19, 111-19, 646-11, 335-16, 71-15, 58-15, 555-12 i 45-12) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz paprike (512-11, 437-10, 343-15 i 525-11), takođe se grupisala u klaster II, pri čemu se samo jedan izolat (345-15) odvojeno grupisao u okviru podgrupe 1 klastera I. Srpski izolati poreklom iz duvana (260-15 i 259-15) grupisali su se u klaster II. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (192-17, 212-15, 230-17, 232-17 i 42-12) grupisala se u okviru podgrupe 1 klastera I, dok se manji broj izolata (147-05, 156-07 i 303-05) grupisao u klaster II, a samo jedan izolat (224-16) grupisao se u poseban rekombinantni klaster R.



Slika 38. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci M segmenta dužine 1591 nt 90 izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem neighbor-joining metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Kao *outgroup* korišćena je sekvenca TCSV (Acc. No. MH742960). Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

5.3.7. Analiza sekvenci RdRp gena

Primenom prajmera L2 TSWV F/L1 TSWV R obavljena je uspešna amplifikacija dela RdRp gena dužine 276 bp kod sva 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije. Deo amplifikovanih fragmenata RdRp gena prikazan je na Slici 39.



Slika 39. Vizuelizacija amplikona RdRp gena dela odabranih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) u 1% agaroznom gelu dobijenih primenom „One-step“ RT-PCR i specifičnih prajmera L2 TSWV F/L1 TSWV R. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Low Range (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 1-izolat 212-15 iz *Begonia* sp.; 2-izolat 228-15 iz *Fuchsia* sp.; 3-izolat 220-16 iz *Dahlia* sp.; 4-izolat 224-16 iz *Cinia* sp.; K-pozitivna kontrola (izolat 53-05 iz *Nicotiana tabacum*); B-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase free vodom).

Nakon sekvenciranja amplikona umnoženih u RT-PCR reakciji, dobijene su delimične sekvence RdRp gena ispitivanih izolata. Rezultati BLAST analize pokazali su da odabrani izolati TSWV poreklom iz Srbije, identifikovani tokom ovih istraživanja, pokazuju najveću nt sličnost od 96,67% do 100% sa izolatima TSWV dostupnim u GenBank bazi podataka.

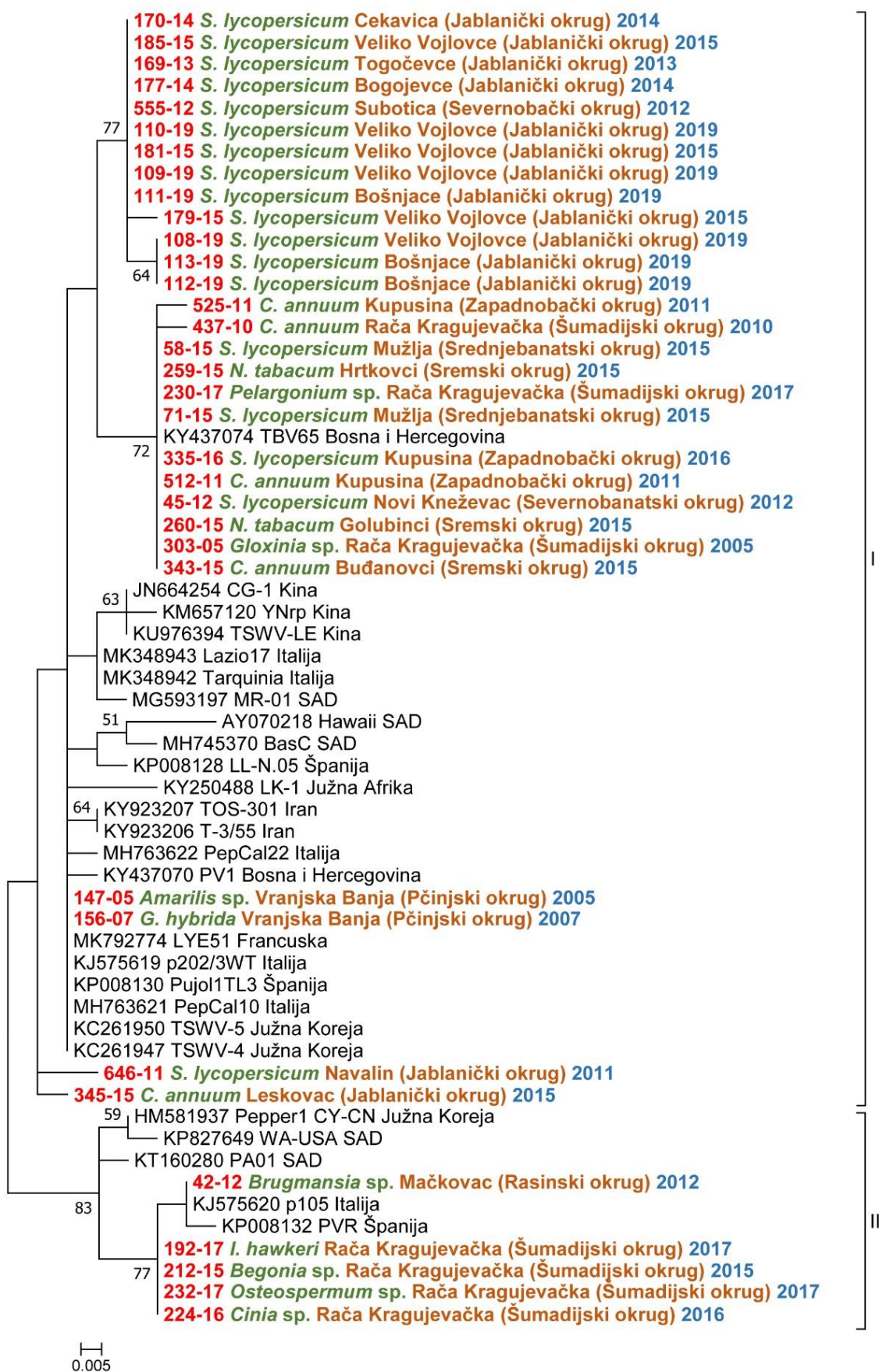
Dalja molekularna identifikacija dobijenih sekvenci dela RdRp gena 34 odabrana izolata TSWV obavljena je na osnovu međusobnog poređenja njihove nukleotidne i aminokiselinske sličnosti primenom p-distance parametra u okviru programa MEGA 6.0. Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence od 182 nt, dobijena nukleotidna (nt) sličnost iznosila je od 91,2% (16 nt razlike) do 100%, dok se aminokiselinska (aa) sličnost kretala od 77,1% (11 aa razlike) do 100% (PRILOG 10).

Molekularna karakterizacija obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu 60 sekvenci RdRp gena dužine 141 nt, uključujući 34 sekvence TSWV dobijene tokom ovog istraživanja (Tabela 2) i 26 sekvenci izolata TSWV preuzetih iz GenBank baze podataka (PRILOG 4) primenom maximum likelihood metode integrisane u okviru programa MEGA 6.0 na osnovu Tamura-3 parametar modela sa Gamma distribucijom (T92+G) i *bootstrap* analizom sa 1000 ponavljanja.

Na Slici 40 prikazano je filogenetsko stablo koje je ukazalo na jasnu podelu izolata TSWV u dva klastera: klaster I i II, gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci istog klastera i visokim *bootstrap* vrednostima. Genetički diverzitet između klastera bio je $0,061 \pm 0,017$, dok je unutrašnji diverzitet za klaster I iznosio $0,022 \pm 0,006$, odnosno $0,016 \pm 0,007$ za klaster II. Ukupan genetički diverzitet sekvenci u filogenetskom stablu iznosio je $0,033 \pm 0,008$. Klaster I čine izolati iz Bosne i Hercegovine (dva izolata), Kine (tri izolata), Italije (pet izolata), SAD (tri izolata), Španije (dva izolata), Južne Afrike (jedan izolat), Irana (dva izolata), Francuske (jedan izolat), Južne Koreje (dva izolata) i Srbije (29 izolata), dok se u klaster II grupišu izolati iz Južne Koreje (jedan izolat), SAD (dva izolata), Italije (jedan izolat), Španije (jedan izolat) i Srbije (pet

izolata). Većina srpskih izolata grupisala se u klaster I (170-14, 185-15, 169-13, 177-14, 555-12, 110-19, 181-15, 109-19, 111-19, 179-15, 108-19, 113-19, 112-19, 525-11, 437-10, 58-15, 259-15, 230-17, 71-15, 335-16, 512-11, 45-12, 260-15, 303-05, 343-15, 147-05, 156-07, 646-11 i 345-15), dok se preostalih pet izolata (42-12, 192-17, 212-15, 232-17 i 224-16) grupisalo u klaster II. Osim toga, filogenetske analize na osnovu RdRp gena ukazale su i na različito grupisanje dva izolata 345-15 poreklom iz paprike i 230-17 poreklom iz ukrasne biljke *Pelargonium* sp. u odnosu na filogenetske analize na osnovu sekvenci N, NSs, NSm i Gn-Gc gena, ukazujući da L segment ova dva izolata vodi različito poreklo u odnosu na S i M segment, što ih čini pseudorekombinantima.

Rezultati filogenetskih analiza pokazali su i da se u klasteru I nalaze izolati kako iz severnih, tako i iz centralnih i južnih krajeva naše zemlje. Svi srpski izolati poreklom iz paradajza (170-14, 185-15, 169-13, 177-14, 555-12, 110-19, 181-15, 109-19, 111-19, 179-15, 108-19, 113-19, 112-19, 58-15, 71-15, 335-16, 45-12 i 646-11), paprike (525-11, 437-10, 512-11, 343-15 i 345-15) i duvana (259-15 i 260-15) grupisali su se u klaster I. Većina srpskih izolata poreklom iz devet vrsta ukrasnih biljaka (42-12, 192-17, 212-15, 232-17 i 224-16) grupisala se u klaster II, dok su se preostala četiri izolata (230-17, 303-05, 147-05 i 156-07) grupisala u klaster I.



Slika 40. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RdRp gena dužine 182 nt 60 izolata virus bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenjem maximum likelihood metode sa *bootstrap* analizom u 1000 ponavljanja, gde su *bootstrap* vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati TSWV poreklom iz Srbije su obojeni.

Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci RdRp gena 34 odabrana izolata TSWV poreklom iz Srbije grupišu u 15 haplotipova (Tabela 8). Haplotip H_1 detektovan je kod jednog izolata (192-17) poreklom iz ukrasne biljke *Impatiens hawkeri* sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu Srbije, dok je haplotip H_2 zabeležen kod tri izolata (212-15, 224-16 i 232-17) poreklom iz tri različite ukrasne biljke (*Begonia* sp., *Cinia* sp. i *Osteospermum* sp.) sakupljene na istom lokalitetu. Haplotip H_3 zastupljen je kod jednog izolata (42-12) poreklom iz ukrasne biljke *Brugmansia* sp. sakupljene u Mačkovcu na jugu Srbije, dok su haplotipovi H_4, H_13 i H_14 zabeleženi svaki pojedinačno kod jednog od tri izolata (345-15, 525-11, odnosno 437-10) poreklom iz biljaka paprike sakupljenih na tri lokaliteta u severnom (Kupusina), centralnom (Rača Kragujevačka) i južnom (Leskovac) delu naše zemlje. Haplotipovi H_5, H_10, H_11 i H_12 detektovani su svaki pojedinačno kod jednog od pet izolata (646-11, 555-12, 111-19, 169-13, odnosno 179-15) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na jednom lokalitetu (Subotica) na severu i na tri lokaliteta (Navalin, VelikoVojlovce i Togočevce) na jugu Srbije, dok su haplotipovi H_6 i H_7 zabeleženi svaki pojedinačno kod jednog od dva izolata (156-07, odnosno 147-05) poreklom iz dve različite ukrasne biljke (*Gerbera hybrida* i *Amarilis* sp.) sakupljene u Vranjskoj Banji na jugu Srbije. Haplotip H_8 zabeležen je kod tri izolata (108-19, 112-19, 113-19) poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na dva lokaliteta (VelikoVojlovce i Bošnjace) na jugu Srbije, dok je haplotip H_9 zastupljen kod šest izolata (170-14, 177-14, 181-15, 185-15, 109-19 i 110-19), takođe, poreklom iz biljaka paradajza sakupljenih na tri lokaliteta (Cekavica, Bogojevce i Veliko Vojlovce) na jugu naše zemlje. Haplotip H_15 predstavlja najučestaliji haplotip i detektovan je kod H_10 izolata (303-05, 512-11, 45-12, 58-15, 71-15, 259-15, 260-15, 343-15, 335-16 i 230-17), od kojih kojih četiri izolata poreklom iz biljaka paradajza, dva izolata poreklom iz biljaka paprike i dva izolata poreklom iz biljaka duvana sakupljenih na severu Srbije na šest lokaliteta (Novi Kneževac, Mužlja, Kupusina, Buđanovci, Hrtkovci i Golubinci), kao i dva izolata poreklom iz dve ukrasne biljke *Gloxinia* sp. i *Pelargonium* sp. sakupljene u Rači Kragujevačkoj u centralnom delu naše zemlje.

Tabela 8. Pregled haplotipova detektovanih kod izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) korišćenih u ovim istraživanjima na osnovu delimične sekvence RdRp gena

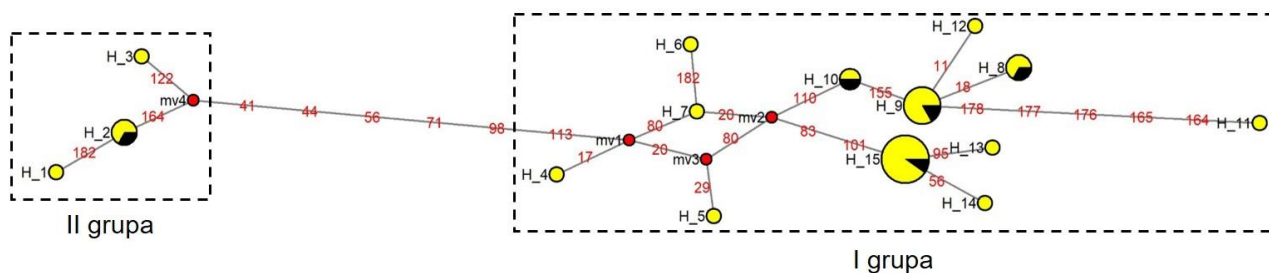
Haplotip	Izolat	Godina sakupljanja	Biljka domaćin	Lokalitet	Region
H_1	192-17	2017	<i>Impatiens hawkeri</i>	Rača	Centralna Srbija
H_2	212-15	2015	<i>Begonia</i> sp.	Kragujevačka	Srbija
	224-16	2016	<i>Cinia</i> sp.		
	232-17	2017	<i>Osteospermum</i> sp.		
H_3	42-12 ^a	2012	<i>Brugmansia</i> sp.	Mačkovac	Južna Srbija
H_4	345-15	2015	<i>Capsicum annuum</i>	Leskovac	
H_5	646-11 ^b	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	Navalin	
H_6	156-07 ^a	2007	<i>Gerbera hybrida</i>	Vranjska Banja	
H_7	147-05 ^a	2005	<i>Amarilis</i> sp.		
H_8	108-19 ^c	2019	<i>Solanum</i>	Veliko Vojlovce	
	112-19 ^c		<i>lycopersicum</i>	Bošnjace	
	113-19 ^c				
H_9	170-14 ^a	2014		Cekavica	
	177-14 ^a			Bogojevce	
	181-15	2015		Veliko Vojlovce	
	185-15				
	109-19 ^c	2019			
H_10	555-12 ^b	2012		Subotica	Severna Srbija
	111-19 ^c	2019		Bošnjace	Južna Srbija
H_11	169-13 ^a	2013		Togočevce	
H_12	179-15	2015		Veliko Vojlovce	
H_13	525-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
H_14	437-10 ^a	2010		Rača	Centralna Srbija
H_15	303-05 ^a	2005	<i>Gloxinia</i> sp.	Kragujevačka	Srbija
	512-11 ^a	2011	<i>Capsicum annuum</i>	Kupusina	Severna Srbija
	45-12 ^a	2012	<i>Solanum</i>	Novi Kneževac	
	58-15	2015	<i>lycopersicum</i>	Mužlja	
	71-15				
	259-15		<i>Nicotiana tabacum</i>	Hrtkovci	
	260-15			Golubinci	
	343-15		<i>Capsicum annuum</i>	Buđanovci	
	335-16	2016	<i>Solanum</i>	Kupusina	
			<i>lycopersicum</i>		
	230-17	2017	<i>Pelargonium</i> sp.	Rača	Centralna Srbija
			Kragujevačka		

Legenda: ^aIzolati TSWV iz kolekcije biljnih virusa Laboratorije za virusologiju i mikologiju (Katedra za fitopatologiju, Institut za fitomedicinu, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet);

^bIzolati TSWV prethodno okarakterisani na osnovu N gena (Nikolić, 2018);

^cIzolati TSWV dobijeni iz hibrida paradajza 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV.

Mreža haplotipova rekonstruisana pomoću median-joining networks algoritma na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji pokazala je da se 15 haplotipova na osnovu delimične sekvence RdRp gena grupišu u dve grupe (I i II) (Slika 41). Grupa I sa 12 haplotipova (H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_10, H_11, H_12, H_13, H_14 i H_15) obuhvata 29 sekvenci koje se u filogenetskom stablu grupišu u klaster I, dok grupa II sa tri haplotipa (H_1, H_2 i H_3) obuhvata pet sekvenci koje se grupišu u klaster II na osnovu filogenetske analize. Centralni ili predački haplotip nije otkriven ni za jednu grupu, već su haplotipovi TSWV pronađeni u Srbiji činili pericentralne haplotipove u obe grupe, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima. U grupi I haplotip H_10 predstavlja tranzicioni čvor ka haplotipu H_9 koji je izvorni za haplotipove H_8, H_11 i H_12. Haplotip H_15 je tranzicioni čvor ka haplotipovima H_13 i H_14.



Slika 41. Mreža haplotipova rekonstruisana na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci RdRp gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije korišćenjem median-joining networks algoritma. Svaki kružić obojen žutom bojom predstavlja jedinstveni haplotip, pri čemu je njegov prečnik proporcionalan broju sekvenci sadržanom u haplotipu. Celi brojevi prikazani na linijama označavaju poziciju nukleotida u sekvenci koji se razlikuje između haplotipova, a puni kružići crvene boje predstavljaju intermedijarne haplotipove ili haplotipove koji nisu detektovani.

5.4. Analiza rekombinacija

U cilju potvrde prisustva rekombinacija kod ispitivanih izolata TSWV poreklom iz Srbije, na čije postojanje su ukazale filogenetske analize, korišćen je RDP v.4.101 softver. Rezultati analize S i M segmenata dobijenih spajanjem sekvenci N i NSs, odnosno NSm i Gn-Gc gena ispitivanih izolata, primenom RDP v.4.101 softvera, ukazali su na postojanje rekombinacija samo u okviru M segmenta kod izolata 224-16 poreklom iz ukrasne biljke *Cinia* sp., dok rekombinacije na osnovu S segmenta nisu ustanovljene.

Analiza M segmenta pokazala je da je kod izolata 224-16 došlo do izmene fragmenta veličine 703 nt. Prisustvo rekombinacija osim osnovnog RDP programa sa P vrednošću od $1,779 \times 10^{-06}$, potvrdili su i sledeći programi: GENECONV ($P=1,870 \times 10^{-04}$), BOOTSCAN ($P=1,202 \times 10^{-04}$), MAXCHI ($P=8,818 \times 10^{-08}$), CHIMAERA ($P=3,470 \times 10^{-08}$), SISCAN ($P=1,730 \times 10^{-8}$) i 3SEQ ($P=2,319 \times 10^{-09}$). S obzirom da set sekvenci korišćen za ove analize ne sadrži kompletne sekvence M segmenta TSWV, program je ustanovio približnu početnu i krajnju tačku rekombinacije, pri čemu početna tačka odgovara poziciji 19, a krajnja tačka poziciji 722, što odgovara poziciji 119, odnosno 822 na sekvenci kompletnog M segmenta izolata LYE51 (Acc. No. MK792775). Na osnovu podataka o dužini izmenjenog fragmenta, zatim pozicije početne i krajnje tačke rekombinacije u ispitivanom setu sekvenci, kao i poređenja sa sekvencom čitavog M segmenta izolata LYE51, ustanovljeno je da je došlo do izmene u delu koji odgovara sekvenci NSm gena. Sa tačnošću od 99,1% utvrđeno je da je glavni roditelj rekombinantnog izolata 224-16 srpski izolat 525-11 koji vodi poreklo iz paprike i pripada klasteru II, dok je sa tačnošću od 98,6% ustanovljeno da je sporedni roditelj srpski izolat 232-17 koji vodi poreklo iz ukrasne biljke *Osteospermum* sp. i pripada klasteru I na osnovu filogenetske analize sekvenci M segmenta. Obzirom na to da je neophodno da četiri ili više programa uključenih u analizu detektuju postojanje rekombinacije sa P vrednošću koja je manja od $1,0 \times 10^{-2}$, ovim su

ispunjeni svi kriterijumi za definisanje izolata 224-16 kao rekombinantnog izolata koji se na osnovu NSm gena svrstava u klaster I (podgrupa 1), dok se na osnovu Gn-Gc gena grupiše u okviru klastera II. Analizom S segmenta primenom RDP v.4.101 softvera, prisustvo rekombinacija kod izolata 525-11 i 646-11 koji se u filogenetskim analizama na osnovu sekvence N gena grupišu u evropsku podgrupu 2, a na osnovu NSs gena u evropsku podgrupu 1 nije potvrđeno. Na prisustvo rekombinacija u S segmentu kod ovih izolata nije ukazao nijedan od programa integrisanih u RDP v.4.101 softver.

5.5. Uticaj selekcije na genske regione odabranih izolata TSWV

Na osnovu broja sinonimnih supstitucija po sinonimnom mestu (dS) i nesinonimnih supstitucija po nesinonimnom mestu (dN), kao i njihovih varijansi $\text{Var}(dS)$ i $\text{Var}(dN)$, primenom Z testa i testiranjem nulte hipoteze $H_0: dN=dS$ nasuprot alternativnoj hipotezi $H_a: dN<dS$, utvrđen je tip selekcije pod kojim se nalazi svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije. U Tabeli 9 prikazane su dobijene ukupne prosečne vrednosti Z parametra, kao i vrednosti p parametra za svaki genski region. Dobijene vrednosti pokazale su da je broj nesinonimnih supstitucija (dN) bio manji od broja sinonimnih (dS), odnosno da je Z vrednost za svaki genski region bila manja od 1 sa vrednošću p parametra većom od 0,05 i da je prisutan uticaj negativne (*purifying*) selekcije kod svih pet genskih regiona odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije. Kod NSm i Gn-Gc gena uočena je nešto niža Z vrednost, -8,235 za NSm, odnosno -7,695 za Gn-Gc gen, u odnosu na preostale genske regione (-0,329 za NSs gen, -1,286 za N gen i -2,503 za RdRp gen), što ukazuje da se NSm i Gn-Gc gen nalaze pod jačim selekcionim pritiskom.

Imajući u vidu da je na osnovu ukupnog seta sekvenci utvrđeno da je aminokiselinski sastav NSm proteina i Gn i Gc glikoproteina podložniji izmenama, kao i to da je u Srbiji utvrđeno prisustvo RB izolata TSWV kod kojih su ustanovljene aminokiselinske promene u okviru NSm proteina, pristupilo se daljem testiranju za svaki par sekvenci NSm i Gn-Gc gena na potencijalni uticaj pozitivne selekcije. Primenom Z testa izvršeno je testiranje nulte hipoteze $H_0: dN=dS$ nasuprot alternativnoj hipotezi $H_a: dN>dS$. Vrednosti $Z>1$ i $p<0,05$ koje ukazuju na uticaj pozitivne selekcije, utvrđene su samo kod pet testiranih parova sekvenci NSm gena (PRILOG 11), kao i kod četiri para sekvenci Gn-Gc gena izolata poreklom iz paradajza (PRILOG 12). Kod parova sekvenci NSm gena: 169-13 i 108-19, 170-14 i 108-19, 177-14 i 108-19, 179-15 i 108-19 i 181-15 i 108-19 Z vrednost iznosila je 1,740, a vrednost parametra p 0,042, dok je kod para sekvenci 181-15 i 108-19 Z vrednost iznosila 1,940, a vrednost parametra p 0,027. U slučaju Gn-Gc gena kod parova sekvenci 108-19 i 179-15, 109-19 i 179-15, 110-19 i 179-15, i 113-19 i 179-15 Z vrednost je iznosila 1,736, a vrednost parametra p 0,043. Kod drugih parova sekvenci gde je $Z>1$, vrednosti parametra p bile su manje od 0,05, što ukazuje da uslovi za odbacivanje postavljene nulte hipoteze $H_0: dN=dS$ u korist alternativne $H_a: dN>dS$ nisu ispunjeni i da kod ovih izolata nije utvrđen uticaj pozitivne selekcije.

