

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana B. Vučurović

**DIVERZITET, BIOLOŠKA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA VIRUSA TIKAVA I
EPIDEMIOLOGIJA OBOLJENJA U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Ana B. Vučurović

**DIVERSITY, BIOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF CUCURBIT VIRUSES
AND DISEASE EPIDEMIOLOGY IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Komisija za ocjenu i odbranu:

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

Članovi komisije: dr Janoš Berenji, naučni savetnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Olivera Petrović-Obradović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Mirko Ivanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

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

Datum odbrane: _____

"Niko na svijetu nije jači od čovjeka koji zna", kaže japanska poslovice. Sržna sam što sam upoznala veoma jakog čovjeka, a mog mentora dr Branku Krstić, red. prof., koja je prepoznala moje kvalitete. Zahvalna sam joj na svemu što me je naučila, za podršku, beskrajno strpljenje i razumijevanje koje mi je pružila tokom izrade doktorske disertacije. Ponosna sam što mi je dr Branka Krstić bila mentor.

Zahvaljujem i dr Janošu Berenjiju, naučnom savjetniku na pomoći i iskrenim i korisnim savjetima tokom realizacije ekperimentalnog dijela i finalne verzije teksta.

Zahvaljujem se dr Oliveri Petrović-Obradović, vanr. prof. na pomoći oko dijela vezanog za proučavanje afidofaune i dr Mirku Ivanoviću, red. prof. na korisnim savjetima i sugestijama.

Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Bulajić, vanr. prof. na stalnoj pomoći i bezrezervnoj podršci koju mi je pružila tokom svih faza izrade ove disertacije.

Veliko hvala mojim kolegama dr Ivani Stanković, doc, mr Danijeli Ristić, Katarini Milojević, dipl. inž., Dušanu Nikoliću, dipl. inž. i dr Jeleni Jović, naučnom saradniku na pomoći i podršci koje su mi mnogo značile.

Iskreno hvala dr Anđi Vučetić, doc. za determinaciju biljnih vaši i korisne savjete oko postavljanja ogleda i dr Dragani Božić, doc. za pomoć oko determinacije korovskih vrsta.

Tokom svoga školovanja, a sigurno će tako biti i ubuduće, postojao je neko gdje sam uvijek imala iskrenog i bezuslovnog prijatelja, savjetnika, slušaoca, kritičara, sagovornika, neobjektivnog pratioca i pomagača. To je moja porodica. Ovo je izuzetan i sržan dan za nas. Beskrajno Vam hvala za podršku, strpljenje, brigu i razumijevanje.

DIVERZITET, BIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VIRUSA TIKAVA I EPIDEMIOLOGIJA OBOLJENJA U SRBIJI

Rezime. U periodu od 2007. do 2011. godine na 61 lokalitetu gajenja tikava u Srbiji utvrđeno je stalno prisustvo virusa sa visokim intenzitetom zaraze. Učestalost virusne zaraze se po godinama mijenjala i kretala od 30-50% u 2007. godini, preko izuzetno visokih 80% u epidemijskoj 2008. godini, da bi tokom naredne dvije godine bila konstantna i kretala se oko 40%. U posljednjoj godini ispitivanja zaraza je ponovo dostigla čak 60%. Serološkim testiranjem 1100 uzoraka sakupljenih sa 19 vrsta, sorti i varijeteta tikava detektovano je prisustvo tri virusa: virusa žutog mozaika kukuruz (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virusa mozaika lubenice (Watermelon mosaic virus, WMV) i virusa mozaika krastavca (Cucumber mosaic virus, CMV). Dodatnim testiranjem simptomatičnih uzoraka detektovano je prisustvo virusa žutila tikava perzistentno prenosivog vašima (Cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV), što predstavlja prvi nalaz ovog virusa u Srbiji i virusa bronzavosti paradajza (Tomato spotted wilt virus, TSWV), što je prvi nalaz ovog virusa na tikvama u Srbiji, ali i prvi nalaz u prirodnoj infekciji na *Cucurbita maxima* u svijetu. Najzastupljeniji virus tokom pet godina ispitivanja bio je ZYMV. Tokom prve dvije godine najčešće su bile detektovane miješane infekcije, a u posljednje tri godine pojedinačne.

U okviru ovih istraživanja dokazano je prenošenje ZYMV sjemenom *Cucurbita pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata*. Utvrđena je zaraženost jednogodišnjih i višegodišnjih korovskih biljaka, koje su prisutne u vrijeme zasnivanja usjeva tikava i u početnim fazama vegetacije, sa ZYMV, WMV, CMV i TSWV. Najzastupljeniji je bio TSWV, a njegovo prisustvo je dokazano u osam različitih korovskih vrsta, sljedeći po zastupljenosti je bio CMV, dokazan u sedam vrsta korova, dok su ZYMV i WMV bili slični po zastupljenosti, a dokazani su u pet, odnosno četiri korovske vrste. Pokazan je visok diverzitet biljnih vaši koje posjećuju usjeve tikava kroz determinaciju 57 taksona. Najzastupljenije vrste vaši bile su *Aphis fabae*, *Anoecia corni*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* i *Acyrtosiphon pisum*. Najveći diverzitet i najveća brojnost vrsta vaši bila je u prvim nedjeljama po nicanju biljaka.

Detekcija i identifikacija do nivoa vrste svih prouzrokovaca virusnih oboljenja na tikvama u Srbiji potvrđena je primjenom RT-PCR metode i odgovarajućih

specifičnih prajmera i sekvencioniranjem. Fenotipska varijabilnost i krug domaćina za ZYMV, WMV i CMV ispitivani su primjenom biotesta na ukupno 45 test biljaka.

U toku ovih istraživanja su uspostavljeni ili unaprijeđeni protokoli za molekularnu detekciju svih pet virusa koji se javljaju na tikvama u Srbiji. Obavljena je molekularna karakterizacija ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV analizom sekvenci i filogenetskim analizama. Analize sekvenci CP gena izolata ZYMV porijeklom iz Srbije su pokazale da oni pripadaju Centralno-evropskoj grupi izolata. Analize sekvenci WMV izolata, na osnovu NIB i CP gena pokazale su da se izolati WMV iz Srbije grupišu u dvije grupe, od čega jedna predstavlja grupu „emerging“ izolata koji prouzrokuju izražene simptome i velike štete, što predstavlja prvi nalaz ovih izolata u Srbiji. Na osnovu CP gena, izolati CMV iz tikava iz Srbije svrstali su se u okviru podgrupe IA, a izolati TSWV na osnovu N gena u okviru podgrupe 1 Evropske grupe, zajedno sa drugim izolatima ovog virusa iz Srbije. Na osnovu filogenetskih analiza preklapajućih CP i MP gena izolati CABYV grupisali su se u dvije grupe, većina izolata iz Srbije našla se u okviru Mediteranske grupe zajedno sa ostalim izolatima porijeklom iz Evrope i mediteranskog regiona, dok su se pojedini izolati grupisali sa Azijskim izolatima u okviru Azijske grupe.

Dobijeni rezultati ilustruju kako su virusi tikava u Srbiji dinamična i raznovrsna grupa patogena, kako po broju zastupljenih vrsta tako i po njihovom diverzitetu i ispoljenim razlikama u biološkim, epidemiološkim i molekularnim osobinama, što objašnjava povremenu epidemijску pojavu i teškoće u kontroli.

Ključne riječi: tikve, virusi, biološka karakterizacija, serološka karakterizacija, molekularna karakterizacija, epidemiologija

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 578.869:635.623(043.3)

DIVERSITY, BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCURBIT VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIOLOGY IN SERBIA

Abstract. In the period from 2007 to 2011 constant high levels of viral infections were detected in 61 cucurbit growing localities in Serbia. The frequency of viral infection fluctuated over the years, ranging from 30-50% in 2007, to the extremely high 80% in the epidemic year of 2008, while it was constant and around 40% in the next two years. In the last year of investigation, the frequency reached a very high level of 60%. Serological testing of 1100 collected samples proved the presence of three viruses: *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV). Additional testing of symptomatic samples revealed the presence of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), which represents the first detection of CABYV in Serbia, and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), which is the first report of TSWV on cucurbits in Serbia and the first report of *Cucurbita maxima* as natural host plant worldwide. ZYMV was the most prevalent virus during this five year survey. Mixed infections were the most frequent infection type in the first two years, while single infection prevailed in the last three years of investigation.

During this investigation, transmission of ZYMV by seeds of *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* and *C. moschata* was proved. Both annual and perennial weeds, which are present during the establishment of cucurbit crops, and in the beginning stages of vegetation, were infected with ZYMV, WMV, CMV and TSWV. The most prevalent was TSWV which was detected in eight different weed species, the second most prevalent virus in weeds was CMV, detected in seven different weed species, while the prevalence of ZYMV and WMV was similar and they were detected in five and four weed species, respectively. A high diversity of aphids which are visiting cucurbit crops was detected through the determination of 57 aphid taxons. The most common aphid species were *Aphis fabae*, *Anoecia corni*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* and *Acyrtosiphon pisum*. The greatest diversity and the largest number of aphids were detected in the first few weeks after plant sprouting.

The detection and identification of the species level for all five cucurbit viruses in Serbia were confirmed by RT-PCR method and suitable specific primers. Bioassay

on 45 test plants was used to determine phenotypic variability and host range for ZYMV, WMV and CMV.

During the course of this investigation protocols for molecular detection of all five cucurbit viruses in Serbia were established or improved. Molecular characterizations of ZYMV, WMV, CMV, TSWV and CABYV were conducted by sequence and phylogenetic analyses. Sequence analysis of the CP gene revealed that Serbian ZYMV isolates belong to the Central European group of isolates. Sequence analysis based on NIb and CP genes showed that Serbian WMV isolates are grouped in two groups, and one of them represents a group of "emerging" strains containing isolates which are known for causing severe damaging symptoms on cucurbits, and this represents the first report of these isolates in Serbia. Based on the CP gene of cucurbit, CMV isolates from Serbia are classified within subgroup IA, and Serbian TSWV isolates, based on the N gene, in subgroup 1 of the European group together with other Serbian TSWV isolates. Based on phylogenetic analysis of the overlapping CP and MP genes, CABYV isolates were grouped into two groups. The majority of isolates from Serbia were grouped in the Mediterranean group, together with other isolates originating from Europe and the Mediterranean region, while some isolates were grouped with the Asian isolates in the Asian group.

The obtained results illustrate that cucurbit viruses in Serbia are a dynamic and diverse group of pathogens, based on the number of species, their diversity and differences in the biological, epidemiological and molecular characteristics, which explains the occasional occurrence of epidemics and difficulties in virus control.

Key words: cucurbits, viruses, biological characterization, serological characterization, molecular characterization, epidemiology

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 578.869:635.623(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Tikve kao gajene biljke.....	3
2.1.1. Geografsko porijeklo tikava.....	3
2.1.2. Morfologija tikava.....	4
2.1.3. Gajenje, značaj i upotreba tikava.....	4
2.2. Bolesti i štetočine tikava.....	5
2.3. Virusi tikava i njihov značaj.....	5
2.4. Proučavanje virusnih oboljenja tikava u Srbiji.....	7
2.5. Osnovne karakteristike virusa tikava prisutnih u Srbiji.....	7
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	10
4. MATERIJAL I METODE.....	11
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka tikava	11
4.2. Serološka ispitivanja.....	13
4.2.1. Direktna imunoenzimaska metoda na ploči (DAS-ELISA).....	13
4.3. Biološka identifikacija i karakterizacija.....	15
4.3.1. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata ZYMV.....	16
4.3.2. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata WMV.....	16
4.3.3. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata CMV.....	16
4.3.4. Biološka identifikacija izolata TSWV.....	17
4.3.5. Biološka identifikacija izolata CABYV.....	17
4.4. Prenosnje ZYMV, WMV i CMV sjemenom tikava.....	17
4.4.1. Sjetva sjemena, proizvodnja sijanaca i utvrđivanje procenta prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom.....	18
4.5. Održavanje ZYMV, WMV i CMV u korovskim biljkama.....	19
4.5.1. Sakupljanje uzoraka korovskih biljaka u usjevima tikava.....	19
4.5.2. Detekcija virusa u korovskim biljkama upotrebom DAS-ELISA testa.....	20
4.6. Ispitivanja prisustva biljnih vašiju u usjevima tikava i sastava njihove populacije.....	20
4.6.1. Postavljanje lovni klopki i sakupljanje uzoraka.....	20
4.6.2. Analiza sakupljenih uzoraka biljnih vaši.....	21
4.7. Molekularna ispitivanja.....	22
4.7.1. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR).....	22
4.7.1.1. Molekularna detekcija izolata ZYMV.....	24
4.7.1.2. Molekularna detekcija izolata WMV.....	27
4.7.1.3. Molekularna detekcija izolata CMV.....	28
4.7.1.4. Molekularna detekcija izolata TSWV.....	29
4.7.1.5. Molekularna detekcija izolata kompleksa virusa koji izaziva žutilo tikava.....	29
4.7.1.5.1. Molekularna detekcija izolata CABYV.....	30
4.7.1.6. Analiza PCR produkta.....	33
4.7.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija najznačajnijih virusa tikava.....	34
4.7.2.1. Molekularna identifikacija najznačajnijih virusa tikava.....	35
4.7.2.2. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa tikava.....	35
4.7.2.2.1. Proračun genetičke sličnosti.....	35
4.7.2.2.2. Filogenetske analize.....	36
4.7.2.2.2.1. Filogenetske analize ZYMV.....	36

