

Detekcija ekonomski značajnih virusa tikvenjača u Hrvatskoj

Mihaljevski Boltek, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:791211>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



DETEKCIJA EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA TIKVENJAČA U HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Lea Mihaljevski Boltek

Zagreb, rujan 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Fitomedicina

DETEKCIJA EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA TIKVENJAČA U HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Lea Mihaljevski Boltek

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Lea Mihaljevski Boltek**, JMBAG 0058200532, izjavljujem da sam samostalno izradila završni rad pod naslovom:

DETEKCIJA EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA TIKVENJAČA U HRVATSKOJ

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga završnog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj završni rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga završnog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana 18. rujna 2019.

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVIJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Završni rad studentice **Lee Mihaljevski Boltek**, JMBAG 0058200532, naslova

DETEKCIJA EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA TIKVENJAČA U HRVATSKOJ

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr.sc. Darko Vončina mentor

2. prof. dr.sc. Edyta Đermić član

3. izv. prof. dr.sc. Božidar Benko član

Zahvala

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Darku Vončini na prihvatanju mentorstva i pruženoj pomoći, savjetima i susretljivosti tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Adrijani Novak i dr. sc. Dariu Iviću na ukazanom povjerenju, nesebičnoj pomoći i mnoštvu savjeta tijekom izrade diplomskog rada. Hvala im što su mi omogućili ovu divnu suradnju! Hvala i dr. sc. Jasni Milanović na pomoći i savjetima tijekom rada u laboratoriju.

Na kraju, želim se zahvaliti svojoj obitelji na strpljenju, moralnoj podršci i ukazanom povjerenju. Veliko hvala i Matku koji je uvijek bio uz mene i neumorno me podržavao.

L. M. B.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Tikvenjače.....	3
2.1.1. Tikvica, <i>Cucurbita pepo</i> L.....	4
2.1.2. Tikva (bundeve), <i>Cucurbita maxima</i> Duchesne ex Lam.	5
2.2. Virusne bolesti tikvenjača.....	7
2.2.1. Virus mozaika krastavca (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV).....	7
2.2.2. Virus žutog mozaika tikvice (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , ZYMV)	9
2.2.3. Virus mozaika lubenice (<i>Watermelon mosaic virus</i> , WMV).....	10
2.2.4. Zaštitne mjere.....	11
2.3. Dijagnostičke metode u biljnoj virologiji	13
2.3.1. ELISA.....	14
3. Materijali i metode	17
3.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka	17
3.2. Laboratorijska analiza	19
4. Rezultati istraživanja	23
4.1. Simptomi u polju.....	23
4.2. Prisutnost virusa	26
4.3. Korelacija simptoma i rezultata analize	33
5. Rasprava.....	40
6. Zaključci	45
7. Literatura.....	46
8. Prilozi.....	52
8.1. Karte lokacija uzimanja uzoraka.....	52
Životopis.....	58

Sažetak

Završnog rada studentice **Lee Mihaljevski Boltek**, naslova

DETEKCIJA EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA TIKVENJAČA U HRVATSKOJ

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) i virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) gospodarski su važni virusi na kultiviranim vrstama iz porodice *Cucurbitaceae*. Prisutnost i rasprostranjenost ovih virusa na tikvicama i tikvama u Republici Hrvatskoj je slabo poznata. Tijekom 2019. godine, uzorci su sakupljeni u proizvodnim nasadima tikava i tikvica u šest županija Republike Hrvatske (Istarskoj, Međimurskoj, Varaždinskoj, Sisačko-moslavačkoj, Virovitičko-podravskoj i Dubrovačko-neretvanskoj). Analizom 82 uzorka serološkom metodom DAS-ELISA potvrđena je prisutnost sva tri istraživana virusa. Postotak pojedinačnih i mješovitih zaraza bio je gotovo identičan. U 46.4 % uzoraka potvrđene su pojedinačne zaraze, a u 46.3 % uzoraka mješovite zaraze (sa dva ili tri virusa). Tipični simptomi virusnih zaraza i pozitivni nalazi virusa zabilježeni su na kultivarima tikvica Galatea, Tendor, Naxos, Brilliant i Sofia, koji su deklarirani kao visoko tolerantni ili tolerantni na CMV, ZYMV i WMV. U radu su prikazani simptomi virusnih bolesti na tikvicama i tikvama, te rezultati o učestalosti pojave istraživanih virusa po županijama u Hrvatskoj.

Ključne riječi: tikvice, tikve, virus mozaika krastavca, virus žutog mozaika tikvice, virus mozaika lubenice, ELISA

Summary

Of the final work - student **Lea Mihaljevski Boltek**, entitled

DETECTION OF ECONOMICALLY IMPORTANT VIRUSES OF CUCURBITS IN CROATIA

Cucumber mosaic virus (CMV), *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *watermelon mosaic virus* (WMV) are economically important viral pathogens of cucurbit crops. So far prevalence and distribution of these viruses in zucchini and pumpkin crops in Croatia has been relatively poorly investigated. During 2019, samples of zucchini and pumpkins were collected in six Croatian counties (Istria County, Međimurje County, Varaždin County, Sisak-Moslavina County, Virovitica-Podravina County and Dubrovnik-Neretva County). Totally 82 samples were collected and analysed using DAS-ELISA. The presence of all three viruses has been confirmed. The percentage of single-virus and mixed (two or three viruses) infections was similar. Single-virus infection was detected in 46.4 % of samples, and mixed infections were detected in 46.3 % of samples. Typical symptoms of virus infections were recorded on zucchini varieties Galatea, Tendor, Naxos, Brilliant and Sofia, which are declared as intermediately resistant or resistant to CMV, ZYMV and WMV. The symptoms recorded in the field and the results of CMV, ZYMV and WMV presence and distribution in six counties surveyed are presented.

Keywords: zucchini, pumpkin, *Cucumber mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, ELISA

1. Uvod

Različite biljne vrste iz porodice *Cucurbitaceae* nazivaju se tikvenjače. Botanički vrlo bogata, ova porodica obuhvaća 940 do 980 biljnih vrsta svrstanih u 97 rodova (Schaefer i Renner, 2011). Za biljnu proizvodnju najznačajniji su rodovi *Cucumis*, *Citrullus*, *Lagenaria* i *Luffa* (Bisognin, 2002). Neke od najvažnijih kultiviranih tikvenjača su krastavac, lubenica, dinja te različite vrste tikvi. Tikvice i tikve se u svijetu uzgajaju na oko 2 078 tisuća ha, sa prosječnim prinosom od 13.2 t/ha (FAO, 2019).

Velika raznolikost vrsta porodice *Cucurbitaceae* razlog je šarolikog geografskog podrijetla kultiviranih tikvenjača. Vrste roda *Cucurbita* potječu iz Srednje i Južne Amerike, a u zemlje Starog svijeta proširile su se tek nakon Kolumbovih otkrića (Vučurović, 2012). Unutar roda *Cucurbita* nalazi se dvanaest ili trinaest vrsta, od kojih se pet uzgaja kao povrće, a najrasprostranjenije i najčešće od njih su *Cucurbita pepo* L., *C. maxima* Duchesne i *C. moschata* Duchesne (Paris, 2017).

Razvoj poljoprivredne proizvodnje, njeno intenziviranje te jednostavnija i brža međunarodna trgovina dovode do bržeg širenje viroza na kultiviranim biljkama. Brojnim znanstvenim istraživanjima i razvojem dijagnostičkih metoda dobivene su brojne informacije o vrstama biljnih virusa na kultiviranim tikvenjačama, njihovoj raširenosti i važnosti, u svijetu. Poznato je da virusna oboljenja mogu uzrokovati ozbiljne ekonomske gubitke u proizvodnji tikvenjača u vidu smanjenja prinosa i tržišne vrijednosti plodova. U svijetu je poznato preko 59 vrsta virusa na biljkama iz porodice *Cucurbitaceae* (krastavci, tikve, dinje, lubenice) (Desbiez i Lecoq, 2012). Ekonomski najvažnijima smatraju se virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV), virus prstenaste pjegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV) te virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Vučurović, 2012; Novak i Ivić, 2019; Agrios, 2005; Nameth i sur., 1986; Lecoq i sur., 2003).

U Hrvatskoj postoji relativno malo podataka o virusima na tikvenjačama, a sve češća i jača pojava virusnih oboljenja na tikvama, tikvicama i ostalim vrstama iz porodice tikvenjača upućivala je na potrebu za detaljnijim istraživanjima. U ovom je radu istražena prisutnost CMV-a, ZYMV-a i WMV-a na tikvicama i tikvama (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*).

1.1. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog rada bili su utvrditi:

- prisutnost virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virusa žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) te virusa mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) u uzgojnim područjima u Virovitičko-podravskoj, Varaždinskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Istarskoj, Međimurskoj i Sisačko-moslavačkoj županiji,
- povezanost vizualno uočenih simptoma na biljkama sa vrstom virusa i deklariranom otpornošću hibrida,
- učestalost pojave mješovitih zaraza s dva ili tri istraživana virusa.

2. Pregled literature

2.1. Tikvenjače

„Tikvenjače“ su skupni naziv za biljne vrste iz porodice *Cucurbitaceae*. Prema botaničkoj pripadnosti porodica *Cucurbitaceae* pripada redu Cucurbitales, razredu Magnoliopsida, u carstvu Plantae (Deyo i O'Malley, 2008). Porodica *Cucurbitaceae* botanički je vrlo bogata te obuhvaća 940 do 980 biljnih vrsta svrstanih u 97 rodova (Schaefer i Renner, 2011). Ove većinom jednogodišnje toploljubive biljke nastanjuju tropska, suptropska i toplija područja, a stradati mogu već i od slabog mraza (Lešić i sur., 2004). Mnoge vrste iz ove porodice od gospodarskog su značaja te se uzgajaju za ljudsku prehranu i životinjsku ishranu. Gospodarski najvažniji rodovi unutar porodice *Cucurbitaceae* su: *Cucumis*, *Citrullus*, *Lagenaria* i *Luffa* (Bisognin, 2002). Na svjetskoj razini, najvažnije kultivirane tikvenjače su krastavac (*Cucumis sativus* L.), lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunberg) Matsum et Nakai), dinja (*Cucumis melo* L.), tikve (*Cucurbita pepo* L., *Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita moschata* (Lom.) Duch et Poir) te meksički krastavac (*Sechium edule* Schwartz.).

Velika raznolikost vrsta porodice *Cucurbitaceae* razlog je šarolikog geografskog podrijetla kultiviranih tikvenjača. Vrste roda *Cucurbita* potječu iz Srednje i Južne Amerike, a u zemlje Starog svijeta proširile su se tek nakon Kolumbovih otkrića (Vučurović, 2012). Sjemenke tih vrsta pronađene u grobovima u Peruu procijenjene su na 8000 godina starosti (Lešić i sur., 2004). Neke od ostalih vrsta ove porodice porijeklom su iz Starog svijeta, pa tako krastavac (*Cucumis sativus* L.) dolazi iz Azije (Indije), lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunberg)) iz Indije i Afrike, a dinja (*Cucumis melo* L.), momordika (*Momordica charantia* L.), vrg (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley) i voštana dinja (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) iz Azije i Afrike (Vučurović, 2012; McCreight, 2017).

Unutar roda *Cucurbita* nalazi se dvanaest ili trinaest vrsta, od kojih se pet uzgaja kao povrće: *Cucurbita pepo* L., *C. maxima* Duchesne, *C. moschata* Duchesne, *C. argyrosperma* Huber i *C. ficifolia* Bouché (Paris, 2017). Od navedenih pet vrsta, prve tri su najrasprostranjenije i najčešće se uzgajaju (Paris, 2017). Vrste roda *Cucurbita* biljke su koje brzo rastu i razvijaju puno zelene mase, a cilj njihovog uzgoja najčešće su plodovi različitih veličina, oblika i boja. Osim upotrebe nedozrelih i dozrelih plodova u prehrani, iz plodova se izdvajaju sjemenke koje se mogu jesti zasebno ili se često prerađuju u visokokvalitetno ulje. Zbog velike raznolikosti oblika i boja ploda, mnoge vrste nalaze upotrebu kao ukrasni

predmeti. Velika raznolikost kultivara unutar vrsta iz roda *Cucurbita* omogućava široku primjenu plodova, ali i cvjetova i listova ovih biljaka.

Kao i kod ostalih vrsta biljaka koje se uzgajaju, oplemenjivanje tikvenjača usmjereno je ka povećanju prinosa i kvalitete ploda, te prema razvoju kultivara otpornih na napade raznih štetnika i bolesti.

Prema podacima Svjetske organizacije za prehranu i hranu (FAO, 2017) u svijetu se tikvice i tikve uzgajaju na oko 2 078 tisuća ha, sa prosječnim prinosom od 13.2 t/ha (FAO, 2019). U Europi se uzgajaju na površini od 177 tisuća ha, sa prosječnim prinosom od 23.7 t/ha. Zemlje vodeće u proizvodnji ovih kultura su Kina, Indija, Rusija te Ukrajina (FAO, 2019). Podataka o proizvodnji tikvica i tikvi u Hrvatskoj nema, jer se vode pod „ostalo povrće“ (Lešić i sur., 2016).

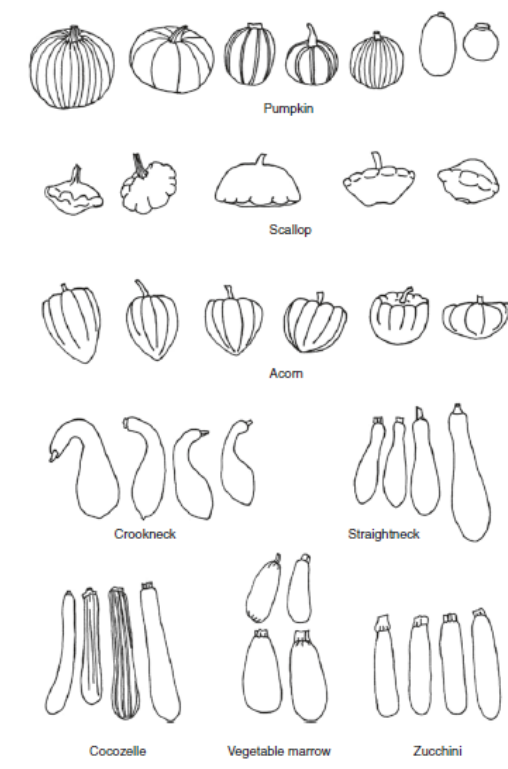
2.1.1. Tikvica, *Cucurbita pepo* L.

Vrsta *Cucurbita pepo* L. podrijetlom je iz Sjeverne i Srednje Amerike, a danas je široko rasprostranjena i uzgaja se diljem svijeta u područjima umjereno hladne do tropske klime, uključujući i polu-suha područja (Paris, 2017). Arheološki dokazi prisutnosti tikvica, *C. pepo* u Meksiku i istočnom SAD-u datiraju od prije 10 do 30 tisuća godina (Robinson i Decker-Walters, 1997). Robinson i Decker-Walters (1997) također navode kako je baš ova vrsta prva tikva unesena u Europu.

Zahvaljujući svojoj prilagodljivosti, brzom dozrijevanju i dobrim prinosima, *C. pepo* gospodarski je važnija od ostalih vrsta iz roda *Cucurbita* i donosi veću financijsku dobit (Gong et al., 2013). Paris (2017) i Robinson i Decker-Walters (1997) navode kako se ova vrsta smatra jednom od vrsta s najvećom raznolikošću plodova i njihovih karakteristika u cijelom carstvu biljaka. Plodovi *C. pepo* mogu narasti i do 25 kilograma težine, mogu biti zeleni, žuti, narančasti, od sasvim tamnih do gotovo bijelih plodova sa različitim uzorcima (Paris, 2017). Unutrašnjost ploda također može biti različitih boja, od zeleno bijele do intenzivne žute ili narančaste, a sjemenke mogu narasti od 8 do 25 mm dužine te im dužina može biti više od dva puta veća od širine (Paris, 2017). Raznolikost oblika i veličina plodova unutar ove vrste, prikazana je na slici 2.1.

Vrsta *C. pepo* ima čvrste listove sa oštrim bodljicama i duboko urezane plojke, sa tvrdom, uglatom i uzdužno žljebastom stapkom. Cvjetovi su žute ili narančaste boje sa laticama zaoštrenim na vrhu, a sjeme je ovalno spljošteno sa izraženim rubom boje tamnije od površine sjemenke (Paris, 2017).