Tabela 9. Ukupna prosečna Z i p vrednost za svaki od pet genskih regiona virusa bronzavosti paradajza (TSWV) dobijena na osnovu „codon-based“ Z-testa selekcije testiranjem nulte hipoteze $H_0: dN=dS$ nasuprot alternativnoj hipotezi $H_a: dN<dS$

Gen	Broj sekvenci	Z vrednost ¹	p vrednost ²
RdRp	34	-2,503	1,00
NSm	34	-8,235	1,00
G1-G2	34	-7,695	1,00
N	42	-1,286	1,00
NSs	34	-0,329	1,00

¹Vrednost Z testa manja od 1 ukazuje na negativnu selekciju, pri čemu niže vrednosti Z testa ukazuju na jači uticaj selekcije; ²p vrednost je statistički parametar i predstavlja nivo značajnosti Z testa. Ukoliko je $Z<1$ i $p>0,05$ smatra se da se radi o uticaju negativne selekcije.

5.6. Biološka karakterizacija odabranih srpskih RI i RB izolata TSWV poreklom iz paradajza

Biološka karakterizacija tri srpska izolata TSWV (108-19, 109-19 i 111-19) poreklom iz prirodno zaraženih biljaka paradajza hibrida ‘Wrestler F1’ sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV i dva izolata (45-12 i 170-14) dobijena iz prirodno zaraženih biljaka paradajza sorti Magnus i Buran koje ne sadrže *Sw-5b* gen obavljena je u cilju utvrđivanja njihovog fenotipa (RI ili RB) na osnovu ekspresije simptoma i njihove sposobnosti da zaraze osetljive i/ili otporne sorte paradajza i paprike (Tabela 10).

Sva tri izolata (108-19, 109-19 i 111-19), dobijena iz biljaka paradajza hibrida ‘Wrestler F1’ sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, izazvala su pojavu sistemичne zaraze na svim korišćenim komercijalnim hibridima paradajza. Simptomi u vidu hlorotičnih i/ili nekrotičnih prstenastih pega, šara i mozaika (Slike 42, 43 i 44), tipičnih za zarazu izazvanu TSWV, uočeni su 10-14 dana nakon obavljene inokulacije kako osetljivih tako i otpornih hibrida paradajza. Osim toga, na biljkama dva otporna hibrida paradajza, ‘Runner F1’ i ‘Attiya RZ F1’, nakon inokulacije izolatima 108-19 i 111-19 zabeležena je pojava sistemičnih simptoma nekoliko dana pre pojave lokalnih nekrotičnih pega na inokulisanim listovima koje nastaju kao posledica hipersenzitivne reakcije (HR) biljaka nosioca *Sw-5b* gena. Međutim, izolat 109-19 nije izazvao pojavu HR na ova dva hibrida, već samo pojavu sistemičnih simptoma. Inokulisane biljke različitih otpornih hibrida paradajza, kod kojih je došlo do pojave sistemičnih simptoma nakon inokulacije, vrlo brzo nakon pojave simptoma su potpuno propale. Nasuprot tome, izolati 45-12 i 170-14 dobijeni iz biljaka paradajza bez *Sw-5b* gena otpornosti, nisu izazvali pojavu sistemične zaraze na biljkama otpornih hibrida paradajza. Nakon mehaničkih inokulacija otpornih hibrida paradajza sa ova dva izolata došlo je samo do pojave lokalnih nekrotičnih pega (HR-hipersenzitivna reakcija) na inokulisanim listovima (Slika 45). Međutim, nakon inokulacije osetljivih hibrida paradajza (‘Partova F1’, ‘Novosadski jabučar’, ‘Volovsko srce’ i ‘Saint Pierre’), svih pet ispitivanih izolata izazvali su pojavu sistemičnih simptoma u vidu hlorotičnih prstenastih pega (Slike 46 i 47) i mozaika (Slike 48 i 49) 14-16 dana po inokulaciji. Broj zaraženih test biljaka paradajza dostigao je maksimum od 100% tri nedelje po inokulaciji. Dobijeni rezultati ukazuju da su izolati 108-19, 109-19 i 111-19 sposobni da prevaziđu otpornost komercijalnih hibrida paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti i potvrđuju da ova tri izolata karakteriše RB fenotip, dok izolati 45-12 i 170-14 nisu sposobni da prevaziđu otpornost hibrida paradajza nosioca *Sw-5b* gena i klasifikuju se kao RI fenotip.

Na inokulisanim biljkama dva osetljiva hibrida paprike (‘Margarita’ i ‘Kurtovska kapija’), svih pet ispitivanih izolata izazvali su pojavu sistemičnih simptoma u vidu hlorotičnih ili nekrotičnih prstenastih pega i mozaika (Slike 50 i 51) 12-15 dana nakon inokulacije, dok pojava HR na inokulisanom lišću nije zabeležena. S druge strane, na biljkama tri otporna hibrida paprike (‘SV1163PB’, ‘SV0102PP’ i ‘Ariadni F1’), nakon inokulacije ispitivanim izolatima nije došlo do

pojave sistemskih simptoma. Pojava lokalnih nekrotičnih pega, odnosno HR, zabeležena je samo kod otpornog hibrida 'SV1163PB', nakon inokulacije izolatima 108-19 i 111-19 (Slika 52). Broj zaraženih test biljaka paprike dostigao je maksimum od 90% četiri nedelje nakon inokulacije. Dobijeni rezultati ukazali su na to da izolati 108-19, 109-19 i 111-19 nisu sposobni da prevaziđu otpornost komercijalnih hibrida paprike sa ugrađenim *T_{sw}* genom otpornosti.

U svim test biljkama, koje su na inokulacije ispitivanim izolatima TSWV reagovala pojavom simptoma, primenom DAS-ELISA testa potvrđeno je prisustvo TSWV dok kod biljaka bez simptoma nije utvrđeno prisustvo ovog virusa.

Tabela 10. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije odabranim RI i RB izolatima virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz paradajza

Test biljka	Hibrid ^a	Izolat				
		108-19 RB	109-19 RB	111-19 RB	45-12 RI	170-14 RI
<i>Solanum lycopersicum</i>	Matissimo F1 (<i>Sw-5b</i> ⁺)	HPP ^b , NPP	M, NPP	HPP, NPP	LNP (HR)	LNP (HR)
	Wrestler F1 (<i>Sw-5b</i> ⁺)	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP	LNP (HR)	LNP (HR)
	Svth0121 (<i>Sw-5b</i> ⁺)	M	M	HPP, NPP	LNP (HR)	LNP (HR)
	Runner F1 (<i>Sw-5b</i> ⁺)	LNP (HR), M, NPP	NPP	LNP (HR), HPP, NPP	LNP (HR)	LNP (HR)
	Attiya RZ F1 (<i>Sw-5b</i> ⁺)	LNP (HR), HPP, NPP	HPP, NPP	LNP (HR), HPP, NPP	LNP (HR)	LNP (HR)
	Partova F1 (<i>Sw-5b</i> ⁻)	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP
	Novosadski jabučar (<i>Sw-5b</i> ⁻)	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	M, HPP	M, HPP
	Volovsko srce (<i>Sw-5b</i> ⁻)	M, HPP, NPP	M, HPP, NPP	HPP, NPP	M, HPP	M, HPP
	Saint Pierre (<i>Sw-5b</i> ⁻)	M, HPP	M	HPP, NPP	M, HPP	M, HPP
<i>Capsicum annuum</i>	SV1163PB (<i>Tsw</i> ⁺)	LNP (HR)	-	LNP (HR)	-	-
	SV0102PP (<i>Tsw</i> ⁺)	-	-	-	-	-
	Ariadni F1 (<i>Tsw</i> ⁺)	-	-	-	-	-
	Margarita (<i>Tsw</i> ⁻)	M, HPP	M, HPP	M, HPP	M, HPP	M, HPP, NPP
	Kurtovska kapija (<i>Tsw</i> ⁻)	M, HPP	M, HPP	M, HPP	M, HPP	M, HPP, NPP

Legenda: ^a(*Sw-5b*⁻) označava hibride paradajza osetljive na TSWV; (*Sw-5b*⁺) označava otporne hibride paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti na TSWV; (*Tsw*⁻) označava hibride paprike osetljive na TSWV; (*Tsw*⁺) označava otporne hibride paprike sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti na TSWV;

^bHPP: hlorotične prstenaste pege; NPP: nekrotične prstenaste pege; LNP (HR): lokalne nekrotične pege (hipersenzitivna reakcija); M: mozaik; -: bez simptoma.



Slika 42. Izolat 108-19 (RB): Hlorotične prstenaste pege na inokulisanom lišću otpornog hibrida paradajza ‘Matissimo F1’



Slika 43. Izolat 109-19 (RB): Nekrotične prstenaste pege na inokulisanom lišću otpornog hibrida paradajza ‘Wrestler F1’



Slika 44. Izolat 111-19 (RB): Nekrotične prstenaste pege i šare na inokulisanom lišću otpornog hibrida paradajza ‘Runner F1’



Slika 45. Izolat 45-12 (RI): Lokalne nekrotične pege (HR) na inokulisanom lišću otpornog hibrida paradajza ‘Wrestler F1’



Slika 46. Izolat 111-19 (RB): Hlorotične prstenaste pege na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paradajza ‘Partova F1’



Slika 47. Izolat 108-19 (RB): Hlorotične prstenaste pege na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paradajza ‘Volovsko srce’



Slika 48. Izolat 170-14 (RI): Mozaik na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paradajza ‘Novosadski jabučar’



Slika 49. Izolat 45-12 (RI): Mozaik na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paprike ‘Saint Pierre’



Slika 50. Izolat 109-19 (RB): Hlorotične prstenaste pege na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paprike ‘Margarita’



Slika 51. Izolat 170-14 (RI): Nekrotične prstenaste pege na inokulisanom lišću osetljivog hibrida paprike ‘Kurtovska kapija’



Slika 52. Izolat 111-19 (RB): Lokalne nekrotične pege (HR) na inokulisanom lišću otpornog hibrida paprike ‘SV1163PB’

6. DISKUSIJA

Virus bronazavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV), tipični predstavnik roda *Orthotospovirus*, familije *Tospoviridae*, jedan je od najštetnijih biljnih virusa prisutan u svim delovima sveta (Scholthof et al., 2011). Krug domaćina TSWV obuhvata više od 1300 biljnih vrsta uključujući i mnoge ekonomski važne useve kao što su paradajz, paprika, zelena salata, pasulj, duvan, krompir i brojne vrste ukrasnih biljaka (Pappu et al., 2009; EFSA, 2012). TSWV se uglavnom prenosi sa nekoliko vrsta tripsa iz rodova *Frankliniella* i *Thrips* na cirkulativan i propagativan način, a kao glavni vektor navodi se zapadni cvetni trips, *F. occidentalis* (Jones, 2005; Whitfield et al., 2005).

Zbog brzog razvoja rezistentnosti tripsa na insekticide (Boiteux and Giordano, 1993; Hanssen et al., 2010), jedan od najefikasnijih načina za kontrolu oboljenja koje ovaj virus izaziva uključuje razvoj i upotrebu otpornih sorti. Međutim, kontinuirano korišćenje ovih otpornih sorti paradajza i paprike dovelo je do pojave izolata koji prevazilaze otpornost (RB izolati) (Thompson and vanZijl, 1996; Latham and Jones, 1998; Canady et al., 2001; Aramburu and Martí, 2003; Ciuffo et al., 2005; Gordillo et al., 2008; Zaccardelli et al., 2008; Batuman et al., 2017).

Osim toga, velika varijabilnost unutar same vrste odlika je svih RNK virusa uključujući i TSWV, što za posledicu ima nastajanje novih varijanti koje odlikuje brza adaptibilnost na nove ili rezistentne domaćine. Upravo postojanje trodelnog genoma omogućava pojavu novih varijanti TSWV ne samo putem mutacija, već i putem drugih mehanizama izmene genetičkog materijala, rekombinacija i pseudorekombinacija.

Imajući sve navedeno u vidu, kontinuirano praćenje prisustva i zastupljenosti ovog virusa, kao i poznavanje sastava i strukture njegove populacije omogućilo bi razvoj i primenu efikasnijih i dugotrajnijih strategija kontrole oboljenja koja ovaj virus izaziva u našoj zemlji.

6.1. Simptomi TSWV na prirodno zaraženim biljkama

Simptomi koje izaziva TSWV na nekoj biljnoj vrsti mogu varirati u zavisnosti od sorte i starosti biljke, soja ovog virusa, vremena infekcije i uslova spoljašnje sredine, a naročito temperature koja veoma značajno utiče na jačinu ispoljavanja simptoma (Allen et al., 1991). Iako je verovatno da nijedan drugi biljni patogen ne izaziva toliko raznolike simptome kao TSWV, neke biljke ili pojedine sorte biljaka u usevu mogu biti zaražene i bez ispoljavanja simptoma (Kucharek et al., 2000). Osim toga, za TSWV je dokazano da može biti neravnomerno raspoređen u zaraženoj biljci ili je njegovo prisustvo ograničeno na samo neke biljne delove što takođe utiče na ispoljavanje simptoma (Peters and Goldbach, 1995; Dekić i sar., 2008c).

Biljke paradajza osetljivih hibrida iz kojih potiču odabrani izolati, zaražene u ranijim fazama razvića, ispoljavale su veoma izražene simptome u vidu mozaičnog šarenila, skoro potpune nekroze i tipične bronazavosti lišća, koji su doprineli bržem propadanju biljaka. Mladi plodovi takvih biljaka većinom su podlegli skoro potpunoj nekrozi ili blažim nekrotičnim prstenastim zonama, koje su dovodile do njihovih deformacija i nepravilnog porasta, kao i nemogućnosti sazrevanja usled propadanja biljaka. Na starijim biljkama osim ovih simptoma, uočena je pojava nekroze na lisnim peteljka i stablu, dok je na plodovima bilo zastupljeno šarenilo usled neravnomernog sazrevanja, što im je značajno smanjivalo tržišnu vrednost. Ovakva zapažanja zabeležena su i od strane drugih autora (Cho et al., 2005; Zindović, 2010; Sevik et al., 2012; Nikolić, 2018; Rodríguez-Román et al., 2018). Učestalo prisustvo TSWV poslednjih godina konstatovano je u mnogim oblastima gajenja paradajza u Srbiji (Nikolić i sar., 2013; Nikolić et al., 2018).

Osim toga, u proleće 2019. godine na dva lokaliteta u Jablaničkom okrugu, po prvi put uočeni su simptomi koji upućuju na infekciju ovim virusom na biljkama otpornog hibrida paradajza. Uočeni

su veoma izraženi simptomi koji su doveli do značajnih gubitaka u prinosu. Osim tipičnih simptoma koji se dovode u vezu sa zarazom izazvanom ovim virusom, zabeležena je pojava izražene nekroze na različitim delovima biljke, koja je praćena propadanjem biljaka. Ovakvi simptomi zabeleženi su na komercijalnim hibridima paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom i u Italiji (Ciuffo et al., 2005) i Kaliforniji (Batuman et al., 2017).

Biljke paprike zaražene TSWV koje su odabrane za dalje analize ispoljavale su simptome u vidu izraženog mozaika, hlorotičnog šarenila praćenog hlorotičnim prstenastim pegama uz uvijanje i naboranost listova, kod kojih je došlo do zadržavanja nerava. Ovakve ili slične simptome opisali su i brojni drugi autori kako na prirodno, tako i na veštački zaraženim biljkama paprike (Marchoux et al., 1991; Soler et al., 1999; Chatzivassiliou et al., 2000b; Thomas-Carroll and Jones, 2003; Coutts et al., 2004; Cho et al., 2005). Krstić i sar. (2008), kao najčešće simptome prouzorkovane infekcijom TSWV navode žutilo lišća i čitavih biljaka, zatim mozaik praćen koncentričnim prstenastim pegama ili hlorotičnim linijskim šarama na starijem lišću, kao i pojavu bronzavosti lišća. Na pojavu simptoma tipa mozaične i nekrotične prstenaste pegavosti na biljkama paprike ukazao je i Rusevski (2001). Osim toga, intenzivni simptomi zaraze ovim virusom u vidu prstenastih hlorotičnih i nekrotičnih pega, skupljanja nerava, izraženog mozaika, žutila i deformacija listova, kao i hlorotičnih i nekrotičnih prstenastih pega i deformacije plodova, ustanovljeni su i na području Crne Gore (Zindović, 2010). Takođe, zaostajanje u porastu i smeđa prugasta nekroza terminalnih delova stabla paprike opisana je i u Bosni i Hercegovini (Delić et al., 2018).

Biljke duvana koje su odabrane za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, uglavnom su ispoljavale simptome na lišću u vidu nekrotičnih pega i šara na nervima ili između njih, koncentričnih hlorotičnih ili nekrotičnih pega, hrastolikog mozaika i sivobeličastih nekroza okruženim nekrotičnim crticama. Kod zaraženih biljaka zabeleženo je i pucanje lisnog tkiva usled neravnomernog porasta lista, a većina njih bila je značajno umanjeno porasta. Ovakve simptome na biljkama duvana zabeležili su i drugi autori (Đekić, 2009; Zindović, 2010; Delić et al., 2018). Kao tipičan simptom koji TSWV prouzrokuje na biljkama duvana, navodi se zastoj u porastu srednjeg lisnog nerva oko kojeg tkivo nastavlja da se razvija. Usled toga, starije lišće biva naborano, savijeno prema naličju i prošarano linijskim i koncentričnim prstenastim šarama, a često i beličastim nekrotičnim pegama. Nakon sušenja, zaražene liske pocrne i time gube svoje upotrebnu vrednost. Osim na lišću, simptomi se mogu javiti i na stablu, peteljka lista, cvetu i na čaurama u vidu nekrotičnih pega. Nije retka ni pojava nekroze vršnog meristema i skraćivanje internodija, koje dovode do kržljivosti biljaka usled zaostajanja u porastu (Gooding, 1991; Anonymous, 2002; Dukić i sar., 2006; Krstić i Bulajić, 2007).

Biljke 13 ukrasnih vrsta odabranih za dalja istraživanja, uključujući *Amarilis* sp., *Gloxinia* sp., *Gerbera hybrida*, *Vinca* sp., *Chrysanthemum* sp., *Brugmansia* sp., *Fuchsia* sp., *Cinia* sp., *Impatiens hawkeri*, *Pelargonium* sp., *Dahlia* sp., *Begonia* sp. i *Osteospermum* sp. ispoljili su raznolike simptome. Simptomi su varirali od blago izraženog mozaika do veoma izraženog hlorotičnog i mozaičnog šarenila praćenog različitim deformacijama lišća i nekrozom. Takođe, uočena je i pojava hlorotičnih i nekrotičnih koncentričnih pega i šara, što je u skladu sa literaturnim navodima drugih autora (Chatzivassiliou et al., 2000b; Chung et al., 2006; Zindović, 2010; Marys et al., 2014; Uzunoğullari et al., 2016; Sivaprasad et al., 2018). Biljke *Gerbera hybrida* ispoljavale su simptome u vidu hlorotičnih prstenastih pega, hrastolikih šara praćenih nekrozom i deformacijom lišća, dok je na biljkama *Chrysanthemum* sp. i *Pelargonium* sp. uočena pojava hlorotičnih prstenastih pega i šara. Na lišću biljaka *Cinia* sp. i *Osteospermum* sp. zabeleženi su simptomi u vidu hlorotičnih koncentričnih zona praćenih mozaikom, dok je na lišću biljaka *Gloxinia* sp. i *Impatiens hawkeri* osim hlorotičnih došlo i do pojave nekrotičnih prstenastih pega. Osim simptoma u vidu hlorotičnih koncentričnih pega na lišću, biljke *Dahlia* sp. ispoljile su simptome na granama i stablu koji su bili prekriveni nekrotičnim zonama. Na biljkama *Begonia* sp. i *Fuchsia* sp., takođe su primećeni simptomi i na drugim delovima biljke, koji su osim nekrotičnih pega na lišću, obuhvatili i pojavu nekroze na cvetovima.

Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da tip simptoma na zaraženim biljkama nije povezan sa genotipom određenog ispitivanog izolata imajući u vidu da se izolati poreklom iz biljaka sa istim simptomima grupišu u različite filogenetske grupe (npr. izolati 45-12 i 646-11 poreklom iz biljaka paradajza sa simptomima bronzavosti se grupišu u dve podgrupe evropskog klastera ili izolat 303-05 poreklom iz *Gloxinia* sp. i 192-17 poreklom iz *Impatiens hawkeri* sa simptomima hlorotičnih i nekrotičnih prstenastih pega na lišću u evropsku podgrupu 1 odnosno severnoameričku podgrupu 4). Osim toga, iako nije došlo do jasnog razdvajanja srpskih izolata TSWV na osnovu biljke domaćina iz koje potiču, uočeno je da se većina izolata iz različitih ukrasnih biljaka svrstala u grupu severnoameričkih izolata, sa izuzetkom četiri izolata, koji su se zajedno sa izolatima iz paradajza, paprike i duvana grupisali u okviru evropske grupe. Na osnovu toga, možemo pretpostaviti da je usled više nezavisnih introdukcija ovog virusa u našu zemlju došlo do ovakvog grupisanja sprskih izolata, čija se evolucija paralelno odvijala i uticala na dalji razvoj lokalne populacije TSWV u našoj zemlji. I brojni drugi autori (**Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Debreczeni et al., 2015**) navode da je genotip izolata i njihovo grupisanje u filogenetskim stablima nezavisno kako od godine i lokaliteta na kom su sakupljeni, tako i biljke domaćina iz koje potiču.

6.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata TSWV

Dosadašnja istraživanja populacije TSWV sprovedena u našoj zemlji zasnovana su na delimičnoj molekularnoj karakterizaciji sekvenci N gena izolata ovog virusa koji vode poreklo iz duvana (**Stanković et al., 2011a**), tikava (**Vučurović et al., 2012**), paprike (**Milošević, 2013**) i paradajza (**Nikolić, 2018**). Kako je cilj ove doktorske disertacije sagledavanje genetičke strukture populacije TSWV u Srbiji, kroz proučavanje varijabilnosti izolata ovog virusa poreklom iz naše zemlje poređenjem međusobnog diverziteta i diverziteta u odnosu na izolate ovog virusa iz drugih delova sveta, neophodno je bilo usmeriti istraživanja ka molekularnoj identifikaciji i karakterizaciji sekvenci sva tri genomna segmenta (S, M i L RNK), odnosno svih pet gena ovog virusa (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) što većeg broja izolata sakupljenih u različitom vremenskom periodu iz različitih biljaka domaćina i sa što većeg broja lokaliteta.

Proračun stepena diverziteta sekvenci svih pet genskih regiona, pokazao je kako visoku međusobnu sličnost odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije tako i sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, bez obzira na poreklo, biljku domaćina ili godinu sakupljanja. Najmanji stepen diverziteta odabranih izolata zabeležen je kod sekvenci N gena (96,4-100%), što potvrđuje ranije utvrđenu činjenicu da je N gen visoko konzervativan genski region (**Heinze et al. 2001**). Visok stepen nukleotidne sličnosti sekvenci svih pet gena utvrđen je i u Džordžiji (**Sundaraj et al., 2014; Lai et al., 2021**), zatim N, NSm i RdRp gena izolata poreklom iz Karoline i Virdžinije (**Kaye et al., 2011**), kao i čitavog S, M i L segmenta izolata iz drugih delova sveta (**Zhang et al., 2016; Fontana et al., 2020**). Osim toga, **Tsompana et al. (2005)** su, takođe, ustanovili izrazito nizak diverzitet nukleotidnih sekvenci različitih genskih regiona kod izolata ovog virusa poreklom iz geografski udaljenih regiona. Takođe, **Lai et al. (2021)** navode da je visok stepen diverziteta haplotipova i nizak stepen nukleotidnog diverziteta odlika populacije virusa koji se nalazi u ekspanziji, kao što je TSWV.