4.7.2.2.2. Filogenetske analize WMV.....	38
4.7.2.2.3. Filogenetske analize CMV.....	40
4.7.2.2.4. Filogenetske analize TSWV.....	41
4.7.2.2.5. Filogenetske analize CABYV.....	43
5. REZULTATI.....	45
5.1. Simptomi u polju i učestalost oboljenja.....	45
5.2. Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima tikava primjenom DAS-ELISA.....	50
5.3.1. Reakcije test biljaka prema ispitivanim izolatima ZYMV.....	69
5.3.2. Reakcije test biljaka prema ispitivanim izolatima WMV.....	76
5.3.3. Reakcije test biljaka prema ispitivanom izolatu CMV.....	83
5.3.4. Biološka identifikacija izolata TSWV.....	90
5.3.5. Biološka identifikacija izolata CABYV.....	91
5.4. Serološka detekcija prisustva ZYMV, WMV i CMV u biljkama odabranim za ispitivanje prenošenja virusa sjemenom.....	91
5.4.1. Simptomi na sijancima, serološka detekcija prisustva ZYMV, WMV i CMV u sijancima tikava i utvrđivanje procenta prenošenja virusa sjemenom.....	92
5.5. Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima korova primjenom DAS-ELISA.....	94
5.6. Prisustvo biljnih vaši u usjevima tikava i sastav njihove populacije.....	103
5.6.1. Sastav populacije biljnih vaši sakupljenih u lovnim klopnama.....	103
5.6.2. Analiza diverziteta biljnih vaši po usjevima.....	104
5.6.2.1. Analiza diverziteta biljnih vaši usjevima u 2009. godini.....	104
5.6.2.1.1. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac I.....	105
5.6.2.1.2. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac II.....	107
5.6.2.1.3. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Čenej.....	110
5.6.2.2. Analiza diverziteta biljnih vaši usjevima u 2010. godini.....	113
5.6.2.2.1. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac I.....	113
5.6.2.2.2. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac II.....	116
5.6.2.2.3. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Kisač.....	118
5.6.2.3. Analiza diverziteta biljnih vaši usjevima u 2011. godini.....	120
5.6.2.3.1. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Bački Petrovac.....	120
5.6.2.3.2. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Kisač.....	123
5.6.2.4. Usporedna analiza afidofaune po usjevima uljane tikve, lokalitetima i godinama.....	125
5.6.2.4.1. Promjene Shannon-Weaver-ovog indeksa kroz nedjelje po usjevima i lokalitetima.....	126
5.7. Molekularno dokazivanje najznačajnijih virusa tikava.....	129
5.7.1. Molekularna detekcija ZYMV.....	130
5.7.2. Molekularna detekcija WMV.....	131
5.7.3. Molekularna detekcija CMV.....	133
5.7.4. Molekularna detekcija TSWV.....	133
5.7.5. Molekularna detekcija izolata kompleksa virusa koji izaziva žutilo tikava... ..	134
5.7.5.1. Molekularna detekcija CABYV.....	135
5.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata virusa tikava.....	136
5.8.1. Molekularna identifikacija izolata virusa tikava.....	136
5.8.1.1. Molekularna identifikacija izolata ZYMV.....	136
5.8.1.2. Molekularna identifikacija izolata WMV.....	138

5.8.1.3. Molekularna identifikacija izolata CMV.....	140
5.8.1.4. Molekularna identifikacija izolata TSWV.....	141
5.8.1.5. Molekularna identifikacija izolata CABYV.....	141
5.8.2. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa tikava.....	143
5.8.2.1.1. Proračun genetičke sličnosti izolata ZYMV.....	143
5.8.2.1.2. Proračun genetičke sličnosti izolata WMV.....	144
5.8.2.1.3. Proračun genetičke sličnosti izolata CMV.....	144
5.8.2.1.4. Proračun genetičke sličnosti izolata TSWV.....	145
5.8.2.1.5. Proračun genetičke sličnosti izolata CABYV.....	145
5.8.2.2.1. Filogenetske analize ZYMV.....	146
5.8.2.2.2. Filogenetske analize WMV.....	148
5.8.2.2.3. Filogenetske analize CMV.....	151
5.8.2.2.4. Filogenetske analize TSWV.....	153
5.8.2.2.5. Filogenetske analize CABYV.....	154
6. DISKUSIJA.....	158
6.1. Simptomi u polju.....	159
6.2. Učestalost oboljenja.....	162
6.3. Identifikacija virusa tikava primjenom DAS-ELISA testa.....	163
6.4.1. Biološka identifikacija i karakterizacija ZYMV.....	166
6.4.2. Biološka identifikacija i karakterizacija WMV.....	169
6.4.3. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV.....	171
6.4.4. Biološka identifikacija TSWV.....	171
6.4.5. Biološka identifikacija CABYV.....	173
6.5. Prenosnje ZYMV, WMV i CMV sjemenom tikava.....	173
6.6. Detekcija ZYMV, WMV, CMV i TSWV u korovskim biljkama primjenom DAS-ELISA testa.....	176
6.7. Ispitivanje prisustva biljnih vaši u usjevima tikava i sastav njihove populacije.....	181
6.8.1. Molekularna detekcija i identifikacija izolata ZYMV.....	183
6.8.2. Molekularna detekcija i identifikacija izolata WMV.....	184
6.8.3. Molekularna detekcija i identifikacija izolata CMV.....	186
6.8.4. Molekularna detekcija izolata i identifikacija TSWV.....	186
6.8.5. Molekularna detekcija i identifikacija izolata CABYV.....	187
6.9.1. Molekularna karakterizacija izolata ZYMV.....	188
6.9.2. Molekularna karakterizacija izolata WMV.....	190
6.9.3. Molekularna karakterizacija izolata CMV.....	193
6.9.4. Molekularna karakterizacija izolata TSWV.....	194
6.9.5. Molekularna karakterizacija izolata CABYV.....	196
7. ZAKLJUČCI.....	197
8. LITERATURA.....	199
BIOGRAFIJA.....	216
IZJAVE.....	217

1. UVOD

Za različite biljne vrste koje pripadaju porodici Cucurbitaceae koristi se zbirni naziv tikve. Porodica Cucurbitaceae karakteriše se velikom diverzitetom vrsta i obuhvata 950-980 vrsta vriježastih biljaka i drvenastih lijana koje su svrstane u 95 rodova (**Schaefer and Renner, 2011**), od čega su za biljnu proizvodnju najznačajnija tri roda *Citrullus*, *Cucumis* i *Cucurbita* (**Gaba et al., 2004; Lebeda et al., 2006**). Proizvodnja tikava u svijetu, po podacima Svjetske organizacije za hranu i poljoprivredu (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), obavlja se na površinama od oko 8,716 miliona ha (**FAO, 2010**). Proizvodnja tikava u Srbiji odvija se na površinama od oko 26 hiljada ha (**Berenji, 2010; RZS, 2010; FAO, 2010**).

Domestifikacija tikava usko je povezana sa začetima razvoja poljoprivrede i ljudske civilizacije i upravo su tikve jedne od prvih biljaka koje je čovjek „pripitomio“, kako u zemljama Novog svijeta, tako i u zemljama Starog svijeta (**Bisognin, 2002**). U Srbiji se različite vrste tikava koriste za ishranu ljudi, kao stočna hrana, ali i u medicinske i dekorativne svrhe (**Berenji, 1999**). Vrste roda *Cucurbita* vode porijeklo iz Centralne i Južne Amerike, dok je posebna forma obične tikve (*Cucurbita pepo*)-uljana tikva golica, koja je veoma značajna vrsta tikava kod nas, nastala u Austriji u XIX vijeku (**Berenji, 2010**).

Na tikvama je do sada opisano preko 200 bolesti različite etiologije koje mogu da izazovu gljive, pseudogljive, bakterije, virusi i drugi biotski i abiotski činioci (**Zitter, 1996**). Međutim, ekonomski najznačajnije štete izazivaju virusi koji se na neperzistentan način prenose biljnim vašima (**Provvidenti and Schroeder, 1970; Lecoq et al., 2003; Bananej et al., 2008**). Veliki je broj radova koji govore o ekonomskim štetama prouzrokovanim pojavom virusnih oboljenja na biljkama porodice Cucurbitaceae. **Provvidenti (1996a)** navodi listu od 32 virusa koji zaražavaju tikve, ističući da većina može da izazovu značajne gubitke u proizvodnji tikava.

U Srbiji, o virusima kao prouzrokovateljima bolesti tikava nije bilo podataka sve do 2000. godine. Te godine problem virusnih oboljenja obične tikve privukao je pažnju izuzetno velikim štetama na više lokaliteta gajenja. Kao prouzrokovatelji oboljenja obične tikve identifikovani su CMV, WMV i ZYMV čija je pojava prvi put zabilježena u našoj zemlji (**Dukić et al., 2001**). Od tada počinju detaljna ispitivanja rasprostranjenosti i

učestalosti oboljenja koje ovi virusi izazivaju na običnoj tikvi kod nas (**Dukić et al., 2001; Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002; Dukić et al., 2004; Dukić et al., 2006**).

Značaj virusa kao prouzrokovaca bolesti tikava uputio je na neophodnost stalnog praćenja prisustva, učestalosti i rasprostranjenosti virusa tikava, zbog pravovremene identifikacije mogućih novih vrsta i proučavanja varijabilnosti i genetičke strukture populacije ekonomski značajnih virusa u Srbiji, a sve u cilju razvijanja adekvatnih mjera kontrole koje, prije svega, treba da se zasnivaju na selekciji na otpornost. Takođe, od velikog značaja je i poznavanje složene ekologije virusa tikava, utvrđivanje značaja sjemena i korovskih biljaka kao izvora virusnog inokuluma, ali i praćenje leta i prisustva biljnih vaši kao vektora virusa u usjevu tikava, a u cilju rasvjetljavanja brojnih epidemioloških pitanja, bez čijeg dobrog poznavanja nije moguća efikasna prevencija i kontrola virusnih oboljenja tikava u Srbiji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Tikve kao gajene biljke

Familija Cucurbitaceae je veoma raznovrsna botanička familija čiji se predstavnici uglavnom sreću u tropskom i umjerenom klimatu. Familija tikava obuhvata jednogodišnje i višegodišnje biljke i po brojnosti vrsta se ubraja u srednje velike familija sa 950-980 predstavnika svrstanih u 95 rodova (**Schaefer and Renner, 2011**). Kao ekonomski značajni navode se tri roda: *Citrullus*, *Cucumis* i *Cucurbita* (**Gaba et al., 2004**; **Lebeda et al., 2006**), dok su od lokalnog ili regionalnog značaja rodovi *Benincasa*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica* i *Sechium* (**Lebeda et al., 2006**).

2.1.1. Geografsko porijeklo tikava

Geografsko porijeklo biljaka familije Cucurbitaceae je veoma raznoliko, shodno velikom diverzitetu vrsta u okviru familije. Vrste roda *Cucurbita* potiču iz Srednje i Južne Amerike (**McCreight and Staub, 1999**; **Berenji, 2010**), a u zemljama Starog svijeta su se pojavile tek posle Kolumbovih otkrića (**Berényi and Karlovits, 1995**). Na naše prostore tikva je došla najvjerojatnije iz Male Azije, preko Grčke, na šta ukazuje i porijeklo riječi „tikva“ od starogrčke riječi „sikna“ (**Popović, 1971**). Posebna forma obične tikve (*Cucurbita pepo* L.)-uljana tikva, koja je veoma značajna vrsta tikava u Srbiji, nastala je između 1870. i 1880. godine u austrijskoj pokrajini Štajerskoj (**Teppner, 2000**). Od ostalih značajnih vrsta ove familije, krastavac (*Cucumis sativus* L.) vodi porijeklo iz Indije, dinja (*C. melo* L.) i vrg (*Lagenaria siceraria* (Molina) Stand.) iz Afrike, a lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunb.)) iz Afrike i Indije (**Mallick and Masui, 1986**; **McCreight and Staub, 1999**).

2.1.2. Morfologija tikava

Najznačajniji gajene vrste tikava u Srbiji su jednogodišnje zeljaste biljke sa vretenastim korijenovim sistemom koji se većinom razvija u površinskom sloju zemljišta. Stablo je puzavo-vriježasto, zbog čega se često nazivaju vriježastim kulturama, sa intercelularom u sredini, a na poprečnom presjeku rebrasto i obraslo kratkim bodljama. Listovi su jednostavne građe, sa dugačkim peteljka i srcolikim trostruko ili petostruko urezanim liskama. Liske su obrasle sitnim dlakama i na rubu

nazubljene. Jednodome su biljke, sa jednopolnim cvjetovima žute boje koji se odlikuju petodjelnom građom. Ženski cvjetovi su sitniji, sa jasno izraženim plodnikom i razvijaju se na bočnim granama, dok su muški krupniji uglavnom na glavnoj vriježi, sa pet čašičnih i kruničnih listića i pet prašnika. Tikve su stranooplodne biljke, a oprašivanje ženskih cvjetova obavljaju insekti, u našim uslovima najviše domaće pčele, a ponekad bumbari. Plod tikve je sočna, krupna bobica. Pokožica ploda je čvrsta i ispod nje se nalazi sloj mesa (mezokarp) različite debljine, žute ili narandžaste boje. Unutrašnjost ploda ispunjava končasto tkivo, placenta na čijem vrhu se nalazi sjeme.