Sasvim mladi plodovi *C. pepo* koriste se za jelo neoguljeni i obično se nazivaju tikvice, a mladi plodovi blizu pune veličine prije konzumacije moraju se oguliti i potrebno im je odstraniti sjemenište (Lešić i sur., 2004).



Slika 2.1. Prikaz raznolikosti oblika i veličina plodova unutar vrste *C. pepo* (Izvor: Paris, 2017)

2.1.2. Tikva (bundeva), *Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.

Vrsta *Cucurbita maxima* podrijetlom iz Sjeverne i Južne Amerike danas je široko rasprostranjena i uzgaja se u umjerenom temperaturnom pojasu zahvaljujući mornarima koji su je u 16. stoljeću prenijeli u Europu (Paris, 2017). *Cucurbita maxima* uzgaja se diljem svijeta, pogotovo u Južnoj Americi, Indiji i Africi (Robinson i Decker-Walters, 1997). Zahvaljujući većoj tolerantnosti na hladnoću, u odnosu na ostale vrste ovog roda, *C. maxima* uzgaja se i na višim nadmorskim visinama (Robinson i Decker-Walters, 1997).

Kao i *C. pepo*, *C. maxima* ima veliku raznolikost kultivara, pa tako plodovi ove vrste mogu doseći težinu od 600 kg, a dolaze u raznim oblicima kao što su oblik turbana ili banane i slično (Paris, 2017). Vanjska boja plodova može biti od crveno-narančaste, preko ružičasto-narančaste pa sve do bijele ili čak tamno zelene, gotovo crne. Plodovi oblika turbana često dolaze u kombinaciji dvije ili tri boje. Unutrašnjost ploda također može biti različitih boja (Paris, 2017). Tikvu (bundevu), *Cucurbitu maximu*, odlikuju krupni bubrežasti listovi, slabo

urezani ili bez ureza, dok su cvjetovi zvonoliki sa širokim laticama i uskom čaškom (Lešić i sur., 2004). Raznolikost boja i oblika unutar ove vrste prikazana je na slici 2.2.

Plodovi *C. maxime* koriste se kada su fiziološki zreli, od jeseni i tijekom zime, a najčešće se nazivaju bundeva, žuta bundeva ili bundeva pečenica (Lešić i sur., 2004), ali i tikva.



Slika 2.2. Prikaz raznolikosti oblika i veličina plodova unutar vrste *C. maxima* (Izvor: Paris, 2017)

2.2. Virusne bolesti tikvenjača

Mnogi autori navode da virusne bolesti mogu uzrokovati ozbiljne ekonomske gubitke, u vidu smanjenja količine i kvalitete prinosa te pada tržišne vrijednosti plodova (Sevik i Arli-Sokmen, 2003; Lecoq i sur., 2003; Novak i Ivić, 2019; Vučurović i sur., 2009b). Lecoq i Desbiez (2012) navode da se na biljkama iz porodice *Cucurbitaceae* u svijetu javlja više od 59 virusa. Ekonomski najvažnijima smatraju se virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV), virus prstenaste pjegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV), te virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Vučurović, 2012; Novak i Ivić, 2019; Agrios, 2005; Nameth i sur., 1986; Lecoq i sur., 2003). Nove vrste virusa koji napadaju tikvenjače konstantno se opisuju, kao što se bilježe i novi slučajevi zaraza tikvenjača do sada poznatim virusima (Kucharek i Purcifull, 1997).

Simptomi koje uzrokuju virusne bolesti tikvenjača uvelike variraju iz godine u godinu, ovisno o intenzitetu pojave virusa, osjetljivosti biljke domaćina, vremenu ostvarene infekcije, prisutnosti različitih sojeva virusa, mješovitim zarazama, prisutnosti i aktivnosti vektora, vremenu zaraze domaćina, vremenskim uvjetima ili mjestu proizvodnje (Novak i Ivić, 2019; Komata i sur. 2014; Vučurović i sur., 2009b).

Biljnim je virusima, kao obligatnim parazitima, za opstanak neophodna živa biljka. Virus koji se nalazi u jednogodišnjoj ili dvogodišnjoj biljci mora se češće prenositi na zdrave biljke u odnosu na onaj virus koji se nalazi u višegodišnjim biljkama (Juretić, 2002). Prijenos biljnih virusa ostvariv je na mnogo načina: vegetativnim razmnožavanjem biljaka domaćina, mehaničkim prijenosom preko zaraženog biljnog soka, sjemenom, polenom, vilihom kosom, cijepljenjem, kukcima, grinjama, nematodama i gljivama (Agrios 2005; Juretić 2002). Izuzevši širenje zaraženim sadnim materijalom, najčešći i ekonomski najvažniji način prijenosa biljnih virusa je uz pomoć kukaca kao vektora (Agrios, 2005). Malo je grupa kukaca koje mogu prenositi biljne viruse, a najvažniji od njih su lisne uši (*Aphididae*), pripadnici reda Homoptera. Lisne uši biljne viruse prenose na tri načina: neperzistentno, semiperzistentno i perzistentno, sisući biljni sok zaraženih biljaka (Juretić, 2002).

2.2.1. Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) pripadnik je roda *Cucumovirus* porodice Bromoviridae, kojoj pripadaju i rodovi *Bromovirus*, *Ilarvirus*, *Alfamovirus* i *Oleavirus* (Agrios, 2005).

Virus mozaika krastavca najrasprostranjeniji je virus tikvenjača uzgajanih na otvorenom, a prisutan je i kod uzgoja u zaštićenim prostorima (Blanchard i sur. 1994). Virus je prvi puta potvrđen na tikvama u SAD-u 1916. godine, kada su ga odvojeno opisali S. P. Doolittle u Michiganu te I. C. Jagger u New Yorku (loc. cit. García-Arenal i Palukaitis, 2008). Od tada se proširio po svim kontinentima (Blanchard i sur. 1994). Geografski široko rasprostranjen, ovaj virus ima najveći broj domaćina od svih poznatih virusa (Kim i sur., 2010). Massumi i sur. (2007) i Vučurović (2012) navode da taj virus može zaraziti više od 1300 biljnih vrsta iz više od 500 rodova i 100 porodica. Domaćini CMV-a mogu biti jednogodišnje ili višegodišnje vrste, kultivirane, ali i korovne vrste (Blanchard i sur. 1994). Ovako široko rasprostranjen, samostalno ili u kombinaciji s drugim virusima uzrokuje pojave mnogih epifitocija svugdje po svijetu (Novak i Ivić, 2019). Najvažniji domaćini ovog virusa su: krastavci, gladiole, dinje, tikve, paprike, špinat, rajčica, celer, cikla, grah, banana i biljek iz porodice krstašica (Agrios, 2005). Virus mozaika krastavca u Hrvatskoj je na vrstama *Aristolochia clemantis* (žuta vučja stopa), *Hespera dinarica* (dinarska večernica), *Nicandra physaloides* (nikandra, peruanska jabuka) i *Sonchus oleraceus* (kostriš) 1974. godine pronašao prof. Juretić (Juretić, 1974). Prisutnost ovog virusa u Hrvatskoj također je zabilježena i na rajčici (Škorić i sur., 1996), maslini (Bjeliš i sur., 2007; Luigi i sur., 2011), krastavcima, paprici i tikvicama (Novak, 2019). Škorić i sur. (2000) CMV su pronašli na vrstama *Capsella rubella* (rusomača), *Conyza canadensis* (kanadska hudoljetnica) i *Solanum nigrum* (crna pomoćnica).

Zaraze CMV-om u povrćarskoj proizvodnji posebno dolaze do izražaja u proljeće i jesen, a štete su velike jer napada mlade biljke (Blanchard i sur. 1994). *Cucumber mosaic virus* uzrokuje pojavu mozaika, pjegavost, deformiranost listova, cvjetova i plodova, biljke su smanjenog rasta, a može uzrokovati venuće biljke (Agrios, 2005). Simptomi koje uzrokuje virus mozaika krastavca vrlo često nisu specifični za taj virus već su rezultat reakcije domaćina na zarazu (García-Arenal i Palukaitis, 2008).

Korovi vrlo često imaju ulogu zimskih domaćina, na kojima se virus održava kada je vegetacija u mirovanju, a u proljeće postaju izvori zaraze, ali i vektora, lisnih uši (Blanchard i sur. 1994). Vektori virusa mozaika krastavca, lisne uši, virus prenose na neperzistentan način i dovode do brzog širenja zaraze u nasadu. Kratko vrijeme akvizicije virusa uz retenciju od dva sata omogućava vrlo brzi prijenos virusa u nasadu sa malim brojem vektora, koji često ostanu neprimijećeni. Mnogo je vrsta lisnih uši, preko 80, koje prenose CMV, no najčešći vektori su pamukova lisna uš (*Aphis gossypii*) i zelena breskvina uš (*Myzus persicae*) (Blanchard i sur. 1994; Massumi i sur. 2007; Vučurović, 2012; Novak i Ivić, 2019). Osim lisnim ušima ovaj se

virus prenosi i sjemenom, parazitskim biljkama, zaraženim biljnim sokom te mehanički (Kim i sur., 2010).

Zahvaljujući mnoštvu različitih sojeva, CMV je rasprostranjen širom svijeta. Neki su sojevi prilagođeni toplijim predjelima Mediterana i tropskih krajeva, dok drugima više odgovaraju niže temperature u umjerenim područjima sjeverne Europe (Blanchard i sur. 1994).

2.2.2. Virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)

Virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) pripada rodu *Potyvirus*, porodice *Potyviridae*, kojoj pripadaju i rodovi *Impomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus* te *Bymovirus* (Agrios, 2005).

Virus žutog mozaika tikvice danas se smatra jednim od najštetnijih virusa tikvenjača u svijetu (Vučurović i sur., 2009b). Ovaj je virus prvi puta uočen u Italiji 1973., na tikvicama, nakon čega je i dokazan nekoliko godina kasnije (Lisa i sur., 1981). Šest godina kasnije, 1979. godine, isti je virus potvrđen u Italiji i Francuskoj na bundevi i dinji (Desbiez i Lecoq, 1997). Od otkrića 1973. odnosno 1979. godine, ovaj se virus proširio u više od pedeset zemalja te ga sada možemo pronaći na svim kontinentima osim na Antartici (Desbiez i Lecoq, 1997). Brzo širenje ovog virusa objašnjeno je na dva načina, kao epidemija „novog“ virusa te kao virus prisutan mnogo prije, ali čije se prisustvo nije moglo dokazati ondašnjim dijagnostičkim metodama (Desbiez i Lecoq, 1997).

ZYMV u prirodi napada vrste iz porodice *Cucurbitaceae*: tikvice, krastavce, dinje, lubenice i bundeve (Agrios 2005; Desbiez i Lecoq 1997), kao i neke korovne vrste iz porodice *Amaranthaceae* (štirovi), *Malvaceae* (sljezovi), *Convolvulaceae* (svlakovi) i *Compositae* (glavočike) (Novak i Ivić, 2019).

Na biljkama zaraženim ZYMV-om može se uočiti usporen rast, žućenje listova i pojava mozaika, smanjena cvatnja, deformacija cvjetova, sitni plodovi vrlo često deformirani sa raznim izbočinama, a deformiranost je katkad vidljiva i na sjemenkama (Komata i sur. 2014; Agrios 2005). Zaraza u ranim razvojnim stadijima biljaka može značajno smanjiti prinose, zaražene biljke su manje od prosjeka, a njihovi plodovi toliko deformirani da nisu prikladni za prodaju (Komata i sur., 2014). Isti autori navode kako je veća vjerojatnost da će doći do odbacivanja nezrelih plodova ako je biljka zaražena u ranijim fazama vegetacije, u odnosu na biljke zaražene nakon prvog plodonošenja. Do pojave ozbiljnijih simptoma može doći kod miješane zaraze ZYMV-om i još nekim virusom, primjerice CMV-om (Desbiez i Lecoq,

1997). Od prve pojave ZYMV-a zabilježena je velika varijabilnost između izolata ovog virusa, u ovisnosti o geografskom području (Desbiez i Lecoq, 1997).

Ovaj se virus, kao i CMV, prenosi lisnim ušima kao vektorima, na neperzistentan način (Agrios 2005; Komata i sur. 2014; Blua i Perring, 1989). Najvažniji vektori su zelena breskvina uš (*Myzus persicae*), pamukova lisna uš (*Aphis gossypii*), mlječikina lisna uš (*Macrosiphum euphorbiae*) te zelena lisna uš agruma (*Aphis citricola*) (Novak i Ivić 2019; Komata i sur, 2014; Gotlin Čuljak i sur. 2012). Ukupno je zabilježeno 26 vektorskih vrsta lisnih uši, sa različitom učinkovitošću prijenosa (Simmons i sur. 2013). Iako je prijenos vektorima najčešći način širenja ovog virusa, njegovo širenje moguće je mehanički zaraženim biljnim sokom te zaraženim sjemenom tikvica (Komata i sur. 2014; Simmons i sur. 2013; Desbiez i Lecoq 1997). Prijenos sjemenom dokazan je za vrstu *C. pepo*, u vrlo malom postotku (Desbiez i Lecoq 1997). Smatra se da se virus nalazi na vanjskom dijelu sjemenke te da do zaraze dolazi prilikom klijanja (Desbiez i Lecoq, 1997). Isti autori navode da iako biljke zaražene ZYMV-om proizvode mali broj vijabilnih sjemenki, taj mali broj virusom zaraženih sjemenki može poslužiti kao primarni inokulum za razvoj jakih epifitocija.

2.2.3. Virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV)

Virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) pripada rodu *Potyvirus*, porodice Potyviridae (Agrios, 2005). Rod *Potyvirus* najveća je grupa biljnih virusa, sadrži preko 200 vrsta biljnih virusa (Ali i Natsuaki, 2007).

WMV prvi su puta opisali Webb i Scott 1965. godine na Floridi, a na temelju kruga domaćina, unakrsne zaštite i antigenih osobina izdvojili su dva virusa i označili ih kao WMV 1 i WMV 2 (Vučurović 2012; Ali i Natsuaki 2007). Nazivom WMV 1 označeni su oni izolati koji nisu mogli zaraziti vrste iz porodice *Cucurbitaceae*, a nazivom WMV 2 oni izolati koji su mogli zaraziti vrste iz porodice *Cucurbitaceae* (Ali i Natusaki, 2007). Kasnijim istraživanjima je utvrđeno da je WMV 1 potpuno druga vrsta virusa koji se danas naziva *Papaya ringspot virus* (PRSV), a WMV 2 zapravo je *Watermelon mosaic virus* (WMV), koji se još naziva i *General watermelon mosaic virus* (Ali i Natsuaki 2007; Vučurović 2012). Ovaj je virus prisutan u mnogim dijelovima svijeta (Europa, Čile, Iran, Izrael, Japan, Meksiko, Novi Zeland, SAD, Venecuela) i smatra se virusom umjerenih i mediteranskih klimatskih regija (Vučurović 2012; Desbiez i sur. 2009).

Za razliku od ostalih pripadnika roda *Potyvirus*, WMV ima širok krug domaćina. Može zaraziti najmanje 160 vrsta biljaka iz 23 porodice dvosupnica, kako navode Gilbert i sur. (1994), odnosno više od 170 vrsta iz 27 porodica kako navode Ali i Natsuaki (2007). Ovaj

virus uzrokuje ekonomske gubitke na vrstama iz porodica *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, *Malvaceae* i *Chenopodiaceae* (Ali i Natsuaki, 2007). WMV pronalazimo u tikvicama, grašku, špinatu i mrkvi (Ali i Natsuaki, 2007).

Prisutnost WMV na biljkama uzrokuje pojavu mozaičnih simptoma, boranje i deformacije listova, nitavost listova na rubovima, također je moguća pojava klorotičnih pjega, tamnjenje žila lista te pojava uzdignutih zelenih mjehura (Ali i Natsuaki 2007; Thomas 1980). Iako široko rasprostranjen, WMV je u početku smatran manje važnim virusom jer je uzrokovao pojavu blagih simptoma. Nakon 1999. godine zapažena je pojava izolata koji uzrokuju ozbiljnije simptome (Desbiez i sur. 2007). Ako je infekcija ovim virusom ostvarena rano u vegetaciji, štete mogu biti od 50 do 100% (Vučurović i sur., 2010).