Kako je tokom ovih istraživanja prvi put utvrđeno prisustvo TSWV kod paradajza hibrida 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, pristupilo se detaljnijoj analizi aminokiselinske sekvence NSm proteina srpskih izolata TSWV poreklom iz paradajza. Poređenjem aminokiselinske sekvence NSm proteina srpskih izolata sa ranije okarakterisanim RI i RB izolatima TSWV poreklom iz Španije (**Aramburu et al., 2010; López et al., 2011**), prisustvo supstitucije C118Y ili T120N utvrđeno je samo kod šest izolata (108-19, 109-19, 110-19, 111-19, 112-19 i 113-19) dobijenih iz otpornog hibrida paradajza 'Wrestler F1'. Imajući u vidu da su ove dve mutacije u aminokiselinskoj sekvenci NSm proteina odgovorne za prevazilaženje otpornosti komercijalnih sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom (**López et al., 2011; Peiró et al., 2014**), ovih šest srpskih izolata mogu se

klasifikovati kao RB izolati. Kod svih šest srpskih RB izolata na poziciji 130 utvrđeno je prisustvo aminokiseline izoleucin (130I), koja je neophodna za pojavu RB izolata (Peiró et al., 2014). Prisustvo aminokiselinских supstitucija na odgovarajućim pozicijama nije ustanovljeno kod preostalih 12 srpskih izolata TSWV, što ukazuje na nedostatak sposobnosti ovih izolata da zaraze otporne hibride paradajza i možemo ih okarakterisati kao RI izolate. Osim toga, prisustvo različitih mutacija u NSm proteinu kod srpskih RB izolata ukazuje da su ovi izolati nezavisno podlegli uticaju selekcije, kao što je zabeleženo i u istraživanjima drugih autora (López et al., 2011; Jiang et al., 2017). Takođe, delimične sekvence NSm gena srpskih izolata poreklom iz paradajza pokazale su visok stepen nukleotidne sličnosti, bez obzira na njihov fenotip (RB ili RI), godinu sakupljanja i geografsko poreklo. Štaviše, neki RI izolati pokazuju niži stepen homologije međusobno nego neki RB i RI izolati, što ukazuje da genetički diverzitet izolata TSWV nije u korelaciji sa njihovim fenotipom. Na isti zaključak ukazuju i istraživanja drugih autora (Margaria et al., 2007; López et al., 2011; Debreczeni et al., 2015), što de Ronde et al. (2014) objašnjavaju činjenicom da samo nekoliko nukleotidnih promena učestvuju u adaptaciji TSWV na otporne hibride paradajza. Međutim, kod RB izolata TSWV poreklom iz otpornih hibrida paprike sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti utvrđen je kako različiti broj tako i pozicije nukleotidnih promena, odnosno mutacija u NSs genu, koje nastaju kao posledica višestrukih nezavisnih evolutivnih događaja i učestvuju u adaptaciji ovog virusa na otporne hibride paprike (Tentchev et al., 2011; Almási et al., 2015; Jiang et al., 2017; de Ronde et al., 2019).

Filogenetske analize na osnovu delimičnih sekvenci N gena, uprkos visokom stepenu nukleotidne sličnosti sekvenci srpskih izolata TSWV, ukazale su na heterogenost populacije ovog virusa u našoj zemlji. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazalo je na grupisanje izolata u jasno definisane klasterne na osnovu njihovog geografskog porekla uz izvesna odstupanja, kao posledice intenzivne međunarodne razmene biljnog materijala, što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Pappu et al., 1998; Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013). Većina srpskih izolata grupisala se u dve geografske subpopulacije u okviru evropskog klastera bez obzira na region iz koga potiču, biljku domaćina ili godinu sakupljanja. Najveći broj izolata grupisao se u podgrupu 1 evropskih izolata, kao što su pokazala i ranija istraživanja sprovedena u našoj zemlji. Svi ranije okarakterisani izolati iz duvana (Đekić, 2009; Stanković et al., 2011a), paprike (Milošević, 2013) i tikava (Vučurović et al., 2012), takođe se grupišu u podgrupu 1 evropskih izolata. Međutim, istraživanja Nikolić (2018) ukazuju da se deo izolata iz paradajza grupišu i u blisku, ali odvojenu subpopulaciju u okviru klastera evropskih izolata što je potvrđeno i tokom ovih istraživanja. U okviru podgrupe 2 evropskih izolata grupisalo se ukupno 10 izolata i to ne samo poreklom iz paradajza, već i iz drugih biljaka domaćina, uključujući papriku i dve vrste ukrasnih biljaka sakupljenih tokom različitih godina. Druga grupa od devet izolata poreklom iz Srbije svrstala se u klaster severnoameričkih izolata, i to jedan izolat u podgrupu 3 zajedno sa izolatima iz Španije i osam u podgrupu 4 sa izolatima iz Italije, što predstavlja prvi nalaz izolata severnoameričkog porekla u Srbiji. Ovakvo grupisanje srpskih izolata u četiri subpopulacije dve geografski različite grupe, posledica je verovatno više nezavisnih introdukcija ovog virusa u našu zemlju i paralelne evolucije geografski različitih varijanti zastupljenih u prirodnoj populaciji TSWV u našoj zemlji. Istraživanja koja su sprovedeli Tentchev et al. (2011), ukazala su na grupisanje nekih izolata iz Španije i Italije u severnoameričke, odnosno francuskih izolata u azijski klaster što objašnjavaju posledicom najmanje tri nezavisne introdukcije TSWV u Evropu, što je bilo u skladu sa rezultatima pionirske studije (Tsompana et al., 2005). Na ovaj način može se objasniti i izdvajanje samo jednog srpskog izolata 345-15 poreklom iz paprike, koji je pokazao veću bliskost sa grupom španskih izolata ovog virusa. Uticaj intenzivne razmene biljnog materijala na sastav prirodne populacije ovog virusa kroz unošenje geografski različitih izolata utvrđen je i u istraživanjima drugih autora (Lian et al., 2013; Abadkhah et al., 2018; Ferrand et al., 2019).

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu delimičnih sekvenci NSs gena ukazalo je na postojanje diverziteta u okviru populacije TSWV u Srbiji. Filogenetsko stablo ukazuje na grupisanje izolata u dva klastera (I i II) u okviru kojih se može izdvojiti nekoliko grupa izolata na osnovu

geografskog porekla, što je saglasno sa ispitivanjima drugih autora (**Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Almási et al., 2015**). Većina ispitivanih izolata TSWV poreklom iz Srbije grupisala se identično kao i u stablu na osnovu sekvence N gena, ukazujući na više nezavisnih introdukcija TSWV u našu zemlju. Međutim, izolati 525-11 poreklom iz paprike i 646-11 poreklom iz paradajza grupisali su se u evropsku podgrupu 1 u odnosu na filogenetske analize na osnovu N gena gde su se grupisali u evropsku podgrupu 2, ukazujući na moguće postojanje rekombinacije u okviru S segmenta. Iako su istraživanja koja su sprovedi **Lian et al. (2013)** ukazala na nižu stopu pojave rekombinacija u odnosu na stopu pseudorekombinacija kod izolata TSWV, **Zhang et al. (2016)** su analizirajući kompletne sekvence izolata TSWV poreklom iz Kine, ali i iz drugih delova sveta, osim pseudorekombinacija, detektovali i 88 mesta rekombinacije kod 27 sekvenci L segmenta, 143 mesta rekombinacije kod 56 sekvenci M segmenta i čak 174 mesta rekombinacije kod 61 sekvence S segmenta. Takođe, rekombinantni izolati u S segmentu otkriveni su i u Južnoj Koreji (**Lian et al., 2013**) i Italiji (**Margaria et al., 2015; Fontana et al., 2020**).

U cilju potvrde rezultata dobijenih filogenetskim analizama na osnovu delimičnih sekvenci N i NSs gena, rekonstruisano je i filogenetsko stablo na osnovu delimičnih sekvenci S segmenta dobijenih spajanjem sekvenci N i NSs gena. Filogenetsko stablo na osnovu S segmenta, takođe je pokazalo jasno izdvajanje izolata u četiri klastera na osnovu njihovog geografskog porekla. Kod većine srpskih izolata TSWV nije bilo razlike u grupisanju u odnosu na filogenetske analize zasnovane na sekvenci N i NSs gena. Jedini izuzetak predstavljaju izolati 525-11 i 646-11 koji se na osnovu delimične sekvence S segmenta grupišu na zasebnoj grani u okviru evropske podgrupe 1. Kako RDP v.4.101 softver nije potvrdio prisustvo rekombinacija kod ova dva izolata, neophodno je sekvencirati ceo S segment i utvrditi tačan način genetičke izmene kod ovih izolata imajući u vidu da je kod RNK virusa sa višedelnim genomom više zastupljeno rearanžiranje genomnih segmenata nego rekombinacije (**White et al., 1995**). Mada, značajnu ulogu u oblikovanju populacije TSWV mogu imati i rekombinacije (**Chare and Holmes, 2006; Kaye et al., 2011; Lian et al., 2013**).

Filogenetske analize na osnovu delimičnih sekvenci NSm gena ukazale su na podelu izolata u dva osnovna klastera kao što su naveli i drugi autori (**Tsompana et al., 2005; López et al., 2011; Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013**). Uprkos visokom stepenu nukleotidne sličnosti sekvenci izolata TSWV, filogenetske analize ukazale su na podelu srpskih izolata u dve grupe. Većina srpskih izolata grupisala se u klaster II. Preostalih sedam izolata grupisalo se u klaster I, ukazujući na postojanje različitih genetskih varijanti iz kojih je došlo do daljeg razvoja lokalne populacije ovog virusa u našoj zemlji. Osim toga, filogenetske analize na osnovu NSm gena pokazale su da su RB izolati različitog geografskog porekla prisutni u oba klastera, što ukazuje na to da ovi izolati vode poreklo iz različitih ancesorskih populacija (**Ferrand et al., 2019**) kod kojih je došlo do nezavisne pojave sposobnosti prevazilaženja *Sw-5b* gena otpornosti (**López et al., 2011**). Filogenetsko stablo na osnovu NSm gena pokazalo je i da se srpski RB izolati, bez obzira na to koja aminokiselinska supstitucija ih karakteriše, grupišu zajedno što je zabeleženo i kod RB izolata TSWV koji vode poreklo iz Španije (**López et al., 2011**). Imajući u vidu da su se srpski RB izolati TSWV grupisali zajedno sa srpskim RI izolatima poreklom iz paradajza sakupljenim na istim ili geografski vrlo bliskim lokalitetima, pretpostavlja se da RB izolati nisu introdukovani u našu zemlju putem uvoza zaraženog biljnog materijala, kao što je to bio slučaj sa mađarskim RB izolatima (**Almási et al., 2015**), već da su nastali razvojem iz postojeće lokalne populacije ovog virusa u našoj zemlji. Takođe, ove analize pokazale su i da ustanovljene genetičke razlike među izolatima TSWV nisu posledica njihovog fenotipa, na šta su ukazala i istraživanja koja su sprovedi **Ferrand et al. (2019)**.

Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu delimičnih sekvenci Gn-Gc gena ukazalo je na podelu izolata u dva osnovna klastera, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (**Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013**). Uprkos visokom stepenu nukleotidne sličnosti sekvenci izolata TSWV, filogenetske analize ukazale su na podelu srpskih izolata u dve grupe. Većina srpskih izolata grupisala se u klaster II, dok se preostalih šest izolata grupisalo u klaster I, ukazujući na postojanje različitih genetskih varijanti u populaciji ovog virusa u našoj zemlji. Većina ispitivanih izolata TSWV poreklom iz Srbije grupisala se identično kao i u stablu na osnovu sekvence NSm gena. Jedini

izuzetak predstavlja izolat 224-16 poreklom iz ukrasne biljke *Cinia* sp. koji se na osnovu filogenetske analize sekvenci NSm gena grupisao u klaster I, a na osnovu sekvence Gn-Gc gena u klaster II, što ukazuje na moguće postojanje rekombinacije u okviru M segmenta. U istraživanjima drugih autora takođe je utvrđeno postojanje rekombinacija kod M segmenta. Tako je zabeleženo postojanje rekombinacija u M segmentu izolata TSWV poreklom iz Južne Koreje (**Lian et al., 2013**) i Italije (**Margaria et al., 2015**), a **Zhang et al. (2016)** navode da je upravo u M segmentu zabeležena visoka stopa rekombinacija.

Kako bi se potvrdili rezultati dobijeni filogenetskim analizama na osnovu delimičnih sekvenci NSm i Gn-Gc gena, rekonstruisano je i filogenetsko stablo na osnovu delimičnih sekvenci M segmenta dobijenih spajanjem sekvenci NSm i Gn-Gc gena. Filogenetsko stablo na osnovu M segmenta, takođe je pokazalo jasno izdvajanje izolata u dva osnovna klastera. Kod većine srpskih izolata TSWV nije bilo razlike u grupisanju u odnosu na filogenetske analize zasnovane na sekvenci NSm i Gn-Gc gena. Jedini izuzetak predstavlja rekombinantni izolat 224-16, koji se na osnovu delimične sekvence M segmenta grupisao u poseban R klaster. Iako su ranija istraživanja ukazala da rekombinacije predstavljaju glavni evolutivni mehanizam kod virusa sa jednolančanom RNK i sporedni evolutivni mehanizam kod RNK virusa sa višedelnim genomom (**Pressing and Reaney, 1984; Chao, 1988; Fraile et al., 1997; Gagarinova et al., 2008; Seo et al., 2009**), kasnija istraživanja pokazala su da i rekombinacije predstavljaju značajne evolutivne mehanizme kod RNK virusa sa višedelnim genomom i da je stopa pojave rekombinacija i pseudorekombinacija povezana sa genetičkom strukturom i životnim ciklusom samog virusa (**Bruyere et al., 2000; Simon-Loriere and Holmes, 2011**). Dosadašnja saopštenja pokazala su da su u prirodi zastupljena upravo ova dva tipa promena kada su u pitanju sva tri genomna segmenta TSWV (**Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Zhang et al., 2016; Fontana et al., 2020**).

Filogenetske analize na osnovu RdRp gena, uprkos visokoj nukleotidnoj sličnosti sekvenci, pokazale su da se izolati TSWV poreklom iz različitih delova sveta mogu podeliti u dva klastera, pri čemu se ispitivani izolati iz Srbije nalaze u obe grupe nezavisno od godine i lokaliteta na kom su sakupljeni, kao i biljke domaćina iz koje potiču. Na ovakvu podelu izolata TSWV iz različitih delova sveta na osnovu sekvenci RdRp gena ukazali su i drugi autori (**Lian et al., 2013; Fontana et al., 2020**). Osim toga, rezultati ove analize pokazali su različito grupisanje izolata 345-15 i 230-17 koji su se u svim prethodnim filogenetskim analizama grupisali zajedno sa izolatima iz ukrasnih biljaka za koje se na osnovu analize sekvence N gena može pretpostaviti da su severnoameričkog porekla. Na osnovu sekvenci RdRp gena ova dva izolata pokazuju veću sličnost i grupišu se sa srpskim izolatima koji su na osnovu sekvence N gena evropskog porekla i mogu se označiti kao pseudorekombinanti. Pojava pseudorekombinacija kod izolata TSWV zabeležena je i od strane drugih autora (**Qiu et al., 1998; Tentchev et al., 2011**). Različito poreklo L segmenta zabeleženo je i kod izolata poreklom iz Koreje ukazujući na postojanje pseudorekombinacija čitavog L segmenta (**Lian et al., 2013**). Osim toga, u Južnoj Koreji zabeleženo je postojanje izolata kod kojih je došlo do rearanžiranja S segmenta (**Lian et al., 2013; Kwon et al., 2021**), dok su u Italiji zabeleženi izolati kod kojih je došlo do promene S ili M segmenta (**Fontana et al., 2020**). Takođe, i u Kini su zabeleženi izolati kod kojih je ustanovljeno rearanžiranje M segmenta (**Zhang et al., 2016**).

Rezultati filogenetskih analiza na osnovu svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) ukazali su na zajedničko grupisanje srpskih izolata TSWV poreklom iz geografski udaljenih područja naše zemlje, upućujući da je došlo do protoka gena („*gene flow*“) između ovih geografskih regiona. Tako je na osnovu delimičnih sekvenci N i NSs gena, i S segmenta utvrđeno da se srpski izolati TSWV poreklom iz severnih, centralnih i južnih delova naše zemlje zajedno grupišu u okviru obe subpopulacije evropskog klastera, zatim na osnovu NSm i Gn-Gc gena, i M segmenta u okviru klastera II, i na osnovu RdRp gena u okviru klastera I. Dobijeni rezultati ukazuju da na oblikovanje populacije ovog virusa u Srbiji, osim utvrđenih nezavisnih introdukcija ovog virusa u našu zemlju, značajan uticaj ima i protok gena („*gene flow*“), na koji upućuju i drugi autori naročito kada je u pitanju protok gena između različitih država ili kontinenata usled intenzivne razmene biljnog materijala (**Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008; Tentchev et al., 2011**).

6.3. Mreža haplotipova izolata TSWV

Na visok stepen diverziteta i postojanje varijabilnosti u populaciji TSWV u našoj zemlji ukazuje i postojanje velikog broja haplotipova za sve ispitivane gene. Primenom DnaSP 6.0 programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp gena srpski izolati TSWV grupišu u 26, 19, 27, 26, odnosno 15 haplotipova što je u saglasnosti sa istraživanjima **Qiu and Moyer (1999)** koji su ukazali na zastupljenost TSWV u prirodi u vidu kompleksa haplotipova koji odlikuje visok nivo adaptibilnosti. Za svaki od ispitivanih genskih regiona utvrđena su dva do tri preovlađujuća haplotipa sa većim brojem izolata, dok su preostali haplotipovi obuhvatili samo pojedinačne sekvence. Analiza strukture populacije, genetičkog diverziteta i izvora genetičke varijabilnosti izolata TSWV porekom iz Severne Karoline i Virdžinije, pokazala je da haplotipsku strukturu svakog gena čini jedan ili dva preovlađujuća haplotipa i više od 100 haplotipova predstavljenih jednim izolatom (**Kaye, 2009**). Veliki broj haplotipova zabeležen je i u populaciji još jednog *Orthotospovirus*-a, virusa nekrotične pegavosti impatiensa (INSV), na osnovu analize sekvenci N gena i IGR regiona kod izolata iz ukrasnih biljaka poreklom iz Japana (**Nekoduka et al., 2015**).

Mreže haplotipova rekonstruisane pomoću median-joining networks algoritma na osnovu delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) izolata TSWV poreklom iz Srbije pružile su uvid u genealoške odnose haplotipova detektovanih u populaciji ovog virusa u našoj zemlji i potvrdile rezultate filogenetskih analiza za svaki ispitivani genski region o više nezavisnih introdukcija izolata TSWV u našu zemlju. Osim toga, haplotipovi pronađeni u populaciji TSWV u Srbiji na osnovu sekvenci svih genskih regiona zauzeli su uglavnom pericentralna mesta, dok su neki od njih predstavljali i tranzicione čvorove ka drugim haplotipovima, što ukazuje da je u okviru naše zemlje došlo i do razvoja i širenja populacije nastale unutar same teritorije naše zemlje. Istraživanja drugih autora iz Japana i Italije, takođe, ukazuju da mreža haplotipova potvrđuje rezultate filogenetskih analiza, upućujući na postojanje introdukcija izolata drugih biljnih virusa iz geografski udaljenih krajeva, kao što su INSV (**Nekoduka et al., 2015**) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) (**Bertin et al., 2020**). Osim toga, veliki broj blisko povezanih haplotipova u mreži može predstavljati indikator brze ekspanzije populacije virusa (**Lévy-Hartmann et al., 2012**)

6.4. Analize rekombinacije

TSWV je virus sa izuzetnom varijabilnošću i u prirodi je zastupljen kao kompleks sojeva (**de Avila et al., 1990; Chatzivassiliou et al., 2000b; Mandal et al., 2006**), a raznovrsnost izolata ovog virusa pripisuje se promenama koje se dešavaju u okviru trodelnog genoma ovog virusa, odnosno brojnih mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija (**Qiu et al., 1998; Bhat et al., 1999; Kaye, 2009**). Obzirom da rekombinacije i pseudorekombinacije predstavljaju značajan evolutivni proces koji utiče na varijabilnost virusa u prirodi, a naročito RNK virusa sa višedelnim genomom (**Bruyere et al., 2000**), dosadašnja saopštenja pokazala su da su u prirodi zastupljena upravo ova dva tipa promena kada su u pitanju sva tri genomna segmenta ovog virusa (**Tentchev et al., 2011; Lian et al., 2013; Zhang et al., 2016**). Većina mesta rekombinacije detektovana su pretežno na 5' kraju RNK lanca sve tri genomne RNK (S, M i L RNK) (**Zhang et al., 2016**). Pretpostavlja se da na ovu pojavu utiče način replikacije svakog od ova tri genska regiona, kao i njihova genetička struktura, ali to još uvek nije zvanično potvrđeno.

Analiza sekvenci S i M segmenata 34 izolata TSWV poreklom iz Srbije pomoću RDP v.4.101 softvera pokazala je da je do izmene genetičkog materijala u vidu rekombinacije došlo samo na M segmentu kod izolata 224-16 poreklom iz ukrasne biljne vrste *Cinia* sp. Ovaj izolat predstavlja prirodnog rekombinanta između dva srpska izolata ukazujući da je do pojave rekombinacije došlo iz postojeće lokalne populacije ovog virusa, čemu u velikoj meri doprinosi i činjenica da je u našoj

zemlji često zastupljeno gajenje povrtarskih i ukrasnih biljaka zajedno u istom zatvorenom prostoru, naročito kada je u pitanju rasadnička proizvodnja povrća.

Iako su uočene razlike u grupisanju dva srpska izolata (525-11 poreklom iz paprike i 646-11 poreklom iz paradajza), na osnovu N i NSs gena u okviru evropske podgrupe 1 i 2, upućivale da se radi o potencijalnim rekombinantnim izolatima, primenom RDP v.4.101 softvera, prisustvo rekombinacija kod ovih izolata nije potvrđeno. S druge strane, u istraživanjima koja su sprovedeli **Zhang et al. (2016)** analizirajući kompletne sekvence izolata TSWV poreklom iz Kine, ali i iz drugih delova sveta, osim pseudorekombinacija, kod 27 sekvenci L segmenta detektovano je 88 mesta rekombinacije, kod 56 sekvenci M segmenta 143 mesta, dok je kod 61 sekvence S segmenta detektovano čak 174 mesta rekombinacije. Ovi podaci ukazuju na značajno prisustvo ne samo pseudorekombinacija, već i rekombinacija u populaciji TSWV. Imajući u vidu da prajmeri TSWVCP-f/TSWVCP-r (**Vučurović et al., 2012**) i S70/S890 (**Qiu et al., 1998**) za umnožavanje N, odnosno NSs gena, obuhvataju delove S segmenta, koji omogućavaju uspešnu detekciju velikog broja različitih izolata TSWV, pretpostavlja se da njima nije obuhvaćeno mesto rekombinacije zbog čega se ova dva srpska izolata (525-11 i 646-11) ne mogu klasifikovati kao rekombinantni bez dalje analize i umnožavanja čitavog S segmenta.

6.5. Uticaj evolutivnih parametara na populaciju TSWV

Dosadašnja istraživanja pokazala su da pozitivna selekcija favorizuje razlikovanje vrsta u okviru *Orthotospovirus* roda (**Tsompana et al., 2005**), dok nukleotidne promene, odnosno mutacije, kao i negativna (*purifying*) selekcija predstavljaju glavne faktore koji utiču na evoluciju TSWV (**Lai et al., 2021**). Rezultati Z-testa selekcije na osnovu ukupnog seta sekvenci pokazali su da su svih pet analiziranih genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) izolata TSWV poreklom iz Srbije pod uticajem negativne (*purifying*) selekcije. Negativna selekcija ukazuje na to da su nesinonimne supstitucije, odnosno nukleotidne promene koje dovode do izmena u aminokiselinskom sastavu proteina, manje zastupljene u populaciji TSWV u našoj zemlji u odnosu na sinonimne supstitucije koje ne dovode do promena u samom proteinu. Dosadašnja istraživanja pokazala su da na populaciju TSWV, odnosno svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp) dominantan uticaj ima negativna selekcija, uprkos uticaju pozitivne selekcije na pojedine kodone genskih regiona ovog virusa (**Tsompana et al., 2005; Kaye et al., 2011; Tentchev et al., 2011; Sundaraj et al., 2014; Lai et al., 2021**).

Međutim, analiza pojedinačnih parova sekvenci NSm gena pokazala je da se pet parova sekvenci srpskih izolata TSWV poreklom iz paradajza nalazi pod uticajem pozitivne selekcije. Iako su prva istraživanja o uticaju evolutivnih parametara na populaciju TSWV, sprovedena od strane **Tsompana et al. (2005)**, pokazala da kod NSm gena nije zabeležena pozitivna selekcija, kasnija istraživanja koja su obuhvatila izolate TSWV poreklom iz osetljivih i otpornih sorti kikirikija potvrdila su da se NSm gen analiziranih izolata ovog virusa nalazi pod uticajem pozitivne selekcije (**Lai et al., 2021**). Imajući u vidu uloge NSm gena, kao transportnog proteina (**Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995; Soellick et al., 2000**) i avirulentnog faktora u prevazilaženju otpornosti komercijalnih sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom (**Hoffmann et al., 2001; Peiró et al., 2014**), ustanovljeno je da su nesinonimne supstitucije na poziciji 118 (C118Y) i 120 (T120N) NSm gena, odgovorne za prevazilaženje otpornosti kod paradajza, pod uticajem pozitivne selekcije (**López et al. 2011; Peiró et al., 2014**).