2.1.3. Gajenje, značaj i upotreba tikava

Gajene biljke porodice Cucurbitaceae su veoma raznolike, zbog čega se gaje širom svijeta u različitim uslovima i na različite načine. Tikve se gaje u nizijama i na planinama, na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru, u tropskim predjelima, pustinjama i u umjerenom klimatu (**McCreight, 1996**).

Biljke porodice tikava spadaju u ekonomski veoma značajne kulture u mnogim zemljama, naročito u zemljama u razvoju (**Bananej and Vahdat, 2008**). Proizvodnja tikava u svjetskim razmjerama obavlja se na površinama većim od površina na kojima se proizvode paradajz ili citrusi, ili na oko polovini površina na kojima se proizvodi krompir, a poređenja radi, samo je proizvodnja lubenica, po površinama, veća od proizvodnje grožđa ili jabuka (**Gaba et al., 2004**). Na globalnom nivou, tikve i bundeva se po ekonomskoj vrijednosti rangiraju kao devete povrtarske kulture (**Paris, 2000**). Uljana tikva golica se u svijetu gaji na površinama koje obuhvataju oko 600.000 ha, koje su uglavnom skoncentrisane u Kini i Evropi (**Boucher, 2010**).

U Srbiji se tikve gaje u skoro svim krajevima zemlje, na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru (**Berenji, 1999**), a od predstavnika roda *Cucurbita* obična tikva je zastupljena sa 90% (**Popović, 1991**). Ostale vrste roda *Cucurbita* se u našoj zemlji gaje uglavnom kao međuusjev ili po baštama (**Berenji, 1999**). Veoma značajnu i perspektivnu vrstu za poljoprivrednu proizvodnju u Srbiji predstavlja uljana tikva golica i površine pod ovom kulturom se procjenjuju na oko 1000-1500 ha sa tendencijom stalnog rasta (**Berenji i Sikora, 2011**) i zbog toga što ova kultura predstavlja jednu od osnovnih u sistemu organske proizvodnje, kao i zbog visokog sadržaja ulja u sjemenu i visoke cijene nerafinisanog ulja tikvinog sjemena (**Karlović et al., 2001**).

Tikve imaju široku upotrebu u ishrani ljudi i životinja, a koriste se i u medicinske i dekorativne svrhe (**Berenji**, 1999). Posljednjih godina Srbija, a prije svega Vojvodina, postaje prepoznatljiva po proizvodnji uljane tikve golice iz koje se dobija tikvino ulje (**Berenji et al.**, 2004) koje je, posle maslinovog, jedno od najkvalitetnijih ulja jer sadrži vitamin E, karotenoide, zasićene i nezasićene masne kiseline i kao takvo se preporučuje u ishrani (**Wagner**, 2000; **Bavec**, 2007). Tikvino ulje ima ljekovita svojstva, a najčešće se koristi za smanjenje nivoa holesterola, umanjeње tegoba kod benigne hiperplazije prostate i jačanja imuniteta (**Wagner**, 2000; **Fruhirth and Hermetter**, 2007).

2.2. Bolesti i štetočine tikava

Proizvodnju tikava ugrožava preko 200 bolesti različite etiologije koje mogu da izazovu gljive, pseudogljive, bakterije, virusi i drugi biotski i abiotski činioci (**Zitter**, 1996). Gljive i pseudogljive na tikvama mogu da se podijele na zemljišne, prouzrokovaoče bolesti nadzemnih organa i prouzrokovaoče truleži ploda (**Krstić i Bulajić**, 2011). Bakterije mogu da izazovu propadanje i uvenuće cijelih biljaka (**Latin**, 1996), lisnu pjegavost ili trulež zrelih plodova (**Latin**, 1996; **Williams**, 1996; **Williams and Zitter**, 1996). Međutim, na tikvama najznačajnije štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta, izazivaju fitopatogeni virusi (**Provvidenti and Schroeder**, 1970; **Lecoq et al.**, 2003; **Sevik and Arli-Sokmen**, 2003). **Provvidenti** (1996a) navodi listu od 32 virusa koji zaražavaju tikve, ali taj broj se stalno povećava, tako da se smatra da ih ima više od 50 (**Kucharek and Purcifull**, 1997)

Osim bolesti, tikve napada i preko 50 štetočina, u koje spadaju nematode, puževi, ptice, sisari i insekti (**Kereši i Sekulić**, 2011). Od insekata na tikvama su najznačajnije biljne vaši, a naročito vrsta *Aphis gossypii* koja prouzrokuje najveće direktne štete (**Webb**, 2007), ali se smatra da vaši nanose najveće štete kao vektori biljnih virusa (**Luis-Arteaga et al.**, 1998; **Sevik and Arli-Sokmen**, 2003).

2.3. Virusi tikava i njihov značaj

Na tikvama, štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta, mogu da izazovu različiti fitopatogeni organizmi, ali su ekonomski najznačajniji virusi (**Provvidenti and Schroeder**, 1970; **Lecoq et al.**, 2003; **Sevik and Arli-Sokmen**, 2003). Kao

prouzrokovajući ekonomski važnih oboljenja tikava najčešće se navodi pet virusa: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV), virus prstenaste pjegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) i virus žutog mozaika cukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (**Salama and Hill**, 1968; **Milne et al.**, 1969; **Nameth et al.**, 1986; **Lecoq et al.**, 2003; **Agrios**, 2005).

Na osnovu stalnog praćenja prisustva i učestalosti pojave virusa u određenim regionima gajenja, izveden je zaključak da su virusi koji se prenose vašima na neperzistentan način najvažnija prepreka u proizvodnji tikava u svijetu. U toku poslednje četiri decenije najveće štete usjevu tikava na Floridi nanose CMV, WMV, PRSV i ZYMV (**Kucharek and Purcifull**, 1997). U Mađarskoj su do 1995. godine, kad je prvi put otkriven ZYMV, najvažniji virusi tikava bili CMV i WMV (**Tóbiás et al.**, 1996). Međutim, za kratko vrijeme, ZYMV se raširio u svim djelovima zemlje izazivajući zastrašujuće epidemije u usjevu različitih vrsta tikava, pa i uljane tikve (**Tóbiás and Tulipán**, 2002). U Austriji, gdje se uljana tikva golica tradicionalno gaji već više od 100 godina, epidemijska pojava virusnog oboljenja izazvanog sa ZYMV prvi put se javila 1997. godine kada je nanijela takve štete da je prepolovila ukupan prinos uljane tikve (**Riedle-Bauer et al.**, 2002; **Lelley and Hengmuller**, 2000).

Procenat zaraženih biljaka u polju može varirati u zavisnosti od lokaliteta i gajene vrste od 10% pa čak do 100% (**Tóbiás and Tulipán**, 2002). U slučaju pojave virusnih zaraza obične tikve prouzrokovanih WMV, zabilježeno je smanjenje prinosa od 50 do 100% (**Mansour and Al-Musa**, 1982). Virusne zaraze tikava, osim direktnog smanjenja prinosa, smanjuju i tržišnu vrijednost plodova i do 94% (**Blua and Perring**, 1989). Pri miješanim infekcijama sa dva ili više virusa na zaraženim biljkama često dolazi do sinergističkog dejstva, tako da se intenzitet simptoma povećava usled čega su i štete u usjevu mnogo značajnije (**Desbiez and Lecoq**, 1997). Tako su miješane infekcije virusima ZYMV i CMV izazvale pojavu jakih simptoma bolesti na zaraženim biljkama dinje i cukinija (**Wang et al.**, 2002).

Na ispoljavanje štetnog efekta virusa, veliki uticaj ima vrijeme infekcije, odnosno starost biljaka u momentu infekcije. Posebno velike štete nastaju prilikom ranih infekcija osjetljivih biljaka virusima, kao i u slučajevima miješanih zaraza.

2.4. Proučavanje virusnih oboljenja tikava u Srbiji

Istraživanja virusa infektivnih za biljke familije Cucurbitaceae u Srbiji bila su do 2000. godine malobrojna, a odnosila su se na izučavanje WMV na dinji i lubenici (Stakić i Nikolić, 1966), krastavcu (Tošić et al., 1996) i CMV na dinji (Stakić i Nikolić, 1966), i drugim biljkama familije Cucurbitaceae (Pejčinovski, 1978). Podataka o virusima kao prouzrokovateljima bolesti roda *Cucurbita* i drugih biljaka familije tikava nije bilo sve do 2000. godine. Te godine problem virusnih oboljenja obične tikve je privukao pažnju izuzetno velikim štetama na više lokaliteta gajenja. Kao prouzrokovaci oboljenja obične tikve identifikovani su CMV, WMV i ZYMV čija je pojava prvi put zabilježena u našoj zemlji (Dukić et al., 2001). Od tada počinju detaljna ispitivanja rasprostranjenosti i učestalosti oboljenja koji ovi virusi izazivaju na običnoj tikvi (Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002; Dukić et al., 2004; Dukić et al., 2006).

2.5. Osnovne karakteristike virusa tikava prisutnih u Srbiji

Iako, se na tikvama javlja više od 50 virusa (Kucharek and Purcifull, 1997) mnogi od njih ne izazivaju velike gubitke u proizvodnji. U Srbiji su do sada na tikvama bila prisutna tri virusa, ZYMV, WMV i CMV (Dukić et al., 2001), koja spadaju u grupu ekonomski najznačajnijih (Lecoq et al., 2003), a u ovim istraživanjima su ustanovljena još dva virusa, virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) i virus žutila tikava perzistentno prenosiv vašima (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV), čije je prisustvo i publikovano (Vučurović et al., 2011a, 2012).

Virus žutog mozika kukuruz, pripada najvećem i ekonomski najvažnijem rodu biljnih virusa, rodu *Potyvirus* familiji *Potyviridae* (Murphy et al., 1995) i jedan je od ekonomski najvažnijih virusa tikava. Prvi put je izolovan u Italiji 1973. godine, a opisan 1981. godine kao novi *Potyvirus* na kukuruzu (Lisa et al., 1981). Skoro istovremeno, u Francuskoj se 1979. godine na dinji javilo novo oboljenje čiji je prouzrokovatelj nazvan *Muskmelon yellow stunt virus* (MYSV) (Lecoq et al., 1981). Međutim, ubrzo je dokazano da se zapravo radi o jednom virusu, koji je nazvan ZYMV (Lecoq et al., 1983). ZYMV je vjerovatno najbolji primjer veoma destruktivnog „emerging“ virusa (ekspanzivni, nadolazeći virus) čija se raširenost i učestalost, od momenta pojave, rapidno povećavala. Danas je ovaj virus opisan u više od 50 zemalja, sa različitim

klimatskim uslovima, od tropskih do umjerenih i na svim kontinentima izuzev Antarktiku (**Desbiedz and Lecoq**, 1997). Introdukcije ovog invazivnog virusa u nove djelove svijeta su veoma česte (**Lecoq et al.**, 2009).

Virus mozaika lubenice prvi put su opisali **Webb and Scott** (1965) na Floridi. Kao i ZYMV, pripada porodici *Potyviridae*, rodu *Potyvirus* (**Shukla et al.**, 1994). **Webb and Scott** (1965) su iz kompleksa virusa mozaika lubenice, na osnovu kruga domaćina, unakrsne zaštite i antigenih osobina, izdvojili dva virusa i označili ih kao WMV 1 (sadašnji naziv *Papaya ringspot virus*, PRSV) i WMV 2. U literaturi se za WMV 2 koriste i nazivi *Watermelon mosaic virus* (WMV) ili *General watermelon mosaic virus* (**Purcifull et al.**, 1984). Prisutan je u mnogim djelovima svijeta (Australija, Čehoslovačka, Čile, Francuska, Mađarska, Iran, Izrael, Italija, Japan, Meksiko, Novi Zeland, SAD, Venecuela i zemlje bivše Jugoslavije) i smatra se opšte rasprostranjenim virusom umjereno toplih i tropskih regiona (**Purcifull et al.**, 1984). Prisustvo WMV zabilježeno je u većini zemalja gdje se tikve gaje (**Provvidenti**, 1996b). Iako je WMV često prevalentan u usjevima tikava, dugo je zanemarivan i smatran manje značajnim patogenom, zbog izazivanja veoma blagih simptoma na listovima, odsustvu simptoma na plodovima tikava i bez očiglednog uticaja na prinos i kvalitet plodova (**Lecoq**, 1992; **Desbiedz et al.**, 2009). Međutim, prije dvadesetak godina u Evropi uočeni su izuzetno jaki simptomi na ljetnjoj tikvici forme cukini, prouzrokovani ovim virusom i od tada WMV privlači sve veću pažnju istraživača (**Moreno et al.**, 2004; **Desbiedz et al.**, 2007, 2009).

Virus mozaika krastavca je tipičan predstavnik roda *Cucumovirus*, porodice *Bromoviridae* i jedan je od ekonomski najznačajnijih virusa (**van Regenmortel et al.**, 2000). Prvi put je otkriven kao prouzrokovatelj oboljenja na tikvama 1916. godine u Americi (Doolittle, 1916, **loc. cit.** **Garcia-Arenal and Palukaitis**, 2008) i upravo je njegovim proučavanjem otpočeo pionirski rad na izučavanju virusa tikava u svijetu 1925. godine (Doolittle and Walker, 1925, **loc. cit.** **Lecoq et al.**, 2009). Od tada, CMV se proširio u mnoge djelove svijeta, gdje je identifikovan kao uzročnik brojnih epidemija, kako u pojedinačnim tako i u miješanim infekcijama (**Palukaitis et al.**, 1992). Mada se CMV ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa, najznačajniji je u umjereno toplim regionima gdje su povoljni uslovi za razvoj vaši, njegovih vektora (**Shew and Lucas**, 1991; **Palukaitis et al.**, 1992).