Prijenos WMV-a moguć je mehanički, sjemenom i vektorima (Lovisol, 1980). Prijenos vektorima moguć je na neperzistentan način lisnim ušima, najčešće vrstama *Aphis gossypii* i *Myzus persicae*, ali i vrstom *Aphis fabae* te mnogim drugim (Lovisol, 1980). Osim lisnim ušima, prijenos WMV moguć je i lisnim minerom *Liriomyza sativae* (Novak i Ivić, 2019).

2.2.4. Zaštitne mjere

Dvije temeljne skupine mjera za suzbijanje biljnih virusa su preventivne i terapijske mjere (Juretić, 2002). Preventivnim se mjerama sprječava zaraza i njeno daljnje širenje, a terapijskim se nastoji eliminirati virus iz zaražene biljke ili ublažiti učinak bolesti (Juretić, 2002). Terapijske mjere, u kojima se za uništavanje virusa ili ograničavanje njegovog djelovanja koriste različiti kemijski spojevi ili povišena temperatura, skupe su i vrlo često imaju fitotoksičan učinak (Juretić, 2002). Kombiniranje više preventivnih mjera odnosno integrirana zaštita od virusa u praksi omogućava postizanje dobrih rezultata (Juretić, 2002; Nameth i sur., 1986; Bulajić i sur., 2010).

Uklanjanjem korovnih biljaka, koje su vrlo često rezervoari virusa, smanjujemo mogućnosti proširenja zaraze na uzgajanu kulturu (Juretić, 2002; Nameth i sur., 1986; Desbiez i Lecog, 1997). Uklanjanje korovnih vrsta moguće je nekim od kultivacijskih zahvata (plijevljenje, košnja, iscrpljivanje) ili primjenom odgovarajućih herbicidnih pripravaka. Juretić (2002) također navodi da je za izbjegavanje širenja virusne zaraze potrebno iz nasada ukloniti i uništiti inficirane kultivirane biljke, kao i kultivirane biljke zaostale iz prijašnjih usjeva. Prostornom i vremenskom izolacijom usjeva te pravilnom higijenom u nasadu također možemo smanjiti pojavnost viroza. Zbog dokazane prenosivosti nekih virusa sjemenom (ZYMV, WMV), važna preventiva mjera je upotreba bezvirusnog sjemena i bezvirusnog sadnog materijala (Desbiez i Lecog, 1986; Lovisol 1980; Juretić, 2002).

Važnu ulogu u širenju virusnih zaraza imaju i vektori, lisne uši (Blanchard i sur. 1994; Massumi i sur. 2007; Juretić, 2002). Kako bi se smanjila mogućnost širenja zaraze, potrebno je raznim metodama djelovati na smanjenje populacije vektora (Juretić, 2002; Nameth i sur., 1986; Novak i Ivić, 2019). Korištenje zaštitnih mreža i reflektirajućih folija, kao i žutih ploča, pridonosi smanjenju populacije vektora (Nameth i sur., 1986; Juretić, 2002; Gotlin Čuljak, 2015). Kemijsko suzbijanje virusa lisnih uši koje viruse prenose na neperzistentan način (CMV, ZYMV, WMV) često može biti neučinkovito (Juretić, 2002). Insekticide je potrebno primijeniti u ranim fazama naseljavanja lisnih uši, što je moguće odrediti samo praćenjem populacije štetnika žutim pločama ili nekom drugom metodom. Prisutnost lisnih uši na tikvenjačama kroz cijelo vrijeme trajanja vegetacije zahtjeva često ponavljanje insekticidnih tretmana što znatno povećava troškove proizvodnje i ima negativan utjecaj na okoliš. Mnogi autori (Nameth i sur., 1986; Massumi i sur., 2007; Desbriez i Lecog, 1997) navode primjenu mineralnih ulja, koja stvaranjem zaštitnog sloja na listovima otežavaju hranjenje lisnim ušima. Isti autori navode da su česta primjena i teško osiguravanje dobre pokrivenosti nedostaci ove metode. Još jedan od načina suzbijanja lisnih uši je biološko suzbijanje prirodnim neprijateljima. Korisne božje ovčice (*Adalia bipunctata*), zlatooke (*Chrysoperia carnea*) ili parazitske osice roda *Aphidius*, iako kroz duže razdoblje, učinkovite su u suzbijanju lisnih uši (Maceljski, 2002; Novak i Ivić, 2019).

Najučinkovitija i najjeftinija metoda zaštite od biljnih virusa je uzgoj otpornih, manje osjetljivih ili tolerantnih kultivara (Ali i Natsuaki, 2007; Nameth i sur., 1986; Bulajić i sur. 2010; Juretić, 2002). Mnoge velike sjemenarske kuće razvile su kultivare krastavaca, dinja, lubenica, tikvica i tikvi relativno visokih ili zadovoljavajućih otpornosti na najvažnije viruse. U svojim katalogima, sjemenarske kuće navode oznake otpornosti razvijenih hibrida. Oznaka „IR“ označava hibride srednje otpornosti (engl. *intermediate resistance*), a oznaka „HR“ hibride visoke otpornosti (engl. *high resistance*) (Syngenta, katalog tikvenjača 2013). Oznaka „IR CMV/WMV/ZYMV“ prikazana na slici 2.3. kod hibrida tikvice Afrodite F1 označava da je hibrid srednje otporan na navedene viruse te da se može uspješno uzgajati u područjima sa visokim pritiskom tih virusa.

Srednja
otpornost (IR)
= CMV / WMV /
ZYMV

Osnovne karakteristike i preporuke za uzgoj:

- Bujna biljka sa srednje dugim internodijima
- Plodovi cilindrični, tamno zelene boje
- Odlična oplodnja i u stresnim uvjetima, preporuča se za ljetni uzgoj na otvorenom
- Zbog visokog potencijala rodnoći preporučuje se berba u kraćim ciklusima
- Malo se oštećuje prilikom berbe, pakiranja i tijekom transporta
- Dobro se čuva nakon berbe i u uvjetima sa nedovoljno vlage



Slika 2.3. Oznaka otpornosti hibrida (Izvor: Syngenta)

2.3. Dijagnostičke metode u biljnoj virologiji

Postavljanje točne dijagnoze odnosno utvrđivanje uzročnika biljne bolesti, prvi je korak u određivanju prikladnih mjera zaštite. U biljnoj virologiji postoji više načina za dokazivanje prisutnosti i identifikaciju biljnih virusa (Juretić, 2002). To su biotestovi na test biljkama indikatorima (mehanička inokulacija, indeksiranje), razne mikroskopske tehnike (svjetlosna i elektronska mikroskopija), serološke metode te metode temeljene na analizi nukleinskih kiselina (PCR). Biotestovi i mikroskopske metode nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze, pa se u tu svrhu koriste serološke i molekularne metode.

Brojne serološke metode razvijene su za rješavanje teorijskih problema i praktičnih pitanja u biologiji i medicini (Juretić, 2002). Isti autor navodi da se u biljnoj virologiji virusni imuni serum (antiserum) ponajprije koristi za identifikaciju pojedinog virusa ili virusnog soja. Pripremom imunog seruma određenog virusa i njegovom pozitivnom reakcijom sa biljnim sokom zaražene biljke može se zaključiti da se u toj biljci nalazi određeni virus (Juretić, 2002).

Serološke metode temelje se na specifičnoj reakciji između antigena odnosno virusa (proteina) i specifičnog protutijela (Lima i sur., 2012). Unošenjem antigena u organizam nekih kralješnjaka (primjerice kunića ili ptice) dolazi do imunskog odgovora u tijelu životinje (Lima i sur., 2012; Juretić, 2002). Kao produkt imunskog odgovora nastaju imuni serum (antiserumi) (Lima i sur., 2012; Juertić, 2002). Različite vrste protutijela vežu se na

različita mjesta na antigenu: pojedina vrsta protutijela može se vezati samo na određena mjesta na antigenu, odnosno na određene epitope (Juretić, 2002). Isti autor navodi da postoje poliklonski imuni serum i koji sadrže različite vrste protutijela (vežu se na različite epitope) te monoklonski imuni serum i koji posjeduju specifičnost za jedan epitop na antigenu. Lima i sur. (2012) navode da su nastala protutijela također proteini, iz skupine imunoglobulina (Ig). Najčešći oblik imunoglobulina je imunoglobulin G (IgG) i upravo se on najčešće koristi u serološkim reakcijama (Lima i sur., 2012).

Zbog jednostavnosti i brzine izvođenja, te zbog visoke specifičnosti i mogućnosti standardizacije, serološke se metode vrlo često koriste u detekciji virusa (Clark i Adams, 1977). Provođenje seroloških metoda moguće je na više načina: kapljičnim testovima, „strip-testovima“, testovima u agaroznom gelu (jednostruka i dvostruka radijalna imunodifuzija), ELISA-metodom te imunoelektroforezom. Najzastupljenija serološka metoda je ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

2.3.1. ELISA

Niska koncentracija virusa, nepovoljna morfologija i prisutnost raznih čestica u biljnom ekstraktu otežavaju detekciju biljnih virusa (Clark i sur., 1976). Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) jedna je od najčešće korištenih seroloških tehnika, koja se koristi za određivanje prisutnosti antigena ili protutijela u različitim uzorcima (Halassy, 2007). Ova se specifična i osjetljiva metoda koristi od 1970.-ih godina (Clark i Adams, 1977; Lima i sur., 2012).

Enzimski imunotest na čvrstoj fazi razvili su Petar Perlmann i Eva Engvall sa Štokholmskog sveučilišta u Švedskoj. Istovremeno su nizozemski znanstvenici Anton Schuurs i Bauke van Weemen razvili sličnu metodu EIA (engl. *enzyme immunoassay*). Iako se ove dvije metode razlikuju po načinu analize, obje se temelje na imunotestu sa enzimima. Ranije poznate metode (RIA, engl. *radioimmunoassay*) temeljile su se na korištenju radioaktivnih spojeva kod vizualizacije rezultata. Nakon otkrića ovih dviju metoda (ELISA, EIA) došlo je do razvoja njihovih novih podvrsta i varijacija (Lequin, 2005).

Metodom ELISA moguće je otkriti virusne čestice u jako malim koncentracijama te morfološki različitih oblika (Lima i sur., 2012). Isti autori navode da je ova metoda visoko osjetljiva, prilagodljiva i ekonomski prihvatljiva te iz tih razloga ima široku upotrebu. Ova metoda omogućava ispitivanje većeg broja uzoraka u manjem vremenskom intervalu (Lima i sur., 2012; Juretić, 2002). Kvantitativni rezultati te mogućnost polu-automatizacije izvođenja još su neke njene prednosti (Bhat i sur., 2010).

ELISA test karakterizira specifična interakcija između antigena (Ag) i protutijela (Ab, engl. *antibody*). Ta specifična interakcija (imunotest) ovisi o dobrom prostornom poklapanju Ag i Ab, što kao posljedicu ima visoku specifičnost takvih reakcija. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi koristi svojstvo raznih plastika da na svojoj površini adsorbiraju monomolekulske slojeve proteina. Također, plastična površina omogućuje jednostavno ispiranje suviška reagensa i nespecifičnih molekula. Enzimskom reakcijom na kraju testa omogućena je vizualizacija rezultata analize. (Halassy, 2007)

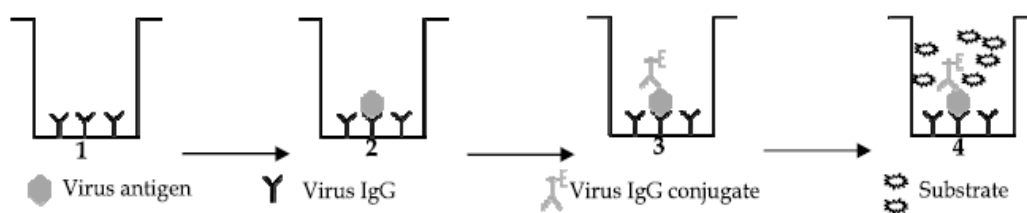
Kako navode Clark i sur. (1976), tom se tehnikom virus iz uzorka (antigen) selektivno zarobljava i imobilizira uz pomoć specifičnih protutijela prethodno adsorbiranih na stjenke plastične mikrotitarske pločice. Nadalje, zarobljeni virus reagira sa specifičnim protutijelima koja nose enzime, višak protutijela sa vezanim enzimima se ispiri, a za detekciju preostalih enzima (vezanih na protutijela) dodaje se specifični enzimski supstrat i dolazi do promjene boje (Clark i sur., 1976). Spektrofotometrijskim mjerenjem obojenog produkta određuje se jačina reakcije, a promjena boje proporcionalna je koncentraciji virusa u uzorku (Clark i sur., 1976).

Najčešće korišteni oblici metode ELISA su direktna i indirektna ELISA (Lima i sur., 2012). Osim navedenih oblika, postoje i TAS-ELISA (engl. *triple antibody sandwich*), PAS-ELISA (engl. *protein A-sandwich*), te IP-ELISA (engl. *immune precipitation*) (Lima i sur., 2012).

2.3.1.1. Direktna ELISA, DAS-ELISA

Za detekciju biljnih virusa najčešće se koristi direktna ELISA. Ova se metoda često naziva i DAS-ELISA, dvostruka protutijelna sendvič-metoda (engl. *double antibody sandwich ELISA*) (Clark i Adams, 1977; Lima i sur., 2012; Juretić, 2002). U toj se metodi mikrotitarska pločica oblaže protutijelima specifičnim za istraživani virus. Nakon ispiranja, u bunarić mikrotitarske pločice se dodaje virusni uzorak koji će se vezati na protutijela. Nevezani se virus uklanja ispiranjem. U bunariće se ponovno dodaju protutijela koja na sebi imaju vezan enzim, a višak se ispiri. Virusni se uzorak sada nalazi „zarobljen“ u sendviču između dva sloja protutijela. Dodavanjem bezbojnog enzimskog supstrata dolazi do reakcije između dodanog enzimskog supstrata i enzima vezanog na protutijela. Enzim vezan na protutijela razgraditi će dodani supstrat i doći će do promjene boje otopine. Na slici 2.3. prikazan je DAS-ELISA postupak. Promjenom boje otkriva se antigen (virus). Promjena boje registrira se vizualno i kolorimetrijski (Juretić, 2002).

Direct ELISA - DAS-ELISA



Slika 2.3. Shematski prikaz metode DAS-ELISA (Izvor: Lima i sur., 2012)

3. Materijali i metode

3.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka

Tijekom vizualnih pregleda nasada tikvica i tikvi na otvorenom prikupljani su uzorci za laboratorijsku analizu u razdoblju od 8. srpnja do 21. kolovoza 2019. godine. Uzorci su sakupljeni nasumično ili u dogovoru s proizvođačem. Uzorkovani su simptomatični listovi i plodovi (Slika 3.1.). Uzorkovanje je obavljeno u šest županija: Virovitičko-podravskoj, Varaždinskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Sisačko-moslavačkoj, Međimurskoj i Istarskoj. Ukupno su prikupljena 82 uzorka: 32 iz Varaždinske, 17 iz Virovitičko-podravske, 19 iz Dubrovačko-neretvanske, 4 iz Sisačko-moslavačke, 7 iz Međimurske te 3 uzorka iz Istarske županije (Tablica 3.1.). Od prikupljenih uzoraka 43 uzorka bile su tikvice, a 39 tikve. Uzorci koji su prikupljeni s nasumično odabranih parcela na kojima nije bio prisutan vlasnik nemaju oznaku kultivara. Uz svaki uzorak zabilježen je datum uzorkovanja, mjesto uzorkovanja (GPS koordinata) te naziv kulture. Uzorci su prikupljeni u ranijim jutarnjim satima kada temperatura zraka nije bila previsoka, kako ne bi došlo do smanjenja koncentracije virusa u listovima uslijed povećane temperature zraka. Prikupljeni uzorci spremljeni su u plastične vrećice i u prijenosnom hladnjaku dostavljeni u laboratorij. Nakon fotografiranja pohranjeni su na -20° C do početka laboratorijske analize.