Osim toga, u ovim istraživanjima, uticaj pozitivne selekcije utvrđen je i kod četiri para sekvenci Gn-Gc gena srpskih TSWV izolata poreklom iz paradajza. S obzirom na to da Gn-Gc gen učestvuje u interakciji virus-vektor (**Fauquet et al., 2005**) i da je neophodan u procesu usvajanja čestica TSWV od strane larvi tripsa, utičući neposredno na njihovu cirkulaciju kroz telo vektora (**Margaria et al., 2014**), može se pretpostaviti da ovaj gen ima posredan uticaj na efekat „uskog grla“

(*bottleneck*), koji ukazuje na smanjenje diverziteta nekog organizma. S tim u vezi, prema navodima **García-Arenal et al. (2001)** da na genetičku stabilnost populacije biljnih virusa utiču negativna (*purifying*) selekcija, genetički drift i efekta „uskog grla” (*bottleneck*), i da se kako navode **Lai et al. (2021)** uticaj negativne selekcije dovodi u vezu sa ekspanzijom populacije virusa, a uticaj pozitivne selekcije sa efektom „uskog grla” (*bottleneck*), može se postaviti pitanje koliki uticaj na oblikovanje populacije TSWV ima sam vektor, odnosno Gn-Gc gen koji je u neposrednoj vezi sa njim. U prilog tome govori i promena u dominaciji vektora TSWV gde je *Thrips tabaci*, kao odgovorni vektor za širenje TSWV u prirodi tokom 30-ih i 40-ih godina prošlog veka (**Goldbach and Peters, 1994**), podlegao dominaciji vrste *Frankliniella occidentalis* koji je preuzeo tu ulogu s kraja 70-ih godina prošlog veka (**Kirk and Terry, 2003**) i u pojedinim delovima sveta doveo do ekspanzije TSWV (*emergence*) i/ili njegove ponovne pojave (*re-emergence*) (**Tentchev et al., 2011**). Ova promena ukazuje na promene koje se dešavaju i u samoj populaciji vektora ovog virusa, a sam način usvajanja i prenošenja TSWV koji podrazumeva usvajanje virusa od strane larve prvog stupnja i njegovo dalje prenošenje na perzistentan i propagativan način (**Ullman et al., 1993; Wijkamp et al., 1993**) od strane larve drugog stupnja i adulta (**Sakimura, 1963; Prins and Kormelink, 2004b**), govori o kompleksnosti razjašnjavanja faktora koji utiču na oblikovanje populacije TSWV u prirodi. Samim tim što se virus zadržava u telu vektora i umnožava u njemu, i što u procesu usvajanja i prenošenja učestvuju različiti razvojni stupnjevi tripsa, značajno je pitanje šta će se od postojeće usvojene populacije virusa preneti u sledeću vegetacionu sezonu, a šta takoreći „izgubiti” (efekat „uskog grla” (*bottleneck*)), naročito ako se uzme u obzir uticaj pozitivne selekcije ne samo na sam virus, u ovom slučaju Gn-Gc gen, već i na samog vektora i biljku domaćina koji u prirodi deluju kao jedan kompleksni sistem.

6.6. Biološka karakterizacija RB izolata TSWV

Biološko testiranje komercijalno dostupnih otpornih i osetljivih hibrida paradajza i paprike na TSWV potvrdilo je rezultate molekularne identifikacije i postojanje RB izolata TSWV u našoj zemlji. Nakon mehaničkih inokulacija sva tri izolata (108-19, 109-19 i 111-19), dobijena iz biljaka paradajza hibrida ‘Wrestler F1’ sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, izazvala su zarazu svih pet otpornih hibrida paradajza. Simptomi tipični za zarazu izazvanu ovim virusom javili su se 10-14 dana nakon mehaničkih inokulacija, kao što je zabeleženo i kod RB izolata TSWV iz paradajza poreklom iz Kalifornije (**Batuman et al., 2017**) i Italije (**Crescenzi et al., 2015**). Osim toga, na biljkama dva od pet korišćenih otpornih hibrida paradajza primećena je pojava sistemskih simptoma nekoliko dana pre pojave lokalnih nekrotičnih pega na inokulisanim listovima, kao posledice hipersenzitivne reakcije biljaka sa ugrađenim *Sw-5b* genom (**Aramburu and Marti, 2003**). S druge strane, srpski RI izolati TSWV (45-12 i 170-14) nisu prouzrokovali pojavu sistemskih simptoma na biljkama otpornih hibrida paradajza, već su doveli samo do pojave hipersenzitivne reakcije na inokulisanim listovima ukazujući da ovi izolati nemaju sposobnost prevazilaženja otpornosti komercijalnih hibrida paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti. Na svim biljkama osetljivih hibrida paradajza, inokulisanih RB izolatima, došlo je do pojave karakterističnih simptoma, što upućuje na nenarušavanje sposobnosti RB izolata da zaraze osetljive hibride paradajza.

Pored toga, sva tri RB izolata, kao i dva RI izolata TSWV poreklom iz paradajza prouzrokovali su sistemsku infekciju svih testiranih osetljivih hibrida paprike, dok na inokulisanim biljkama otpornih hibrida paprike nije došlo do pojave simptoma. Jedini izuzetak bio je razvoj lokalnih nekrotičnih pega na inokulisanim listovima biljaka jednog otpornog hibrida paprike nakon inokulacije sa dva RB izolata, što **Aramburu et al. (2010)** objašnjavaju posledicom hipersenzitivne reakcije biljaka sa ugrađenim genom otpornosti. Dobijeni rezultati pokazali su da srpski RB izolati poreklom iz paradajza nemaju sposobnost prevazilaženja otpornosti komercijalnih hibrida paprike sa ugrađenim *Tsw* genom otpornosti na TSWV i da, iako se ovi izolati označavaju kao RB izolati kada je u pitanju paradajz, istovremeno se mogu označiti i kao RI izolati kada je u pitanju paprika. Obzirom

da još uvek u prirodi nije pronađen izolat TSWV koji je sposoban da zarazi kako otporne hibride paradajza, tako i tako i otporne hibride paprike, **Debreczeni et al. (2015)** predložili su klasifikaciju izolata TSWV u tri biotipa: WT (divlji tip), SBR (*Sw-5b* RB izolat) i TBR (*Tsw* RB izolat). U skladu sa ovom klasifikacijom, srpski izolati 108-19, 109-19, i 111-19 pripadaju SBR biotipu, odnosno odlikuju se sposobnošću da zaraze otporne hibride paradajza, ali ne i paprike.

Nastanak RB fenotipova verovatno je posledica široke upotrebe otpornih hibrida u proizvodnji paradajza, naročito u periodu od 2016. do 2019. godine, što je dovelo do selekcionog pritiska i pojave RB izolata TSWV u našoj zemlji. Iako **Thompson and Van Zijl (1996)** navode da se RB izolati nisu širili na obližnje useve, **Aramburu and Marti (2003)** su ustanovili kako vremenski tako i prostorno širenje ovih izolata. Pojava RB izolata TSWV predstavlja potencijalnu opasnost za proizvodnju paradajza u Srbiji, imajući u vidu da se i RI i RB izolati efikasno prenose vrstom *F. occidentalis* (**Roggero et al., 2002**), kao i da je ovaj vektor prisutan u našoj zemlji (**Jović et al., 2012**). Stoga, pored pažljivog monitoringa i kontrole tripsa, pažnju treba obratiti i na naizmenično gajenje osetljivih i otpornih hibrida paradajza kako bi se smanjio selekciono pritisak i sprečila pojava RB izolata TSWV, kao što navode **Aramburu et al. (2010)**.

7. ZAKLJUČAK

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije donose prva saznanja o genetičkoj strukturi prirodne populacije TSWV u Srbiji i faktorima koji oblikuju populaciju ovog virusa u našoj zemlji.

Molekularna karakterizacija na osnovu delimičnih sekvenci svih pet genskih regiona (N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp), ali i na osnovu sekvenci dela S i M segmenata dobijenih spajanjem odgovarajućih sekvenci ukazala je na postojanje genetičke varijabilnosti u prirodnoj populaciji TSWV u Srbiji, pre svega kao posledice više nezavisnih introdukcija izolata TSWV u našu zemlju iz drugih delova sveta, ali i pojave mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija zabeleženih u populaciji ovog virusa u Srbiji.

Filogenetske analize na osnovu delimičnih sekvenci N i NSs gena, kao i dela S segmenta pokazale su da se izolati TSWV grupišu na osnovu geografskog porekla i to u četiri klastera (Evropa, Brazil, Severna Amerika i Azija), pri čemu se evropski klaster dalje deli na dve geografske subpopulacije 1 i 2, a severnoamerički na tri: 3, 4 i 5. Ispitivani izolati TSWV poreklom iz Srbije grupisali su se u okviru evropskog i severnoameričkog klastera, ali u okviru različitih geografskih subpopulacija. Većina srpskih izolata grupisala se u podgrupu 1 i 2 evropskih izolata, dok se manji broj izolata grupisao u podgrupu 4 i 5 severnoameričkih izolata, što je najverovatnije posledica introdukcija iz različitih delova sveta.

Iako je proračun genetičkog diverziteta delimičnih sekvenci NSm i Gn-Gc gena pokazao visok stepen sličnosti sekvenci TSWV poreklom iz Srbije, rekonstruisano filogenetsko stablo ukazuje na varijabilnost srpskih izolata i njihovo grupisanje u dva različita klastera. Većina srpskih izolata grupisala se u klaster II, dok se manji broj grupisao u klaster I. Osim toga, filogenetske analize na osnovu Gn-Gc gena ukazale su i na različito grupisanje izolata 224-16 poreklom iz ukrasne biljke *Cinia* sp. u odnosu na filogenetske analize na osnovu NSm gena, što je i potvrđeno filogenetskim analizama na osnovu sekvenci dela M segmenta. Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci dela M segmenta pokazuje podelu izolata TSWV u dva velika klastera, ali i izdvajanje rekombinantnog klastera koji čini izolat 224-16.

Varijabilnost izolata TSWV poreklom iz Srbije utvrđena je i filogenetskim analizama na osnovu sekvenci RdRp gena. Rekonstruisano filogenetsko stablo ukazuje da se srpski izolati TSWV ponovo grupišu u dva različita klastera, ali i na različito grupisanje izolata 345-15 poreklom iz paprike i izolata 230-17 poreklom iz ukrasne biljke *Pelargonium* sp. u odnosu na filogenetske analize na osnovu sekvenci drugih gena. Ovakav način grupisanja izolata 345-15 i 230-17 ukazuje da je kod ovih izolata došlo do izmene čitavog genomnog segmenta i da se radi o pseudorekombinantima.

Osim toga, rezultati filogenetskih analiza pokazali su da su srpski izolati iz paradajza, paprike i duvana većinom evropskog porekla i da su više puta introdukovani u našu zemlju, dok izolati iz ukrasnih biljaka uglavnom pripadaju severnoameričkoj grupi izolata TSWV, što govori o njihovom poreklu i ukazuje da su introdukovani u Evropu zajedno sa *F. occidentalis* iz tog dela sveta. Takođe, filogenetske analize na osnovu sekvenci svih pet ispitivanih gena pokazuju i zajedničko grupisanje srpskih izolata poreklom iz različitih regiona (severni, centralni i južni) u okviru evropske grupe, ukazujući na prisustvo protoka gena između različitih regiona unutar teritorije naše zemlje.

Tokom ovih istraživanja prvi put u našoj zemlji detektovano je i prisustvo RB (*resistance-breaking*) izolata TSWV izolovanih iz simptomatičnih biljaka paradajza hibrida 'Wrestler F1' sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti prema virusu. Poređenje aminokiselinskih sekvenci NSm proteina odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije sa RI (*resistance-inducing*) i RB izolatima TSWV iz GenBank baze podataka, potvrdilo je prisustvo dve supstitucije aminokiselina karakterističnih za RB izolate TSWV. Kod izolata 108-19, 109-19, 110-19, 112-19 i 113-19 utvrđena je supstitucija cisteina tirozinom na poziciji 118 (C118Y), dok je kod izolata 111-19 na poziciji 120 prisutan asparagin umesto treonina (T120N). Velika nukleotidna sličnost između RI i RB izolata,

kao i filogenetske analize, ukazuju da fenotip izolata (RI ili RB) nema uticaja na njihovo grupisanje, zbog čega se može zaključiti da je do pojave RB izolata došlo razvojem iz lokalne populacije pod uticajem selekcionog pritiska gajenjem otpornih sorti paradajza.

Na postojanje varijabilnosti u populaciji TSWV u našoj zemlji ukazalo je i postojanje velikog broja haplotipova za svaki od ispitivanih genskih regiona. Primenom DnaSP programa utvrđeno je da se na osnovu delimičnih sekvenci N, NSs, NSm, Gn-Gc i RdRp gena srpski izolati TSWV grupišu u 26, 19, 27, 26, odnosno 15 haplotipova. U cilju sagledavanja geneaoloških odnosa haplotipova pronađenih u populaciji TSWV u Srbiji, za svaki od pet genskih regiona primenom median-joining networks algoritma rekonstruisana je i mreža haplotipova, koje su potvrdile rezultate filogenetskih analiza za svaki ispitivani genski region o više nezavisnih introdukcija izolata TSWV u našu zemlju iz različitih delova sveta. Haplotipovi pronađeni u populaciji TSWV u Srbiji na osnovu sekvenci svih genskih regiona zauzeli su uglavnom pericentralna mesta, dok su neki od njih predstavljali i tranzicione čvorove ka drugim haplotipovima što ukazuje da je u okviru naše zemlje došlo i do razvoja i širenja populacije nastale unutar same teritorije naše zemlje.

Primenom RDP v.4.101 softvera prisustvo rekombinacija u M segmentu potvrđeno je kod izolata 224-16 poreklom iz ukrasne biljke *Cinia* sp. koji predstavlja prirodnog rekombinanta između srpskih izolata 525-11 poreklom iz paprike koji pripada klasteru II i 232-17 poreklom iz ukrasne biljke *Osteospermum* sp. koji pripada klasteru I na osnovu filogenetskih analiza.

Rezultati „codon-based“ Z-testa selekcije ukazuju na dominantan uticaj negativne (*purifying*) selekcije na svih pet genskih regiona odabranih izolata TSWV poreklom iz Srbije. Međutim, testiranjem svakog para sekvenci NSm i Gn-Gc gena odabranih izolata utvrđen je uticaj pozitivne selekcije kod pet testiranih parova sekvenci NSm gena (169-13 i 108-19, 170-14 i 108-19, 177-14 i 108-19, i 179-15 i 108-19), kao i kod četiri para sekvenci Gn-Gc gena (108-19 i 179-15, 109-19 i 179-15, 110-19 i 179-15, i 113-19 i 179-15) izolata poreklom iz paradajza. Iako negativna selekcija ima ulogu očuvanja funkcije proteina, utvrđivanje određenih aminokiselina koje su pod uticajem pozitivne selekcije ukazuje na prilagođavanje virusa određenim promenama, kao što je pojava mutacija kod NSm gena usled selekcionog pritiska izazvanog korišćenjem otpornih hibrida paradajza otpornih na TSWV.

Biološka karakterizacija odabranih izolata TSWV poreklom iz paradajza hibrida ‘Wrestler F1’, sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, mehaničkim inokulacijama otpornih i osetljivih sorti paradajza i paprike komercijalno dostupnih na našem tržištu pokazala je da je svih šest srpskih RB izolata TSWV sposobno da prevaziđe otpornost ugrađenu u komercijalne sorte paradajza, ali ne i paprike.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na heterogenost prirodne populacije TSWV u Srbiji kojoj doprinosi više nezavisnih introdukcija izolata TSWV u našu zemlju iz drugih delova sveta. Takođe, varijabilnost populacije ovog virusa u našoj zemlji posledica je i pojave mutacija, rekombinacija i pseudorekombinacija. Tokom ovih istraživanja prvi put je utvrđeno postojanje mutacija u okviru NSm gena srpskih izolata TSWV koje su izazvale supstituciju dve aminokiseline, ili C118Y ili T120N, karakterističnih za RB izolate sposobne da prevaziđu otpornost ugrađenu u komercijalne sorte paradajza. Velika sličnost RB izolata TSWV, zabeleženih tokom ovih istraživanja, sa srpskim RI izolatima ukazuje na njihov razvoj iz lokalne populacije pod uticajem pozitivne selekcije i selekcionog pritiska izazvanog gajenjem otpornih sorti paradajza. Osim toga, u prirodnoj populaciji TSWV u Srbiji utvrđeno je i postojanje genetičkih izmena putem rekombinacija, ali i pseudorekombinacija genomnih segmenata. Međutim, iako je stopa rekombinacija i pseudorekombinacija u ovim istraživanjima niska ukazuje na faktore koji utiču na oblikovanje populacije TSWV u Srbiji. Osim toga, nove rekombinacije i pseudorekombinacije mogu biti favorizovane unosom novih izolata u regione gde su potencijalni domaćini već zaraženi nekim od izolata TSWV prisutnih na tom području. Iako su ova istraživanja pokazala da se populacija TSWV u Srbiji nalazi pod dominantnim uticajem negativne (*purifying*) selekcije, primećen je izvestan uticaj pozitivne selekcije kod sekvenci NSm i Gn-Gc gena pojedinih izolata poreklom iz paradajza. Pored

doprinosa u sagledavanju strukture i sastava populacije ovog virusa u našoj zemlji, ova disertacija omogućava dalja molekularna epidemiološka istraživanja i primenu efikasnijih i dugotrajnijih strategija kontrole oboljenja koja ovaj virus izaziva u našoj zemlji.

8. LITERATURA

- Abadkhah, M., Koolivand, D. and Eini, O. (2018): A New Distinct Clade for Iranian *Tomato spotted wilt virus* Isolates Based on the Polymerase, Nucleocapsid, and Non-structural Genes. *The Plant Pathology Journal* 34 (6): 514-531.
- Allen, W. R. and Matteoni, J. A. (1991): *Petunia* as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the Tomato spotted wilt virus in greenhouse. *Plant Disease* 75: 78-82.
- Allen, W. R., Matteoni, J. A. and Broadbent, A. B. (1991): Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemum infected with *Tomato spotted wilt virus*. In: Hsu, H. T. and Lawson, R. H. (eds.), *Virus-thrips-plant interactions of TSWV*. Springfield, National Technology Information Service, pp. 28-45.
- Almási A., Csilléry, G., Csömör, Z., Nemes, K., Palkovics, L., Salánki, K. and Tóbiás, I. (2015): Phylogenetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) NSs protein demonstrates the isolated emergence of resistance-breaking strains in pepper. *Virus Genes* 50: 71-78.
- Amin, P. W., Reddy, D. V. R. and Ghanekar, A. M. (1981): Transmission of *Tomato spotted wilt virus*, the causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. *Plant Disease* 65: 663-665.
- Anonymous (2002): *Plant Protection Compendium*. CAB International, Wallingford, UK.
- Antignus, Y., Mor, N., Ben Joseph, R., Lapidot, M. and Cohen, S. (1996): Ultraviolet-absorbing plastic sheets protect crops from insect pests and from virus diseases vectored by insects. *Environmental Entomology* 25: 919-924.
- Aramburu, J. and Martí, M. (2003): The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathology* 52: 407.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S. and López, C. (2010): Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the *Sw-5* resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 342-351.
- Bandelt, H. J., Forster, P. and Röhl, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
- Batuman, O., Turini, T. A., Oliveira, P. V., Rojas, M. R., Macedo, M., Mellinger, H. C., Adkins, S. and Gilbertson, R. L. (2017): First report of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomatoes with the *Sw-5* tospovirus-resistance gene in California. *Plant Disease* 101: 637.
- Bennison, J., Maulden, K., Barker, I., Morris, J., Boonham, N., Smith, P. and Spence, N. (2001): Reducing spread of TSWV on ornamentals by biological control of western flower thrips. 7th International Symposium on Thysanoptera, Reggio Calabria, 2-7th July, Italy, Proceedings: 215-219.
- Berling, A., Llanas-Bousquet, W., Malezieux, S. and Gebre-Selassie, K. (1990): Tomato spotted wilt virus. *Connaitre le probleme pour enrayer l'epidemie*. *Phytoma* 422: 46-50.
- Bertin, S., Manglli, A., McLeish, M. and Tomassoli, L. (2020): Genetic variability of watermelon mosaic virus isolates infecting cucurbit crops in Italy. *Archives of Virology* 165: 937-946.
- Best, R. J. (1968): Tomato spotted wilt virus. *Advance in Virus Research* 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.

- Bohlman, M. C., Morzunov, S. P., Meissner, J., Taylor, M. B., Ishibashi, K., Rowe, J., Levis, S., Enria, D. and St. Jeor, S. C. (2002): Analysis of Hantavirus Genetic Diversity in Argentina: S Segment-Derived Phylogeny. *Journal of Virology* 76: 3765-3773.
- Boiteux, L. S. (1995): Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 146-149.
- Boiteux, L. S. and Giordano, L. de B. (1993): Genetic basis of resistance against 2 tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71: 151-154.
- Boiteux, L. S. and Nagata, T. (1993): Susceptibility in *Capsicum chinense* PI 159236 to *Tomato spotted wilt virus* isolates in Brazil. *Plant Disease* 77: 210.
- Brittlebank, C. C. (1919): Tomato diseases. *Journal of Agriculture of Victoria* 17: 213-235.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. and Watson, L. (1995): *Viruses of Plants. Description and lists from the VIDE database*, CAB International.
- 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/>
- Bruyere, A., Wantroba, M., Flasiński, S., Dziańt, A. and Bujarski, J. (2000): Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology* 74: 4214-4219.
- 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.
- Canady, M. A., Stevens, M. R., Barineau, M. S. and Scott, J. W. (2001): Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica* 117: 19-25.
- Chao, L. (1988): Evolution of sex in RNA viruses. *Journal of Theoretical Biology* 133: 99-112.
- Chare, E. R. and Holmes, E. C. (2006): A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151, 933-946.
- Chatzivassiliou, E. K., Boubourakas, I., Drossos, I., Eleftherohorinos, I., Jenser, G., Peters, D. and Katis, N. I. (2001): Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by Tomato spotted wilt virus and infested by its vector species. *Plant Disease* 85: 40-46.
- Chatzivassiliou, E. K., Livieratos, I., Jenser, G. and Katis, N. I. (2000a): Ornamental plants and thrips populations associated with Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytoparasitica* 28: 257-264.
- Chatzivassiliou, E. K., Peters, D. and Katis, N. I. (2002): The efficiency by which *Thrips tabaci* populations transmit *Tomato spotted wilt virus* depends on their host preference and reproductive strategy. *Phytopathology* 92: 603-609.
- Chatzivassiliou, E. K., Weekes, R., Morris, J., Wood, K. R., Barker, I. and Katis, N. I. (2000b): Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Greece-its incidence following the expansion of *Frankliniella occidentalis*, and characterisation of isolates collected from various hosts. *Annual of Applied Biology* 137: 127-134.
- Cho, J. J., Custer, D. M., Brommonschenkel, S. H. and Tanksley, S. D. (1996): Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to the *Tomato spotted wilt virus*. *Acta Horticulturae* 431: 367-378.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, J. Y., Kim, J. H., Lee, S. H., Choi, G. S. et al. (2005): Occurrence and symptoms of tomato spotted wilt virus on vegetables in Korea (I). *Research in Plant Disease* 11: 213-216.