Virus pjegavog uvenuća paradajza, kod nas poznatiji pod imenom virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) tipičan je predstavnik roda *Tospovirus*, porodice *Bunyaviridae* i dugo je bio klasifikovan kao jedini član „Tomato spotted wilt“ grupe (Matthews, 1979). TSWV se nalazi na EPPO A2 listi (OEPP/EPPO, 2008) i na listi IA dio II karantinski štetnih organizama Republike Srbije (Službeni glasnik RS, 7/10). Oboljenje prouzrokovano ovim virusom otkriveno je u Australiji (Brittlebank, 1919), ali je virusna priroda utvrđena tek 1930. godine (Samuel et al., 1930). Prema OEPP/EPPO (1999), TSWV je opšte rasprostranjen i do sada je njegovo prisustvo potvrđeno u umjerenim, subtropskim i tropskim područjima svijeta, a u hladnijim područjima nalazi se u staklenicima i drugim zaštićenim prostorima. Prisustvo TSWV u našoj zemlji utvrđeno je, na duvanu, paprici, paradajzu i mnogobrojnim vrstama ukrasnih biljaka (Đekić et al., 2007a; Krstić i Bulajić, 2007).

Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) pripada porodici *Luteoviridae*, rodu *Polerovirus* (Domier, 2011) i jedan je od nekoliko virusa koji izazivaju simptome žutila u usjevima tikava. Prvi put su ga opisali Lecoq et al. (1992) u Francuskoj. Virus je osim u u Francuskoj, prisutan i u Sjedinjenim Američkim Državama (Lemaire et al., 1993), Španiji (Juarez et al., 2004), Tunisu (Hattab, 2005), Kipru (Papayianis et al., 2005), Iranu (Bananej et al., 2006), Grčkoj (Boubourakas et al., 2006), Kini (Xiang et al., 2008), Italiji (Tomassoli and Meneghini, 2007), Turskoj (Yardımcı, 2007), Slovačkoj (Bananej et al., 2009), Češkoj (Svoboda et al., 2011), na Tajvanu (Knierim et al., 2010) i u Egiptu (Omar and Bagdady, 2012). U mnogim regionima gajenja ovaj virus je jedan od najčešćih virusa koji se javlja na tikvama gajenim na otvorenom polju (Lecoq, 2004), a javlja se i u zaštićenom prostoru (Boubourakas et al., 2006). Rane infekcije sa CABYV mogu dovesti do značajnog gubitka prinosa, čak do 50% kod krastavca i 40% kod dinje (Lecoq et al., 1992). Gubici u prinosu nastaju usled smanjenja broja plodova po biljci, što je rezultat zakržljavanja cvjetova kod dinje (40%) i krastavca (51%), dok oblik i kvalitet plodova nijesu ugroženi (Dogimont et al., 1996).

Literaturni podaci koji se odnose na pojavu, rasprostranjenost, učestalost pojave, krug prirodnih domaćina, simptomatologiju, biološku karakterizaciju, način održavanja i širenja u prirodi, genomnu organizaciju, fenotipsku i genotipsku varijabilnost i genetičku strukturu populacije, za sve proučavane viruse tikava u okviru ove disertacije, implementirani su u poglavlju Diskusija.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U svijetu je do danas opisano preko 50 virusa koji se javljaju na tikavama i često prouzrokuju veoma destruktivna oboljenja i izazivaju velike štete. Ekonomske štete izazvane virusnim oboljenjima na tikvama prouzrokovane su direktnim smanjenjem prinosa, ali i umanjemem tržišne vrijednosti plodova.

Kako se virusi na tikvama u Srbiji redovno javljaju prouzrokujući značajne gubitke prinosa, ukazala se potreba za redefinisanjem statusa prisustva, učestalosti i rasprostranjenosti ranije prisutnih virusa, kao i identifikacije novih primjenom različitih dijagnostičkih tehnika. Petogodišnji pregled različitih vrsta tikava na različitim lokalitetima gajenja omogućiti će novu inventarizaciju virusa tikava u Srbiji i uvid u njihov relativni značaj u proizvodnji tikava kod nas, ali i razjašnjenje brojnih nedoumica u pogledu ekologije i epidemiologije virusa tikava, kroz utvrđivanje prenošenja virusa sjemenom tikava, održavanja u korovima i sastava populacije lisnih vaši koje posjećuju usjev tikava.

Zbog toga su kao osnovni ciljevi ove disertacije definisani:

- ✓ utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa tikava u Srbiji primjenom DAS-ELISA testa;
- ✓ biološka karakterizacija najznačajnijih virusa tikava kod nas;
- ✓ prenošenja sjemenom tikava tri najznačajnija virusa kod nas;
- ✓ utvrđivanje prisustva virusa tikava u korovskim biljkama u i oko usjeva;
- ✓ ispitivanje brojnosti, diverziteta populacije i dinamike leta lisnih vaši koje posjećuju usjeve tikava;
- ✓ molekularna karakterizacija prisutnih virusa u Srbiji u cilju utvrđivanja genotipske varijabilnosti i poređenja izolata iz Srbije sa odgovarajućim izolatima iz drugih dijelova svijeta;
- ✓ filogenetske analize prisutnih virusa tikava u Srbiji.

Detaljna karakterizacija omogućiti će utvrđivanje dominantnih patotipova virusa, na kojima treba da se zasniva selekcija na otpornost, kao najefikasnija mjera kontrole. Epidemiološka ispitivanja pružiće odgovore o načinu održavanja virusa u prirodi u periodu mirovanja, načinu unošenja u usjev i daljem širenju u toku vegetacije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka tikava

Prisustvo, rasprostranjenost i učestalost pojave virusa tikava u Srbiji ispitivani su u tokom pet godina, u periodu od 2007. do 2011. godine. Pregledan je ukupno 61 lokalitet gajenja 19 različitih vrsta, sorti i varijeteta tikava. Sakupljeni su uzorci: obične tikve (*Cucurbita pepo*)-nepoznate sorte, šest sorti posebne forme obične tikve-uljane tikve (*C. pepo* var. *styriaca* 'Olinka', 'Gleisdorfer Ölkürbis', 'Horgoš', 'Long of Nepal', 'Wrinkle bat', 'Weis 371'), dvije sorte ljetnjih tikvica (*C. pepo* 'Beogradska', 'Cue Ball'), dvije sorte cukinija (*C. pepo* 'Tosca', 'Genovese'), zimске tikve (*C. mixta* 'Striped Cushow'), bundeve (*C. maxima*), muskatne tikve (*C. moschata*), bizonske tikve (*C. foetidissima*), vrga (*Lagenaria siceraria*), krastavca (*Cucumis sativus*), dinje (*C. melo*) i lubenice (*Citrullus lanatus*). Najviše lokaliteta nalazilo se u Vojvodini koja je i najznačajnije područje gajenja ovih biljaka u našoj zemlji, prije svega uljane tikve. Svako polje je pregledano dva puta u toku vegetacije, prvi put u ranim fazama razvoja usjeva da bi se utvrdilo da li je došlo do ranih infekcija, a drugi put u periodu od jula do avgusta, kada su i sakupljeni uzorci za analize.

Tokom pregleda sakupljeni su uzorci lišća i plodova tikava sa simptomima koji su ukazivali na virusnu zarazu. Takođe, procijenjena je i učestalost pojave simptoma.

Za testiranje su u svakom pregledanom usjevu sakupljeni uzorci sa simptomima virusnih infekcija. Svaki uzorak sadržao je lišće ili plodove različitih faza razvoja sa različitih vriježa iste biljke od kojih je formiran zbirni uzorak. Tako sakupljeni uzorci pakovani su u plastične kese sa etiketama na kojima su upisivani podaci o biljci i lokalitetu uzorkovanja, a zatim transportovani u laboratoriju u ručnom frižideru i čuvani na temperaturi 4°C do analize. Svi uzorci su testirani u roku do 48 h od uzorkovanja. Metoda po kojoj su uzorci sakupljeni zavisila je od veličine usjeva, odnosno parcele i intenziteta zaraze, odnosno broja biljaka sa simptomima virusnih zaraza. Ukoliko su parcele bile manjih dimenzija ili intenzitet zaraze slab, sakupljen je manji broj uzoraka sa simptomima, a ukoliko su parcele bile veće ili je intenzitet zaraze bio jači, uzorci sa simptomima sakupljeni su kretanjem po „W“ modelu koji omogućava najbolje pokrivanje cijelog polja.

U svakom testiranom usjevu prije uzorkovanja određena je učestalost pojave oboljenja vizuelno ili kretanjem po „W“ modelu i nasumičnim sakupljanjem po 100 biljaka. Učestalost je zatim utvrđena brojanjem biljaka sa simptomima i određivanjem njihovog udjela u ukupnom broju sakupljenih biljaka. Takođe, na pet lokaliteta gajenja u pet usjeva 2009. godine i tri lokaliteta gajenja, a u četiri usjeva 2010. godine procijenjena je učestalost virusnih infekcija upotrebom metode višestrukog transfera koju su opisali **Gibbs and Gower** (1960) (postupak metode opisan je u poglavlju 4.4.). Lokaliteti na kojima je izvršena procjena učestalosti virusnih infekcija 2009. godine bili su: Budisava, Čenej, Srbobran, Zmajevo i Kisač, a 2010. godine Hetin, Bačka Topola i Horgoš. Na ovim lokalitetima nasumično je sakupljeno lišće sa 100 biljaka kretanjem po „W“ modelu, zatim je sakupljeno lišće grupisano u 25 zbirnih grupa, pri čemu je svaka zbirna grupa sadržala lišće sa četiri biljke. Tako formirane zbirne grupe su testirane na prisustvo šest ekonomski značajnih virusa tikava po postupku opisanom u poglavlju 4.2.

U toku 2007. godine sakupljeno je 69 uzoraka tikava sa simptomima virusnih zaraza iz 11 usjeva. Pregled je obuhvatio osim *C. pepo* var. *styriaca* i druge vrste, kao što su *C. maxima*, *C. moschata*, *C. feotidissima* i *L. siceraria* na pet lokaliteta gajenja u Vojvodini.

Pregledi 13 usjeva tikava tokom 2008. godine i sakupljanje uzoraka *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *L. siceraria* sa simptomima virusnih infekcija sprovedeni su na 6 lokaliteta gajenja tikava, pri čemu je sakupljen 51 uzorak.

Tokom 2009. godine pregledano je 15 usjeva na osam lokaliteta gajenja tikava, pri čemu je sakupljeno 599 uzoraka tikava. Sakupljeni uzorci su poticali iz *C. pepo* 'Olinka', *C. pepo* 'Tosca', *C. pepo* 'Beogradska', kao i *C. maxima* i *C. moschata*.

Sakupljanje uzoraka tikava tokom 2010. godine obavljeno je na 18 lokaliteta gajenja, pri čemu je pregledano 48 usjeva i sakupljena su ukupno 183 uzorka *C. pepo* var. *styriaca* (sorti Olinka, Horgoš, Gleisdorfer Ölkürbis, Weis 371, Wrinkle bat, Long of Nepal), *C. pepo* 'Genovese', *C. maxima*, *L. siceraria*, *C. mixta*, kao i *Cucumis sativus* i *Citrullus latanus*. U toku 2010. godine istraživanja su proširena i na dva lokaliteta izvan Vojvodine (Družetić i Porodin) kako bi se stekao uvid u prisustvo virusa tikava i u ovim proizvodnim područjima.

Pregled terena i sakupljanje uzoraka tokom 2011. godine obuhvatili su 24 lokaliteta koji su bili raspoređeni u 13 okruga Srbije. U Vojvodini je pregledano 12 lokaliteta u pet okruga: Zapadna Bačka, Sjeverna Bačka, Južna Bačka, Srem i Južni Banat. Izvan Vojvodine je pregledano osam okruga kako bi se dobila što potpunija slika o prisustvu i zastupljenosti virusa tikava u njima. Pregledani lokaliteti su se nalazili u Beogradskom, Mačvanskom, Podunavskom, Braničevskom, Raškom, Rasinskom, Jablaničkom i Pčinjskom okrugu. Sakupljeno je ukupno 198 uzoraka iz 44 usjeva *C. pepo*-nepoznate sorte, *C. pepo* 'Olinka', *C. pepo*-ljetnja tikvica, *C. moschata*, *C. melo*, *C. sativus* i *C. latanus*.

4.2. Serološka ispitivanja

Testiranje sakupljenih uzoraka lišća tikava, obavljeno je serološkim analizama na prisustvo šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava i to: virus žutog mozaika kukuruz (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virus mozaika lubenice (Watermelon mosaic virus, WMV), virus mozaika krastavca (Cucumber mosaic virus, CMV), virus prstenaste pjegavosti papaje (Papaya ringspot virus, PRSV), virus prstenaste pjegavosti duvana (Tobacco ringspot virus, TRSV) i virus mozaika bundeve (Squash mosaic virus, SqMV) u cilju utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave pojedinih virusa po godinama, lokalitetima i usjevima.

4.2.1. Direktna imunoenzimska metoda na ploči (DAS-ELISA)

Za detekciju virusa u usjevima tikava korišćena je direktna imunoenzimska metoda na ploči (Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA) po protokolu koju su opisali **Clark and Adams** (1977). Metoda je primijenjena prema uputstvu proizvođača dijagnostičkih ELISA kitova.