Slika 3.1. Prikaz simptoma virusnih zaraza u polju (original)

Tablica 3.1. Prikaz lokacija, broja sakupljenih uzoraka, biljne vrste i datuma uzorkovanja

Županija	Lokacija		Broj prikupljenih uzoraka	Biljna vrsta	Datum uzorkovanja
	Ime	GPS koordinate			
Varaždinska županija		N 46°16'40.06"			
	Krkanec	E 16°15'20.06"	5	Tikve	08.07.2019.
		N 46°17'43.45"			
	Šijanec	E 16°15'17.16"	5	Tikve	08.07.2019.
		N 46°17'22.68"			
	Nedeljanec	E 16°16'31.98"	2	Tikvice	08.07.2019.
	Donji Knežinec	N 46°15'50.91" E 16°23'13.21"	3	Tikve	08.07.2019.
Dubrovačko-neretvanska županija		N 46°16'33.83"			
	Donji Kućan	E 16°23'26.09"	17	Tikve	08.07.2019.
		N 43°1'42.29"			
	Metković I	E 17°37'54.98"	3	Tikvice	09.07.2019.
		N 43°142.83"			
	Metković II	E 17°37'54.98"	6	Tikvice	09.07.2019.
		N 43°2'4.37"			
	Neretva	E 17°39'6.94"	1	Tikvice	23.07.2019.
		N 43°1'25.57"			
	Dobranje	E 17°37'41.33"	2	Tikvice	21.08.2019.
		N 43°1'23.14"		Tikvice	21.08.2019.
Virovitičko-podravska županija	Vrbovci	E 17°3'11.34"	1		
		N 43°2'18.90"		Tikvice	21.08.2019.
	Klada	E 17°39'5.49"	2		
		N 43°2'38.70"		Tikvice	21.08.2019.
	Bočine	E 17°37'54.29"	4		
		N 45°54'27.16"			
	Sedlarica I	E 17°12'8.92"	12	Tikvice	16.07.2019.
Sisačko-moslavačka županija		N 43°1'42.83"			
	Sedlarica II	E 17°11'57.45"	5	Tikvice	16.07.2019.
		N 45° 21'5.47"			
Sisačko-moslavačka županija	Šatornja I	E 16°21'1.77"	2	Tikve	18.07.2019.
		N 45° 21'5.59"			

	Šatornja II	E 16° 2' 1.91"	2	Tikvice	23.07.2019.
Međimurska		N 46° 21' 13.37"			
županija	Pušćine	E 16° 21' 29.33"	7	Tikve	18.07.2019.
		N 45° 29' 16.13"			
Istarska županija	Bašanija	E 13° 30' 26.69"	3	Tikvice	08.08.2019.

3.2. Laboratorijska analiza

Laboratorijska analiza provedena je u Laboratoriju za virologiju Centra za zaštitu bilja - Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu. Prikupljeni uzorci testirani su u tri navrata, u srpnju, kolovozu i rujnu. Uzorci biljnog tkiva testirani su serološkom metodom (DAS-ELISA) na prisutnost tri biljna virusa: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) i virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV).

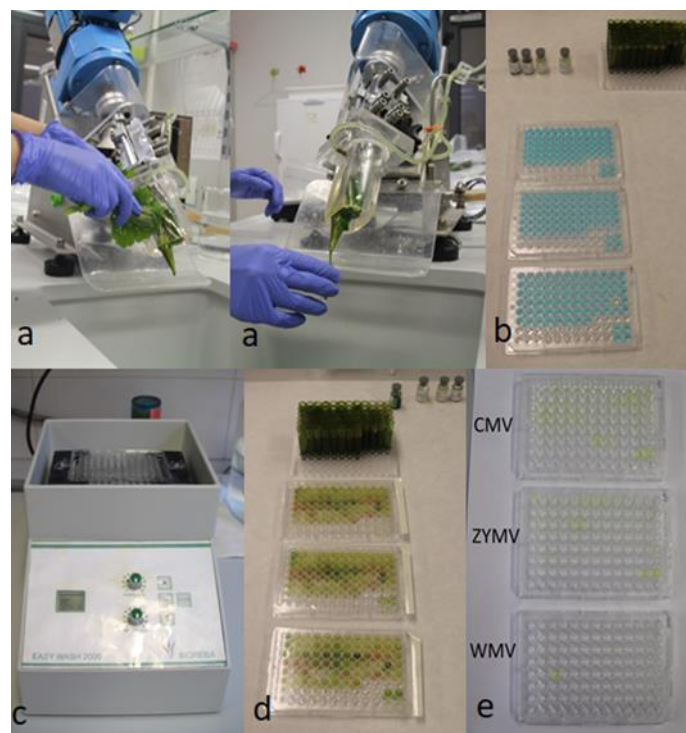
Metoda DAS-ELISA provedena je prema protokolu proizvođača BIOREBA AG (Švicarska), uz manje preinake. Korišteni protokol prikazan je u tablici 3.2. i na slici 3.3., a bio je jednak za sva tri testirana virusa.

Analize prikupljenih uzoraka provedene su u tri navrata, kao tri samostalne analize. Prilikom analize, za svaki je virus korištena posebna mikrotitarska pločica. Na svaku su pločicu nanosili uzorci i odgovarajuće kontrole, po dvije pozitivne i dvije negativne (Slika 3.4.).

Nanošenjem pozitivne i negativne kontrole na mikrotitarsku pločicu omogućuje se provjera pravilnosti izvedbe testa te aktivnosti reagensa. Pri očitavanju spektrofotometrom, prosječna vrijednost očitane apsorpcije negativne kontrole služila je kao minimalna granica za potvrdu prisutnosti virusa u uzorku. Za pripremu pozitivnih i negativnih kontrola, liofilizirano biljno tkivo je prije prve upotrebe otopljeno u 2,5 ml destilirane vode. Rezultati su očitavani spektrofotometrom nakon 60 i 90 minuta.

Tablica 3.2. Prikaz protokola za DAS-ELISA-u prema BIOREBA AG, uz manje preinake označene podebljeno

Postupak pojedine faze metode DAS-ELISA	
Oblaganje mikrotitarskih pločica protutijelima	Razrjeđenje specifičnih IgG protutijela u puferu za oblaganje (1:1000) Distribucija po 100 µl pripremljenih protutijela u bunarčić Inkubacija prekrivene pločice na 30 °C kroz 4 sata Ispiranje mikrotitarske pločice 3 puta sa puferom za ispiranje u „Easy wash“ uređaju (BIOREBA AG, Švicarska)
Priprema uzorka i nanošenje na mikrotitarske pločice	Homogenizacija uzorka sa ekstrakcijskim puferom u omjeru 1:10 uz pomoć „Pollähne Juice presses“ uređaja (MEKU, Erich Pollähne GmbH) Distribucija po 100 µl biljnog ekstrakta u bunarčić Inkubacija prekrivene pločice na 4 °C preko noći Ispiranje mikrotitarske pločice 3 puta sa puferom za ispiranje u „Easy wash“ uređaju (BIOREBA AG, Švicarska)
Nanošenje konjugiranih protutijela	Razrjeđenje konjugiranih protutijela u puferu za konjugiranje (1:1000) Distribucija po 100 µl pripremljenih konjugiranih protutijela u bunarčić Inkubacija prekrivene pločice na 30 °C kroz 5 sati Ispiranje mikrotitarske pločice 3 puta sa puferom za ispiranje u „Easy wash“ uređaju (BIOREBA AG, Švicarska)
Nanošenje supstrata	Otapanje supstrata u supstratnom puferu u koncentraciji 1 mg/ml Distribucija po 100 µl pripremljenog supstrata u bunarčić Inkubacija prekrivene pločice na sobnoj temperaturi u mraku
Očitavanje rezultata	Očitavanje rezultata spektrofotometrom ELx800 (Biotek, SAD) pri valnoj duljini 405/492 nm nakon 60 minuta Očitavanje rezultata spektrofotometrom ELx800 (Biotek, SAD) pri valnoj duljini 405/492 nm nakon 90 minuta



Slika 3.2. Koraci protokola DAS-ELISA: a) homogenizacija uzoraka sa ekstrakcijskom puferom, b) mikrotitarske pločice obložene specifičnim protutijelima i uzorci u kivetama, c) ispiranje mikrotitarskih pločica, d) uzorci biljnog soka nanášeni na mikrotitarske pločice, e) izgled mikrotitarskih pločica prije očitavanja spektrofotometrom (original)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46		48
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68				
										K+	K+
										K-	K-

Slika 3.3. Primjer rasporeda uzoraka na mikrotitarskoj pločici

Za izvođenje ove metode korišteno je pet različitih pufera:

Pufer za oblaganje pločice (engl. *Coatin buffer*), pH 9.6:

Na ₂ CO ₃	1,59 mg
NaHCO ₃	2,93 mg
NaN ₃	0,20 g
dH ₂ O	1000 ml

Pufer za ispiranje pločice (engl. *Washing buffer*), pH 7.4:

NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KCl	0,20 g
Tween 20	0,50 g
dH ₂ O	1000 ml

Ekstrakcijski pufer (engl. *Extraction buffer*), pH 7.4:

TRIS	2,40 g
NaCl	8,00 g
PVP K25	20,00 g
Tween 20	0,50 g
KCl	0,20 g
NaN ₃	0,20 g
dH ₂ O	1000 ml

Konjugatni pufer (engl. *Conjugate buffer*), pH 7.4:

TRIS	2,40 g
NaCl	8,00 g
PVP K25	20,00 g
Tween 20	0,50 g
BSA	2,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g
KCl	0,20 g
NaN ₃	0.20 g
dH ₂ O	1000 ml

Supstratni pufer (engl. *Substrate buffer*), pH 9.8:

Diethanolamine	97,00 mg
NaN ₃	0,20 g
dH ₂ O	1000 ml.

4. Rezultati istraživanja

4.1. Simptomi u polju

Pregledom usjeva tikvica i tikvi uočeni su različiti simptomi virusnih zaraza na nadzemnim dijelovima biljaka. Najčešći simptom na listovima bio je mozaik koji je varirao od blagog (Slika 4.1.) do žutog mozaika praćenog smanjenim rastom cijele biljke (Slika 4.2.). Nerijetko su uz mozaik listova bili prisutni i ostali simptomi kao što je naboranost listova (Slika 4.3.), pojava koncentričnih prstenova (Slika 4.4.), posvjetljenje između žila lista (Slika 4.5.) i mjehuravost listova (Slika 4.6.). Na pojedinim biljkama uočena je nitavost i nazubljenost listova (Slika 4.7.). Simptomi virusnih oboljenja plodova uočeni su na tikvicama, dok su plodovi kod tikva bili normalno razvijeni bez obzira na simptomatične listove. Na plodovima tikvica zabilježene su jače ili slabije deformacije (Slika 4.8. i 4.9.) Plodovi su bili sitniji, slabo razvijeni, kvrgavi, s udubljenjima na površini ploda ili bradavičastim izraslinama i lošije kvalitete (Slika 4.10- 4.12).



Slika 4.1. Simptom blagog mozaika lista (original)



Slika 4.2. Simptom žutog mozaika praćenog smanjenim rastom (original)



Slika 4.3. Naboranost lista (original)



Slika 4.4. Pojava koncentričnih prstenova (original)



Slika 4.5. Posvjetljenje između lisnih žila (original)



Slika 4.6. Kombinacija simptoma – žućenje, koncentrični krugovi, mjehuravost (original)



Slika 4.7. Smanjenje lisne površine
uslijed nitavosti i nazubljenosti lista
(Snimio D. Ivić)



Slika 4.8. Jače izražena deformacija ploda
(original)



Slika 4.9. Slabije izražena deformacija
ploda (original)



Slika 4.10. Udubljenja na površini ploda
(original)



Slika 4.11. Bradavičaste izrasline na
plodu (original)



Slika 4.12. Deformiranost i zastoj u
rastu mladih plodova (original)

4.2. Prisutnost virusa

U uzorcima sakupljenim u periodu od početka srpnja do kraja kolovoza 2019. godine dokazana je prisutnost sva tri istraživana virusa (CMV, ZYMV, WMV). Ukupno su analizirana 82 uzorka iz šest različitih županija.

U Varaždinskoj županiji su prikupljena 32 uzorka na pet lokacija, a dokazana je prisutnost sva tri istraživana virusa (Tablica 4.2.). U pojedinačnim zarazama najčešće je potvrđen ZYMV (15.6%), a slijedi ga CMV (12.5%). Pojedinačna zaraza WMV-om nije potvrđena. U najvećem broju uzoraka dokazana je mješovita zaraza CMV + ZYMV (65.63%), dok ostale dvostruke zaraze nisu dokazane. Osim kombinacije dva virusa u istom uzorku, u dva uzorka potvrđena je mješovita zaraza sa tri virusa CMV + ZYMV + WMV (6.25%).

Tablica 4.2. Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Varaždinskoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
			CMV	ZYMV	WMV	CMV +	CMV	ZYMV	CMV +
						ZYMV	+WMV	+WMV	ZYMV +WMV
Krkanec	Tikve	5	0	2	0	3	0	0	0
Šijanec	Tikve	5	0	2	0	3	0	0	0
Nedeljanec	Tikvice	2	0	0	0	2	0	0	0
Donji									
Kneginec	Tikve	3	0	0	0	3	0	0	0
Donji									
Kučan	Tikve	17	4	1	0	10	0	0	2
UKUPNO:		32	4	5	0	21	0	0	2

U Dubrovačko-neretvanskoj županiji prikupljeno je 19 uzoraka na sedam lokacija, a dokazana je prisutnost dva od tri istraživana virusa (Tablica 4.3.). U pojedinačnim zarazama najzastupljeniji je bio WMV (21%), a slijedio ga je CMV (17.8%). U ovoj županiji u pojedinačnim zarazama ZYMV nije dokazan. Najzastupljenije mješovite zaraze bile su CMV + ZYMV (31.6%) i CMV + WMV (15.8%). Mješovite zaraze ZYMV + WMV i CMV + ZYMV + WMV nisu dokazane. U tri uzorka (jedan uzorak iz Dobranje i dva uzorka iz Bočinja) nije potvrđena prisutnost virusa. Simptomatični uzorci uzeti su s kultivara Naxos F1, Brilliant F1 i Sofia F1. Prema podacima sjemenskih kuća navedeni kultivari deklarirani su kao otporni na istraživane viruse (Naxos F1 IR=CMV/WMV/ZYMV, Brilliant F1 IR=CMV/WMV/ZYMV, Sofia F1 IR=ZYMV/WMV/PRSV).

Tablica 4.3. Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Dubrovačko-neretvanskoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Kultivar	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
				CMV	ZYMV	WMV	CMV + ZYMV	CMV +WMV	ZYMV +WMV	CMV + ZYMV +WMV
Metković I	Tikvice		3	1	0	0	2	0	0	0
Metković II	Tikvice		6	2	0	0	4	0	0	0
Neretva	Tikvice		1	0	0	1	0	0	0	0
Dobranje	Tikvice	Naxos F1	2	0	0	1	0	0	0	0
Vrbovci	Tikvice	Briliant								
		F1	1	0	0	0	0	1	0	0
Klada	Tikvice	Naxos F1	2	0	0	0	0	2	0	0
Bočine	Tikvice	Sofia F1	4	0	0	2	0	0	0	0
UKUPNO:			19	3	0	4	6	3	0	0

U Virovitičko-podravskoj županiji analizirano je 17 uzoraka sa dvije lokacije, pri čemu je dokazana prisutnost sva tri istraživana virusa (Tablica 4.4.). U pojedinačnim zarazama najzastupljeniji su bili CMV (29.4%) i ZYMV (29.4%). U ovoj županiji WMV nije dokazan u pojedinačnim zarazama. Bile su prisutne mješovite zaraze sa dva virusa, CMV + ZYMV (29.4%) i CMV + WMV (5.9%). Dvostruka mješovita zaraza ZYMV + WMV te trostruka mješovita zaraza CMV + ZYMV + WMV nisu dokazane. Jedan je uzorak bio negativan na sve istraživane viruse. Simptomatični uzorci uzeti su s kultivara Galatea F1 i Tendor. Prema podacima sjemenskih kuća navedeni kultivari su deklarirani kao otporni na istraživane viruse.