- Cho, J., Mau, R., Hamssak, R. and Gonsalves, D. (1988): Detection of *Tomato spotted wilt virus* in individual thrips by enzymelinked immunosorbent assay. *Phytopathology* 78 (10): 1348-1351.
- Cho, J., Mau, R. F. L., Pang, S-Z, Wang, M, Gonsalves, C., Watterson, J., Custer, D.M. and Gonsalves, D. (1998): Approaches for controlling Tomato spotted wilt virus, in: Hadidi, A., Khetarpal, R. K., Koganezawa, H. (1998): *Plant Virus Disease Control*, APS Press, St. Paul-Minnesota: 547-564.
- Chung, B. N., Pak, H. S., Jung, J. A. and Kim, J. S. (2006): Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *The Plant Pathology Journal* 22 (3): 230-234.
- 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.
- Coutts, B. A., Thomas-Carroll, M. L. and 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.
- Crescenzi, A., Fanigliulo, A. and Viggiano, A. (2015): Resistance breaking *Tomato spotted wilt virus* isolates on resistant tomato cultivars in Italy. *Acta Horticulturae* 1069: 95-98.
- Culbreath, A. K., Todd, J. W. and Brown, S. L. (2003): Epidemiology and menagment of Tomato spotted wilt in peanut. *Annual Review of Phytopathology* 41: 53-75.
- Daughtrey, M. L., Jones, R. K., Moyer, J. W. and Daub, M. E. (1997): Tospoviruses strike the greenhouse industry-INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease* 81: 1220-1230.
- de Avila, A. C., de Haan, P., Kitajima, E., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. and Peters, D. (1992): Characterization of a distinct isolate of Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134: 133-151.
- de Avila, A. C., de Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1993): Classification of *Topoviruses* based on phylogeny of nucleoprotein. *Journal of General Virology* 74: 153-159.
- de Avila, A. C., Huguenot, C., Resende, R. de O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1990): Serological differentiation of 20 isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 71: 2801-2807.
- de Borbón, C. M., Gracia, O. and De Santis, L. (1999): Survey of Thysanoptera occurring on vegetable crops as potential Tospovirus vectors in Mendoza, Argentina. *Revista de Sociedad Entomológica Argentina* 58: 59-66.
- de Borbón, C. M., Gracia, O. and Piccolo, R. (2006): Relationships between tospovirus incidence and thrips populations on tomato in Mendoza, Argentina. *Journal of Phytopathology* 154: 93-99.
- de Fazio, G., Caner, J. and Vicente, M. (1980): Effect of virazole (ribavirin) on Tomato spotted wilt virus in the systemic hosts, tomato and tobacco. *Archives of Virology* 63: 305-309.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D. and Goldbach, R. (1991): Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology* 71: 2207-2216.
- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., van Lent, J. W. M. and Kormelink, R. (2013): *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology* 14 (4): 405-415.

- de Ronde, D., Lohuis, D. and Kormelink, R. (2019): Identification and characterization of a new class of *Tomato spotted wilt virus* isolates that break *Tsw*-based resistance in a temperature-dependent manner. *Plant Pathology* 68, 60-71.
- de Ronde, D., Pasquier, A., Ying, S., Butterbach, P., Lohuis, D. and Kormelink, R. (2014): Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSS protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Molecular Plant Pathology* 15, 185-195.
- Debreczeni, D. E., López, C., Aramburu, J., Darós, J. A., Soler, S., Galipienso, L., Falk, B. W. and Rubio, L. (2015): Complete sequence of three different biotypes of tomato spotted wilt virus (wild type, tomato *Sw-5* resistance-breaking and pepper *Tsw* resistance-breaking) from Spain. *Archives of Virology* 160: 2117-2123.
- Delić, D., Balech, B., Radulović, M., Đurić, Z., Lolić, B., Santamaria, M. and Đurić, G. (2018): Molecular identification of *Tomato spotted wilt virus* on pepper and tobacco in Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina). *European Journal of Plant Pathology* 150: 785-789.
- Deligoz, I., Arli Sokmen, M. and Sari, S. (2014): First report of resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*; *Bunyaviridae*) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey. *New Disease Reports* 30: 26.
- Dewey, R. A., Semorile, L. C., Grau, O. and Crisci, J. V. (1997): Cladistic analysis of *Tospovirus* using molecular characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 11-32.
- Dietzgen, R. G., Martin, K. M., Anderson, G., Goodin, M. M. (2012): In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *Journal of General Virology* 93: 2490-95.
- 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.
- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B. (2006): Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 21: 205-214.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I. i Duduk, B. (2002): Molekularna identifikacija virusa bronzavosti paradajza na paprici. *Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor*, str. 72.
- Đekić, I. (2009): Prisustvo, rasprostranjenost i molekularna karakterizacija virusa duvana u Srbiji. *Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija*.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2007a): Neravnomerna distribucija *Tomato spotted wilt virus* u duvanu, paradajzu i paprici. *Zbornik rezimea XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, str. 117-118.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J., Duduk, B., Antonijević, D. i Krstić, B. (2007b): Identifikacija sojeva virusa crtičastog mozaika krompira na duvanu. *Pesticidi i fitomedicina* 22: 155-163.
- Đekić I., Bulajić A., Jović J., Krnjajić S., Vučurović A., Berenji J. i Krstić B. (2008a): Molekularna proučavanja *Cucumber mosaic virus*-a iz duvana. *Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, str. 72-73.
- Đekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2008b): Zastupljenost i molekularna detekcija virusa mozaika krastavca u usevu duvana. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 40: 70-82.
- Đekić, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D. i Krstić, B. (2008c): Uticaj neravnomerne distribucije virusa bronzavosti paradajza na serološko dokazivanje virusa u paradajzu, paprici i ukrasnim biljkama. *Pesticidi i fitomedicina* 23: 225-234.

- 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, str. 69-70.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). (2012): Scientific opinion on the pest categorization of the tospoviruses. EFSA Journal 10: 3029.
- Elliott, H. and Richard, M. (1996): The Bunyaviridae. Plenum press, New York and London.
- Elsayed, A. I., Boulila, M., Komor, E. and Zhu, Y. J. (2012): Putative recombination signature and significance of insertion/deletion events in the RNA-dependent RNA polymerase coding region of sugarcane yellow leaf virus. Biochimie 94: 1764.
- EPPO/CABI (1992): *Frankliniella occidentalis*. In: Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R. and Harris, K. M. (eds), Quarantine Pests for Europe. CAB International, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI (1997): *Frankliniella occidentalis*. pp. 267-272. In: Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M., Burger, B. (eds): Quarantine Pests for Europe (2nd ed). CAB International Wallingford, UK.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (2005): Virus taxonomy- Classification and Nomenclature of viruses. Virology division-International Union of Microbiological Societies 712-716.
- Ferrand, L., Almeida, M. M. S., Orflio, A. F., Dal Bó, E., Resende, R. O. and García, M. L. (2019): Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance-breaking isolates from Argentina. Plant Pathology 68: 1587-1601.
- Finetti Sialer, M. M., Lanave, C., Padula, M., Vovlas, C. and Gallitelli, D. (2002): Occurrence of two distinct TSWV subgroups in Southern Italy. Journal of Plant Pathology 84 (3): 145-152.
- Finetti Sialer, M. M., Parrella, 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.
- Finlay, K. W. (1953): Inheritance of spotted wilt resistance in tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. Australian Journal of Biological Sciences 6: 153-163.
- Fontana, A., Albanese, G., Manglli, A., Tomassoli, L. and Tiberini, A. (2020): Phylogenetic analysis based on full genome sequencing of Italian tomato spotted wilt virus isolates identified in "Roggianese" sweet pepper and chilli pepper. Annals of Applied Biology 176: 170-179.
- Fraile, A., Alonso-Prados, J. L., Aranda, M., Bernal, J. J., Malpica, J. M. and García-Arenal, F. (1997): Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. Journal of Virology 71: 934-940.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. D. and Brown, P. (1991): Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplementum 2: 1-450.
- Fujisawa, I., Tanak, K. and Ishii, M. (1988): Tomato spotted wilt virus transmissibility by three species of thrips, *Thrips setosus*, *Thrips tabaci* and *Thrips palmi*. Annual Phytopathological Society of Japan 54: 392.
- Gagarinova, A., Babu, M., Strömvik, M. and Wang, A. (2008): Recombination analysis of *Soybean mosaic virus* sequences reveals evidence of RNA recombination between distinct pathotypes. Virology Journal 5: 143.
- García-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2001): Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. Annual Review of Phytopathology 39 (1): 157.

- Gardner, M. C., Tompkins, C. M. and Whipple, O. C. (1935): Spotted wilt of truck crops and ornamental plants. *Phytopathology* 25: 17.
- Geerts-Dimitriadou, C., Lu, Y. Y., Geertsema, C., Goldbach, R. and Kormelink, R. (2012): Analysis of the tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLOS One* 7 (2): e31013.
- German, L. T., Ullman, E. D. and Moyer, W. J. (1992): Tospoviruses: Diagnosis, Molecular biology, phylogeny and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology*: 315-341.
- Ghotbi, T., Shahraeen, N. and Winter, S. (2005): Occurrence of tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran Provinces in Iran. *Plant Disease* 89, 425-429.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. and Gibbs, A. J. (2000): Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.
- Gitaitis, R. D., Dowler, C. C. and Chalfant, R. B. (1998): Epidemiology of Tomato spotted wilt in pepper and tomato in Southern Georgia. *Plant Disease* 82: 752-756.
- Goldbach, R. and Peters, D. (1994): Possible causes of the emergence of tospovirus disease. *Virology* 5: 113-120.
- Golnaraghi, A. R., Shahraean, N., Pourrahim, R., Ghorbani, S. and Farzadfar, S. (2001): First report of *Tomato spotted wilt virus* in Iran. *Plant Disease* 85: 1290.
- Gooding, G. V. (1991): Disease caused by viruses. In: Shew, H. D. and Lucas, G. B. (eds.), *Compendium of tobacco diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 41-47.
- Gordillo, L. F., Stevens, M. R., Millard, M. A. and Geary, B. (2008): Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 92: 694-704.
- Groves, C., German, T., Dasgupta, R., Mueller, D., Smith, D. L. (2016): Seed transmission of Soybean vein necrosis virus: the first Tospovirus implicated in seed transmission. *PLOS One* 11: e0147342.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. and Kennedy, G. G. (2001): Overwintering of *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) on winter annual weeds infected with Tomato spotted wilt virus and patterns of virus movement between susceptible weed hosts. *Phytopathology* 91: 891-899.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. and Kennedy, G. G. (2002): The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 86: 573-582.
- Hall, B. G. (2008): *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual*, Third edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hallwas, M., de Oliveira, A. S., de Campos Dianese, E., Lohuis, D., Silva Boiteux, L., Kayuko Inoue-Nagata, A., Resende, R. O. and Kormelink, R. (2014): The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in *Sw-5*-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology* 15: 871-880.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. and Thomma, B. P. H. J. (2010): Emerging Viral Diseases of Tomato Crops, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 539-48.
- Hartman, J., Johnson, M. and Bessin, R. (2005): Control of Tomato spotted wilt and Impatiens necrotic spot viruses and their vectors, western flower thrips, in greenhouse crops. *Plant Pathology Sheet*. www.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/ext_files/PPFShtml/PPFS-GH-2.pdf

- Hassani-Mehraban, A., Westenberg, M., Verhoeven, J. Th. J., van de Vossen, B. T. L. H., Kormelink, R. and Roenhorst, J. W. (2016): Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses. *Journal of Virological Methods* 233: 89-96.
- Hatala-Zseller, I. and Kiss, E. F. (1999): Control of *Frankliniella occidentalis* and TSWV in capsicum crops in Hungary. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* 29, 63-67.
- Hausbeck, M. K., Welliver, R. A., Derr, M. A. and Gildow, F. E. (1992): *Tomato spotted wilt virus* survey among greenhouse ornamentals in Pennsylvania. *Plant Disease* 76: 795-800.
- Heinze, C., 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.
- Higgins, C. J. (1992): Western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in glasshouses: population dynamics, distribution on plants, and associations with predators. *Journal of Economic Entomology* 85: 1891-1903.
- Hoffmann, K., Qiu, W. P. and Moyer, J. W. (2001): Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of Tomato spotted wilt virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 242-249.
- Holmes, F. L. (1948): Resistance to spotted wilt. *Phytopathology* 38: 467-473.
- Hull, R. (2009): *Comparative plant virology*. Second edition, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA.
- ICTV (2017): *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*, The Online (10th) Report of the ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/
- ICTV (2019): *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*, The Online Report of the ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/
- Ie, T. S. (1982): A sap-transmissible, defective form of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 59: 387-391.
- Jahn, M., Paran, I., Hoffmann, K., Radwanski, E. R., Livingstone, K. D., Grube, R. C., Aftergoot, E., Lapidot, M. and Moyer, J. (2000): Genetic Mapping of the *Tsw* Locus for Resistance to the *Tospovirus Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. and Its Relationship to the *Sw-5* Gene for Resistance to the Same Pathogen in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 13, 673-682.
- Jain, R. K., Pappu, S. S., Pappu, H. R., Culbreath, A. K. and Todd, J. W. (1998): Molecular diagnosis of Tomato Spotted Wilt Tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Disease* 82: 900-904.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J. (2000): Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 34: 67-76.
- Jiang, L., Huang, Y., Suna, L., Wang, B., Zhu, M., Li, J., Huang, C., Liu, Y., Dong, J., Zhang, Z. and Tao, X. (2017): Occurrence and diversity of *Tomato spotted wilt virus* isolates breaking the *Tsw* resistance gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, southwest China. *Plant Pathology* 66: 980-989.
- Jones, D. R. (2005): Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*. 113: 119-157.
- Jones, J. B., Thomas, A. Z., Timur, M. M. and Miller, S. A. (2014): *Compendium of Tomato Diseases and Pests*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

- Jonson, M. G., Choi, H. S., Kim, J. S., Choi, I. R. and Kim, K. H. (2009): Sequence and phylogenetic analysis of the RNA1 and RNA2 segments of Korean *Rice stripe virus* isolates and comparison with those of China and Japan. *Archives of Virology* 154: 1705-1708.
- Jorda, C., Ortega, A. and Juarez, M. (1995): New hosts of Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 79: 538.
- Jović, J., Mitrović, M., Cvrković, T., Krstić, O. and Toševski, I. (2012): Occurrence and molecular identification of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in Serbia. In: Proceedings of International Symposium „Current Trends in Plant Protection“, September 25–28, Belgrade, Serbia, pp 520–525.
- Kajić, V. i Milanović, J. (2013): Virus pjegavosti i venuća rajčice (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV) i virus nekrotične pjegavosti vodenike (*Impatiens necrotic spot virus* - INSV) - biljni virusi koji prijete proizvodnji povrća, ukrasnog i industrijskog bilja. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb.
- Karavina, C. and Gubba, A. (2017): Detection and characterization of Tomato spotted wilt virus infecting field and greenhouse-grown crops in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 149: 933-944.
- Kaye, A. C. (2009): Population genetic analysis of Tomato spotted wilt virus (TSWV) on peanut in North Carolina and Virginia, PhD thesis, Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- Kaye, A. C., Moyer, J. W., Parks, E. J., Carbone, I. and Cubeta, M. A. (2011): Population Genetic Analysis of *Tomato spotted wilt virus* on Peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101: 147-153.
- Kikkert, M., van Lent, J., Storms, M., Bodegom, P., Kormelink, R. and Goldbach, R. (1999): Tomato Spotted Wilt Virus Particle Morphogenesis in Plant Cells. *Journal of Virology* 73 (3): 2288-2297.
- Kikkert, M., van Poelwijk, F., Storms, M., Kassies, W., Bloksma, H., van Lent, J., Kormelink, R. and Goldbach, R. (1997): A protoplast system for studying *Tomato spotted wilt virus* infection. *Journal of General Virology* 78: 1755-63.
- Kikkert, M., Verschoor, A., Kormelink, R., Rottier, P. and Goldbach, R. (2001): *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *Journal of Virology* 75: 1004-12.
- 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.
- Kirk, W. D. J. and Terry, I. L. (2003): The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology* 5: 301-310.
- Kohnić, A., Radulović, M. and Delić, D. (2019): First report of tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology* 101: 421.
- Kormelink, R., Kitajima, E. W., de Haan, P., Zuidema, D., Peters, D. and Goldbach, R. (1991): The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* 181: 459-468.
- Kormelink, R., Storms, M., van Lent, J., Peters, D. and Goldbach, R. (1994): Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200: 56-65.

- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. (2001): Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease* 85: 838-842.
- Krstić, B. i Bulajić, A. (2007): Karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Beograd.
- Krstić, B., Bulajić, A. and Dukić, N. (2005a): Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* and *Impatiens necrotic spot virus* in Serbia. Proceeding of Articles XXX–th Meeting for Plant Protection in Republica Macedonia and Ist Congress of Plant Protection „Environmental Concern and Food Safety“, Ohrid, pp. 85-88.
- Krstić, B., Bulajić, A. i Dukić, N. (2006a): Virusi paradajza sa posebnim osvrtom na virus žute uvijenosti lišća paradajza. VII Savetovanje „Savremena proizvodnja povrća“, Novi Sad, decembar 2006, Zbornik radova: 24-27.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B. (2006b): Prisustvo fitopatogenih virusa u pošiljkama cveća iz uvoza i u domaćoj proizvodnji. Seminar pejzažna hortikultura 2006, Banja Vrujci 16-18. februar 2006. Zbornik predavanja: 57-62.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B. (2006c): Virus bronzavosti paradajza i virus nekrotične pegavosti *Impatiensa*. Seminar pejzažna hortikultura 2006, Banja Vrujci 16-18. februar 2006. Zbornik predavanja: 63-75.
- Krstić, B., Bulajić, A. and Đekić, I. (2007): The *Tospoviruses* in greenhouse tomato and ornamental crops in Serbia. Abstracts book of 5th Balkan Congress for Microbiology, Budva, Montenegro, pp. 133.
- Krstić, B., Bulajić, A. i Đekić, I. (2007): Ekonomski značajni i karantinski virusi paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea IV simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, str. 13.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Berenji, J. (2005b): Virus bronzavosti paradajza na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama na području Republike Srbije. II Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, 14-16. decembar 2005. godine, Teslić. Zbornik rezimea: 15-16.
- Krstić, B., Bulajić, A., Đekić, I. i Berenji, J. (2008): Virus bronzavosti paradajza-jedan od najdestruktivnijih biljnih virusa. *Pesticidi i fitomedicina* 23: 153-166.
- Krstić, B., Bulajić, A., Petrović, D., Stanković, I., Vučurović, A. i Ristić, D. (2011): Epidemiologija virusa paprika i mere kontrole. Zbornik rezimea VIII Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 38-39.
- Krstić, B., Bulajić, A., Trkulja, V., Stanković, I., Vučurović, A., Mihić Salapura, J. i Kovačić, D. (2012): Virusi lukovičastog povrća-značaj i mere kontrole. Zbornik rezimea IX Simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, BiH, str. 7-8.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N., Duduk, B. i Berenji, J. (2006d): Integralna zaštita duvana od virusa bronzavosti paradajza. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 79: 49-60.
- Krstić, B., Dukić, N., Bulajić, A. i Duduk, B. (2005d): Utvrđivanje statusa nekih karantinski štetnih virusa na području Republike Srbije. Zbornik rezimea VII Savetovanja o zaštiti bilja, Sokobanja, Srbija, str. 78-79.
- Krstić, B., Dukić, N., Bulajić, A., Vico, I. i Duduk, B. (2005c): Prisustvo fitopatogenih virusa u pošiljkama cveća iz uvoza. VII Savetovanje o zaštiti bilja, Sokobanja 15-18. novembar 2005. godine. Zbornik rezimea: 81-82.
- 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/Fact Sheet/circ0914.pdf>

- Kwon, S-J., Cho, Y-E., Kwon, O-H., Kang, H-G. and Seo, J-K. (2021): Resistance-Breaking Tomato Spotted Wilt Virus Variant that Recently Occurred in Pepper in South Korea is a Genetic Reassortant. *Plant Disease* 105 (10): 2771-2775.
- Lai, P-C., Abney, M. R., Bag, S., Culbreath, A. K. and Srinivasan, R. (2021): Impact of Host Resistance to Tomato Spotted Wilt Orthotospovirus in Peanut Cultivars on Virus Population Genetics and Thrips Fitness. *Pathogens* 10: 1418.
- Lam, H. M., Ratmann, O. and Boni, M. F. (2018): Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular Biology and Evolution* 35: 247-251.
- Latham, L. J. and Jones, R. A. C. (1998): Selection of resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Annals of Applied Biology* 133: 385-402.
- Law, M. D. and Moyer, J. W. (1990): A Tomato spotted wilt-like virus with serologically distinct N protein. *Journal of General Virology* 71: 933-938.
- 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.
- Lévy-Hartmann, L., Roussel, V., Le Tourneur, Y. and Sellos, Y. D. (2012): Global and New Caledonian patterns of population genetic variation in the deep-sea splendid alfonsino, *Beryx splendens*, inferred from mtDNA. *Genetica* 139: 1349-1365.
- Li, J., Feng, Z., Wu, J., Huang, Y., Lu, G., Zhu, M., Wang, B., Mao, X. and Tao, X. (2015): Structure and function analysis of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt virus interacting with RNA using homology modeling. *Journal of Biological Chemistry* 290 (7): 3950-3961.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. and Kinard, G. (2008): A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154 (1-2): 48-55.
- Lian, S., Lee, J-S., Cho, W. K., Yu, J., Kim, M-K., Choi, H-S. and Kim, K-H. (2013): Phylogenetic and Recombination Analysis of Tomato Spotted Wilt Virus. *PLOS One* 8 (5): e63380.
- López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F. and Rubio, L. (2011): Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 92: 210-215.
- Love, P. G. (2005): Tomato spotted wilt virus in tobacco, www.ces.ncsu.edu/robenson/agriculture/tospowiltvirus.pdf
- Mandal, B., Pappu, H. R. and Culbreath, A. K. (2001): Factors affecting mechanical transmission of Tomato spotted wilt virus to peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* 85: 1259-1263.
- 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., Gébré-Selassie, K. and Villeveille, M. (1991): Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology* 40 (3): 347-351.
- Margaria, P., Bosco, L., Vallino, M., Ciuffo, M., Mautino, G. C., Tavella, L. and Turina, M. (2014): The NSs Protein of *Tomato Spotted Wilt Virus* Is Required for Persistent Infection and Transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology* 88 (10): 5788-5802.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D. and Turina, M. (2007): Evidence That the Nonstructural Protein of *Tomato spotted wilt virus* Is the Avirulence Determinant in the Interaction with Resistant Pepper Carrying the *Tsw* Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 20: 547-558.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Rosab, C. and Turina, M. (2015): Evidence of a tomato spotted wilt virus resistance-breaking strain originated through natural reassortment between two evolutionary-distinct isolates. *Virus Research* 196: 157-161.

- Martin, D. and Rybicki, E. (2000): RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16: 562-563.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. and Muhire, B. (2015): RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1: vev003
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. and Williamson, C. (2005): A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses* 21: 98-102.
- Marys, E., Mejías, A., Rodríguez-Román, E., Avilán, D., Hurtado, T., Fernández, A., Zambrano, K., Garrido, M. and Brito, M. (2014): The first report of tomato spotted wilt virus on gerbera and chrysanthemum in Venezuela. *Plant Disease* 98: 1161.
- Matteoni, J. A. and Allen, W. R. (1989): Symptomatology of Tomato spotted wilt virus infection in florist's chrysanthemum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 373-380.
- 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: 1288.
- Maynard Smith, J. (1992): Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34: 126-129.
- McDonough, M. J., Gerace, D. and Ascerno, M. E. (2005): Western flower thrips feeding scars and tospovirus lesions on Petunia indicator plants. Extension Service, University of Minnesota. www.extension.umn.edu/distribution/horticulture/DG7375.html
- Mertelik, J. and Mokra, V. (1999): Occurrence of tomato spotted wilt tospovirus in horticultural crops and weeds in the Czech Republic in 1992-1997. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29: 81-83.
- Mickovski, J. (1969): *Tomato spotted wilt virus* na duvanu u Jugoslaviji (*Lucopersicum virus* 3-Smith). *Zaštita bilja* 105: 203-214.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. i Stevanović, D. (1999): Rasprostranjenost i intenzitet pojave nekih virusa parazita paprike u Srbiji. *Zaštita bilja*, 228: 151-159.
- Milošević, D. (2013): Diverzitet i karakterizacija virusa paprika u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Momol, M. T., Olson, S. M., Funderburk, J. E., Stavisky, J. and Marois, J. J. (2004): Integrated management of Tomato spotted wilt on field-grown tomatoes. *Plant Disease* 88: 882-890.
- Montero-Astua, M. (2012): *Unveiling and blocking the interaction between Tomato spotted wilt virus and its insect vector*, *Frankliniella occidentalis*. PhD Dissertation, Kansas State University.
- Moury, B., Desbiez, C., Jacquemond, M. and Lecoq, H. (2006): Genetic diversity of plant virus populations: Towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Advanced Virus Research* 67: 49-87.
- Moyer, J. W. (1999): Tospoviruses (Bunyaviridae), In: A. Granoff and R. G. Webster: *Encyclopedia of Virology* (Third edition): 1803-1807.
- Moyer, J. W., German, T., Sherwood, J. L. and Ullman, D. (1999): An update on Tomato spotted wilt virus and related tospoviruses. *Plant pathology on-line*, American Phytopathological Society, <http://www.apsnet.org/online/feature/tospovirus/>
- Moyer, J. W., Sin, S. H. and Kennedy, G. G. (2006): Population structure and evolutionary biology of *Tomato spotted wilt virus*: pathways to understanding virus vector interactions. *Indian Journal of Virology* 17: 18.

- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996a): An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 57: 109-115.
- Mumford, R. A., Barker, I. and Wood, K. R. (1996b): The biology of *Tospoviruses*. *Annals of Applied Biology* 128: 159-183.
- Nachappa, P., Challacombe, J., Margolies, D. C., Nechols, J. R., Whitfield, A. E. and Rotenberg, D. (2020): Tomato spotted wilt virus benefits its thrips vector by modulating metabolic and plant defense pathways in Tomato. *Frontiers in Plant Science* 11: 575564.
- Nagata, T., Aimeida, A. C. L., Resende, R. O. and de Avila, A. C. (2004): The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53: 136-140.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Prins, M., Goldbach, R. and Peters, D. (2000): Impeded thrips transmission of defective Tomato spotted wilt virus isolates. *Phytopathology* 90: 454-459.
- Naidu, R. A., Sherwood, J. L. and Deom, C. M. (2008): Characterization of vector-non transmissible isolate of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology* 57: 190-200.
- Nakazato, T., Franklin, R. A., Kirk, B. C. and Housworth, E. A. (2012): Population structure, demographic history, and evolutionary patterns of a green-fruited tomato, *Solanum peruvianum* (Solanaceae), revealed by spatial genetics analyses. *American Journal of Botany* 99 (7): 1207-1216.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nekoduka, S., Kobayashi, K., Fuji, S-i., Okuda, M. and Sano, T. (2015): Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. *Journal of General Plant Pathology* 81: 429-438.
- Nesbitt, T. C. and Tanksley, S. D. (2002): Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* 162 (1): 365-379.
- Nikolić, D. (2018): Diverzitet i karakterizacija virusa paradajza u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Nikolić, D., Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): Viroze paradajza u Srbiji. Zbornik rezimea radova XII Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 44-45.
- Nikolić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Bulajić, A. and Krstić, B. (2013): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on *Brugmansia* sp. in Serbia. *Plant Disease* 97: 850.
- Nikolić, D., Vučurović, A., Stanković, I., Radović, N., Zečević, K., Bulajić, A. and Krstić, B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 152: 225-235.
- Nischwitz, C., Mullis, S. W., Gitaitis, R. D. and Csinos, A. S. (2006): First report of *Tomato spotted wilt virus* in soybean (*Glycine max*) in Georgia. *Plant Disease* 90: 524.
- 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.
- Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B. W. and Groves, R. L. (2014): Genetic Structure and Molecular Variability of *Cucumber mosaic virus* Isolates in the United States. *PLOS One* 9: e96582.
- 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 (2020): EPPO A2 List from: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>. 2020.
- Ohnishi, J., Katsuzaki, H., Tsuda, S., Sakurai, T., Akutsu, K. and Murai, T. (2006): *Frankliniella cephalica*, a new vector for Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 90: 685.
- Oliver, J. E. and Whitfield, A. E. (2016): The Genus *Tospovirus*: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. *Annual Review of Virology* 3: 101-124.
- Padidam, M., Sawyer, S. and Fauquet, C. M. (1999): Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
- Pang, S-Z., Ja, F-J., Carney, K., Stout, J., Tricoli, D. M., Quemada, H. D. and Gonsalves, D. (1996): Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *The Plant Journal* 9 (6): 899-909.
- Pappu, H., Pappu, S., Jain, R., Bertrand, P., Culbreath, A., McPherson, R. and Csinos, A. (1998): Sequence characteristics of natural populations of *Tomato spotted wilt tospovirus* infecting flue-cured tobacco in Georgia. *Virus Genes* 17: 169-177.
- Pappu, H. R., Jones, R. A. C. and Jain, R. K. (2009): Global status of *tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219-236.
- Pappu, S. S., Bhat, A. I., Pappu, H. R., Deom, C. M. and Culbreath, A. K. (2000): Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: Bunyaviridae) based on the intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. *Archives of Virology* 145: 1035-1045.
- 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.
- Pavan, M. A., Costa, A. S., Kurozawa, C. and Soler, J. M. F. (1996): Infecção localizada em frutos de tomateira causada por *Tospovirus*. *Summa Phytopathologica* 22: 14-19.
- Peiró, A., Cañizares, M. C., Rubio, L., López, C. Moriones, E., Aramburu, J. and Sánchez-Navarro, J. (2014): The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology* 15: 802-813.
- Persley, D. M., Thomas, J. E. and Sharman, M. (2006): *Tospoviruses*-an Australian perspective. *Australasian Plant Pathology* 35: 161-180.
- Peters, D. and Goldbach, R. (1995): The biology of Tospoviruses, In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular basis. Vol. 3: Viruses & viroids, U.S. Singh (ed.): 199-210.
- Plyusnin, A. (2002): Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Archive of Virology* 147: 665-682.
- Posada, D. and Crandall, K. A. (2001): Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13757-13762.
- Pressing, J. and Reaney, D. (1984): Divided genomes and intrinsic noise. *Journal of Molecular Evolution* 20: 135-146.
- Price, D. L., Memmott, F. D., Scott, J. W., Olson, S. M. and Stevens, M. R. (2007): Identification of molecular markers linked to a new *Tomato spotted wilt virus* resistance source in tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 57: 35.

- Prins, M. and Kormelink, R. (2004a): Genetic organization of the Tospoviral genome. http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t_1_3.html
- Prins, M. and Kormelink, R. (2004b): Transmission and epidemiology. http://www.dpw.wau.nl/viro/research/t_1_5.html
- 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.
- 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.
- Reddy, D. V. R. and Wightman, J. A. (1988): *Tomato spotted wilt virus*: Thrips transmission and control. *Advances in Disease Vector Research* 5: 203-220.
- Resende, R. de O., de Haan, P., de Avila, A. C., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1991): Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of Tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *Journal of General Virology* 72: 2375-2383.
- Ribeiro, D., Borst, J. W., Goldbach, R. and Kormelink, R. (2009): *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* 383: 121-30.
- Ribeiro, D., Jung, M., Moling, S., Borst, J. W., Goldbach, R. and Kormelink, R. (2013): The cytosolic nucleoprotein of the plant-infecting bunyavirus Tomato spotted wilt recruits endoplasmic reticulum-resident proteins to endoplasmic reticulum export sites. *The Plant Cell* 25: 3602-14.
- Riley, D. G. and Pappu, H. R. (2000): Evaluation of tactics for management of thrips-vectored Tomato spotted wilt virus in tomato. *Plant Disease* 84: 847-852.
- Robb, K., Casey, C., Whitfield, A., Campbell, L. and Ullman, D. (1998): A new weapon to fight INSV and TSWV. *Growers talk* (February): 64-73.
- Rodríguez-Román, E., Mejías, A. and Marys, E. (2018): First detection of tomato spotted wilt virus in tomato in Venezuela. *Journal of Plant Pathology* 100: 363.
- Roggero, P., Masenga, V. and Tavella, L. (2002): Field isolates of tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease* 86: 950-954.
- Rosello, S., Diez, M. J. and Nuez, F. (1998): Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 499-509.
- Rosello, S., Ricarte, B., Diez, M. J. and Nuez, F. (2001): Resistance to Tomato spotted wilt virus introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to *Sw-5* and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars. *Euphytica* 119: 357-367.
- Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneeweis, D. J. and Whitfield, A. E. (2015): Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology* 15: 80-89.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. and Sanchez-Garcia, A. (2017): DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.
- Rusevski, R. (2001): Virus bronzavosti paradajza-patogen paprike u Makedonji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Rybicki, E. P. (2015): A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology* 160: 17-20.

- Saidi, M. and Warade, S. D. (2008): Tomato breeding for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV): an overview of conventional and molecular approaches. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 44: 83-92.
- Sakimura, K. (1963): *Frankliniella fusca*, an additional vector of Tomato spotted wilt virus with notes on *Thrips tabaci*, another vector. *Phytopathology* 53: 412-415.
- Samuel, G., Bald, J. G. and Pittman, H. A. (1930): Investigations on „spotted wilt“ of tomatoes. *Australian Council of Science and industrial Research Bulletin* 44: 64.
- Scholthof, K. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T. and Ahlquist, P. (2011): Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.
- Scott, A. (2000): Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology* 1: 151-157.
- Seo, J., Ohshima, K., Lee, H., Son, M., Choi, H., Lee, H. S., Sohn, S. H. and Kim, K. H. (2009): Molecular variability and genetic structure of the population of Soybean mosaic virus based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393: 91-103.
- Sevik, M. A. and Arli-Sokmen, M. (2012): Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. *Phytoparasitica* 40: 87-93.
- Sherman, J. M., Moyer, J. W. and Daub, M. E. (1998): Tomato spotted wilt virus resistance in chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene. *Plant Disease* 82: 407-414.
- Silva, M. S., Martins, C. R. F., Bezerra, I. C. M., Nagata, I., de Avila, A. C. and Resende, R. De O. (2001): Sequence diversity of NSm movement protein of Tospoviruses. *Archive of Virology* 146: 1267-1281.
- Simon-Loriere, E. and Holmes, E. C. (2011): Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology* 9: 617-626.
- Sin, S. H., McNulty, B. C., Kennedy, G. G. and Moyer, J. W. (2005): Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5168-73.
- Sivaprasad, Y., Garrido, P., Mendez, K., Pachacama, S., Garrido, A. and Ramos, L. (2018): First report of tomato spotted wilt virus infecting Chrysanthemum in Ecuador. *Journal of Plant Pathology* 100: 113.
- Sivparsad, B. J. and Gubba, A. (2008): Isolation and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in South Africa. *African Journal of Agricultural Research* 3: 428-434.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2015): Pravilnik o listama štetnih organizama i listama bilja, biljnih proizvoda i propisanih objekata, broj 57/15.
- Smith, P. G. (1944): Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 44: 413-416.
- Smith, T. N., Jones, R. A. C. and Wylie, S. J. (2006): Genetic diversity of the nucleocapsid gene of *Iris yellow spot virus*. *Australasian Plant Pathology* 35: 359-362.
- Soellick, T. R., Uhrig, J. F., Bucher, G. L., Kellmann, J. W. and Schreier, P. H. (2000): The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 2373-2378.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J. and Nuez, F. (2003): Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 207-219.

- Soler, S., Díez, M. J., Roselló, S. and 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.
- Sonoda, S. (2003): Analysis of the nucleocapsid protein gene from Tomato spotted wilt virus as target and inducer for posttranscriptional gene silencing. *Plant Science* 164: 717-725.
- Sonoda, S., Nishiguchi, M. and Tsumuki, H. (2005): Evaluation of virus resistance conferred by the NSs gene sequences from *Tomato spotted wilt virus* in transgenic plants. *Breeding Science* 55: 27-33.
- Stanković, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2013): Virusi ukrasnih biljaka sa osvrtom na rod *Tospovirus*. *Biljni lekar* 41: 651-663.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Jović, J. and Krstić, B. (2011b): First report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. *Plant Disease* 95: 226.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J. and Krstić B. (2011a): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica* 55: 337-347.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D. and Krstić, B. (2012): First Report of *Tomato spotted wilt virus* Infecting Onion and Garlic in Serbia. *Plant Disease* 96: 918.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D. and Krstić, B. (2013): First Report of *Tomato spotted wilt virus* on Chrysanthemum in Serbia. *Plant Disease* 97: 150.
- Stevens, M. R., Price, D. L., Memmott, F. D., Scott, J. W. and Olson, S. M. (2007): Identification of markers linked to *Sw-7* a new *Tomato spotted wilt virus* resistance gene, derived from *S. chilense*. In *Abstracts from the 2007 Tomato Breeders Roundtable*. State College, PA: Pa. State Univ. <http://tgc.ifas.ufl.edu/2007/2007IndividualAbsPDF/Identification%20of%20Markers%20Linked%20to%20Sw.pdf>
- Stevens, M. R., Scott, S. J. and Gergerich, R. C. (1992): Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59: 9-17.
- Storms, M. M. H., Kormelink, R., Peters, D., van Lent, J. W. M. and Goldbach, R. W. (1995): The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214: 485-93.
- Sundaraj, S., Srinivasan, R., Culbreath, A. K., Riley, D. G. and Pappu, H. R. (2014): Host plant resistance against *Tomato spotted wilt virus* in peanut (*Arachis hypogaea*) and its impact on susceptibility to the virus, virus population genetics, and vector feeding behavior and survival. *Phytopathology* 104: 202-10.
- Škorić, D., Krajačić, M. and Šarić, A. (1997): Tomato spotted wilt tospovirus isolated from pepper plants in Dalmatia. *Petria-Giornale di Patologia delle Piante* 7 (1), 47-50.
- Takacs, A., Jenser, G., Kazainczi, G. and Horvath, J. (2006): Natural weed hosts of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Hungary. V Alps-Adria Scientific Workshop, Opatia-Croatia, *Cereal Research Communications* 34: 685-688.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. and Okuno, T. (2002): Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters* 532: 75-79.
- 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.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725-9.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M. and Moury, B. (2011): Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92: 961-973.
- Teycheney, P. Y., Laboureau, N., Iskra-Caruana, M. L. and Candresse, T. (2005): High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. *Journal of General Virology* 86: 3179-3187.
- Thomas-Carrol, M. L. and Jones, R. A. C. (2003): Selection, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of tomato spotted wilt virus in pepper. *Annals of Applied Biology* 142: 235-243.
- Thompson, G. J. and Van Zijl, J. J. B. (1996): Control of Tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. *Acta Horticulturae* 431: 379-384.
- 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.
- Tomić, Đ., Jeremić, S., Simić, A., Petković, N., Đekić, I., Bulajić, A. i Krstić, B. (2007): Status viroza paprike u Srbiji. Zbornik rezimea XIII Simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, str. 114-115.
- Tomitaka, Y. and Ohshima, K. (2006): A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in east Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Molecular Ecology* 15: 4437-4457.
- Trkulja, V., Mihić Salapura, J., Ćurković, B., Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A. and Krstić, B. (2013): First report of tomato spotted wilt virus on gloxinia in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease* 97: 429.
- Tsakiridis, J. P. and Gooding, G. V. Jr. (1972): Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 11: 42-47.
- Tsompana, M. and Moyer, J. W. (2008): *Tospoviruses*. In: Mahy, B. W. J. and Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, Vol. 5, 3rd edition. Elsevier Ltd., Oxford, UK. pp. 157-162.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. and Moyer, J. W. (2005): The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53-66.
- Turina, M., Kormelink, R. and Resende, R. O. (2016): Resistance to Tospoviruses in Vegetable Crops: Epidemiological and Molecular Aspects. *Annual Review of Phytopathology* 54: 347-371.
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiaro, M., Minafra, A., Savino, V. and Martelli, G. P. (2005): Genetic variability and population structure of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates. *Journal of General Virology* 86: 217-224.
- Ullman, D. E., German, T. L., Sherwood, J. L., Westcot, D. M. and Cantone, F. A. (1993): *Tospovirus* Replication in Insect Vector Cells: Immunocytochemical Evidence that the Nonstructural Protein Encoded by the S RNA of Tomato Spotted Wilt Tospovirus Is Present in Thrips Vector Cells. *Phytopathology* 83 (4): 456-463.
- Uzunoğullari, N., Önder, S. and Gümüş, M. (2016): Detection and Characterization of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in *Pelargonium* spp., *Gloxinia* spp. and *Dahlia* spp. Conference: Turkey 6th Plant Protection Congress with International Participation, 5-8 September 2016

At: Konya, Turkey Volume: Turkey 6th Plant Protection Congress with International Participation Abstract Book, p:562.

- Verkleij, F. N. and Peters, D. (1983): Characterisation of a defective form of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 64: 677-686.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J. and Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of Zucchini yellow mosaic virus isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935-947.
- Vučurović, A., Stanković, I., Milojević, K., Nikolić, D., Berenji, J., Bulajić, A. i Krstić, B. (2012): *Tomato spotted wilt virus* - novi patogen tikava u Srbiji. Zbornik rezimeja radova XIV Simpozijuma o zaštiti bilja i IX Kongresa o korovima, Zlatibor, Srbija, str. 109-110.
- Vučurović, I. (2019): Diverzitet vrsta i molekularna karakterizacija prevalentnih virusa infektivnih za vrste roda *Allium* u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- Webb, S. E., Kok-Yokomi, M. L. and Tsai, J. H. (1997): Evaluation of *Frankliniella bispinosa* as a potential vector of *Tomato spotted wilt virus*. *Phytopathology* 87: 102.
- Webb, S., Tsai, J. and Mitchell, F. (1998): Binomics of *Frankliniella bispinosa* and its transmission of Tomato spotted wilt virus. Symposium on Tospoviruses and Thrips in Floral and Vegetable Crops, 2-6 May 1998, Wageningen, The Netherlands. Abstract of papers: 67.
- White, J. L., Tousignant, M. E., Geletka, L. M. and Kaper, J. M. (1995): The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature-sensitive in tomato. *Archives of Virology* 140: 53-63.
- Whitfield, A. E., Campebell, L. R., Sherwood, J. L. and Ullman, D. E. (2003): Tissue blot immunoassay for detection of Tomato spotted wilt virus in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. *Plant Disease* 87: 618-622.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E. and German, T. L. (2004): Expression and characterization of a soluble form of *Tomato spotted wilt virus* glycoprotein GN. *Journal of Virology* 78: 13197-206.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E. and German, T. L. (2005): Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 459-89.
- Wijkamp, I., Almazara, N., Goldbach, R. and Peters, D. (1995): Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069-1074.
- Wijkamp, I., van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R. and Peters, D. (1993): Multiplication of Tomato spotted wilt virus in its vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology* 74: 341-349.
- Williams-Woodward, J. L. (2000): 1999 Georgia plant disease loss estimates. Univ. Georgia Crop Ext. Serv. Publ. Path. 99-002. June 1999.
- Wu, X., Xu, S., Zhao, P., Zhang, X., Yao, X., Sun, Y., Fang, R. and Ye, J. (2019): The Orthotospovirus nonstructural protein NSs suppresses plant MYC-regulated jasmonate signaling leading to enhanced vector attraction and performance. *PLoS Pathogens* 15 (6): e1007897.
- Zaccardelli, M., Perrone, D., Del Galdo, A., Campanile, F., Parrella, G. and Giordano, I. (2008): Tomato genotypes resistant to tomato spotted wilt virus evaluated in open field crops in Southern Italy. *Acta Horticulturae* 789: 147-149.

- Zhang, Z., Wang, D., Yu, C., Wang, Z., Dong, J., Shi, K. and Yuan, X. (2016): Identification of three new isolates of Tomato spotted wilt virus from different hosts in China: molecular diversity, phylogenetic and recombination analyses. *Virology Journal* 13: 8.
- Zindović, J. (2010): Molekularna karakterizacija izolata virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*) iz različitih domaćina i različitog geografskog porijekla. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija.
- 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* 95: 882.
- Zindović, J., Ciuffo, M. and Turina, M. (2014): Molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* in Montenegro. *Journal of Plant Pathology* 96 (1): 201-205.
- Zindović, J., Paolo, M., Dukić, N., Bulajić, A., Krstić, B. i Massimo, T. (2006): Karakterizacija jednog izolata virusa bronzavosti paradajza na molekularnom nivou. Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 37-38.
- Zitter, T. A., Daughtrey, M. L. and Sanderson, J. P. (1989): Tomato spotted wilt virus. *Vegetable MD Online*, Department of Plant Pathology, Ithaca, NY. Fact Sheet Page: 735.90. http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/virus_spottedwilt.htm

PRILOG 1. Sekvence N gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize (deo 1)

Izolat^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	Pristupni broj
97	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ296598
45-12	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	MG922823
L3	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	D13926
20 Da96/1		<i>Dahlia</i> sp.	AJ296602
GD98		<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ297609
39-06	Srbija		GQ373172
BS97	Bugarska		AJ297610
Is-56	Crna Gora		GU369729
53-05	Srbija		GQ373173
33-06			GQ355467
T992	Italija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY848922
NC-3	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744478
TSWV-GP	Južna Afrika	<i>Arachis hypogaea</i>	EF059705
TSWV-MP			EF059706
555-12	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	MG922824
NC-1	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744476
646-11	Srbija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KF184652
LE98/527	Nemačka	<i>Lysimachia</i> sp.	AJ297611
TSWV-D	Holandija	<i>Dahlia</i> sp.	AF020660
C27084	Češka	<i>Calla</i> sp.	AJ296599
Br20	Brazil	<i>Capsicum annuum</i>	DQ915948
SPAIN-2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744480
VE430		<i>Capsicum annuum</i>	DQ376184
LC		/	X94550
SPAIN-1		<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744479
p105/2006RB	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ915946
P267			DQ376180
Iw	Japan	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB277581
AC	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064469
NC-2		<i>Arachis hypogaea</i>	AY744477
MC		<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064472
10		<i>Arachis hypogaea</i>	AF020659
CA-4		<i>Chrysanthemum</i> spp.	AY744471
CA-1		<i>Aster</i> sp.	AY744468
L		<i>Lactuca sativa</i>	X61799
H		/	AF306490
BL		<i>Lactuca sativa</i>	L20953
TSWV-4	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	KC261949
TSWV-7			KC261958
KAIxe		<i>Ixeris chinensis</i>	EF195227
KAPo		<i>Solanum tuberosum</i>	EF195228

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;

/-Nema podataka.

PRILOG 1. Sekvence N gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize (deo 2)

Izolat^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	Pristupni broj
France81	Francuska	<i>Capsicum annuum</i>	FR693053
SO46		<i>Solanum lycopersicum</i>	FR693255
Japan	Japan	/	AB010997
O		<i>Capsicum annuum</i>	AB277582

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;
 /-Nema podataka.

PRILOG 2. Sekvence NSs gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize

Izolat^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	Pristupni broj
Is-56	Crna Gora	<i>Nicotiana tabacum</i>	GU369740
BS97	Bugarska		AJ418777
L3			D13926
GD98			AJ418780
p202/3WT	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	HQ830187
PepCal 24			MG989676
PepCal 12			MG989674
Pujol1TL3	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KP008131
NC-3	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744478
LE98/527	Nemačka	<i>Lysimachia</i> sp.	AJ418781
TSWV-12	Južna Koreja	<i>Lactuca sativa</i>	KC261967
TSWV-17		<i>Stellaria media</i>	KC261973
NC-1	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744476
TSWV-D	Holandija		AF020660
TSWV-7	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	KC261958
TSWV-4			KC261949
SO46	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	FR693031
France81		<i>Capsicum annuum</i>	FR692829
Br20	Brazil		DQ915948
SPAIN-2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744480
VE430		<i>Capsicum annuum</i>	DQ376184
LL-N.05		<i>Solanum lycopersicum</i>	KP008129
SPAIN-1			AY744479
PVR		<i>Capsicum annuum</i>	KP008134
TSWV-M	SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AY870391
CA-4		<i>Chrysanthemum</i> spp.	AY744471
CA-1		<i>Aster</i> sp.	AY744468
p105/2006RB	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ915946
P267			DQ376180
10	SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AF020659
NC-2			AY744477
TSWV-T			AY870392

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;

/-Nema podataka.

PRILOG 3. Sekvence kompletnog M segmenta (NSm i Gn-Gc gena) izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize (deo 1)

Izolat ^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	GenBank pristupni broj	Fenotip izolata (RI ili RB) ^b
CA-4	SAD	<i>Chrysanthemum</i> spp.	AY744482	RI
CA-5			AY744483	
CA-6			AY744484	
LL-N.05	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	FM163373	
ZO			FM163372	
TSWV-18	Južna Koreja	<i>Chrysanthemum</i> spp.	KC261975	
Pepper1 CY-CN		<i>Capsicum annuum</i>	HM581938	
Pepper2 CY-CN			HM581941	
Unknown			AB190818	
CA-3	SAD	<i>Chrysanthemum</i> spp.	AY744481	
CA-7		<i>Dahlia</i> sp.	AY744485	
NC-4		<i>Nicotiana tabacum</i>	AY744487	
NC-5			AY744488	
NC-6		<i>Capsicum annuum</i>	AY744489	
NC-7		<i>Nicotiana tabacum</i>	AY744490	
NC-8		<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744491	
TSWV-T		<i>Arachis hypogaea</i>	AY870389	
TSWV-M			AY870390	
Regular2A		/	AF208498	RB
TSWV-5	Južna Koreja	<i>Stellaria aquatica</i>	KC261951	RI
TSWV-6		<i>Stellaria media</i>	KC261954	
TSWV-8		<i>Lactuca indica</i>	KC261960	
TSWV-10		<i>Stellaria aquatica</i>	KC261963	
TSWV-16		<i>Solanum lycopersicum</i>	KC261969	
NJ-JN			HM581935	
Ab1NL2	Španija		HM015510	
TSWV-7	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	KC261957	
SPAIN-2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744493	
TSWV-4	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	KC261948	
SPAIN-1	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY744492	
Gr1NL2			HM015513	
Mon1NL2			HM015514	
Llo2TL3			HM015518	RB
ViTL3			HM015522	

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;

^bRI („*resistance-inducing*“) izolati TSWV-izolati koji podstiču otpornost sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, RB („*resistance-breaking*“) izolati TSWV-izolati koji su sposobni da prevaziđu otpornost sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti;

/-Nema podataka.