Serološko testiranje uzoraka 2007. godine obavljeno je primjenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma specifičnih za detekciju CMV, WMV, ZYMV, PRSV i SqMV (Loewe Biochemica GmbH, Germany) i TRSV (Neogen Europe Ltd, Scotland, UK). Specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razrijeđenju 1:200 u odgovarajućem puferu, osim za TRSV kada su antitijela korišćena u razrijeđenju 1:500, a antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom u razrijeđenju 1:4000. Uzorci sakupljeni u toku 2008. godine testirani su na

prisustvo šest najznačajnijih virusa i to: CMV, WMV, ZYMV, PRSV, TRSV i SqMV primjenom komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland). Specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razrijeđenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. Serološko testiranje uzoraka sakupljenih 2009. godine obavljeno je upotrebom komercijalnih poliklonalnih antiseruma (DSMZ, Braunschweig, Germany) na CMV, WMV, ZYMV, PRSV, TRSV i SqMV, pri čemu su specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena u razrijeđenju 1:1000 za sve testirane viruse, osim za CMV i PRSV kada su antitijela razrijeđena u odnosu 1:500, u odgovarajućem puferu. Uzorci sakupljeni tokom 2010. i 2011. godine testirani su na prisustvo šest ekonomski najznačajnijih virusa tikava upotrebom komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland). Specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razrijeđenju 1:1000 u odgovarajućem puferu.

DAS-ELISA izvedena je po sljedećem postupku: polistirenske ploče obložene su unošenjem u svaki bunarčić po 200 μ l razrijeđenja IgG odgovarajućeg antiseruma u puferu za prekrivanje, a prema preporuci proizvođača. Obložene ploče su zatim inkubirane 4 h na 37°C, a potom isprane puferom za ispiranje 4 puta po 3 min. U bunarčiće je dodato po 200 μ l pripremljenog ekstrakta ispitivanih uzoraka, komercijalne negativne i pozitivne kontrole i inkubirano na 4°C preko noći. Posle ispiranja, u bunarčiće je unijeto po 200 μ l antitijela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom u konjugatnom puferu razrijeđenja preporučenog od strane proizvođača, a ploče su inkubirane 4 h na 37°C. Posle inkubacije, mikrotitarske ploče ispirane su kako je prethodno navedeno, a zatim je u svaki bunarčić dodato po 200 μ l pripremljenog supstrata (p-nitrofenilfosfata) u supstratnom puferu (20 μ l/20 ml). Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi do pojave bojene reakcije. Hidroliza supstrata praćena je vizuelno, kao i mjerenjem apsorpcije na 405 nm, 1-2 h po nanošenju supstrata.

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

4.3. Biološka identifikacija i karakterizacija

U cilju dobijanja izolata ispitivanih virusa tikava, kao i potvrde rezultata seroloških analiza obavljena je i biološka identifikacija i karakterizacija odabranih izolata ZYMV, WMV i CMV mehaničkim inokulacijama niza test biljaka koje pripadaju krugu domaćina ovih virusa. Kao početni materijal korišćeno je lišće prirodno zaraženih biljaka tikava u kojima je, primjenom DAS-ELISA testa, prethodnim ispitivanjima dokazano prisustvo virusa.

U ispitivanje kruga domaćina i tipa ispoljenih simptoma bilo je uključeno 45 test biljaka koje pripadaju familijama Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae, Fabaceae i Amaranthaceae: *C. pepo* 'Olivija', 'Olinka', 'Slovenačka golica', 'Beogradska', 'Ezra F1' i 'Zucchini', *C. moschata* 'Lola' i 'Beja', *C. maxima*, *C. foetidissima*, *C. mixta*, *C. ficifolia*, *Cucumis sativus* 'Regal', 'Delicates', 'Dugi zeleni', 'Senzacija' i 'Sunčani potok', *C. anguria*, *C. melo* 'Ananas', *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet', *Benincasa hispida*, *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata*, *Lagenaria siceraria*, *Momordica* sp., *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *C. foetidum*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum nigrum*, *Solanum lycopersicum* 'San Pjer', *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* 'Banat', 'Prilep' i 'Samsun', *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyii*, *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac' i *Pisum sativum* 'Mali provansalac'.

Mehaničke inokulacije su obavljene po postupku koji su koji su opisali **Krstić i Tošić** (1994). Inokulum za mehaničke inokulacije pripremljen je homogenizacijom zaraženog lišća u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera pH 7,0, uz korišćenje karborundum praha finoće 400 meša kao abraziva. Svaki izolat ZYMV inokulisan je na po pet biljaka jedne vrste eksperimentalnog domaćina. Test biljke su inokulisane u fenofazi 2-3 lista i održavane u uslovima staklenika. Pojava i tip simptoma praćeni su na inokulisanom lišću kao i lišću formiranom posle inokulacije, u periodu do mjesec dana nakon inokulacija. Moguće latentne infekcije test biljka bez simptoma provjeravane su DAS-ELISA testom.

U cilju identifikacije i dobijanja izolata virusa bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) odabrani uzorci inokulisani su na indikator biljku *Petunia x hybrida* i test biljku *Nicotiana tabacum* 'Samsun'. Kao početni materijal korišćeno je

lišće prirodno zaraženih tikava sa simptomima koji su podsjećali na simptome izazvane *Tospovirus*-ima.

Identifikacija virusa žutila tikava perzistentno prenosivog vašima (*Cucurbit aphiborne yellows virus*, CABYV) obavljena je korišćenjem testa perzistentne prenosivosti virusa vašima vektorima. Biljne vaši su se prije prenošenja na test biljke ishranjivale na prirodno zaraženom lišću tikava sa simptomima žutila.

4.3.1. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata ZYMV

Radi dobijanja izolata ZYMV, biljke *C. pepo* 'Ezra F1' mehanički su inokulisane, inokulumom pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka *C. pepo* 'Olinka' u kojima je prethodno upotrebom DAS-ELISA testa dokazana pojedinačna infekcija sa ZYMV. Izolati su dobijeni iz pet uzoraka iz dva usjeva sa lokaliteta Titel, pet uzoraka iz četiri usjeva sa lokaliteta Kisač i dva uzorka iz istog usjeva sa lokaliteta Bački Petrovac. Na osnovu tipa ispoljenih simptoma u polju i simptoma ispoljenih nakon mehaničkih inokulacija na *C. pepo* 'Ezra F1' odabrana su ukupno četiri izolata i to izolat 128-08 sa lokaliteta Titel, dva izolata 140-08 i 146-08 iz različitih usjeva lokaliteta Kisač, kao i jedan izolat 147-08 sa lokaliteta Bački Petrovac. Detaljnija biološka karakterizacija obavljena je mehaničkim inokulacijama niza test biljaka.

4.3.2. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata WMV

Izolacija odabranih izolata WMV iz *C. pepo* 'Tosca' sprovedena je mehaničkim inokulacijama *C. pepo* 'Ezra F1'. Za određivanje eksperimentalnog kruga domaćina odabrani su uzorci 255-09, 256-09, 266-09, sakupljeni tokom 2009. godine na lokalitetu Ruma, čija je zaraženost WMV prethodno utvrđena primjenom seroloških metoda.

4.3.3. Biološka identifikacija i karakterizacija izolata CMV

Radi dobijanja izolata CMV za biološku karakterizaciju, biljke *Nicotiana glutinosa* mehanički su inokulisane inokulumom pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka *C. pepo* 'Olinka' sa lokaliteta Gardinovci, u kojima je prethodno dokazana miješana infekcija CMV sa ZYMV i WMV. Na ovaj način dobijeno je pet izolata, a kako su dobijeni izolati pokazivali iste simptome na *N. glutinosa* odabran je izolat 115-08 koji je korišćen za dalju biološku karakterizaciju.

4.3.4. Biološka identifikacija izolata TSWV

U cilju dobijanja izolata TSWV, biljke *Nicotiana tabacum* 'Samsun' su mehanički inokulisane inokulumom pripremljenim od lišća prirodno zaraženih biljaka *C. maxima* i *C. pepo* 'Beogradska' sa lokaliteta Bački Petrovac, u kojima prethodno nije dokazana infekcija ni sa jednim od šest serološki testiranih virusa, a koji su ispoljavali karakteristične simptome virusnih infekcija u vidu hlorotičnih prstenova i mozaičnog šarenila. Na ovaj način su dobijena dva izolata, izolat 236-09 iz *C. maxima* i izolat 240-09 iz *C. pepo* 'Beogradska', sa lokaliteta Bački Petrovac koji su korišćeni za biološku identifikaciju inokulacijama indikator biljke *Petunia x hybrida*. Ispitivani izolati TSWV inokulisani su na po pet biljaka *Petunia x hybrida*.

4.3.5. Biološka identifikacija izolata CABYV

Biološka identifikacija izolata CABYV obavljena je primjenom testa perzistentne prenosivosti virusa korišćenjem *Aphis gossypii* kao vektora. Kao test biljka korišćena je *C. pepo* 'Olinka'. Vašima *Aphis gossypii* je dozvoljeno da se dva dana ishranjuju, u cilju usvajanja virusa, na lišću *C. pepo* 'Olinka' sa lokaliteta Kisač koje je pokazivalo simptome žutila i iz kojeg je dobijen izolat 145-08. Zatim je po deset vaši preneseno na svaku od 20 biljaka *C. pepo* 'Olinka' koje su bile u fenofazi prvog pravog lista, gdje im je omogućena ishrana od pet dana, posle čega su uništavane prskanjem insekticidom. Pojava i tip simptoma praćeni su na lišću na kom su se ishranjivale vaši i lišću formiranom posle inokulacije u periodu do mjesec dana nakon inokulacija. Moguće latentne infekcije test biljaka bez simptoma i potvrda rezultata u simptomatičnim biljkama provjeravane su RT-PCR metodom korišćenjem CABYV up/down prajmera (kao što je opisano u poglavlju 4.7.1.5.1).

Vaši *Aphis gossypii* sakupljene su u polju i donešene u laboratoriju u plastičnim kesama i istog dana prenešene na biljke *C. pepo* 'Olinka' i dalje gajene u kavezima sa mrežom. Ispiljene larve vaši korišćene su za test prenosivosti virusa.

4.4. Prenošenje ZYMV, WMV i CMV sjemenom tikava

U cilju utvrđivanja mogućnosti prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata* testirano je sjeme sakupljeno iz plodova sa prirodno zaraženih biljaka. Tokom vegetacije u polju obilježene su biljke tikava sa

simptomima u kojima je serološkim analizama detektovano prisustvo nekog od ispitivanih virusa u pojedinačnim ili miješanim infekcijama. Tako obilježene biljke gajene su na uobičajen način u polju do postizanja pune biološke zrelosti. Po završetku vegetacije, sjeme iz dobijenih obilježenih plodova tikava sakupljeno je i korišćeno za utvrđivanje mogućnosti i stepena prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom različitih vrsta tikava. Ukupno je sakupljeno 6731 sjemenki iz 22 ploda. 12 plodova je poticalo od različitih sorti i selekcionog materijala *C. pepo* var. *styriaca* (Institut za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada), šest plodova je poticalo od četiri sorte *C. moschata*, dok su četiri bili plodovi *C. maxima*.

4.4.1. Sjetva sjemena, proizvodnja sijanaca i utvrđivanje procenta prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom

U cilju dobijanja sijanaca, sjeme *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata* sakupljeno iz ukupno 22 ploda, posijano je u kontrolisanim uslovima staklenika Poljoprivrednog fakulteta, a nakon 23 dana od nicanja sijanci su vizuelno pregledani i testirani na prisustvo virusa. Od sijanaca dobijenih iz sjemena svakog ploda formirane su zbirne grupe od po četiri sijanaca koje su testirane ELISA metodom na prisustvo ZYMV, WMV i CMV upotrebom komercijalnih kitova (Loewe Biochemica GmbH, Germany).

Proračun stepena prenošenja ispitivanih virusa sjemenom, za svaki od testiranih uzoraka sjemena, obavljen je korišćenjem formule koju su predložili **Gibbs and Gower** (1960): $p^* = 1 - (1 - R/N)^{1/i}$, gdje je:

p^* –udio zaraženih biljaka procijenjen metodom maksimalne vjerovatnoće (maximum likelihood method)=moguća procijenjena vrijednost,

N –ukupan broj testiranih zbirnih grupa,

i –broj klijanaca u svakoj zbirnoj grupi,

R –broj pozitivnih zbirnih grupa.

Korišćena formula višestrukog transfera omogućava testiranje više biljaka (sijanaca), odnosno testiranje više od jedne biljke u svakom uzorku. Greške usled heterogenosti populacije obuhvaćene testom na ovaj način su minimizirane.

4.5. Održavanje ZYMV, WMV i CMV u korovskim biljkama

Tokom 2010. i 2011. godine u usjevima tikava sakupljene su korovske biljke sa i bez simptoma u cilju utvrđivanja njihove zaraženosti virusima tikava prisutnim kod nas, kako bi se ostvario što bolji uvid u njihovu epidemiologiju u Srbiji. Korovske biljke su sakupljane u usjevu, ali i na površinama oko usjeva, koje su veoma često jako zakorovljene i koje se u literaturi navode kao značajni izvori inokuluma za viruse tikava, ali i kao biljke, koje biljne vaši često koloniziraju i sa kojih one, formirajući krilate forme, u nepovoljnim uslovima suše prelijeću na usjeve gajenih biljaka.