Tablica 4.4 Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Virovitičko-podravskoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Kultivar	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
				CMV	ZYMV	WMV	CMV + ZYMV	CMV + WMV	ZYMV + WMV	CMV + ZYMV + WMV
Sedlarica I	Tikvice	Galatea								
		F1	12	5	1	0	5	1	0	0
Sedlarica	Tikvice	Tendor F1								
II			5	0	4	0	0	0	0	0
UKUPNO:			17	5	5	0	5	1	0	0

U Sisačko–moslavačkoj županiji sakupljena su 4 uzorka sa dvije lokacije (Tablica 4.5.). Dokazana je samo pojedinačna zaraza sa CMV-om (75%). Ostale pojedinačne zaraze (ZYMV, WMV), kao ni mješovite zaraze (CMV + ZYMV, CMV + WMV, ZYMV + CMV, CMV + ZYMV + WMV) nisu potvrđene. Jedan uzorak (lokacija Šatornja II) je bio negativan na sve istraživane viruse.

Tablica 4.5. Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Sisačko-moslavačkoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
			CMV	ZYMV	WMV	CMV + ZYMV	CMV +WMV	ZYMV + WMV	CMV + ZYMV +WMV
Šatornja I	Tikve	2	2	0	0	0	0	0	0
Šatornja II	Tikvice	2	1	0	0	0	0	0	0
UKUPNO:		4	3	0	0	0	0	0	0

U Međimurskoj je županiji na jednoj lokaciji prikupljeno 7 uzoraka s različitih parcela, u kojima je dokazan samo ZYMV (85.7%). Ostale istraživani virusi, kao i mješovite zaraze nisu zabilježeni. Jedan je uzorak bio negativan na sve istraživane viruse.

Tablica 4.6. Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Međimurskoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
			CMV	ZYMV	WMV	CMV + ZYMV	CMV +WMV	ZYMV + WMV	CMV + ZYMV +WMV
Pušćine	Tikve	7	0	6	0	0	0	0	0
UKUPNO:		7	0	6	0	0	0	0	0

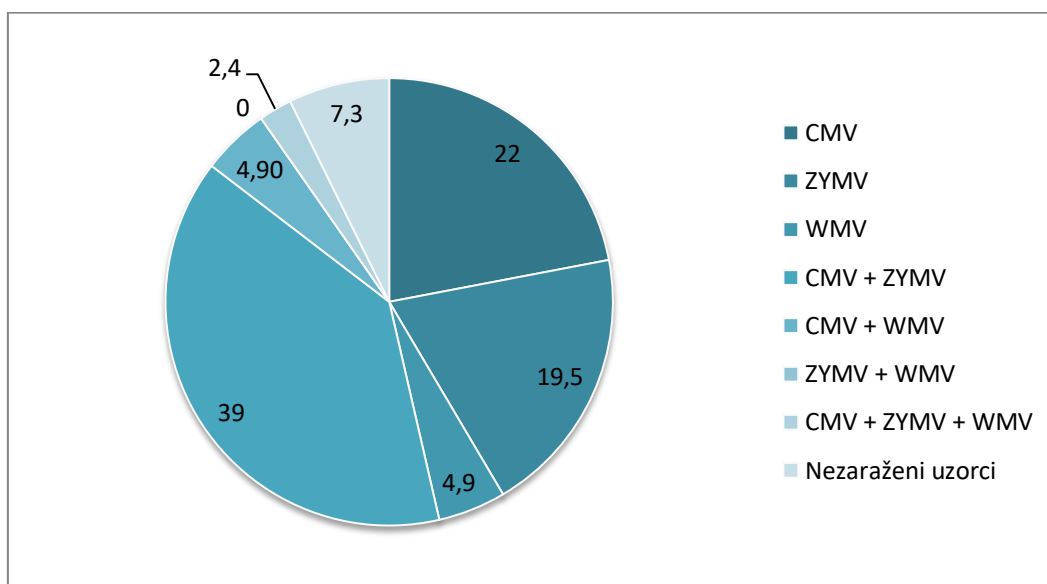
Tablica 4.7. Prisustvo i rasprostranjenost *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) i *Watermelon mosaic virus* (WMV) u Istarskoj županiji

Lokacija	Biljna vrsta	Broj uzoraka	Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze			
			CMV	ZYMV	WMV	CMV +	CMV	ZYMV	ZYMV
						ZYMV	+WMV	+ WMV	+WMV
Bašanija	Tikvice	3	3	0	0	0	0	0	0
UKUPNO:		3	3	0	0	0	0	0	0

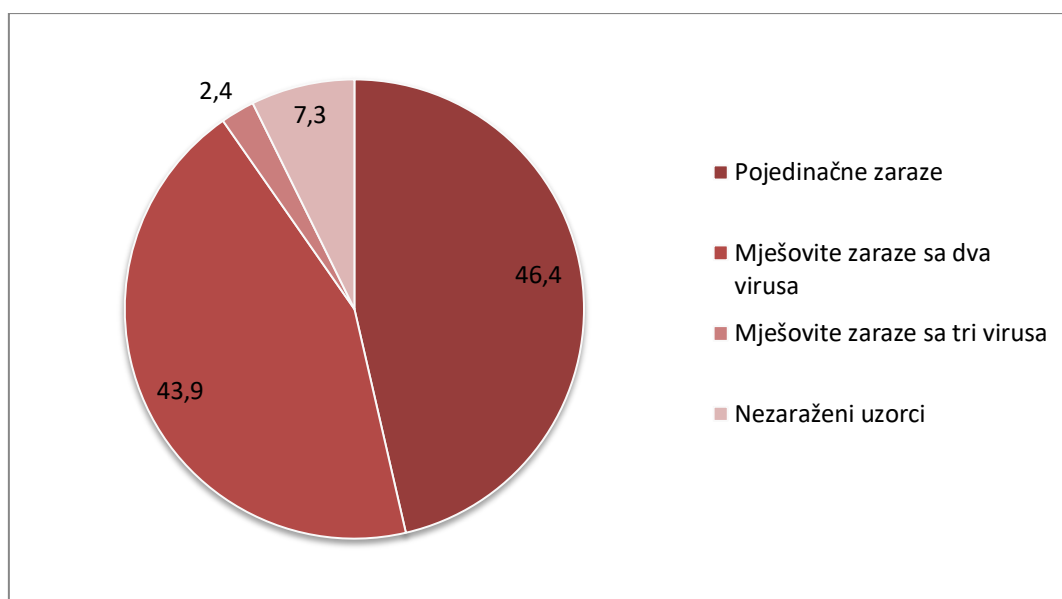
Analizom svih uzoraka sakupljenih u šest hrvatskih županija, potvrđena je prisutnost sva tri istraživana virusa (Tablica 4.8., Grafikon 4.1. i 4.2.). Najveći broj testiranih uzoraka bio je pozitivan na CMV (67.1%), drugi po zastupljenosti bio je ZYMV (60.9%), a treći WMV (12.2%). U pojedinačnim je zarazama također najzastupljeniji bio CMV (22%), slijedio ga je ZYMV (19.5%), a posljednji je bio WMV (4.9%). Mješovite zaraze sa dva virusa bile su prisutne u gotovo polovici testiranih uzoraka (43.9%). Od mješovitih zaraza, najzastupljenija je bila zaraza sa CMV + ZYMV (39%). Zaraza sa CMV + WMV je bila prisutna u malom broju uzoraka (4.9%), dok zaraza sa ZYMV + WMV nije dokazana niti u jednom uzorku. Mješovita zaraza sa tri virusa, CMV + ZYMV + WMV, dokazana je u samo 2.4% uzoraka. Iako je većina analiziranih uzoraka bila pozitivna na bar jedan od istraživanih virusa, u 7.3% uzoraka nije potvrđena prisutnost niti jednog od njih. U Grafikonu 4.1. prikazana je zastupljenost istraživanih virusa u postocima dok Grafikon 4.2. pokazuje udio pojedinih kombinacija istraživanih virusa.

Tablica 4.8. Prisutnost virusa i njihova zastupljenost u pojedinačnim i mješovitim zarazama

Broj uzoraka	Ukupan broj uzoraka zaraženih virusom			Pojedinačne zaraze			Mješovite zaraze				Nezaraženi uzorci
	CMV	ZYMV	WMV	CMV	ZYMV	WMV	CMV + ZYMV	CMV + WMV	ZYMV + WMV	CMV +	
										ZYMV	
										+WMV	
	55	50	10	18	16	4	32	4	0	2	6



Grafikon 4.1. Zastupljenost CMV, ZYMV i WMV u pojedinačnim i mješovitim zarazama u postocima



Grafikon 4.2. Udio pojedinačnih i mješovitih zaraza u ukupnoj zaraženosti analiziranih uzoraka

4.3. Korelacija simptoma i rezultata analize

Nakon završene laboratorijske analize i dobivenih podataka o prisutnosti i rasprostranjenosti istraživanih virusa bilo je moguće povezati ranije uočene simptome sa virusom uzročnikom.

Simptomi zaraze CMV prikazani su na slikama od 4.13. do 4.16. Vrlo čest simptom na biljkama zaraženim ovim virusom bila je pojava mozaika na listu (Slika 4.13.), ali i

istovremena pojava mozaika i deformiranosti lista (Slika 4.14.). Na zaraženima biljkama uočeno je smanjenje lisne površine uslijed pojave nitavosti lista (Slika 4.15.). Na plodovima zaraženih biljaka uočene su deformacije, naboranost i pjegavost (Slika 4.16.).



Slika 4.13. Simptom mozaika na listu uzrokovan CMV-om (original)



Slika 4.14. Istovremena pojava simptoma mozaika i deformacije lista uzrokovana CMV-om (original)



Slika 4.15. Simptom nitavosti lista uzrokovan CMV-om (original)



Slika 4.16. Simptomi CMV-a na plodovima tikvice (snimila A. Novak)

Simptomi zaraze ZYMV prikazani su na slikama od 4.17. do 4.22. Na biljkama zaraženim ovim virusom zapaženi su pojedinačni simptomi mozaika (Slika 4.17.), deformiranosti (Slika 4.18.), žutog mozaika (Slika 4.19.) te pojava pjegavosti lista (4.20.). Osim pojedinačnih, zapažene su i kombinacije simptoma (4.21.). Virus žutog mozaika tikvice može uzrokovati smanjenje rasta uz pojavu mozaika i žućenja listova (Slika 4.22.).



Slika 4.17. Simptom mozaika na listu uzrokovan ZYMV-om (original)



Slika 4.18. Simptom deformacije lista uzrokovan ZYMV-om (original)



Slika 4.19. Simptom žutog mozaika lista uzrokovan ZYMV-om (original)



Slika 4.20. Simptom pjegavosti lista uzrokovan ZYMV-om (original)



Slika 4.21. Simptom deformacije i mozaika lista uzrokovan ZYMV-om (original)



Slika 4.22. Smanjen rast biljke uz pojavu mozaika i žučenja uslijed zaraze ZYMV-om (original)

Simptomi zaraze WMV prikazani su na Slikama 4.23. do 4.26. Vidljiva je deformacija listova uz pojavu mjehuravosti (4.23.), odnosno uz pojavu klobučavosti lista (4.24.). Smanjenje lisne površine uslijed pojave nitavosti vidljivo je na slici 4.25. Plodovi zaraženi ovim virusom pokazuju promjenu boje i deformiranost (Slika 4.26).



Slika 4.23. Deformacija lista uz pojavu mjehuravosti uzrokovana WMV-om (Snimio D. Ivić)



Slika 4.24. Deformacija lista uz pojavu klobučavosti uzrokovana WMV-om (Snimio D. Ivić)



Slika 4.25. Simptom nitavosti lista uzrokovan WMV-om (Snimio D. Ivić)



Slika 4.26. Promjena boje i deformiranost ploda uslijed zaraze WMV-om (Snimio D. Ivić)

Simptomi mješovite virusne zaraze CMV + ZYMV prikazani su na Slikama od 4.27. do 4.30. Mješovita zaraza ovim virusima uzrokovala je izraženu nitavost listova (Slika 4.27.) kao i pojavu jako izraženog mozaika (Slika 4.28.). Na nekim je biljkama uočena deformiranost listova sa istovremenim posvjetljenjem glavnih žila lista (Slika 4.29.). Osim pojedinačnih, zapažene su i kombinacije simptoma (Slika 4.30.).



Slika 4.27. Izražena nitavost listova kao posljedica zaraze CMV-om i ZYMV-om (original)



Slika 4.28. Simptom izraženog mozaika uzrokovan zarazom sa CMV-om i ZYMV-om (original)



Slika 4.29. Deformiranost lista sa posvjetljenjem žila uslijed zaraze CVM-om i ZYMV-om (original)



Slika 4.30. Deformacije i žućenje listova te deformiranost ploda uzrokovani zarazom sa CMV-om i ZYMV-om (original)

Simptomi mješovite virusne zaraze CMV + WMV prikazani su na Slikama od 4.31. do 4.34. Na slikama 4.31. i 4.32. prikazani su simptomi mješovite zaraze na listovima. Vidljiva je promjena boje i oblika listova, uz pojavu mozaika. Na slici 4.31. vidljiva je umjerena pojava zelenog mozaika lista, dok je na Slici 4.3. vidljiva pojava žutog mozaika. Simptomi na plodovima vidljivi su u vidu izbočenja i udubljenja te deformacija ploda (Slika 4.33., Slika 4.34.).



Slika 4.31. Zeleni mozaik lista
uzrokovan zarazom CMV-om i
WMV-om (original)



Slika 4.32. Žuti mozaik lista
uzrokovan zarazom CMV-om i
WMV-om (original)



Slika 4.33. Deformacije ploda kao
posljedica zaraze CMV-om i WMV-om
(Snimio D. Ivić)



Slika 4.34. Deformacije ploda kao
posljedica zaraze CMV-om i WMV-om
(Snimio D. Ivić)

Simptomi virusne zaraze sa tri ispitivana virusa (CMV + ZYMV + WMV) prikazani su na Slici 4.35. i Slici 4.36. Uočen je slabiji rast i razvoj biljke (Slika 4.34.). Vidljiva je pojava žutog mozaika na listovima uz deformacije i naboranost listova (Slika 4.35.). Kod ovakvih zaraza plodovi su bili vrlo kržljavi ili se uopće nisu razvijali.



Slika 4.35. Slabiji rast biljke kao posljedica zaraze CMV-om, ZYMV-om i WMV-om (original)



Slika 4.36. Simptomi žutog mozaika i deformiranosti lista uzrokovani zarazom CMV-om, ZYMV-om i WMV-om (original)

5. Rasprava

Na tikvicama i tikvama javlja se velik broj uzročnika bolesti i štetnika, koji nanose ekonomski značajne štete (Vučurović, 2012). Virusne bolesti mogu uzrokovati ozbiljne ekonomske gubitke, u vidu smanjenja količine i kvalitete prinosa te pada tržišne vrijednosti plodova (Sevik i Arli-Sokmen, 2003; Lecoq i sur., 2003; Novak i Ivić, 2019; Vučurović i sur., 2009). Iako nema službenih podataka o proizvodnji tikvica i tikvi u Hrvatskoj, ove su kulture prisutne u poljoprivrednoj proizvodnji malih, ali i velikih proizvođača. Prisutnost virusa koji napadaju tikvice i tikve u Hrvatskoj prvi je puta ispitana u ovom radu.

Tri virusa, virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika tikvice (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) te virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) istraživani su na tikvicama i tikvama u uzgojnim područjima šest hrvatskih županija. U fazi prvotnog planiranja ovog istraživanja, kao lokacije uzimanja uzoraka odabrane su tri županije: Varaždinska, Virovitičko-podravska i Dubrovačko-neretvanska. Županije su odabrane zbog saznanja o postojanju veće proizvodnje tikvica i tikvi, kao i prisutnosti virusnih oboljenja u prijašnjim godinama. Uslijed nepoznatih razloga koji su doveli do smanjenja broja zaraženih nasada tikvica i tikv u Dubrovačko-neretvanskoj županiji, došlo je do potrebe za proširivanjem lokacija uzimanja uzoraka kako bi se prikupio planiran broj uzoraka. Iz navedenih razloga istraživanje je u konačnici provedeno u šest županija: Varaždinskoj, Virovitičko-podravskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Međimurskoj, Sisačko-moslavačkoj i Istarskoj.