PRILOG 3. Sekvence kompletnog M segmenta (NSm i Gn-Gc gena) izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize (deo 2)

Izolat ^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	GenBank pristupni broj	Fenotip izolata (RI ili RB) ^b
Gr5TL1	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	HM015523	RB
Rib1TL1			HM015524	
ALPA		<i>Capsicum annuum</i>	HQ537114	RI
GRAU		<i>Solanum lycopersicum</i>	FM163370	RB
GA-1L			FM163371	RI
YNrp	Kina	<i>Capsicum annuum</i>	KM657117	
YNta		<i>Nicotiana tabacum</i>	KU552117	
Da1NL2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	HM015512	
/	Brazil	/	S48091	
BR01		/	NC002050	
TSWV-17	Južna Koreja	<i>Stellaria media</i>	KC261972	
TSWV-12		<i>Lactuca sativa</i>	KC261966	
p202/3WT	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	HQ830188	
NC-3	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744486	
p202/3RB	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	HQ830185	
Cr1NL2	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	HM015511	
Ag1TL3			HM015515	RB
Ber1TL3			HM015517	
Oller1TL3			HM015519	
Pujol1TL3			HM015520	
Sala1TL3			HM015521	
D	SAD	/	AF208497	RI

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;

^bRI („*resistance-inducing*“) izolati TSWV-izolati koji podstiču otpornost sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti, RB („*resistance-breaking*“) izolati TSWV-izolati koji su sposobni da prevaziđu otpornost sorti paradajza sa ugrađenim *Sw-5b* genom otpornosti;

/-Nema podataka.

PRILOG 4. Sekvence RdRp gena izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) koje su preuzete iz GenBank baze podataka i korišćene za filogenetske analize

Izolat^a	Zemlja porekla	Biljka domaćin	GenBank pristupni broj
TBV65	Bosna i Hercegovina	<i>Nicotiana tabacum</i>	KY437074
CG-1	Kina	<i>Lactuca sativa</i>	JN664254
YNrp		<i>Capsicum annuum</i>	KM657120
TSWV-LE		<i>Lactuca sativa</i>	KU976394
Lazio17	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	MK348943
Tarquinoa			MK348942
MR-01	Kalifornija	<i>Cichorium intybus</i>	MG593197
Hawaii	SAD	/	AY070218
BasC	SAD	<i>Ocimum basilicum</i>	MH745370
LL-N.05	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KP008128
LK-1	Južna Afrika	<i>Amaranthus thunbergii</i>	KY250488
TOS-301	Iran	/	KY923207
T-3/55			KY923206
PepCal22	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	MH763622
PV1	Bosna i Hercegovina		KY437070
LYE51	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	MK792774
p202/3WT	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	KJ575619
Pujol1TL3	Španija	<i>Solanum lycopersicum</i>	KP008130
PepCal10	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	MH763621
TSWV-5	Južna Koreja	<i>Stellaria aquatic</i>	KC261950
TSWV-4		<i>Capsicum annuum</i>	KC261947
Pepper1 CY-CN			HM581937
WA-USA	SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	KP827649
PA01		<i>Capsicum annuum</i>	KT160280
p105	Italija		KJ575620
PVR	Španija		KP008132

Legenda: ^aPodaci preuzeti iz GenBank baze podataka;

/-Nema podataka.

PRILOG 5. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) N gena svih ispitivanih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije

	185-15	111-19	58-15	71-15	177-14	170-14	179-15	181-15	109-19	169-13	108-19	555-12	646-11	45-12	156-07	512-11	335-16	147-05	525-11	303-05	437-10	435-10	259-15	526-11	260-15	108-17	147-17	186-16	112-19	113-19	110-19	343-15	212-15	232-17	228-15	230-17	220-16	224-16	192-17	42-12	345-15			
185-15	/	98.1	96.9	96.9	100.0	99.4	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	96.9	97.5	98.8	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	97.5	97.5	98.1	98.1	97.5	98.8	98.8	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.2		
111-19	99.3	/	96.3	96.3	98.1	98.8	98.8	98.8	98.8	98.1	98.1	95.1	96.9	98.1	96.3	96.3	95.7	95.7	97.5	96.9	96.9	97.5	97.5	96.9	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	98.1	97.5	93.2	92.0	93.8	92.6	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	92.6		
58-15	98.9	98.6	/	100.0	96.9	97.5	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	97.5	99.4	98.1	100.0	100.0	99.4	98.1	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	96.9	96.9	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.8		
71-15	98.9	98.6	100.0	/	96.9	97.5	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	97.5	99.4	98.1	100.0	100.0	99.4	98.1	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	96.9	96.9	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.8		
177-14	100.0	99.3	98.9	98.9	/	99.4	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	96.9	97.5	98.8	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	97.5	97.5	98.1	98.1	97.5	98.8	98.8	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.2		
170-14	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	/	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	96.3	98.1	99.4	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	99.4	99.4	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	93.8		
179-15	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	/	100.0	100.0	99.4	99.4	96.3	98.1	99.4	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	99.4	99.4	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	93.8		
181-15	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	100.0	/	100.0	99.4	99.4	96.3	98.1	99.4	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	99.4	99.4	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	93.8		
109-19	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	100.0	100.0	/	99.4	99.4	96.3	98.1	99.4	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	99.4	99.4	100.0	100.0	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	93.8		
169-13	99.6	99.3	98.9	98.9	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	/	98.8	95.7	97.5	98.8	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	97.5	97.5	98.1	98.1	97.5	98.8	98.8	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.2		
108-19	99.6	99.3	98.9	98.9	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	/	95.7	97.5	98.8	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	97.5	97.5	98.1	98.1	97.5	98.8	98.8	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.2		
555-12	98.9	98.2	99.3	99.3	98.9	98.7	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6	/	98.1	96.9	97.5	97.5	96.9	96.9	97.5	96.9	96.9	97.5	97.5	96.9	95.7	95.7	96.3	96.3	96.3	95.7	95.7	97.5	92.0	90.7	92.6	91.4	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6		
646-11	99.1	98.7	99.8	99.8	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.1	99.5	/	98.8	99.4	99.4	98.8	98.8	99.4	98.8	98.8	99.4	99.4	98.8	97.5	97.5	98.1	98.1	98.1	98.1	97.5	97.5	99.4	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
45-12	99.5	99.1	99.1	99.1	99.5	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	98.7	99.3	/	98.1	97.5	97.5	99.4	98.8	98.8	98.8	99.4	99.4	98.8	98.8	98.8	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	99.4	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
156-07	99.9	98.6	100.0	100.0	98.9	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	98.9	99.3	99.8	99.1	/	100.0	99.4	98.1	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	96.9	96.9	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.8		
512-11	98.9	98.6	100.0	100.0	98.9	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	98.9	99.3	99.8	99.1	100.0	/	99.4	98.1	98.8	98.1	98.1	98.8	98.8	98.1	96.9	96.9	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	98.8	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.8		
335-16	98.7	98.4	99.8	99.8	98.7	98.9	98.9	98.9	98.9	98.7	98.7	99.1	99.6	98.9	99.8	99.8	/	97.5	98.1	98.1	97.5	98.1	98.1	97.5	97.5	97.5	96.9	96.9	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	93.2	92.0	93.8	92.6	93.8	93.8	93.8	93.8	93.2		
147-05	98.6	98.2	99.3	99.3	98.6	98.7	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6	98.6	98.9	99.5	98.7	99.3	99.1	/	98.1	97.5	97.5	98.1	98.1	97.5	96.3	96.3	96.9	96.9	96.9	96.9	96.3	96.3	98.1	92.6	91.4	93.2	92.0	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2		
525-11	99.3	98.9	99.6	99.6	99.3	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	99.3	99.8	99.5	99.6	99.6	99.5	99.3	/	99.4	99.4	100.0	100.0	99.4	98.1	98.1	98.8	98.8	98.8	98.1	98.1	100.0	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	95.1	95.1	95.1		
303-05	99.3	98.9	99.3	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	98.9	99.5	99.5	99.6	99.6	99.3	99.3	99.3	/	98.8	99.4	99.4	98.8	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	97.5	97.5	99.4	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
437-10	99.1	98.7	99.1	99.1	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.1	99.1	98.7	99.3	99.3	99.1	99.1	98.9	98.7	99.5	99.5	/	99.4	99.4	98.8	97.5	97.5	98.1	98.1	98.1	98.1	97.5	97.5	99.4	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
435-10	99.3	98.9	99.3	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	98.9	99.5	99.5	99.3	99.3	99.1	98.9	99.6	99.6	99.8	/	100.0	99.4	98.1	98.1	98.8	98.8	98.8	98.1	98.1	100.0	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	95.1		
259-15	99.5	99.1	99.5	99.5	99.5	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.1	99.6	99.6	99.5	99.5	99.3	99.1	99.8	99.8	99.6	/	99.4	98.1	98.1	98.8	98.8	98.8	98.8	98.1	98.1	100.0	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1		
526-11	99.3	98.9	99.3	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.3	98.9	99.5	99.5	99.3	99.3	99.1	98.9	99.6	99.6	99.5	99.6	99.8	/	97.5	97.5	98.1	98.1	98.1	98.1	97.5	97.5	99.4	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
260-15	99.5	99.1	98.7	98.7	99.5	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	98.4	98.9	99.3	98.7	98.7	98.9	98.9	98.4	99.1	99.3	98.9	99.1	99.3	99.1	/	100.0	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	93.2	
108-17	99.6	99.3	98.9	98.9	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.6	98.6	99.1	99.5	98.9	98.9	98.9	99.1	98.6	99.3	99.5	99.1	99.3	99.5	99.3	99.8	/	99.4	99.4	99.4	98.8	98.8	98.1	93.8	92.6	94.4	93.2	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4		
147-17	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	98.7	99.3	99.6	99.1	99.1	98.9	98.7	99.5	99.5	99.3	99.5	99.6	99.5	99.6	99.5	99.6	99.5	99.6	99.8	/	100.0	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	93.8
186-16	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	98.7	99.3	99.6	99.1	99.1	98.9	98.7	99.5	99.5	99.3	99.5	99.6	99.5	99.6	99.5	99.6	99.8	100.0	/	100.0	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	95.1	93.8	
112-19	99.8	99.5	99.1	99.1	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	98.7	99.3	99.6	99.1	99.1	98.9	98.7	99.5	99.5	99.3	99.5	99.6	99.5	99.6	99.8	100.0	/	99.4	99.4	98.8	94.4	93.2	95.1	93.8	95.1	93.8	95.1	95.1	95.1	95.1	93.8		
113-19	99.6	99.3	98.9	98.9	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	98.6	99.1	99.5	98.9	98.9	98.7	98.6	99.3	99.3	99.1	99.3	99.5	99.3	99.5	99.6	99.8	99.8	99.8	/	100.0	98.1	93.8	92.6</										

PRILOG 6. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) NSs gena svih ispitivanih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije

	147-05	232-17	192-17	230-17	224-16	303-05	212-15	42-12	156-07	345-15	343-15	525-11	335-16	512-11	437-10	259-15	260-15	111-19	109-19	108-19	185-15	181-15	71-15	179-15	58-15	177-14	110-19	112-19	113-19	169-13	555-12	646-11	45-12	170-14
147-05	/	90.4	90.4	90.4	90.4	96.8	90.4	89.3	98.4	91.4	97.9	97.9	98.4	98.4	96.3	97.9	96.8	96.3	96.8	96.8	96.8	96.8	98.4	96.8	98.4	97.9	96.8	97.3	96.8	96.3	97.9	95.7	96.8	96.8
232-17	96.0	/	100.0	100.0	100.0	88.8	100.0	98.9	90.4	96.3	89.8	89.8	90.4	90.4	88.2	89.8	89.8	89.3	89.8	89.8	89.8	89.8	90.4	89.8	90.4	89.8	89.8	89.3	89.8	89.3	90.4	88.8	88.8	89.8
192-17	96.0	100.0	/	100.0	100.0	88.8	100.0	98.9	90.4	96.3	89.8	89.8	90.4	90.4	88.2	89.8	89.8	89.3	89.8	89.8	89.8	89.8	90.4	89.8	90.4	89.8	89.8	89.3	89.8	89.3	90.4	88.8	88.8	89.8
230-17	96.0	100.0	100.0	/	100.0	88.8	100.0	98.9	90.4	96.3	89.8	89.8	90.4	90.4	88.2	89.8	89.8	89.3	89.8	89.8	89.8	89.8	90.4	89.8	90.4	89.8	89.8	89.3	89.8	89.3	90.4	88.8	88.8	89.8
224-16	96.0	100.0	100.0	100.0	/	88.8	100.0	98.9	90.4	96.3	89.8	89.8	90.4	90.4	88.2	89.8	89.8	89.3	89.8	89.8	89.8	89.8	90.4	89.8	90.4	89.8	89.8	89.3	89.8	89.3	90.4	88.8	88.8	89.8
303-05	98.3	95.2	95.2	95.2	95.2	/	88.8	87.7	98.4	90.4	97.9	98.9	98.4	98.4	98.4	98.9	97.9	97.3	97.9	97.9	97.9	97.9	98.4	97.9	98.4	98.9	97.9	98.4	97.3	97.9	96.8	97.9	97.9	
212-15	96.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.2	/	98.9	90.4	96.3	89.8	89.8	90.4	90.4	88.2	89.8	89.8	89.3	89.8	89.8	89.8	89.8	90.4	89.8	90.4	89.8	89.8	89.3	89.8	89.3	90.4	88.8	88.8	89.8
42-12	95.5	99.5	99.5	99.5	99.5	94.7	99.5	/	89.3	95.2	88.8	88.8	89.3	89.3	87.2	88.8	88.8	88.2	88.8	88.8	88.8	88.8	89.3	88.8	89.3	88.8	88.2	88.8	88.2	89.3	87.7	87.7	88.8	
156-07	99.4	96.0	96.0	96.0	96.0	98.6	96.0	95.5	/	92.0	98.4	99.5	100.0	100.0	97.9	99.5	98.4	97.9	98.4	98.4	98.4	98.4	100.0	98.4	100.0	99.5	98.4	98.9	98.4	97.9	99.5	97.3	98.4	98.4
345-15	96.3	98.5	98.5	98.5	98.5	95.5	98.5	98.0	96.3	/	91.4	91.4	92.0	92.0	89.8	91.4	90.4	90.9	90.4	90.4	90.4	92.0	90.4	92.0	91.4	90.4	90.9	90.4	89.8	92.0	89.3	90.4	90.4	
343-15	98.6	95.5	95.5	95.5	95.5	99.1	95.5	95.1	98.6	95.8	/	98.9	98.4	98.4	97.3	98.9	97.9	97.3	97.9	97.9	97.9	97.9	98.4	97.9	98.4	98.9	97.9	98.4	97.9	97.3	97.9	96.8	97.9	97.9
525-11	98.8	95.7	95.7	95.7	95.7	99.5	95.7	95.2	99.1	96.0	99.5	/	99.5	99.5	98.4	100.0	98.9	98.4	98.9	98.9	98.9	98.9	99.5	98.9	99.5	100.0	98.9	99.5	98.9	98.4	98.9	97.9	98.9	98.9
335-16	99.4	96.0	96.0	96.0	96.0	98.6	96.0	95.5	100.0	96.3	98.6	99.1	/	100.0	97.9	99.5	98.4	97.9	98.4	98.4	98.4	98.4	100.0	98.4	100.0	99.5	98.4	98.9	98.4	97.9	99.5	97.3	98.4	98.4
512-11	99.4	96.0	96.0	96.0	96.0	98.6	96.0	95.5	100.0	96.3	98.6	99.1	100.0	/	97.9	99.5	98.4	97.9	98.4	98.4	98.4	98.4	100.0	98.4	100.0	99.5	98.4	98.9	98.4	97.9	99.5	97.3	98.4	98.4
437-10	98.0	94.9	94.9	94.9	94.9	99.4	94.9	94.4	98.3	95.2	98.8	99.2	98.3	98.3	/	98.4	97.3	96.8	97.3	97.3	97.3	97.3	97.9	97.3	97.9	98.4	97.3	97.9	98.4	97.3	96.8	97.3	96.3	97.3
259-15	98.6	95.5	95.5	95.5	95.5	99.4	95.5	95.1	98.9	95.8	99.4	99.8	98.9	98.9	99.1	/	98.9	98.4	98.9	98.9	98.9	98.9	99.5	98.9	99.5	100.0	98.9	99.5	98.9	98.4	98.9	97.9	98.9	98.9
260-15	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	/	98.4	100.0	100.0	100.0	100.0	98.4	100.0	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
111-19	98.3	95.5	95.5	95.5	95.5	99.1	95.5	95.1	98.6	95.8	99.1	99.5	98.6	98.6	98.8	99.4	99.5	/	98.4	98.4	98.4	98.4	97.9	98.4	97.9	98.4	98.4	98.9	98.4	97.9	97.3	96.3	97.3	98.4
109-19	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	/	100.0	100.0	100.0	98.4	100.0	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
108-19	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	100.0	/	100.0	100.0	98.4	100.0	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
185-15	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	100.0	100.0	/	100.0	98.4	100.0	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
181-15	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	100.0	100.0	100.0	/	98.4	100.0	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
71-15	99.4	96.0	96.0	96.0	96.0	98.6	96.0	95.5	100.0	96.3	98.6	99.1	100.0	100.0	98.3	98.9	98.8	98.6	98.8	98.8	98.8	98.8	/	98.4	100.0	99.5	98.4	98.9	98.4	97.9	99.5	97.3	98.4	98.4
179-15	98.3	95.5	95.5	95.5	95.5	99.1	95.5	95.1	98.9	95.5	99.1	99.5	98.9	98.9	98.8	99.4	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	99.8	98.9	/	98.4	98.9	100.0	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
58-15	99.4	96.0	96.0	96.0	96.0	98.6	96.0	95.5	100.0	96.3	98.6	99.1	100.0	100.0	98.3	98.9	98.8	98.6	98.8	98.8	98.8	98.8	100.0	98.9	/	99.5	98.4	98.9	98.4	97.9	99.5	97.3	98.4	98.4
177-14	98.8	95.7	95.7	95.7	95.7	99.5	95.7	95.2	99.1	96.0	99.5	100.0	99.1	99.1	99.2	99.8	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.1	99.5	99.1	/	98.9	99.5	98.9	98.4	98.9	97.9	98.9
110-19	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.8	98.8	99.7	/	99.5	100.0	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
112-19	98.6	95.5	95.5	95.5	95.5	99.4	95.5	95.1	98.9	95.8	99.4	99.8	98.9	98.9	99.1	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	98.9	99.7	98.9	99.8	99.8	/	99.5	98.9	98.4	97.3	98.4	99.5
113-19	98.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.2	95.7	95.2	98.8	95.7	99.2	99.7	98.8	98.8	98.9	99.5	100.0	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.8	98.8	99.7	100.0	99.8	/	99.5	97.9	96.8	97.9	100.0
169-13	98.3	95.5	95.5	95.5	95.5	99.1	95.5	95.1	98.6	95.5	99.1	99.5	98.6	98.6	98.8	99.4	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	99.8	98.6	99.7	98.6	99.5	99.8	99.7	99.8	/	97.3	96.3	97.3	99.5
555-12	99.2	95.8	95.8	95.8	95.8	98.5	95.8	95.4	99.5	96.1	98.5	98.9	99.5	99.5	98.1	98.8	98.6	98.5	98.6	98.6	98.6	98.6	99.5	98.5	99.5	98.9	98.6	98.8	98.6	98.5	/	96.8	97.9	97.9
646-11	98.0	95.2	95.2	95.2	95.2	98.8	95.2	94.7	98.3	95.2	98.8	99.2	98.3	98.3	98.5	99.1	98.9	98.8	98.9	98.9	98.9	98.9	98.3	98.8	98.3	99.2	98.9	99.1	98.9	98.8	98.1	/	96.8	96.8
45-12	98.3	95.2	95.2	95.2	95.2	99.1	95.2	94.7	98.6	95.5	99.2	99.5	98.6	98.6	98.8	99.4	99.2	99.1	99.2	99.2	99.2	99.2	98.6	99.1	98.6	99.5	99.2	99.4	99.2	99.1	98.5	98.8	/	97.9
170-14	98.3	95.5	95.5	95.5	95.5	99.1	95.5	95.4	98.6	95.5	99.1	99.5	98.6	98.6	98.8	99.4	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	99.8	98.6	99.7	98.6	99.5	99.8	99.7	99.8	99.7	98.5	98.8	99.1	/

PRIOLOG 7. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) NSm gena svih ispitivanih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije

	109-19	108-19	110-19	111-19	112-19	113-19	169-13	170-14	179-15	177-14	181-15	185-15	45-12	58-15	555-12	646-11	71-15	259-15	260-15	512-11	437-10	335-16	343-15	345-15	156-07	212-15	42-12	224-16	192-17	230-17	232-17	525-11	303-05	147-05
109-19	/	97.5	100.0	99.2	98.3	98.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	97.9	99.6	99.2	99.2	99.2	99.2	98.3	99.2	98.8	98.3	99.2	98.8	98.8	97.5	98.8	99.2	99.2
108-19	98.9	/	97.5	96.7	95.8	96.3	97.1	97.1	97.1	97.1	96.7	97.1	96.7	96.7	96.3	97.1	96.3	96.3	97.1	96.7	96.7	96.7	96.7	95.8	96.7	96.3	95.8	96.7	96.3	96.3	95.0	96.3	96.7	96.7
110-19	100.0	98.9	/	99.2	98.3	98.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	97.9	99.6	99.2	99.2	99.2	99.2	98.3	99.2	98.8	98.3	99.2	98.8	98.8	97.5	98.8	99.2	99.2
111-19	99.3	98.2	99.3	/	97.5	97.9	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	97.9	99.6	99.2	99.2	99.2	99.2	98.3	99.2	98.8	98.3	99.2	98.8	98.8	97.5	98.8	99.2	99.2
112-19	99.2	98.1	99.2	98.5	/	97.1	97.9	97.9	97.9	97.9	97.5	97.9	97.5	97.5	97.1	97.9	97.1	96.3	97.9	97.5	97.5	97.5	97.5	96.7	97.5	97.1	96.7	97.5	97.1	97.1	95.8	97.1	97.5	97.5
113-19	99.0	97.9	99.0	98.3	98.8	/	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	97.9	97.9	97.5	98.3	97.5	98.3	98.3	97.9	97.9	97.9	97.9	97.1	97.9	97.5	97.1	97.9	97.5	97.5	96.3	97.5	97.9	97.9
169-13	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	/	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6
170-14	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	/	100.0	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6
179-15	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	100.0	/	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6
177-14	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	100.0	100.0	/	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6
181-15	99.7	98.6	99.7	99.3	98.9	98.8	99.9	99.9	99.9	/	99.6	99.2	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	98.3	99.6	99.2	99.2	99.2	99.2	98.3	99.2	98.8	98.3	99.2	98.8	98.8	97.5	98.8	99.2	99.2
185-15	99.6	98.5	99.6	99.2	98.8	98.6	99.7	99.7	99.7	99.6	/	99.6	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6
45-12	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	/	100.0	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	100.0
58-15	98.6	97.5	98.6	98.8	97.8	97.6	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.5	99.3	/	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0
555-12	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.3	99.2	99.9	/	99.2	99.2	98.3	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6	
646-11	99.3	98.2	99.3	99.4	98.5	98.3	99.4	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	99.0	98.9	/	99.2	98.3	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6	
71-15	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	99.2	99.9	99.7	98.9	/	98.3	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6	
259-15	98.1	97.1	98.1	98.2	97.2	97.6	98.2	98.2	98.2	98.1	97.9	98.8	98.9	98.8	98.5	98.8	/	98.3	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	97.9	98.8	98.3	97.9	98.8	98.3	98.3	97.1	98.3	98.8	98.8
260-15	99.3	98.2	99.3	99.4	98.5	98.3	99.4	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	99.0	98.9	99.7	98.9	98.8	/	99.6	99.6	99.6	99.6	98.8	99.6	99.2	98.8	99.6	99.2	99.2	97.9	99.2	99.6	99.6	
512-11	98.3	97.2	98.3	98.5	97.5	97.4	98.5	98.5	98.5	98.3	98.2	99.0	99.7	99.6	98.8	99.6	98.6	98.8	/	100.0	100.0	100.0	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
437-10	98.8	97.6	98.8	98.9	97.9	97.8	98.9	98.9	98.9	98.8	98.6	99.4	99.6	99.4	99.2	99.4	99.0	99.2	99.3	/	100.0	100.0	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
335-16	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	99.2	99.9	99.7	98.9	99.7	98.8	98.9	99.9	99.4	/	100.0	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
343-15	98.6	97.5	98.6	98.8	97.8	97.6	98.8	98.8	98.8	98.6	98.5	99.6	99.4	99.3	99.0	99.3	98.9	99.0	99.2	99.6	99.3	/	99.2	100.0	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
345-15	93.5	92.5	93.5	93.6	92.6	92.5	93.6	93.6	93.6	93.5	93.3	93.9	93.5	93.3	93.9	93.3	93.1	93.9	93.2	93.6	93.3	93.8	/	99.2	98.8	98.3	99.2	98.8	98.8	97.5	98.8	99.2	99.2	
156-07	98.6	97.5	98.6	98.8	97.8	97.6	98.8	98.8	98.8	98.6	98.5	99.3	100.0	99.9	99.0	99.7	98.9	99.0	99.7	99.6	99.9	99.4	93.5	/	99.6	99.2	100.0	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
212-15	93.5	92.5	93.5	93.6	92.6	92.5	93.6	93.6	93.6	93.5	93.3	94.2	93.8	93.6	93.9	93.6	93.3	93.9	93.8	94.2	93.6	94.0	97.6	93.8	/	99.6	99.6	100.0	100.0	98.8	99.2	99.6	99.6	
42-12	93.5	92.5	93.5	93.6	92.6	92.5	93.6	93.6	93.6	93.5	93.3	94.2	93.5	93.3	93.9	93.3	93.3	94.2	93.2	93.6	93.3	93.8	98.2	93.5	98.3	/	99.2	99.6	99.6	98.3	98.8	99.2	99.2	
224-16	94.2	93.2	94.2	94.3	93.3	93.2	94.3	94.3	94.3	94.2	94.0	94.6	94.4	94.3	94.6	94.3	94.0	94.6	94.4	94.9	94.3	94.7	97.5	94.4	99.3	97.9	/	99.6	99.6	98.3	99.6	100.0	100.0	
192-17	93.5	92.5	93.5	93.6	92.6	92.5	93.6	93.6	93.6	93.5	93.3	94.2	93.8	93.6	93.9	93.6	93.3	93.9	93.8	94.2	93.6	94.0	97.6	93.8	100.0	98.3	99.3	/	100.0	98.8	99.2	99.6	99.6	
230-17	93.5	92.5	93.5	93.6	92.6	92.5	93.6	93.6	93.6	93.5	93.3	94.2	93.8	93.6	93.9	93.6	93.3	93.9	93.8	94.2	93.6	94.0	97.6	93.8	100.0	98.3	99.3	100.0	/	98.8	99.2	99.6	99.6	
232-17	92.6	91.7	92.6	92.8	91.8	91.7	92.8	92.8	92.8	92.6	92.5	93.3	92.9	92.8	93.1	92.8	92.5	93.1	92.9	93.3	92.8	93.2	96.7	92.9	99.0	97.4	98.3	99.0	99.0	/	97.9	98.3	98.3	
525-11	98.3	97.2	98.3	98.5	97.5	97.4	98.5	98.5	98.5	98.3	98.2	99.0	98.9	98.8	98.8	98.8	98.3	98.8	98.6	99.0	98.8	98.9	93.8	98.9	93.8	93.8	94.2	93.8	93.8	92.9	/	99.6	99.6	
303-05	98.8	97.6	98.8	98.9	97.9	97.8	98.9	98.9	98.9	98.8	98.6	99.4	99.6	99.4	99.2	99.4	99.0	99.2	99.3	99.7	99.4	99.6	93.6	99.6	93.9	93.6	94.6	93.9	93.9	93.1	99.0	/	100	
147-05	98.6	97.5	98.6	98.8	97.8	97.6	98.8	98.8	98.8	98.6	98.5	99.0	99.2	99.0	99.0	99.0	98.6	99.0	98.9	99.3	99.0	99.2	94.3	99.2	94.6	94.3	95.3	94.6	94.6	93.8	98.6	99.3	/	