4.5.1. Sakupljanje uzoraka korovskih biljaka u usjevima tikava

U toku 2010. godine u 17 usjeva tikava, na 13 lokaliteta gajenja sakupljeno je ukupno 49 uzoraka korovskih biljaka sa simptomima koji su podsjećali na virusnu infekciju, ali i biljke bez simptoma, jer, po literaturi, korovske biljke često ne ispoljavaju simptome, iako su zaražene virusom. Sakupljene biljke su pripadale familijama: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiace, Convolvulaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Polygonaceae, Portulacaceae i Solanaceae. Od ukupno sakupljenih 50 biljaka, 48 je determinisano do nivoa vrste, a dvije do nivoa roda. 41 korovska biljka sakupljena je u usjevu, a devet na površinama neposredno pored. Sakupljeni korovi su uglavnom pripadali jednogodišnjim biljkama, njih ukupno 46, dok su dvije biljke bile višegodišnje.

Tokom 2011. godine, sakupljeni su uzorci korovskih biljaka sa i bez simptoma virusnih infekcija u osam usjeva na četiri lokaliteta. Ukupno je sakupljeno 76 biljaka iz 12 familija: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiace, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Plantaginaceae, Polygonaceae, Portulacaceae i Solanaceae. Sve sakupljene biljke su determinisane do nivoa vrste, izuzev dvije, koje su determinisane do nivoa roda. Od ukupnog broja sakupljenih biljaka, 50 ih je sakupljeno u usjevu, a 26 je sakupljeno po obodu usjeva. Jednogodišnjih korova je bilo 62, višegodišnjih 12, dvogodišnjih dva, dok jedna sakupljena vrsta može biti i jednogodišnja i dvogodišnja.

4.5.2. Detekcija virusa u korovskim biljkama upotrebom DAS-ELISA testa

Za detekciju tri ekonomski značajna virusa tikava koji su prisutni u Srbiji, kao i TSWV, čije je prisustvo u tikvama dokazano 2009. godine, u korovskim biljkama primijenjena je DAS-ELISA metoda. Za ZYMV, WMV i CMV metoda je primijenjena prema uputstvu proizvođača dijagnostičkih ELISA kitova kako je opisano u poglavlju 4.2.1. Za detekciju TSWV u korovskim biljkama sakupljenim 2010. i 2011. godine upotrijebljeni su komercijalni poliklonalni antiserumi (Bioreba AG, Switzerland). Specifična poliklonalna antitijela i poliklonalna antitijela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razrijeđenju 1:1000 u odgovarajućem puferu. DAS-ELISA je izvedena po protokolu opisanom u poglavlju 4.2.1..

4.6. Ispitivanja prisustva biljnih vaši u usjevima tikava i sastava njihove populacije

Tokom tri godine ispitivanja, od 2009. do 2011. godine, na šest lokaliteta gajenja u osam usjeva *C. pepo* 'Olinka' u Vojvodini, postavljane su žute lovne posude koje su korišćene u cilju sakupljanja biljnih vaši (**Petrović-Obradović et al., 2006; Vučetić et al., 2007**). Praćene su i promjene u brojnosti tokom vegetacije, prisustvo i brojnost u literaturi opisanih vektora virusa tikava, kao i njihove fluktuacije tokom vegetacije.

4.6.1. Postavljanje lovnih klopki i sakupljanje uzoraka

Broj postavljenih lovnih posuda u svakom usjevu zavisio je od veličine parcele, tako da su na svaki hektar parcele postavljane po dvije klopke, koje su bile najmanje 15 m udaljene međusobno, kao i 15 m od ivice usjeva. Klopke, dimenzija 22x22x11 cm, su postavljane neposredno posle sjetve tikava i na početku su bile na zemlji, da bi kasnije, sa porastom tikava bile podizane na postolje kako bi bile vidljive vašima. Svaka klopka u jednom usjevu označavana je rednim brojem.

Sakupljanje insekata ulovljenih u klopke vršeno je jednom nedjeljno, od perioda nicanja tikava, pa do sušenja listova, pri čemu je sadržaj klopki cijeden, a ulovljeni insekti prebacivani u staklene posude u kojima je bio 70% etanol. Na svaku posudu nalijepljene su samoljepljive etikete na kojima je grafitnom olovkom ispisan datum uzorkovanja, lokalitet i broj klopke. Sadržaj svake klopke prebacivan je u pojedinačnu posudu, po principu: jedna klopka-jedna posuda. Tako sakupljeni insekti dopremani su

u laboratoriju za Entomologiju i poljoprivrednu zoologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu, gdje su čuvani do determinacije. Prilikom determinacije iz uzoraka svih sakupljenih insekata izdvajane su biljne vaši i konzervisane u 75% etanolu. Identifikaciju vaši u uzorcima obavile su dr Olivera Petrović-Obradović, vanredni profesor i dr Anđa Vučetić, docent na osnovu ključeva za determinaciju (**Taylor, 1984; Jacky and Bouchery, 1988; Remaudiere and Seco Fernandez, 1990**) i druge literature.

U 2009. godini lovne klopke su bile postavljene u dva usjeva na lokalitetu Bački Petrovac i u jednom usjevu na lokalitetu Čenej. Sva tri usjeva bila su površine od 1 ha, pa su postavljene po dvije klopke.

Tokom 2010. godine klopke su takođe bile postavljene u dva usjeva na lokalitetu Bački Petrovac i u jednom usjevu na lokalitetu Kisač. Veličina parcela ove godine je bila 0,5 ha, tako da su u svakoj nedjelji praćenja postavljane po tri klopke.

Tokom 2011. godine klopke su postavljene u po jednom usjevu na dva lokaliteta, Bački Petrovac i Kisač. Parcele na ovim lokalitetima su bile veličine 0,5 ha, pa je u njima postavljena po jedna klopka.

4.6.2. Analiza sakupljenih uzoraka biljnih vaši

Posle determinacije vaši u sakupljenim uzorcima iz klopki postavljenih u osam usjeva, izvršena je dalja analiza dobijenih podataka. U cilju što boljeg opisivanja afidofaune u usjevima uljane tikve u Vojvodini izračunati su sljedeći parametri po modelu **Vučetić (2011)** za afidofaunu u usjevu sjemenskog krompira:

1. brojnost taksona u svakoj nedjelji,
2. vremenska dinamika brojnosti taksona kroz nedjelje,
3. Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za svaku nedjelju i svaki lokalitet,
4. broj taksona koji imaju najveću brojnost u određenoj nedjelji,
5. broj taksona (%) na nekom lokalitetu u odnosu na ukupan broj taksona na svim lokalitetima,
6. ukupan broj jedinki na nekom lokalitetu u odnosu na ukupan broj jedinki na svim lokalitetima,
7. frekvencija taksona (%) sa samo jednom jedinkom u odnosu na broj utvrđenih taksona za svaki lokalitet.

Shannon-Weaver-ov indeks (H') karakteriše diverzitet vaši u jednoj klopki, u jednoj nedjelji i ukupno na određenom lokalitetu (**Kerbs**, 1989). Ovaj indeks uzima u obzir kako bogatstvo vrstama, tako i udio određene vrste u ispitivanoj zajednici.

Shannon-Weaver-ov indeks se izračunava po formuli:
$$H' = -\sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$$
 gdje je:

H' =Shannon-Weaver-ov indeks,

p_i =relativna gustina svakog taksona koja se računa kao proporcija broja individua određenog taksona i ukupnog broja individua u uzorku (n_i/N),

N =ukupan broj individua,

S =broj taksona.

4.7. Molekularna ispitivanja

Detekcija virusa tikava u Srbiji obavljena je i primjenom molekularne metode reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimeraze (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction, RT-PCR). Izolati virusa dobijeni na ovaj način su zatim sekvencionirani, identifikovani i okarakterisani utvrđivanjem njihove filogenetske sličnosti sa ostalim izolatima istog virusa iz drugih djelova svijeta i deponovani u GenBank bazu podataka Nacionalnog centra za biotehnoška ispitivanja u Merilendu (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA, NCBI), gdje su im dodijeljeni pristupni brojevi (Accession numbers).

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

Ekstrakcija ukupnih RNA iz biljnog materijala obavljena je upotrebom RNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Hilden, Germany), po protokolu proizvođača. Prvi korak ekstrakcije je usitnjavanje 100 mg zaraženog lišća tikava u avanu tučkom ili u ependorf tubici od 1,5 ml sa odgovarajućim plastičnim tučkom dodavanjem tečnog azota. Ukoliko je maceracija vršena u avanu, usitnjen biljni materijal i tečni azot su prebačeni u ependorf tubicu od 2 ml i nakon isparavanja tečnog azota, dodato je 450 μ l RLT pufera u koji je prethodno dodat β -merkaptotanol (u odnosu 10 μ l β -merkaptotandola na 1 ml RLT pufera). Ukoliko je maceracija vršena u ependorf tubici, RLT pufer je dodavan odmah nakon isparavanja azota. Sadržaj tubice zatim je kratko izmiješan snažnim vorteksovanjem. U cilju što efikasnije razgradnje biljnog tkiva tubice su

inkubirane 3 min u vodenom kupatilu na 56°C. Nakon inkubacije uzorak je prebačen u QIAshredder spin filter u tubicama od 2 ml i centrifugiran 3 min na maksimalnom broju obrtaja (14 000 obrtaja/min) u cilju odstranjivanja ćelijskih djelova i homogenizacije lizata. Za dalji rad korišćen je supernatant pipetiran u novu ependorf tubicu u koju je dodato 225 µl 96% etanola u cilju prosvjetljavanja. Sadržaj tubice je zatim pipetiran u RNase spin filter smješten u nove kolekcione tubice od 2 ml. Centrifugiranjem uzorka 15 s na $\geq 10\,000$ rpm obezbijeđeno je izdvajanje i vezivanje RNA za filter kao i uklanjanje većeg dijela DNA koji se odbacuje zajedno sa supernatanom. Nakon toga, RNase spin filter smješten je u kolekcionu tubicu i više puta ispiran različitim puferima. Prvo je pipetirano 700 µl RW1 pufera za ispiranje, a zatim je ponovo centrifugirano 15 s na $\geq 10\,000$ rpm. Tečna faza je odbačena, a na RNase spin filter je pipetirano 500 µl RPE pufera i u cilju ispiranja RNA, tubica sa uzorkom centrifugirana je 15 s na $\geq 10\,000$ rpm. Tečna faza je odbačena, a ispiranje RNase spin filtera je ponovljeno sa novih 500 µl RPE pufera, centrifugiranjem 2 min na $\geq 10\,000$ rpm. Nakon centrifugiranja, RNase spin filter je prebačen u novu kolekcionu tubicu i centrifugiran 1 min na maksimalnom broju obrtaja da bi se uklonili ostaci etanola i pufera. U cilju rastvaranja izolovanih RNA u RNase spin filter pipetirano je 50 µl RNase free vode. Tako dobijena i izolovana RNA čuvana je na -80°C za dalji rad.

Nakon izolacije ukupnih RNA iz biljnog materijala, RT-PCR metodom uz upotrebu specifičnih prajmera amplifikovan je određeni, ciljani fragment nukleinske kiseline. U prvom koraku izolovane RNA prevode se u DNA pomoću enzima reverzne transkriptaze, jer ispitivani virusi tikava svoju genetsku informaciju prenose pomoću RNA, a zatim DNA ulazi u više ciklusa PCR koji imaju za cilj da umnože dovoljan broj kopija DNA. Detekcija određenog virusa obavljena je pomoću „One-Step“ RT-PCR kita (Qiagen, Hilden, Germany) korišćenjem specifičnih prajmera. Dobijene amplikone je moguće vizuelizovati, nakon elektroforetskog razdvajanja u agaroznom gelu bojenjem etidijum bromidom. Vizuelizacija se vrši na transiluminatoru, pod UV svijetlom, kada se u slučajevima uspješne amplifikacije, umnoženi fragmenti vide kao trake, čija se veličina procjenjuje upoređivanjem sa markerom, koji sadrži miksa fragmenata poznatih veličina.

Molekularna ispitivanja, obuhvatila su sva tri virusa, koji su serološki detektovani u usjevima tikava kod nas, ZYMV, WMV i CMV, zatim TSWV koji je

detektovan naknadnim testiranjem uzoraka u kojima nije utvrđeno prisustvo nijednog od šest testiranih virusa primjenom ELISA i CABYV porijeklom iz tikava sa simptomima žutila.

4.7.1.1. Molekularna detekcija izolata ZYMV

U cilju potvrde rezultata seroloških i bioloških analiza, ali i molekularne detekcije ZYMV primijenjena je RT-PCR metoda. Pored toga, izvršena je optimizacija protokola za rutinsku molekularnu detekciju ZYMV primjenom ZYMV CP_{fwd}/CP_{rev} prajmera, utvrđena je i pogodnost ZY-2/3 prajmera za detekciju ovog virusa. Za ova ispitivanja odabran je 31 izolat sakupljen tokom pet godina ispitivanja, od 2007. do 2011. godine koji su prethodno okarakterisani serološki, a dva izolata 128-08 i 147-08 i biološki. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 1. Oba primijenjena para prajmera obuhvataju dio gena za nuklearne inkluzije (nuclear inclusion b-NIb), kompletan gen za protein omotača (coat protein-CP) i dio 3' neprepisujućeg regiona (3' untranslated region-3' UTR).