Na biljkama tikvica i tikvi sa kojih su uzimani uzorci, zapaženi su različiti simptomi. Neki od simptoma zapaženih na uzorkovanim biljkama bili su: mozaik lista u slabijem ili jačem intenzitetu, pojava žutog mozaika listova, razni oblici deformacije lista uslijed kojih je moguća i redukcija lisne površine (primjerice nitavost lista), mjehuravost lista, pojava pjega tamno zelene boje, slabije ili jače izražene deformacije plodova, pojava izbočenja i udubljenja na plodovima te kržljivost cijele biljke. Vrlo često je na biljkama uočena i pojava više simptoma istovremeno. Pregledom biljaka uočena je i gradacija simptoma, to jest pojava jače izraženih simptoma istog tipa. Zbog navedene raznolikosti simptoma bilo je teško uočiti povezanost simptoma sa vrstom virusa koji ga uzrokuje. U periodu uzimanja uzoraka, na biljkama tikvica i tikvi nisu zapažene lisne uši. S obzirom na to da promatranje populacije lisnih uši nije bilo cilj ovog rada, postoji mogućnost da lisne uši jednostavno nisu bile primijećene.

Analizom ukupno 82 uzorka, od čega 43 tikvica (*Cucurbita pepo*) i 39 tikvi (*Cucurbita maxima*) dokazana je prisutnost sva tri istraživana virusa u Hrvatskoj. ZYMV i WMV su prvi puta dokazani u Hrvatskoj. U tri su županije dokazana sva tri istraživana virusa. U preostalim županijama dokazana je prisutnost po jednog istraživanog virusa. Najzastupljeniji je bio CMV prisutan u 67.1% uzoraka, zatim ZYMV (60.9%) te WMV (2.2%). Vučurović (2012) je u svom istraživanju provedenom u razdoblju od 2007. do 2011. godine dokazala prisutnost CMV, ZYMV i WMV na tikvama u Srbiji. U razdoblju od pet godina, koliko je trajalo istraživanje, ZYMV dokazan je u 71.7% uzoraka, WMV u 30.3% , a CMV u 20.7% (Vučurović, 2012). Zindovic i sur. (2017) su u istraživanju provedenom 2015. godine prvi puta dokazali prisutnost ista tri virusa na tikvenjačama u Crnoj Gori (CMV 62.4%, WMV 50.5%, ZYMV 12.9%). U Iranu je prisutnost navedena tri virusa na tikvenjačama dokazana u zaštićenim prostorima (CMV 34.28%, ZYMV 33.91%, WMV 8.02%) (Massumi i sur. 2007), ali i na polju (CMV 49%, ZYMV 35%, WMV 26%) (Mohammadi i sur. 2016). Köklü i Yilmaz (2006) dokazali su prisutnost CMV-a, ZYMV-a i WMV-a na tikvenjačama u Turskoj, najzastupljeniji je bio ZYMV, zatim WMV te CMV. Sevik i Arli-Sokmen (2003) dokazali su prisutnost sva tri navedena virusa na tikvenjačama u Samsunu u Turskoj (WMV 53.9%, ZYMV 38.8%, CMV 20.6%). Romay i sur. (2014) navode CMV, ZYMV i WMV kao samo neke od virusa koji su prisutni na tikvenjačama u Latinskoj Americi i Karipskim otocima. Nameth i sur. (1986) navode prisutnost ovih virusa na tikvenjačama u Kaliforniji.

CMV od prije je prisutan u Hrvatskoj. Škorić i sur. (1996) zabilježili su pojavu ovog virusa na rajčici u dolini Neretve. Bjeliš i sur. (2007) i Luigi i sur. (2011) detektirali su njegovu pojavu na maslini u obalnim dijelovima Hrvatske. Novak i Ivić (2019) navode prisutnost ovog virusa na krastavcima, paprici i tikvicama. Osim na kultiviranim biljkama, CMV je zabilježen i na nekim samoniklim biljkama (Juretić, 1974), ali i korovnim vrstama (Škorić i sur., 2000) u Hrvatskoj. CMV u pojedinačnim je zarazama zabilježen u 22% uzoraka. Ovaj je virus zabilježen u uzorcima iz svih županija osim Međimurske. Mnogi su autori u svojim istraživanjima zabilježili prisutnost CMV-a u uzorcima tikvenjača u Koreji (Kim i sur., 2010), Turskoj (Yardimci i sur. 2015; Ozaslan i sur., 2006), Srbiji (Vučurović, 2012), Kirgistanu (Mazenov i Serçe, 2018).

Prisutnost ZYMV, koji se smatra najštetnijim virusom tikvenjača u svijetu (Vučurović i sur., 2009), nije ranije zabilježena u Hrvatskoj. U ovom je radu ZYMV u pojedinačnim infekcijama zabilježen u 19.5 % uzoraka. Od šest županija u kojima su sakupljani uzorci, ovaj je virus potvrđen u četiri (Varaždinskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Virovitičko-podravskoj te Međimurskoj). Vučurović i sur. (2009b) potvrdili su pojedinačnu zarazu ZYMV-om (23.53%)

na tikvenjačama u Srbiji. Potvrđena je prisutnost ZYMV-a na tikvicama i tikvama na Floridi (oko 30%) (Adlerz i sur., 1983). Zaraze ovim virusom potvrđene su u Nizozemskoj (Schrijnwerkers i sur., 1991), Velikoj Britaniji, Turskoj, Libanonu, Jordanu, Egiptu, Japanu, Australiji, Kanadi, SAD-u (Sammons i sur., 1989), Iranu (Hosseini i sur., 2007), Francuskoj (Lecoq i sur., 2009), Španjolskoj, Italiji, Izraelu, Maroku, Njemačkoj (Adlerz i sur., 1983).

WMV, koji također nije prethodno potvrđen u Hrvatskoj, u ovom je radu u pojedinačnim zarazama potvrđen u 4.9% uzoraka. Utvrđeno je da je taj virus prisutan u tri županije: Varaždinskoj, Dubrovačko-neretvanskoj i Virovitičko-podravskoj. Pojedinačna zaraza WMV-om dokazana je samo na uzorcima iz Dubrovačko-neretvanske županije. Lecoq i Desbiez (2008) navode da je ovaj virus prisutan u mediteranskim područjima sa toplom klimom. Istraživanja WMV-a u Srbiji pokazala su znatno veću prisutnost ovog virusa (čak i do 100%) (Vučurović i sur., 2010). WMV na tikvama i drugim tikvenjačama prisutan je i na Novom Zelandu (60-100%) (Thomas, 1980). Prisutnost virusa u Francuskoj zabilježena je prije četrdesetak godina, a novija su istraživanja potvrdila prisutnost novih sojeva Desbiez i sur. 2009). U Španjolskoj su Moreno i sur. (2004) dokazali varijabilnost populacije WMV-a. Virus mozaika lubenice prisutan je u mnogim regijama Turske (Samson 22.4%) (Sevik i Arli-Sokmen, 2003; Kamberoglu i sur., 2015).

Osim pojedinačnih zaraza (46.4%), u ovom je istraživanju utvrđeno i postojanje mješovitih zaraza (46.3%) sa dva odnosno tri istraživana virusa. Najzastupljenija mješovita zaraza bila je ona sa CMV i ZYMV, čak 39%. Mješovita zaraza CMV-om i WMV-om potvrđena je u 4.9% uzoraka, dok mješovita zaraza ZYMV-om i WMV-om nije potvrđena. Mješovita zaraza sa sva tri virusa potvrđena je u 2.4% uzoraka. Mješovitu zarazu sa sva tri virusa, kao i mješovite zaraze sa dva virusa (CMV + ZYMV, CMV + WMV) dokazali su i Kim i sur. (2010) na tikvicama u Koreji. Mješovitu zarazu sa tri istraživana virusa potvrdili su i Köklü i Yilmaz (2006) i Sevik i Arli-Sokmen (2003) na tikvenjačama u Turskoj, kao i Vučurović i sur. (2009b) u Srbiji. Zarazu CMV-om i ZYMV-om u Turskoj potvrdili su Ozaslan i sur. (2006). Subašić i sur. (1990) navode kako je CMV u prirodi češće u miješanim nego u pojedinačnim zarazama, što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Gal-on (2007) navodi da su mješovite zaraze CMV, ZYMV, CMV i još nekim virusima vrlo česte kod tikvenjača, što je također u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Od ukupnih zaraza, 45.1% bile su mješovite zaraze. Učestalost mješovitih zaraza potvrđuju i drugi autori (Lecoq i sur., 2009; Gilbert i sur., 1994; Gal-on, 2007).

Na biljkama zaraženim CMV-om uočeni su raznovrsni simptomi mozaika, deformacija lista, smanjenja lisne površine uslijed pojave nitavosti te deformiranost plodova. Uočeni

simptomi u skladu su sa zapažanjima drugih autora. Mnogo je autora uočilo različite simptome zaraze CMV-om: mozaika lista (izmjenjena svijetlih i tamnih zelenih dijelova lista), žuti mozaik, mjehuravost, žućenje, posvjetljenje žila lista, nitavost, kloroza i šarenilo listova, klobučavost, smanjen rast biljke, pjegavost plodova, deformacije plodova i pojava bradavičastih izraslina te smanjenje broja plodova (Rani i sur., 2014; Yardimci i sur., 2015; Kim i sur. 2010; Bagi i sur., 2016). Postojanje različiti sojeva virusa, kao i mnogo različitih domaćina ovog virusa razlozi su pojave različitih simptoma (Mazenov i Serçe, 2018; Bagi i sur., 2016).

Simptomi uočeni na biljkama zaraženim ZYMV-om također su bili raznoliki: mozaik i žuti mozaik, deformacije i pjegavost listova, istovremena pojava mozaika i deformacija listova te pojava smanjenog rasta uz žućenje biljke. Mnogi su autori zamijetili iste ili slične simptome: žućenje, mozaik, kloroze, zakržljalogost, deformacije lista, zadržavanje zelene boje oko žila, mjehuravost lista, posvjetljenje žila, pjegavost listova, deformacije i promjene boje ploda (Simmons i sur., 2008; Vučurović i sur., 2009a; Lisa i sur., 1981; Adlerz i sur. 1983). Pojava simptoma ovog virusa ovisi o soju virusa, biljci domaćinu te stadiju rasta i razvoja u kojem je došlo do zaraze (Komata i sur., 2014).

Biljke zaražene WMV-om pokazivale su simptome deformiranosti lista sa pojavom mjehuravosti odnosno klobučavosti, došlo je do smanjenja lisne površine uslijed pojave nitavosti, plodovi su bili deformirani i promijenjene boje. Slične su simptome oboljenja opisali i drugi autori. Zabilježena je pojava različitih oblika mozaika, klorotičnog šarenila i klobučavosti listova, nitavost listova, pojava mjehuravosti, šarenilo i deformiranost plodova te zastoj u rastu biljke (Bagi i sur., 2016; Thomas, 1980; Ali i Natsuaki, 2007).

Kod uzoraka sa mješovitom zarazom uočeni su intenzivniji i destruktivniji simptomi, te istovremena pojava više simptoma. Nije uočena pojava novih oblika simptoma. Zapaženi su sljedeći simptomi: izražena nitavost lista, izražen mozaik, deformacije lista uz istovremeno posvjetljivanje žila, deformacije i žućenje listova, istovremena pojava mozaika, deformiranosti i naboranosti lista, deformacije ploda, pojava izbočenja i udubljenja na plodovima te slabiji rast biljke. Kim i sur. (2010) i Wang i sur. (2002) potvrdili su postojanje intenzivnijih simptoma kod biljaka zaraženih sa više virusa odjednom. Česta pojava mješovitih zaraza onemogućuje determinaciju virusa samo na osnovi simptoma (Bagi i sur., 2016). Pojava sinergističkog djelovanja između dva virusa uslijed mješovite zaraze razlog je pojavi jače izraženih simptoma i većih šteta (Gal-on, 2007; Desbriez i Lecoq, 1997; Wang i sur., 2002; Zeng i sur., 2007).

Na testiranim je biljkama bilo prisutno mnogo različitih simptoma koji su se ponavljali neovisno o vrsti virusa ili biljci domaćinu, pa je identifikacija virusa isključivo preko vizualno uočenih simptoma izuzetno teška tj. gotovo nemoguća. Kao potvrdu ove tvrdnje, Garcia-Arenal i Palukaitis (2008) navode nespecifičnost uočenih simptoma sa virusom uzročnikom oboljenja.

Virusi obuhvaćeni istraživanjem bili su potvrđeni u svim županijama obuhvaćenim ovim radom. Velika rasprostranjenost virusa, pogotovo na kultivarima koji su deklarirani kao tolerantni ili visoko tolerantni na sva tri virusa ukazuje na potrebu njihovog detaljnijeg proučavanja. Sva tri virusa dominantno se prenose vektorima – lisnim ušima na neperzistentan način. Prijenos ovih virusa moguć je i zaraženim prijesadnicama. Mogućnost proširenja sjemenom je slabo istražena iako neka istraživanja potvrđuju da se mogu prenijeti sjemenom (Kim i sur., 2010; Desbiez i Lecoq, 1997; Lovisolo i sur., 1980). Tijekom 2019. godine, pregledom površina pod tikvicama i tikvama, nisu uočene lisne uši prije i za vrijeme pojavljivanja simptoma na biljkama. Iz tog razloga postoji opravdana sumnja da su se virusna oboljenja pojavila zbog zaraženih prijesadnica, a kasnije proširila u nasadu nakon pojave veće populacije lisnih uši. Široka rasprostranjenost virusa otvara i raspravu o zaštitnim mjerama. Najučinkovitija mjera zaštite protiv istraživanih virusa svakako je korištenje otpornih i rezistentnih kultivara. Ovim istraživanjem pojedinačne i mješovite zaraze potvrđene su upravo na tolerantnim i otpornim kultivarima tikvica. Da li se radi o novim sojevima virusa koji su agresivniji od prije poznatih ili kultivari nisu tolerantni na mješovite zaraze, bilo bi dobro istražiti u budućnosti uz pomoć suvremenih molekularnih metoda.

6. Zaključci

Na osnovi obavljenih istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Dokazana je prisutnost virusa mozaika krastavca (CMV), virusa žutog mozaika tikvice (ZYMV) i virusa mozaika lubenice (WMV) u Virovitičko-podravskoj, Varaždinskoj i Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Prisutnost CMV-a dokazana je u Sisačko-moslavačkoj i Istarskoj županiji, a prisutnost ZYMV-a u Međimurskoj županiji.
2. Najveći broj testiranih uzoraka bio je pozitivan na virusa mozaika krastavca (67.1%). Nešto manji broj uzoraka, 60.9%, bio je pozitivan na virus žutog mozaika tikvice (ZYMV), dok je 12.2% uzoraka bilo pozitivno na virus mozaika lubenice (WMV). U 7.3% uzoraka nije potvrđena zaraza niti jednim istraživanim virusom.
3. U 46.3% testiranih uzoraka potvrđena je mješovita zaraza virusima. Najveći udio u mješovitim zarazama imali su CMV + ZYMV (39%). Kombinacija CMV i WMV potvrđena je u 4.9% uzoraka, dok je kombinacija CMV + ZYMV + WMV potvrđena u 2.4% uzoraka.
4. Zbog pojave sličnih simptoma teško je potvrditi povezanost simptoma sa vrstom virusa. Ipak, moguće je potvrditi jaču izraženost simptoma kod mješovitih virusnih zaraza sa dva ili tri istraživana virusa.
5. Istraživani virusi potvrđeni su na hibridima tikvica Galatea, Tendor, Naxos, Brilliant i Sofia koji su deklarirani kao visoko tolerantni ili tolerantni na zarazu CMV-a, ZYMV-a i WMV-a. Potvrđene su pojedinačne i mješovite zaraze sa izraženijim simptomima na plodovima tikvica.
6. Virus žutog mozaika tikvice (ZYMV) i virus mozaika lubenice (WMV) prvi su puta potvrđeni u Hrvatskoj.