PRILOG 8. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselnih sekvenci (iznad dijagonale) NSm gena ispitivanih izolata virusa bronjavosti paradajza (TSWV) iz paradajza poreklom iz Srbije

	109-19	108-19	110-19	111-19	112-19	113-19	169-13	170-14	179-15	177-14	181-15	185-15	45-12	58-15	555-12	646-11	71-15	335-16
109-19	/	97.5	100.0	99.2	98.3	98.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	99.2
108-19	98.9	/	97.5	96.7	95.8	96.3	97.1	97.1	97.1	97.1	96.7	97.1	96.7	96.7	96.3	97.1	96.3	96.7
110-19	100.0	98.9	/	99.2	98.3	98.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	99.2
111-19	99.3	98.2	99.3	/	97.5	97.9	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	99.2
112-19	99.2	98.1	99.2	98.5	/	97.1	97.9	97.9	97.9	97.9	97.5	97.9	97.5	97.5	97.1	97.9	97.1	97.5
113-19	99.0	97.9	99.0	98.3	98.8	/	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	97.9	97.9	97.5	98.3	97.5	97.9
169-13	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	/	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	99.6
170-14	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	/	100.0	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	99.6
179-15	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	100.0	/	100.0	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	99.6
177-14	99.9	98.8	99.9	99.4	99.0	98.9	100.0	100.0	100.0	/	99.6	100.0	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	99.6
181-15	99.7	98.6	99.7	99.3	98.9	98.8	99.9	99.9	99.9	99.9	/	99.6	99.2	99.2	98.8	99.6	98.8	99.2
185-15	99.6	98.5	99.6	99.2	98.8	98.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	/	99.6	99.6	99.2	100.0	99.2	99.6
45-12	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	/	100.0	99.6	99.6	99.6	100.0
58-15	98.6	97.5	98.6	98.8	97.8	97.6	98.8	98.8	98.8	98.8	98.6	98.5	99.3	/	99.6	99.6	99.6	100.0
555-12	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	99.2	99.9	/	99.2	99.2	99.6
646-11	99.3	98.2	99.3	99.4	98.5	98.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	99.0	98.9	/	99.2	99.6
71-15	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	99.2	99.9	99.7	98.9	/	99.6
335-16	98.5	97.4	98.5	98.6	97.6	97.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.3	99.2	99.9	99.7	98.9	99.7	/

PRIOLOG 9. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) Gn-Gc gena svih ispitivanih izolata virusa bronzavosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije

	45-12	58-15	71-15	169-13	170-14	177-14	179-15	259-15	260-15	646-11	109-19	147-05	185-15	343-15	525-11	335-16	42-12	156-07	192-17	212-15	303-05	110-19	232-17	230-17	345-15	437-10	555-12	512-11	108-19	181-15	224-16	111-19	112-19	113-19	
45-12	/	99.3	99.7	99.3	99.3	99.3	99.0	99.3	99.7	99.3	98.6	99.0	99.3	100.0	99.7	99.3	95.2	99.7	96.2	94.8	99.3	98.6	94.1	94.5	96.6	99.3	99.3	99.3	98.6	97.2	99.3	99.3	97.9	98.6	
58-15	99.3	/	99.7	98.6	98.6	98.6	98.3	99.3	99.0	98.6	97.9	98.3	98.6	99.3	99.7	99.3	94.8	99.7	95.9	94.8	100.0	97.9	94.1	94.5	96.2	99.3	99.3	99.3	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9	
71-15	99.4	99.9	/	99.0	99.0	99.0	98.6	99.7	99.3	99.0	98.3	98.6	99.0	99.7	100.0	99.7	95.2	100.0	96.2	94.8	99.7	98.3	94.1	94.5	96.6	99.7	99.7	99.7	98.3	96.9	99.7	99.0	97.6	98.3	
169-13	98.5	98.5	98.6	/	100.0	100.0	99.7	98.6	99.7	99.3	99.3	99.0	100.0	99.3	99.0	98.6	94.5	99.0	95.5	94.1	98.6	99.3	93.4	93.8	96.2	98.6	98.6	98.6	99.3	97.9	98.6	99.3	98.6	99.3	
170-14	98.5	98.5	98.6	100.0	/	100.0	99.7	98.6	99.7	99.3	99.3	99.0	100.0	99.3	99.0	98.6	94.5	99.0	95.5	94.1	98.6	99.3	93.4	93.8	96.2	98.6	98.6	98.6	99.3	97.9	98.6	99.3	98.6	99.3	
177-14	98.5	98.5	98.6	100.0	100.0	/	99.7	98.6	99.7	99.3	99.3	99.0	100.0	99.3	99.0	98.6	94.5	99.0	95.5	94.1	98.6	99.3	93.4	93.8	96.2	98.6	98.6	98.6	99.3	97.9	98.6	99.3	98.6	99.3	
179-15	98.4	98.4	98.5	99.9	99.9	99.9	/	98.3	99.3	99.0	99.0	98.6	99.7	99.0	98.6	98.3	94.1	98.6	95.2	93.8	98.3	99.0	93.1	93.4	95.9	98.3	98.3	98.3	99.0	97.6	98.3	99.0	98.3	99.0	
259-15	99.3	99.3	99.4	98.3	98.3	98.3	98.2	/	99.0	99.3	97.9	98.3	98.6	99.3	99.7	99.3	94.8	99.7	95.9	94.8	99.3	97.9	94.1	94.5	96.2	99.3	99.3	99.3	97.9	96.9	99.3	98.6	97.2	97.9	
260-15	99.2	99.2	99.3	99.3	99.3	99.3	99.2	99.0	/	99.7	99.0	99.3	99.7	99.7	99.3	99.0	94.8	99.3	95.9	94.5	99.0	99.0	93.8	94.1	96.6	99.0	99.0	99.0	99.0	97.6	99.0	99.7	98.3	99.0	
646-11	98.9	98.9	99.0	99.4	99.4	99.4	99.3	98.9	99.7	/	98.6	99.0	99.3	99.3	99.0	98.6	94.5	99.0	95.5	94.5	98.6	98.6	93.8	94.1	96.2	98.6	98.6	98.6	97.6	98.6	99.3	97.9	98.6		
109-19	98.3	98.3	98.4	99.8	99.8	99.8	99.7	98.0	99.1	99.2	/	98.3	99.3	98.6	98.3	97.9	93.8	98.3	94.8	93.4	97.9	100.0	92.8	93.1	95.5	97.9	97.9	97.9	100.0	97.2	97.9	98.6	99.3	100.0	
147-05	98.4	98.4	98.5	98.3	98.3	98.3	98.2	98.2	98.7	98.6	98.0	/	99.0	99.0	98.6	98.3	94.8	98.6	95.9	94.5	98.3	98.3	93.8	94.1	96.6	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	97.2	98.3	99.0	97.6	98.3
185-15	98.5	98.5	98.6	100.0	100.0	100.0	99.9	98.3	99.3	99.4	99.8	98.3	/	99.3	99.0	98.6	94.5	99.0	95.5	94.1	98.6	99.3	93.4	93.8	96.2	98.6	98.6	98.6	99.3	97.9	98.6	99.3	98.6	99.3	
343-15	99.5	99.3	99.4	98.5	98.5	98.5	98.4	99.3	99.2	98.9	98.3	98.4	98.5	/	99.7	99.3	95.2	99.7	96.2	94.8	99.3	98.6	94.1	94.5	96.6	99.3	99.3	99.3	98.6	97.2	99.3	99.3	97.9	98.6	
525-11	99.1	99.3	99.4	98.4	98.4	98.4	98.3	99.1	99.1	98.7	98.2	98.3	98.4	99.1	/	99.7	95.2	100.0	96.2	94.8	99.7	98.3	94.1	94.5	96.6	99.7	99.7	99.7	98.3	96.9	99.7	99.0	97.6	98.3	
335-16	99.2	99.7	99.8	98.4	98.4	98.4	98.3	99.2	99.1	98.7	98.2	98.3	98.4	99.2	99.2	/	94.8	99.7	95.9	94.5	99.3	97.9	93.8	94.1	96.2	99.3	99.3	99.3	100.0	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9
42-12	92.4	92.7	92.8	92.1	92.1	92.1	92.0	92.4	92.5	92.4	91.8	92.3	92.1	92.4	93.0	92.8	/	95.2	97.6	95.9	94.8	93.8	95.9	95.5	96.2	94.8	94.8	94.8	93.8	92.4	94.8	94.5	93.1	93.8	
156-07	99.4	99.9	100.0	98.6	98.6	98.6	98.5	99.4	99.3	99.0	98.4	98.5	98.6	99.4	99.4	99.8	92.8	/	96.2	94.8	99.7	98.3	94.1	94.5	96.6	99.7	99.7	99.7	98.3	96.9	99.7	99.0	97.6	98.3	
192-17	93.2	93.5	93.6	92.9	92.9	92.9	92.8	93.2	93.3	93.2	92.7	93.1	92.9	93.2	93.8	93.6	97.5	93.6	/	98.3	95.9	94.8	97.6	97.9	97.9	95.9	95.9	95.9	94.8	93.4	95.9	94.8	93.4	95.9	94.1
212-15	92.5	92.8	92.9	92.2	92.2	92.2	92.1	92.7	92.7	92.7	92.0	92.4	92.2	92.5	93.3	92.9	96.7	92.9	99.2	/	94.8	93.4	99.3	99.7	96.9	94.5	94.5	94.5	93.4	93.4	94.5	94.1	92.8	93.4	
303-05	99.3	99.8	99.7	98.5	98.5	98.5	98.4	99.3	99.2	98.9	98.3	98.4	98.5	99.3	99.3	99.4	92.9	99.7	93.7	93.0	/	97.9	94.1	94.5	96.2	99.3	99.3	99.3	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9	
110-19	98.3	98.3	98.4	99.8	99.8	99.8	99.7	98.0	99.1	99.2	100.0	98.0	99.8	98.3	98.2	98.2	91.8	98.4	92.7	92.0	98.3	/	92.8	93.1	95.5	97.9	97.9	97.9	100.0	97.2	97.9	98.6	99.3	100.0	
232-17	92.2	92.4	92.5	91.8	91.8	91.8	91.7	92.3	92.3	92.3	91.6	92.1	91.8	92.2	93.0	92.5	96.6	92.5	98.9	99.7	92.7	91.6	/	99.0	96.2	93.8	93.8	93.8	92.8	92.8	93.8	93.4	92.1	92.8	
230-17	92.4	92.7	92.8	92.1	92.1	92.1	92.0	92.5	92.5	92.5	91.8	92.3	92.1	92.4	93.2	92.8	96.6	92.8	99.1	99.9	92.9	91.8	99.5	/	96.6	94.1	94.1	94.1	93.1	93.1	94.1	93.8	92.4	93.1	
345-15	92.7	92.9	93.0	92.3	92.3	92.3	92.2	92.7	92.8	92.7	92.1	92.5	92.3	92.9	93.2	93.0	96.6	93.0	98.2	97.6	93.1	92.1	97.2	97.5	/	96.2	96.2	96.2	95.5	94.1	96.2	96.2	94.8	95.5	
437-10	99.1	99.3	99.4	98.3	98.3	98.3	98.2	99.1	99.0	98.6	98.0	98.2	98.3	99.1	99.1	99.2	93.1	99.4	93.9	93.2	99.5	98.0	92.9	93.1	93.3	/	99.3	99.3	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9	
555-12	99.2	99.7	99.8	98.4	98.4	98.4	98.3	99.2	99.1	98.7	98.2	98.4	98.4	99.2	99.2	99.5	92.5	99.8	93.3	92.7	99.4	98.2	92.3	92.5	92.8	99.2	/	99.3	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9	
512-11	99.2	99.7	99.8	98.4	98.4	98.4	98.3	99.2	99.1	98.7	98.2	98.3	98.4	99.2	99.2	100.0	92.8	99.8	93.6	92.9	99.4	98.2	92.5	92.8	93.0	99.2	99.5	/	97.9	96.6	99.3	98.6	97.2	97.9	
108-19	98.3	98.3	98.4	99.8	99.8	99.8	99.7	98.0	99.1	99.2	100.0	98.0	99.8	98.3	98.2	98.2	91.8	98.4	92.7	92.0	98.3	100.0	91.6	91.8	92.1	98.0	98.2	/	97.2	97.9	98.6	99.3	100.0		
181-15	97.5	97.5	97.6	99.0	99.0	99.0	98.9	97.4	98.3	98.5	98.7	97.2	99.0	97.5	97.6	97.4	91.0	97.6	91.8	92.1	97.5	98.7	91.7	92.0	91.3	97.2	97.4	97.4	98.7	/	96.6	97.2	96.6	97.2	
224-16	99.1	99.3	99.4	98.3	98.3	98.3	98.2	99.1	99.0	98.6	98.0	98.2	98.3	99.1	99.1	99.2	93.1	99.4	93.9	93.2	99.5	98.0	92.9	93.1	93.3	99.5	99.2	99.2	98.0	97.2	/	98.6	97.2	97.9	
111-19	98.6	98.6	98.7	99.2	99.2	99.2	99.1	98.4	99.4	99.5	99.0	98.4	99.2	98.6	98.5	98.5	92.2	98.7	93.0	92.3	98.6	99.0	92.0	92.2	92.4	98.4	98.5	98.5	99.0	98.2	98.4	/	97.9	98.6	
112-19	97.9	97.9	98.0	99.4	99.4	99.4	99.3	97.7	98.7	98.9	99.7	97.7	99.4	97.9	97.8	97.8	91.5	98.0	92.3	91.6	97.9	99.7	91.3	91.5	91.7	97.7	97.8	97.8	99.7	98.4	97.7	98.6	/	99.3	
113-19	98.3	98.3	98.4	99.8	99.8	99.8	99.7	98.0	99.1	99.2	100.0	98.0	99.8	98.3	98.2	98.2	91.8	98.4	92.7	92.0	98.3	100.0	91.6	91.8	92.1	98.0	98.2	98.2	100.0	98.7	98.0	99.0	99.7	/	

PRILOG 10. Procenat sličnosti nukleotidnih sekvenci (ispod dijagonale) i izvedenih aminokiselinskih sekvenci (iznad dijagonale) RdRp gena svih ispitivanih izolata virusa bronzaovosti paradajza (TSWV) poreklom iz Srbije

	192-17	212-15	232-17	224-16	42-12	345-15	646-11	156-07	147-05	113-19	112-19	110-19	555-12	177-14	169-13	170-14	185-15	181-15	111-19	109-19	179-15	108-19	525-11	437-10	58-15	259-15	230-17	71-15	303-05	343-15	335-16	512-11	45-12	260-15				
192-17	/	100.0	100.0	100.0	95.8	85.4	83.3	85.4	85.4	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	77.1	81.3	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2			
212-15	99.5	/	100.0	100.0	95.8	85.4	83.3	85.4	85.4	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	77.1	81.3	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2		
232-17	99.5	100.0	/	100.0	95.8	85.4	83.3	85.4	85.4	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	77.1	81.3	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	
224-16	99.5	100.0	100.0	/	95.8	85.4	83.3	85.4	85.4	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	77.1	81.3	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	
42-12	98.4	98.9	98.9	98.9	/	85.4	83.3	85.4	85.4	81.3	81.3	81.3	83.3	81.3	77.1	81.3	81.3	83.3	81.3	81.3	81.3	77.1	81.3	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	
345-15	95.1	95.6	95.6	95.6	95.6	/	93.8	95.8	95.8	91.7	91.7	91.7	93.8	91.7	87.5	91.7	91.7	93.8	91.7	91.7	91.7	87.5	87.5	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	
646-11	94.5	95.1	95.1	95.1	95.1	98.4	/	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	95.8	93.8	89.6	93.8	93.8	93.8	95.8	93.8	93.8	89.6	89.6	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	
156-07	95.1	95.1	95.1	95.1	95.1	98.4	97.8	/	100.0	95.8	95.8	95.8	97.9	95.8	91.7	95.8	95.8	95.8	97.9	95.8	95.8	95.8	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
147-05	95.1	95.6	95.6	95.6	95.6	98.9	98.4	99.5	/	95.8	95.8	95.8	97.9	95.8	91.7	95.8	95.8	95.8	97.9	95.8	95.8	95.8	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
113-19	92.9	93.4	93.4	93.4	93.4	96.7	97.3	97.3	97.8	/	100.0	100.0	97.9	100.0	95.8	100.0	100.0	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
112-19	92.9	93.4	93.4	93.4	93.4	96.7	97.3	97.3	97.8	100.0	/	100.0	97.9	100.0	95.8	100.0	100.0	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
110-19	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	/	97.9	100.0	95.8	100.0	100.0	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
555-12	94.0	94.5	94.5	94.5	94.5	97.8	98.4	98.4	98.9	98.9	98.9	99.5	/	97.9	93.8	97.9	97.9	97.9	97.9	100.0	97.9	97.9	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
177-14	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	100.0	99.5	/	95.8	100.0	100.0	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
169-13	91.8	92.3	92.3	92.3	91.2	94.5	95.1	95.1	95.6	96.7	96.7	97.3	96.7	97.3	/	95.8	95.8	95.8	93.8	95.8	95.8	95.8	87.5	87.5	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6		
170-14	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	100.0	99.5	100.0	97.3	/	100.0	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
185-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	100.0	99.5	100.0	97.3	100.0	/	100.0	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
181-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	100.0	99.5	100.0	97.3	100.0	100.0	/	97.9	100.0	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
111-19	94.0	94.5	94.5	94.5	94.5	97.8	98.4	98.4	98.9	98.9	98.9	99.5	100.0	99.5	96.7	99.5	99.5	99.5	/	97.9	97.9	97.9	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
109-19	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	99.5	99.5	100.0	99.5	100.0	97.3	100.0	100.0	100.0	99.5	/	100.0	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8
179-15	92.9	93.4	93.4	93.4	93.4	96.7	97.3	97.3	97.8	98.9	98.9	99.5	98.9	99.5	96.7	99.5	99.5	99.5	98.9	99.5	/	100.0	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	
108-19	92.9	93.4	93.4	93.4	93.4	96.7	97.3	97.3	97.8	100.0	100.0	99.5	98.9	99.5	96.7	99.5	99.5	99.5	98.9	99.5	98.9	/	91.7	91.7	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8
525-11	92.9	93.4	93.4	93.4	93.4	96.7	97.3	97.3	97.8	96.7	96.7	97.3	97.8	97.3	94.5	97.3	97.3	97.3	97.8	97.3	96.7	96.7	/	95.8	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9
437-10	94.0	94.5	94.5	94.5	94.5	96.7	97.3	97.3	97.8	96.7	96.7	97.3	97.8	97.3	94.5	97.3	97.3	97.3	97.8	97.3	96.7	96.7	96.7	98.9	/	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9
58-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
259-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
230-17	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
71-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
303-05	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
343-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
335-16	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
512-11	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
45-12	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/	100.0	100.0	100.0	100.0	
260-15	93.4	94.0	94.0	94.0	94.0	97.3	97.8	97.8	98.4	97.3	97.3	97.8	98.4	97.8	95.1	97.8	97.8	97.8	98.4	97.8	97.3	97.3	99.5	99.5	100.0													

BIOGRAFIJA

Branka Petrović rođena je 28. juna 1993. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovne akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Biljna proizvodnja, modul Fitomedicina, upisala je školske 2012/13. godine i diplomirala sa prosečnom ocenom 9,46 (devet i 46/100) odbranivši diplomski rad „Razvijanje brzog i efikasnog protokola za ekstrakciju ukupnih RNK za dokazivanje virusa paradajza“ sa ocenom 10. Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet dodelio je pohvalnicu Branki Petrović za postignut odličan uspeh na studijskom programu Biljna proizvodnja-Fitomedicina. Master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Fitomedicina upisala je školske 2016/17. godine i završila ih sa prosečnom ocenom 9,88 (devet i 88/100), odbranivši master rad „Karakterizacija izolata virusa mozaika krastavca na osnovu sekvenci CP i MP gena primenom analize polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP metode)“ sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Poljoprivredne nauke, modul Fitomedicina, upisala je školske 2017/18. godine. Tokom 2018. i 2019. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije angažovana je na Katedri za fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog fakulteta, na projektu III 43001 „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“. Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,88 (devet 88/100). U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 27.05.2021. godine. Objavila i saopštila 13 naučnih radova, govori engleski jezik i član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Branka Petrović

Broj indeksa FM170032

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Genetička struktura populacije virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*) poreklom iz različitih domaćina u Srbiji

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

Potpis autora

U Beogradu, 31.03.2022.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Branka Petrović

Broj indeksa FM170032

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Genetička struktura populacije virusa bronzavosti paradajza
(*Tomato spotted wilt tospovirus*) poreklom iz različitih domaćina u Srbiji

Mentor dr Ivana Stanković, redovni profesor

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

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

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

Potpis autora

U Beogradu, 31.03.2022.

Izjava o korišćenju

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

Genetička struktura populacije virusa bronzavosti paradajza
(*Tomato spotted wilt tospovirus*) poreklom iz različitih domaćina 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 Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu o dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 31.03.2022.