Tabela 1. Pregled izolata *Zucchini yellow mosaic virus* iz Srbije dobijenih u ovim istraživanjima

Izolat ZYMV	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	Virusi serološki dokazani*
125-07	2007.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Aradac	ZYMV, WMV
164-07	2007.	<i>Lagenaria siceraria</i>	Futog	ZYMV, CMV, WMV
244-07	2007.	<i>Cucurbita moschata</i>	Bački Petrovac	ZYMV
441-07	2007.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Krajišnik	ZYMV, CMV
115-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Gardinovci	ZYMV, CMV, WMV
128-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Titel	ZYMV
147-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	ZYMV
151-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kulpin	ZYMV, CMV, WMV
161-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV, CMV, WMV
162-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV, CMV, WMV
163-08	2008.	<i>Lagenaria siceraria</i>	Bački Petrovac	ZYMV, CMV, WMV
128-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Čenej	ZYMV
199-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajevo	ZYMV
226-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	ZYMV
237-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Bački Petrovac	ZYMV
239-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV, CMV
243-09	2009.	<i>Cucurbita moschata</i>	Bački Petrovac	ZYMV
216-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Wrinkle bat'	Hetin	ZYMV
230-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	Hetin	ZYMV, CMV
300-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Kisač	ZYMV
308-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> selekcionirani materijal	Bački Petrovac	ZYMV, CMV
328-10	2010.	<i>Lagenaria siceraria</i>	Bački Petrovac	ZYMV

390-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	Horgoš	ZYMV
472-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Stanišić	ZYMV
492-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Gakovo	ZYMV
431-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	ZYMV, CMV
435-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	ZYMV, CMV, WMV
550-11	2011.	<i>Citrullus lanatus</i>	Gornji Tavankut	ZYMV, CMV
681-3	/**	<i>Cucurbita moschata</i> 681-3	/	ZYMV
686-31	/	<i>Cucurbita pepo</i> 686-31	/	ZYMV
670-40	/	<i>Cucurbita maxima</i> 670-40	/	ZYMV

*-virusi dokazani u izvornim biljkama iz kojih je dobijen ZYMV izolat

** -izolati dobijeni testiranjem prenošenja sjemenom

Umnožavanje odabranih izolata obavljeno je korišćenjem dva različita para prajmera prikazanih u tabeli 2. RT–PCR reakcije obavljane su u 25 µl zapremine PCR smješe, koja je sadržala: 5 µl 5x Qiagen OneStep RT–PCR pufera (koji sadrži 12,5 mM MgCl₂), 1 µl dNTP mješavine (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP, finalne koncentracije u smješi 400 µM), 1 µl Qiagen OneStep RT–PCR smješe enzima (koji sadrži Omniscript Reverse transkriptazu, Sensiscript Reverse transkriptazu i HotStar Taq DNA polimerazu), po 1,5 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,6 µM, 14 µl RNase–free vode i 1 µl izolovanih ukupnih RNA. Kao negativna kontrola korišćena je DNase free voda, kao i ukupna RNA ekstrahovana iz zdravog lišća tikava. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler (Biometra, UK).

Reakcija je izvedena po sljedećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C, denaturacija Omniscript Reverse transkriptaze i Sensiscript Reverse transkriptaze, aktivacija HotStar Taq DNA polimeraze kao i inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C. Zatim slijedi trostruki korak ciklusa, koji se ponavlja određeni broj puta, a čine ga denaturacija, hibridizacija prajmera (annealing) i elongacija određeni vremenski period na određenim temperaturama prilagođenim ili preporučenim za svaki od korišćenih prajmera (Tabela 2) i finalna elongacija 72°C 10 min.

Tabela 2. Prajmeri i uslovi trostrukog koraka korišćeni za umnožavanje izolata *Zucchini yellow mosaic virus*

Prajmer	Sekvenca (5' do 3')	Uslovi trostrukog koraka (temperatura/vrijeme)				Cikl.	Veličina amplikona (bp)	Referenca
		Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija				
CPfwd	GCTCCATACATAGCTGAGAC	94°C/25 s	55°C/25 s	72°C/70 s	35	1100	Pfossier and Baumann (2002)	
CPrev	AACGGAGTCTAATCTCGAGC							
ZY-2	GCTCCATACATAGCTGAGACAGC	94°C/30 s	60°C/30 s	72°C/60 s	35	1186		
ZY-3	TAGGCTTGCAAACGGAGTCTAATC							

Tabela 3. Prajmeri i uslovi trostrukog koraka korišćeni za umnožavanje izolata *Watermelon mosaic virus*

Prajmer	Sekvenca (5' do 3')	Uslovi trostrukog koraka (temperatura/vrijeme)				Cikl.	Veličina amplikona (bp)	Referenca
		Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija				
WMV-5'	GGCTTCTGAGCAAAGATG	94°C/30 s	55°C/30 s	72°C/30 s	35	400	Desbiez et al. (2007)	
WMV-3'	CCCAYCAACTGTYGGAAG							
WMVCPfwd	GGKRAYAARCCRCARAACCT	94°C/30 s	50°C/30 s	72°C/60 s	35	1017	Duduk et al. (2008)	
WMVCPprev	CATTACCGTACCTCGGC							
WCPd	GCACTAGTGAYGGKTGCTGTGAATCAG	95°C/20 s	55°C/20 s	72°C/60 s	30	930	Moreno et al. (2004)	
WCPr	GCACTAGTCGACCCGAAATGCTAACTG							
WMV-1-5'	AAATTAATACTACTCATAAAGAC	94°C/30 s	55°C/30 s	72°C/75 s	35	1200	Desbiez et al. (2007)	
WMV-1190-3'	TATTTGCCTTCTTCATGTGG							
WP1d	CATCAAGCTCGAACAAGAA	95°C/20 s	45°C/20 s	72°C/60 s	30	708	Moreno et al. (2004)	
WP1r	GCTGTTACTACTTAACATTA							
WC1d	GGGTAACGTTGAAATTACCA	95°C/20 s	50°C/20 s	72°C/60 s	30	702	Moreno et al. (2004)	
WC1r	CCAAAACCTGCATCACACTT							

4.7.1.2. Molekularna detekcija izolata WMV

Za molekularnu detekciju WMV korišćeno je šest parova specifičnih prajmera (Tabela 3).

Upotreba šest različitih parova prajmere imala je za cilj utvrđivanje najpogodnijih prajmera za rutinsku detekciju WMV u lišću tikava, jer korišćeni prajmeri amplifikuju različite djelove genoma WMV. Prajmeri WMV-5'/3' amplifikuju dio N1b i početak CP gena, dok prajmeri WMVCPfwd/rev amplifikuju veći dio CP gena i 3' UTR. Prajmeri WCPd/r amplifikuju kraj N1b, cijeli CP i dio 3' UTR. Par prajmera WMV-1-5' i WMV-1190-3' umnožavaju 5' UTR i dio P1 proteina, dok par WP1d/r umnožava takođe P1 protein, ali nekompletan sa C i N kraja. Prajmeri WCId/r umnožavaju dio gena koji kodira protein za cilindrične inkluzije (CI), parcijalan i sa 5' i sa 3' kraja.

Za ova ispitivanja odabrana su četiri izolata, po dva iz 2008. godine (izolati 137-08 porijeklom iz *C. pepo* 'Olinka' sa lokaliteta Kisač i 159-08 porijeklom iz *C. maxima* sa lokaliteta Bački Petrovac) i 2009. godine (izolati 256-09 i 268-09 iz *C. pepo* 'Tosca' sa lokaliteta Ruma).

PCR reakcija je obavljena u reakcionoj smješi od 25 µl kako je prethodno opisano u poglavlju 4.7.1.1., samo je kod prajmera WMVCPfwd koncentracija u smješi povećana šest puta, zbog šest degenerativnih mjesta, dok je količina RNase-free vode smanjena onoliko koliko je povećana količina prajmera.

Posle odabira najboljeg para prajmera za rutinsku detekciju WMV u ispitivanja je uključeno još 14 izolata WMV iz 2009., 2010. i 2011. godine (Tabela 4) čija je molekularna detekcija obavljena kako je prethodno opisano, a kao pozitivna kontrola korišćen je izolat 137-08 koji je prethodno molekularno okarakterisan kao WMV.

Tabela 4. Pregled izolata *Watermelon mosaic virus* iz Srbije dobijenih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	Virusi serološki dokazani*
137-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV, WMV
159-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	WMV, CMV
160-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	WMV
256-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	WMV
268-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	WMV
381-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	Horgoš	WMV
466-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Čonoplja	WMV
499-10	2010.	<i>Cucurbita sativus</i>	Porodin	WMV
500-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV
170-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Staro Selo	WMV

485-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Greycetini F1'	Kupusina	ZYMV, WMV, CMV
541-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Dikanovac	ZYMV, WMV, CMV
571-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Ratari	WMV, CMV
613-11	2011.	<i>Cucurbita melo</i>	Togočevce	WMV, CMV
680-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Novo Selo	ZYMV, WMV, CMV
693-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Veliko Selo	ZYMV, WMV, CMV
714-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV
717-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV

*-virusi dokazani u izvornim biljkama iz kojih je dobijen WMV izolat

4.7.1.3. Molekularna detekcija izolata CMV

Za detekciju CMV korišćeni su specifični prajmeri CMV Au1u/Au2d (Stanković et al., 2011). Primijenjeni prajmeri obuhvataju cijeli gen za CP i djelove 5' i 3' neprepisujućih regiona koji se nalaze na RNA3 segmentu (ili subgenomnom RNA4) i amplifikuju fragment veličine oko 850 bp.

Za ova ispitivanja odabrano je osam izolata CMV, koji su prethodno okarakterisani serološki, a izolat 115-08 i biološki. Porijeklo odabranih izolata, lokalitet, biljka domaćin i godina izolacije prikazani su u tabeli 5. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat CMV iz paradajza 746-07, prethodno serološki, biološki i molekularno okarakterisan kao CMV (Đekić i sar., 2008).

Tabela 5. Pregled izolata *Cucumber mosaic virus* iz Srbije korišćenih za molekularnu detekciju

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	Virusi serološki dokazani*
115-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Gardinovci	ZYMV, WMV, CMV
151-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kulpin	ZYMV, WMV, CMV
242-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV, CMV
270-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	CMV
500-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV
171-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Staro Selo	CMV
717-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV
720-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	WMV, CMV

*-virusi dokazani u izvornim biljkama iz kojih je dobijen CMV izolat

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u poglavlju 4.7.1.1. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera su: denaturacija 30 s na 94°C, hibridizacija prajmera 30 s na 58°C i elongacija 30 s na 72°C. Ovaj trostruki korak ponavljan je 35 puta. Sekvence korišćenih prajmera su: Au1u 5'-CATGGATGCTTCTCCRCGAG-3', Au2d 5'-CGTAAGCTGGATGGACAACC-3'.

4.7.1.4. Molekularna detekcija izolata TSWV

Za detekciju TSWV korišćen je par specifičnih prajmera TSWVCP-f/r (Vučurović et al., 2012). Primijenjeni prajmeri obuhvataju dio gena za nukleokapsid (N) i amplifikuju fragment veličine 738 bp.

Za ova ispitivanja odabrano su dva izolata TSWV iz 2009. godine iz tikava, 236-09 iz *C. maxima* i 240-09 *C. pepo* 'Beogradska' oba sa lokaliteta Bački Petrovac. Osim dva izolata iz tikava, u ispitivanja su uključena i dva izolata iz korovskih biljaka, 273-10 iz višegodišnjeg korova *Convolvulus arvensis* sa lokaliteta Kisač i 354-10 iz jednogodišnjeg korova *Amaranthus retroflexus* sa lokaliteta Zmajevo. Kao pozitivna kontrola korišćeni su izolati TSWV iz duvana 33-06 i 53-06 (GQ355467 i GQ373173), prethodno serološki, biološki i molekularno okarakterisani kao TSWV (Đekić, 2009).

PCR reakcija obavljena je u reakcionoj smješi od 25 µl kako je opisano u poglavlju 4.7.1.1, ali je zbog postojanja degenerativnih mjesta kod oba prajmera koncentracija prvog povećana dva puta, drugog četiri puta, a količina RNase-free vode smanjena onoliko koliko je povećana količina prajmera. Uslovi trostrukog koraka za korišćeni par prajmera bili su: denaturacija 60 s na 94°C, hibridizacija prajmera 60 s na 51°C i elongacija 60 s na 72°C. Ovaj trostruki korak je ponavljan 45 puta. Sekvence korišćenih prajmera su: TSWVCP-f 5'-GGTTAAGCTCACTAAGAAARCA-3', TSWVCP-f 5'-TTTAACYCCRAACATTTTCATAGA-3'.

4.7.1.5. Molekularna detekcija izolata kompleksa virusa koji izaziva žutilo tikava

Detekcija virusa koji izazivaju simptome žutila na tikvama izvršena je korišćenjem prajmera specifičnih za detekciju virusa koji su udruženi sa sindromom žutila tikava (Tabela 6).

Odabrani prajmeri za virus žutila tikava perzistentno prenosiv vašima (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) i virus žutila nerava krastavca (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV) umnožavaju djelove gena za proteinski omotač virusa (CP) i dio ne kodirajućeg regiona ispred CP (non coding region-NCR). Prajmeri CYSCPf/r specifični za detekciju virusa žute kržljivosti tikava (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) takođe umnožavaju gen za CP virusa, dok prajmeri CYSDV 1/2 za detekciju CYSDV i prajmeri BPYV I/II za detekciju virusa lažnog žutila repe (*Beet pseudo yellows virus*, BPYV) umnožavaju "heat-shock" protein (HSP70) virusa.