7. Literatura

1. Adlerz, W. C., Purcifull, D. E., Simone, G.W., Hiebert, E. (1983). Zucchini yellow mosaic virus: A pathogen of squash and other Cucurbits in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 96, 72-74.
2. Agrios, G. N. (2005). Plant pathology, Fifth edition. Elsevier Academic Press, London, UK.
3. Bagi, F., Jasnić, S., Budakov, D. (2016). Viroze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
4. Bhat, K. A., Ashraf Bhat, M., Masoodi, S. D., Ahmad, M., Dar, G. H., Bhat, N. A., Ali Anwar, Halema Ashrav, Akhtar, S., Mir, M. R., Rashid, R., Wani, S. H., Bhat, J. A., Habib, M., Wani, N. (2010). Serodiagnosis in plant pathology: Present status and future prospects. Journal of Ecobiotechnology, 2(1), 21-28.
5. Bjeliš, M., Loconsole, G., Saponari, M. (2007). Nazočnost virusa u malsinicima Hrvatske. Pomologia Croatica, 13(3), 165-172.
6. Blanchard D., Lecoq H., Pitrat M. (1994). A Colour Atlas of Cucurbit Diseases, Observation, Identification and Control. Manson Publishing Ltd, London, Velika Britanija.
7. Blua, M. J., Perring, T. M. (1989). Effect of Zucchini yellow mosaic virus on development and yield of Cantaloupe (*Cucumis melo*). Plant Disease, Vol. 3 No. 4, 317-320.
8. Bulajić, A., Vučurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2010). Novi pravci primene otpornosti tikava u kontroli virusnih oboljenja. Pesticides and Phytomedicine (Beograd), 25(3), 201-211.
9. Clark, B. F., Adams, A. N. (1977). Characteristics of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
10. Clark, M. F., Adams, A. N., Barbara, D. J. (1976). The detection of plant viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Acta Horticulturae, 67, 43-49.
11. Desbiez, C., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., Lecoque, H. (2009). Emergence of new strains of Watermelon mosaic virus in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. Virus Research, 141, 200-208.

12. Desbiez, C., Lecoq, H. (1997). Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46, 809-829.
13. Deyo, A., O'Malley, B. (2008). Cucurbitaceae. *College Seminar 235 Food for Thought: The Science, Culture & Politics of Food*.
14. Gal-on, A. (2007). Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity-the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 139-150.
15. García-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008). Cucumber mosaic virus. *Encyclopedia of Virology*, 1, 614-619.
16. Gilbert, R. Z., Kyle, M. M., Munger, M. (1994). Inheritance of resistance to Watermelon mosaic virus in *Cucumis melo* L. *Horticultural Science*, 29(2), 107-110.
17. Gong, L., Paris, H. S., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J., Lelley, T. (2013). Genetic relationships and evolution in Cucurbitaceae viewed with simple sequence repeat polymorphisms: the centrality of *C. okeechobeensis*. *Genet Resour Crop Evol.*, 60(15), 31-46.
18. Gotlin Čuljak, T. (2015). Lisne uši na jagodama. *Glasilo biljne zaštite*, 15(5), 315-318.
19. Halassy, B. (2007). Odabrane metode u imunologiji. U: Metode u molekularnoj biologiji (Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., urednice), Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 676-686.
20. Hosseini, S., Mosahebi, G. H., Koohi Habibi, M., Okhovvat, S. M. (2007). Characterization of the Zucchini Yellow Mosaic Virus from squash in Tehran Province. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9, 137-143.
21. J. Albersio A. Lima, Aline Kelly Q. Nascimento, Paula Radaelli and Dan E. Purcifull (2012). Serology Applied to Plant Virology, Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases, Dr. Moslih Al-Moslih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0370-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/serological-diagnosis-of-certain-human-animal-and-plant-diseases/serology-applied-to-plant-virology>
22. Juretić, N. (1974). Četiri nova prirodna domaćara Virusna mozaika krastavca u Hrvatskoj. *Acta Botanica Croatica*, 33, 45-51.
23. Juretić, N. (2002). Osnove biljne virologije. Školska knjiga d.d . Zagreb
24. Kamberoglu, M. A., Desbiez, C., Caliskan, A. F. (2015). Characterization of an emergent isolate of Watermelon mosaic virus in Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17, 211-215.

25. Kim, M. K., Kwak, H. R., Jeong S. G., Ko, S. J., Lee, S. H., Kim, J. S., Kim, K. H., Choi, J. K., Choi, H. S., Cha, B. J. (2010). Characteristics of Cucumber mosaic virus Infecting Zucchini in Korea. *Plant Pathology Journal*, 26(2), 139-148.
26. Köklü, G., Yilmaz, Ö. (2006). Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection*, 87(3), 123-130.
27. Komata, J., Malzer, M., Nelson, S. (2014). Zucchini yellow mosaic. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai'i at Mānoa.
28. Kucharek T. A., Purcifull D. E. (1997): Aphid-transmitted viruses of cucurbits in Florida. Florida Cooperative Extension Service Circular, No. 1184. University of Florida, Gainesville, pp. 11.
29. Lecoq, H., Desbiez, C. (2008). Watermelon mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus. *Encyclopedia of Virology*, 3, 433-440.
30. Lecoq, H., Desbiez, C. (2012). Cucurbit viruses in Mediterranean region: an ever-changing picture. *Advances in Virus Research*, 84, 67-126.
31. Lecoq, H., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, Girard, M. (2003). Potential Involvement of Melon Fruit in the Long Distance Dissemination of Cucurbit Potyviruses. *Plant Disease*, 87(8), 955-959.
32. Lecoq, H., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., Lê Van, A., Fabre, F., Desbiez, C. (2009). Molecular epidemiology of Zucchini yellow mosaic virus in France: An historical overview. *Virus Research*, 141, 190-200.
33. Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415-2418.
34. Lešić, R. (2004). Specijalno povrćarstvo: Porodica tikvenjače (Cucurbitaceae). U: Povrćarstvo (Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Herak-Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D.) Zrinski d. d. Čakovec, 380-435.
35. Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellevalle, G., d'Aquilio M. (1981). Characterization of a Potyvirus that causes Zucchini Yellow Mosaic. *The American Phytopathological Society*, 71(7), 667-672.
36. Lovisolo, O. (1980). Viruses and viroid diseases of Cucurbits. *Acta Horticulturae* 88, 33-82.
37. Luigi, M., Godena, S., Đermić, E., Barba, M., Faggioli, F. (2011). Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. *Phytopatologia Mediterranea*, 50, 150-153.
38. Maceljiski M. (2002). Poljoprivredna entomologija, II. dopunjeno izdanje, Zrinski d.d., Čakovec.

39. Mazenov, A., Serçe, Ç. U. (2018). First report of Cucumber mosaic virus on Solanaceae and Cucurbitaceae crops in Chui region of Kyrgyzstan. Disease note. *Journal of Plant Pathology*, 101(2), 415-415.
40. McCreight, J. D. (2017). Cultivation and uses of Cucurbits. In: Genetics and genomics of Cucurbitaceae (Grumet, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J., eds.) Springer International Publishing, Switzerland, 1-12.
41. Mohammadi, K., Hajizadeh, M., Koolivanda, D. (2016). Detection and identification of four vegetable fruit viruses in west and northwest of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52(2), 279-288.
42. Moreno, I. M., Malpica, J. M., Díaz-Pendón, Moriones, E., Fraile, A., García-Arenal, F. (2004). Variability and genetic structure of population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, 318, 451-460.
43. Nameth, S. T., Dodds, J.A., Paulus, A. O., Laemmlen, F. F. (1986). Cucurbit viruses of California. *Plant Disease*, 70(1), 8-12.
44. Novak A. (2019). Virusne i gljivične bolesti u proizvodnji povrća u 2018. godini. Sažeci 4. hrvatskog stručnog skupa o proizvodnji povrća, Sv. Martin na Muri, 28.11. - 1.12.2018.
45. Novak, A., Ivić, D. (2019). Virusne bolesti tikvenjača. *Glasilo biljne zaštite* 3, 368-376.
46. Ozaslan, M., Aytekin, T., Bas, B., Halil Kilic, I., Didem Afacan, I., Dag, D. S. (2006). Virus diseases of Cucurbits in Gaziantep-Turkey. *Plant Pathology Journal*, 5(1), 24-27.
47. Palukaitis, P., Roosinck, M. J., Dietzgen, R. G., Francki, R. I. B. (1992). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 41, 281-348.
48. Paris, H. S. (2017). Genetic resources of pumpkins and squash, *Cucurbita* spp. In: Genetics and genomics of Cucurbitaceae (Grumet, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J., eds.) Springer International Publishing, Switzerland, 111-154.
49. Pleh, M., Kolak, I., Dubravec, K. D., Šatović, Z. (1998). Sjemenarstvo bundeva. *Sjemenarstvo*, 15(1-2), 43-75.
50. Rani, R., Kumar Sharma, V., Kumar, P. (2014). Diseases of Cucurbit crops and their management. *Popular Kheti*, 2(3), 120-122.
51. Robinson, R. W., Decker-Walters, D. S. (1997). Cucurbits. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K.; New York, N.Y.

52. Romy, G., Lecoq, H., Desbiez, C. (2014). Cucurbit crops and their viral diseases in Latin America and the Caribbean Islands: A review. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 227-242.
53. Sammons, B., Barnett, O. W., Davis, R. F., Mizuki, M. K. (1989). A survey of viruses infecting summer squash in South Carolina. *Plant Disease*, 73, 401-404.
54. Schaefer, H., Renner, S. S. (2011): Cucurbitaceae. In: Kubitzki, K. (eds.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 10, Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Berlin, Springer, 112-174.
55. Schrijnwerkers, C. C. F. M., Huijberts, N., Bos, L. (1991). Zucchini yellow mosaic virus; two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97, 187-191.
56. Sevik, M. A., Arli-Sokmen, M. (2003). Viruses infecting Cucurbits in Samsun, Turkey. *Plant Disease*, 88(4), 341-344.
57. Simmons, H. E., Dunham, J. P., Zinn, K. E., Munkvold, G. P., Holmes, E. C., Stephenson, A. G. (2013). Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Research*, 176, 259-264.
58. Subašić, Đ., Rusak, G., Miličić, D. (1990). Virus mozaika krastavca izdvojen iz paprike (*Capsicum annuum* L.) u BiH. *Acta Botanica Croatica*, 49, 7-12.
59. Škorić, D., Krajačić, M., Ćurković Perica, M., Halupecki, E., Topić, J., Igrc-Barčić, J. (2000). Cucumber mosaic (Cucumovirus) and associated satRNA in weed species under the natural epidemic conditions of tomato lethal necrosis in Croatia. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(3), 304-309.
60. Thomas, W. (1980) Watermelon mosaic virus, the cause of a serious disease of cucurbits in Cook Islands. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 8, 309-312.
61. Vučurović, A. (2012). Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava i epidemiologija oboljenja u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
62. Vučurović, A. Bulajić, A. Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009a). Biološka varijabilnost žutog mozaika kukuriza u Srbiji. *Pesticides and Phytomedicine (Beograd)*, 24(4), 271-280.

63. Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009b). Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna detekcija virusa žutog mozaika kukuriza. *Pesticides and Phytomedicine* (Beograd), 24, 85-94.
64. Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2010). Učestalost pojave i molekularna karakterizacija virusa mozaika lubenice poreklom iz Srbije. *Pesticides and Phytomedicine* (Beograd), 25(3), 213-230.
65. Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., Gal-on, A. (2002). Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and Potyviruses in Cucurbit hosts. *Phytopathology*, 92(2), 51-58.
66. Yardimci, N., Çulal Kiliç, H., Kör, A. (2015). Identification of Cucumber mosaic virus (CMV) on squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivars in Lakes region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24, 417-421.
67. Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D., Chen, J. (2007). Synergy between Cucumber mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus on Cucurbitaceae hosts tested by Real-time reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(6), 431-437.
68. Zindovic, J., Manglli, A., Hrnčić, S., Radonjic, S., Perovic, T., Tomassoli, L. (2017). First report of cucurbit aphid-borne yellows virus affecting summer squash and melon in Montenegro. *Disease note. Journal of Plant Pathology*, 99(1), 299.

Popis korištenih internet izvora-poveznice:

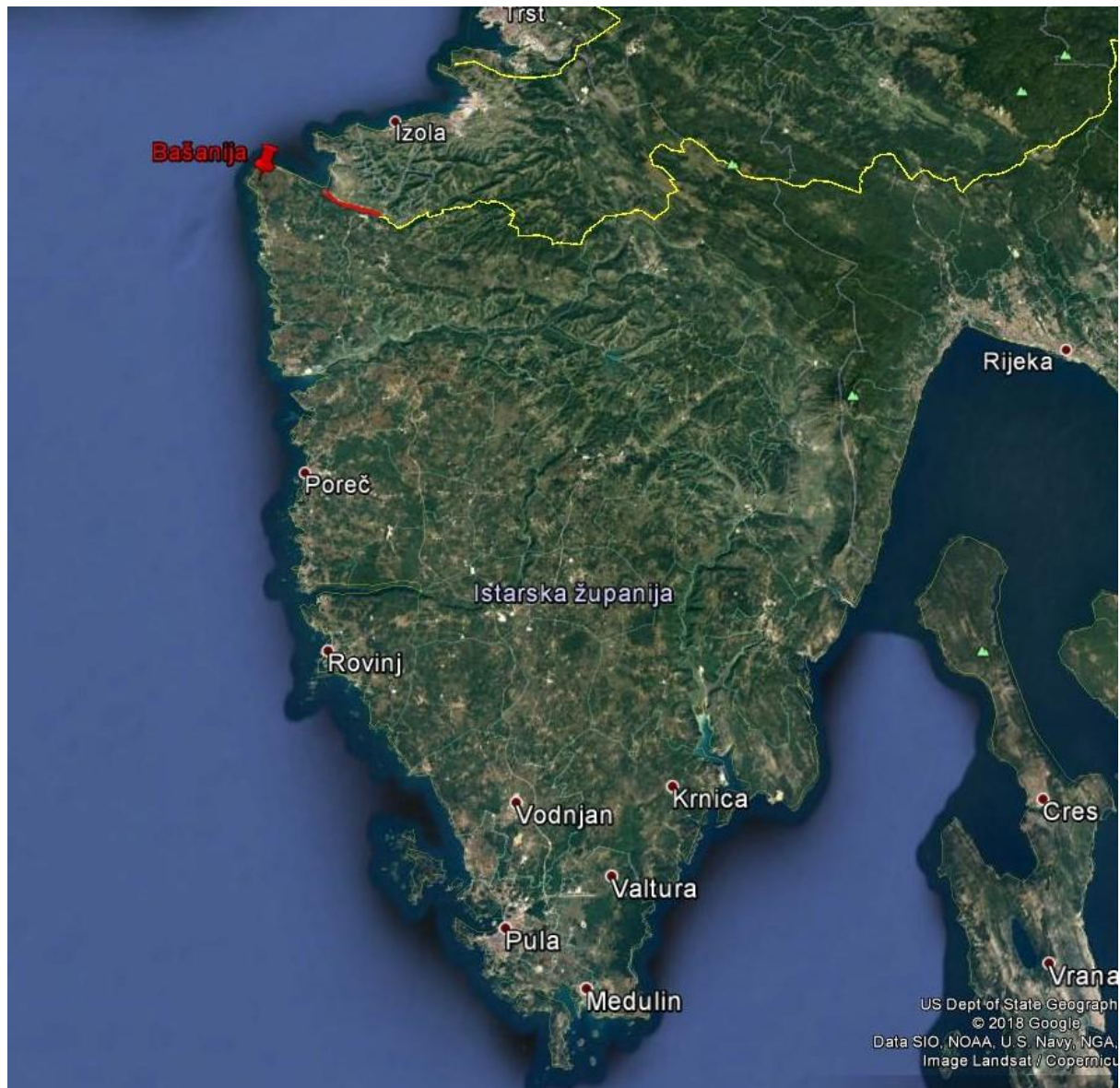
FAO- Svjetska organizacija za prehranu i hranu
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> -pristup 06.09.2019.

Ministarstvo poljoprivrede
<https://fis.mps.hr/TrazilicaSZB/Default.aspx?lan=hr-Hr> –pristup 06.09.2019.

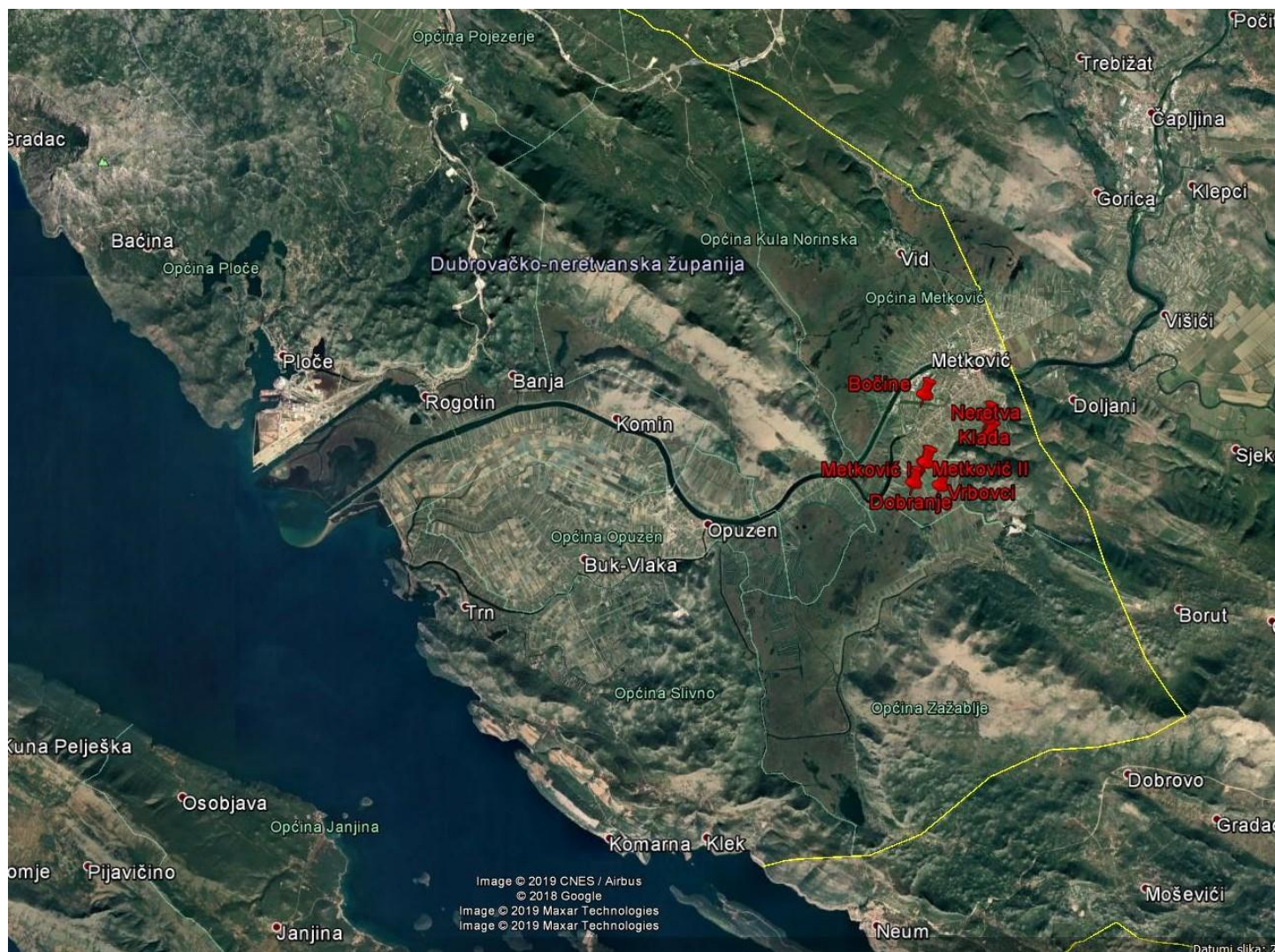
Syngenta Hrvatska
<https://www.syngenta.hr/> - pristup 07.09.2019.

8. Prilozi

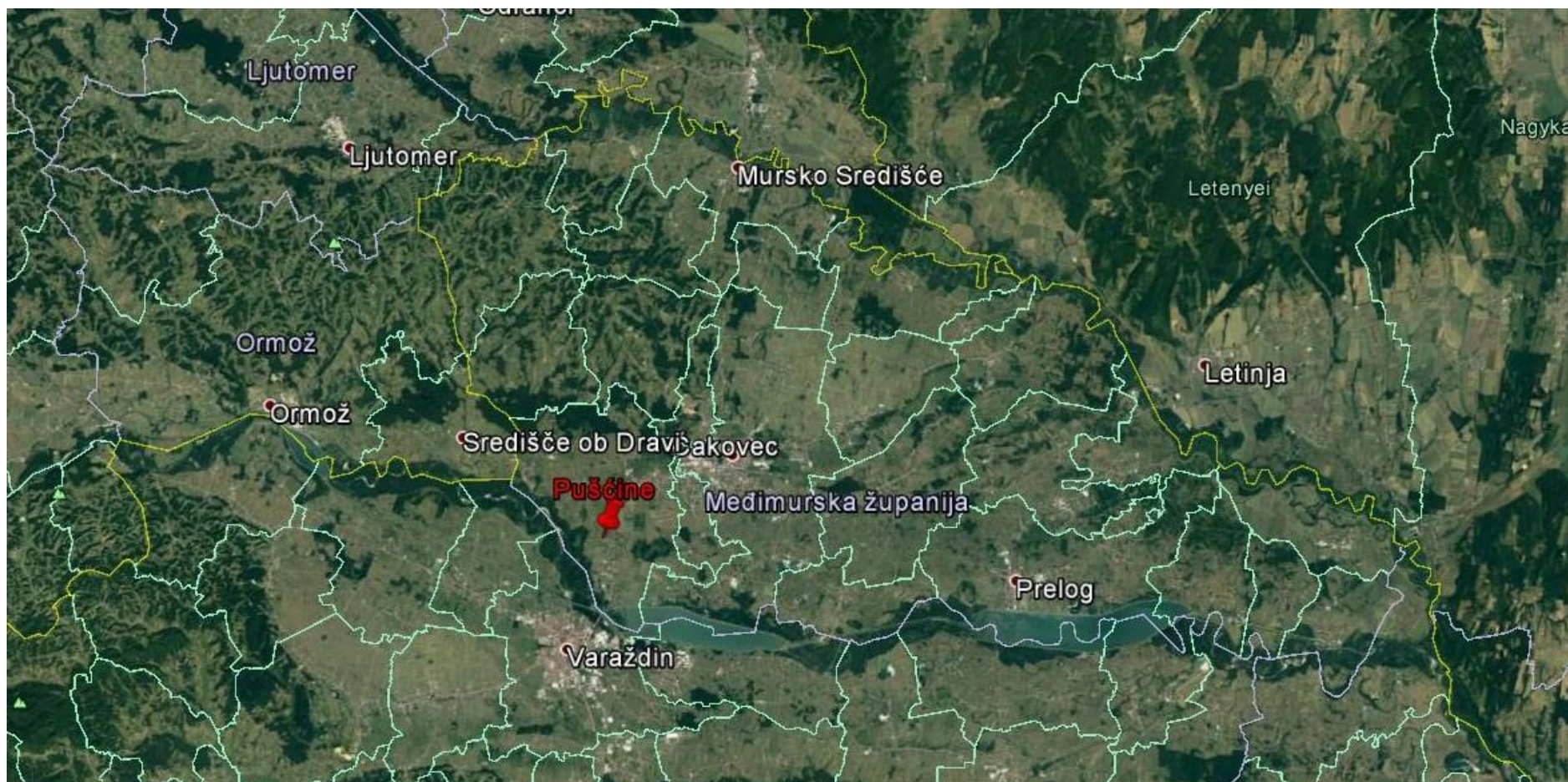
8.1. Karte lokacija uzimanja uzoraka



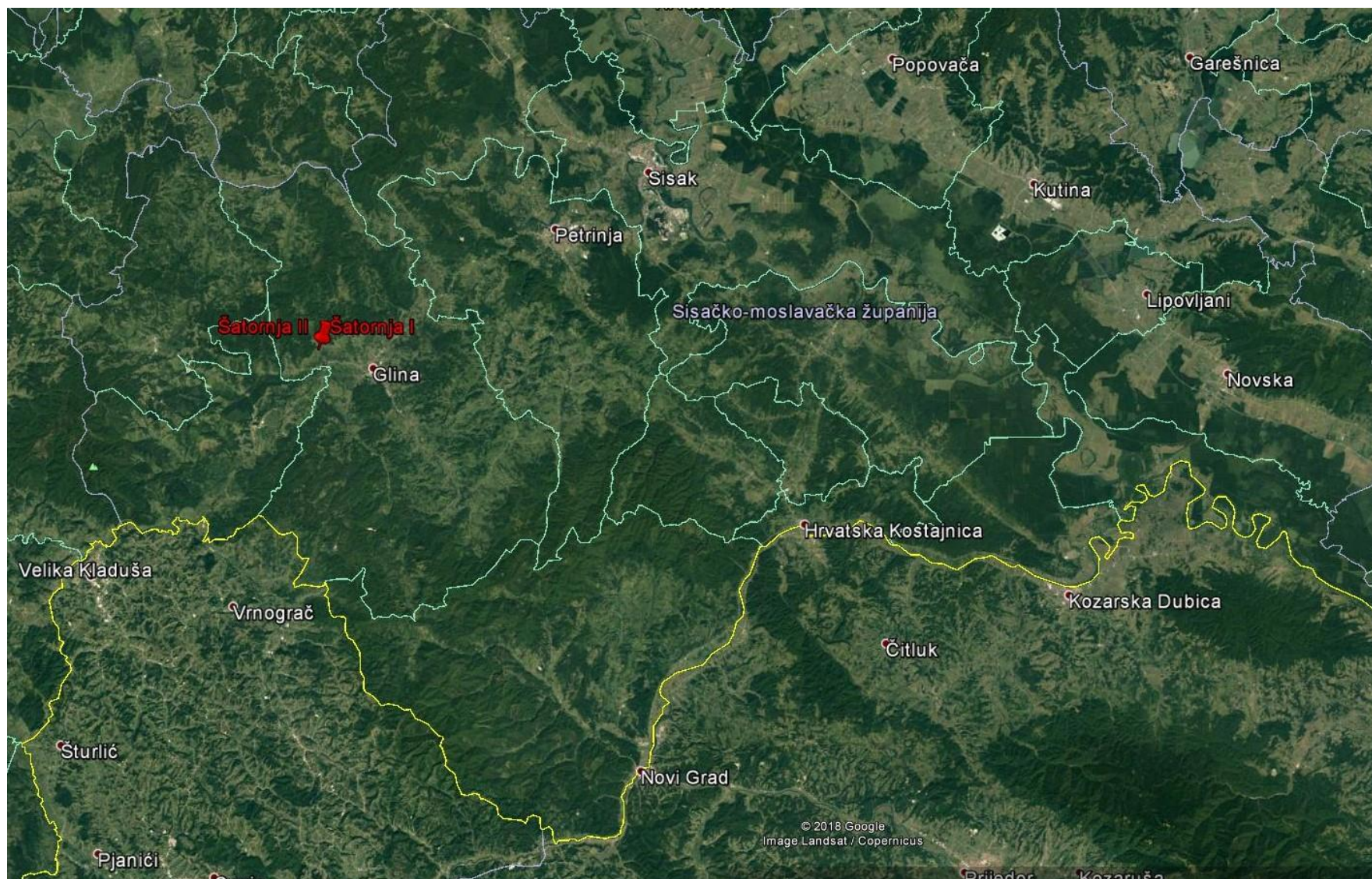
Slika 8.1. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Istarskoj županiji (Izvor: Google Earth)



Slika 8.2. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Dubrovačko-neretvanskoj županiji (Izvor: Google Earth)



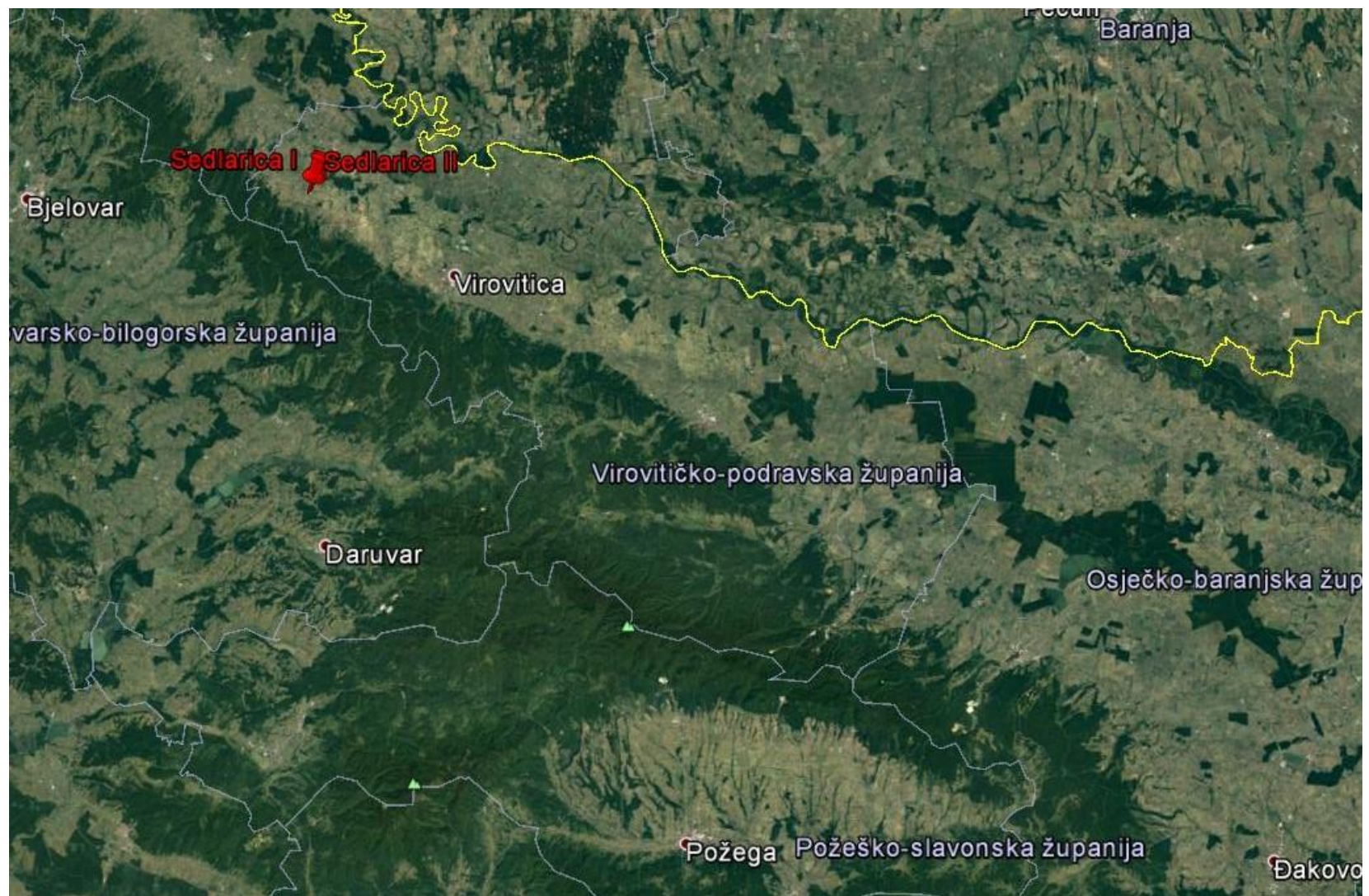
Slika 8.3. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Međimurskoj županiji (Izvor: Google Earth)



Slika 8.4. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Sisačko-moslavačkoj županiji (Izvor: Google Earth)



Slika 8.5. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Varaždinskoj županiji (Izvor: Google Earth)



Slika 8.6. Karta lokacija uzimanja uzoraka u Virovitičko-podravskoj županiji (Izvor: Google Earth)

Životopis

Lea Mihaljevski Boltek, rođena je 20. studenog 1992. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Augusta Šenoje u Zagrebu. 2007. godine upisuje Prirodoslovnu školu Vladimir Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija, gdje je maturirala 2011. godine. Preddiplomski studij „Agroekologija“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine. Stručnu praksu za vrijeme preddiplomskog studija obavljala je na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, te na Zavodu za mikrobiologiju, Agronomskog fakulteta u Zagrebu. 2017. godine stječe titulu univ. bacc. ing. agr. obranom završnog rada naslova „Određivanje sadržaja ukupnog ugljika u obradivom tlu tipa psedoglej metodom spektroskopije“, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Šestak. Iste godine upisuje studij „Fitomedicina“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Stručnu praksu za vrijeme diplomskog studija obavljala je u Zavodu za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo (danas Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu). U akademskoj godini 2018./2019. izrađuje diplomski rad pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine, u suradnji sa kolegama dr. sc. Dariem Ivićem i dr. sc. Adrijanom Novak sa Zavoda za zaštitu bilja. Koautor je originalnog znanstvenog rada objavljenog 2019. godine (Šestak, I., Mihaljevski Boltek, L., Mesić, M., Zgorelec Ž., Perčin, A. Hyperspectral sensing of soil pH, total carbon and total nitrogen content based on linear and non-linear calibration methods, Journal of Central European Agriculture).