Za ova ispitivanja odabrana su četiri izolata sakupljena 2009. godine: izolat 66-09 (lokalitet Budisava), 165-09 (Sirig), 234-09 (Kisač), koji su poticali iz *C. pepo* 'Olinka' i izolat 241-09 (Bački Petrovac) iz vrste *C. maxima*. PCR reakcija je obavljena u reakcionoj smješi od 25 µl kako je prethodno opisano u poglavlju 4.7.1.1.

4.7.1.5.1. Molekularna detekcija izolata CABYV

Detekcija CABYV izvršena je korišćenjem dva para prajmera CABYV up/down i CE9/10 (Tabela 6).

Za ova ispitivanja odabrano je 59 izolata iz 22 usjeva sa 21 lokaliteta gajenja tikava u Srbiji. Spisak odabranih izolata, njihovo porijeklo, lokalitet, godina izolacije i biljka domaćin prikazani su u tabeli 7.

Upotreba dva različita para prajmera za detekciju imala je za cilj utvrđivanje njihove pogodnosti za rutinsku detekciju CABYV. Za dalje analize korišćen je par prajmera koji se pokazao kao pogodniji. PCR reakcija je obavljena u reakcionoj smješi od 25 µl kako je prethodno opisano u poglavlju 4.7.1.1.

Tabela 6. Prajmeri i uslovi trostrukog koraka korišćeni za detekciju virusa koji izazivaju žutilo tikava

Virus	Prajmer	Sekvenca (5' do 3')	Uslovi trostrukog koraka (temperatura/vrijeme)				Veličina amplikona (bp)	Referenca
			Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Cikl.		
CABYV*	CE9	GAATACGGTCGCGGCTAGAAATC	94°C/45 s	64°C/45 s	72°C/60 s	35	600	Juarez et al. (2004)
	CE10	CTATTTCTGGGTTCTGGACCTGGC						
CABYV	up	GAACACTAGCCAAGCACACAC	94°C/30 s	54°C/45 s	72°C/120 s	33	484	Boubourakas et al. (2006)
	down	GGTAGGCCTTGAGTATTCCAG						
BPYV	BPYV I	TCGAAAGTCCAACAAGACGT	94°C/30 s	54°C/45 s	72°C/120 s	33	251	Boubourakas et al. (2006)
	BPYV II	CTGATGGTGC GCGAGTG						
CYSDV	CYSDV 1	ATGGACATGCCTAACTGTTACTT	94°C/30 s	54°C/45 s	72°C/120 s	33	364	Boubourakas et al. (2006)
	CYSDV 2	ATAGCTGCTGCAGATGGTTC						
	CYSCPf	ATGGCGAGTTCGAGTGAGAATAA						
	CYSCP r	ATTACCACAGCCACCTGGTGCTA	94°C/30 s	50°C/120 s	72°C/120 s	30	755	Rubio et al. (2001)
CVYV	CVYV CP1	GCTTCTGGTTCTCAAGTGGA	94°C/30 s	55°C/30 s	72°C/30 s	35	540	Yakoubi et al. (2007)
	CVYV CP2	GATGCATCAGTTGTCAGATG						

*CABYV-Cucurbit aphid-borne yellows virus, BPYV-Beet pseudo yellows virus, CYSDV-Cucurbit yellow stunting disorder, CVYV-Cucumber vein yellowing virus

Table 7. Pregled izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* iz Srbije dobijenih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	Virusi serološki dokazani*
135-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
136-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV, WMV
145-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
157-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	ZYMV, CMV
65-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
66-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
67-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
69-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
100-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
101-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	ZYMV
161-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	/**
162-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	/
164-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	WMV
165-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Srbobran	/
166-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Srbobran	WMV
167-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Srbobran	WMV
194-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
195-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
196-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
197-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
230-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
231-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
232-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
233-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
234-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
235-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
237-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Bački Petrovac	ZYMV
241-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	/
242-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV
246-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	ZYMV
249-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i>	Bački Petrovac	ZYMV
197-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Long of Nepal'	Hetin	/
229-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	Hetin	ZYMV, CMV
262-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV, CMV
298-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	ZYMV
315-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Wies 371'	Bački Petrovac	ZYMV, CMV
336-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajevo	ZYMV, CMV
338-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajevo	ZYMV
339-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajevo	ZYMV
343-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	/
346-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	/
349-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
350-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV
351-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	ZYMV, CMV

352-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajevo	CMV
356-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajevo	CMV
378-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	Orom	CMV
465-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Čonoplja	ZYMV
168-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Staro Selo	/
422-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Irmovo	ZYMV
432-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	/
433-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	WMV, CMV
441-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Silbaš	ZYMV
439-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Silbaš	ZYMV
488-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Greycetini F1'	Kupusina	/
504-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Kupusina	WMV, CMV
570-11	2011.	<i>Cucumis sativus</i>	Debrč	CMV
610-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Togočevce	CMV
694-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Veliko Selo	ZYMV, WMV

*-virusi dokazani u izvornim biljkama iz kojih je dobijen CABYV izolat

**/-uzorci u kojima serološki nije detektovano prisustvo ni jednog od ispitivanih virusa

4.7.1.6. Analiza PCR produkta

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcije obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1x TBE puferu, bojenjem etidijumbromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem agaroze u 1x TBE pufera i zagrijavanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Gel je zatim hlađen do temperature od 60°C, razliven je u kalup za horizontalnu elektroforezu, u koji su predhodno postavljeni separatori i češljevi, nakon čega je ostavljen na sobnoj temperaturi pola sata da se ohladi i polimerizuje. Nakon polimerizacije gela i uklanjanja češljeva, kalup je uranjan u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1x TBE puferom. Uzorci su pripremani tako što je na parafilmu pomiješano 5 µl produkta PCR reakcije i 1 µl boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i odmah su unošeni u bunarčice po odgovarajućem rasporedu.

Elektroforeza je obavljena pri konstantnoj struji jačine 40 mA u trajanju od približno 40 min u aparatima za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100 i BlueMarine 200, Serva Electrophoresis GmbH, UK). Za određivanje veličine amplifikovanih PCR produkata korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Posle završene elektroforeze, gelovi su inkubirani 15 min u rastvoru za bojenje od destilovane vode i etidijumbromida u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml.

Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori na transiluminatoru (Biometra, UK) pod UV svjetlošću talasne dužine 312 nm pri kojoj etidijumbromid umetnut između baznih parova dvostrukog heliksa fluorescira. Pozitivnom reakcijom je smatrana pojava traka na očekivanoj poziciji.

U metodi je korišćen 1x TBE pufer koji sadrži: 90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA.

Dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela korišćenjem žutog filtera.

4.7.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija najznačajnijih virusa tikava

U cilju molekularne identifikacije i karakterizacije obavljeno je sekvencioniranje izolata najznačajnijih virusa tikava u Srbiji. Posle uspješne amplifikacije uzoraka odabranih za sekvencioniranje, dobijeni amplikoni su prečišćeni pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) po uputstvu proizvođača. Jedna zapremina dobijenog PCR produkta i miksa pomiješana je sa pet zapremina PBI pufera, a zatim prebačena u QIAquick kolonu smještenu u kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13000 rpm) u cilju vezivanja DNA za filter. Nakon toga, tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolonu je pipetirano 750 µl PE pufera u cilju ispiranja RNA, posle čega je tubica sa uzorkom centrifugirana 1 min na 13 000 rpm. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a QIAquick kolona vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na 13 000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera. U cilju rastvaranja DNA u QIAquick kolonu smještenu u novu tubicu od 1,5 ml pipetirano je 50 µl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13 000 rpm.

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

Reakcije sekvencioniranja urađene su u BMR Genomics (Padova, Italy) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvencionatoru ili u MACROGEN Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea) na ABI 3730XL automatskom kapilarnom sekvencionatoru. Umnoženi fragmenti gena virusa sekvencionirani su u oba smjera upotrebom prajmera koji su korišćeni za njegovo umnožavanje. Nakon

sekvencioniranja, dobijene sekvence odabranih izolata ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV su obrađene u programu FinchTV Version 1.4.0., konsenzus sekvence su dobijene međusobnim poređenjem obrađenih sekvenci uzvodnog i nizvodnog prajmera u CLUSTAL *W* programu, implementiranom u okviru MEGA softvera verzija 5.0 (Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2011). Po obradi, sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, posle čega su im dodijeljeni pristupni brojevi (GenBank Accession number).

4.7.2.1. Molekularna identifikacija najznačajnijih virusa tikava

Molekularna identifikacija obavljena je pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize. Ova analiza obavljena je poređenjem sekvenci dobijenih izolata virusa tikava iz Srbije sa dostupnim sekvencama odgovarajućih gena virusa u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Proračun prosječne stope genetičkog diverziteta između izolata ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV iz Srbije i sekvenci izolata ovih virusa iz drugih djelova svijeta dostupnih u GenBank obavljen je pomoću MEGA 5.0. softvera. Odabrane sekvence su prvo poravnate i međusobno upoređene CLUSTAL *W* programom (Thompson et al., 1994), dijelom programa MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011).

4.7.2.2. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa tikava

Molekularna karakterizacija ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV obavljena je proračunavanjem genetičke sličnosti, preko prosječne stope genetičkog diverziteta dobijenih sekvenci izolata iz Srbije i filogenetskim analizama koje su uključile izolate dobijene u Srbiji i izolate iz drugih djelova svijeta deponovane u GenBank bazi podataka.

4.7.2.2.1. Proračun genetičke sličnosti

Proračun genetičke sličnosti između izolata virusa ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV dobijenih u ovim istraživanjima obavljen je proračunom prosječne stope genetičkog diverziteta na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou. Sve sekvence ispitivanog virusa poravnate su u CLUSTAL *W*, a zatim skraćene po dužini najkraće, a

zatim su korišćenjem MEGA 5.0. dobijene vrijednosti prosječnih stopa genetičkog diverziteta između ispitivanih izolata, broj nukleotidnih, kao i aminokiselinskih razlika.

4.7.2.2.2. Filogenetske analize

Proračun evolutivne povezanosti izolata najznačajnijih virusa tikava iz Srbije obavljen je rekonstrukcijom filogenetskih stabala na osnovu sekvenci dobijenih u ovim istraživanjima i odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka. Za ZYMV i WMV prvo je u MEGA 5.0. programu sproveden test pronalaženja najbolje prilagođenog modela nukleotidne supstitucije metodom maksimalne vjerodostojnosti, na osnovu najniže vrijednosti BIC (Bayesian Information Criterion). Po dobijanju parametra koji najbolje karakteriše odabrane sekvence, rekonstruisana su filogenetska stabla Neighbour-joining metodom sa „bootstrap“ podrškom u 1000 ponavljanja i izvršen je proračun prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskim stablima. Sličnost na aminokiselinskom nivou izražena je preko prosječne stope genetičkog diverziteta. Filogenetska stabla za CMV, TSWV i CABYV su rekonstruisana Maximum parsimony metodom sa „bootstrap“ podrškom u 1000 ponavljanja, a po rekonstrukciji stabla na osnovu model testa najbolje prilagođene nukleotidne supstitucije određen je parametar na osnovu koga su se računale vrijednosti genetičke udaljenosti u i između grupa izdvojenih u stablu. Pored rekonstrukcije filogenetskog stabla, izolati ZYMV su okarakterisani i poređenjem aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP gena izolata porijeklom iz Srbije sa 31 drugom sekvencom izolata ZYMV iz Evrope. Sve analize su sprovedene korišćenjem MEGA 5.0. programa.

4.7.2.2.2.1. Filogenetske analize ZYMV

Za rekonstrukciju filogenetskog stabla ZYMV iskorišćene su sekvence svih izolata ovog virusa dobijene u ovim istraživanjima, kao i 37 odabranih sekvenci iz drugih djelova svijeta (Tabela 8). Posle uparivanja, sve sekvence su skraćene na 837 nt koji obuhvataju cijeli CP. Kao „outgrupe“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćene su sekvence *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Soybean mosaic virus* (SMV) i WMV. Prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih

grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Tamura 3-parametra sa Gamma distribucijom (T92+G) u okviru programa MEGA 5.0.

Tabela 8. Sekvence CP gena izolata *Zucchini yellow mosaic virus* dostupnih u GenBank bazi podataka korišćene za filogenetske analize

Virus	Izolat ^a	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
ZYMV	Austria 2, 5, 6, 10-12	Austrija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420012-17
ZYMV	Slovenia 1	Slovenija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420018
ZYMV	Berlin 1	Nemačka	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420019
ZYMV	Italy 1	Italija	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420020
ZYMV	Kuchyna	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124239
ZYMV	10	Mađarska	<i>Cucumis sativus</i>	AJ251527
ZYMV	H266-2, 272-5, 272-8	Mađarska	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i>	AJ459954-56
ZYMV	Zuy	Poljska	<i>Cucurbita pepo</i> 'Girromontiina'	EU561044
ZYMV	Zug	Poljska	<i>Cucurbita pepo</i> 'Girromontiina'	EU561045
ZYMV	B*	Izrael	<i>Cucurbita pepo</i> 'Diamant'	AY188994
ZYMV	C-16	Španija	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ645729
ZYMV	M	Japan	/	AB004641
ZYMV	Florida	SAD	<i>Cucurbita moschata</i>	D13914
ZYMV	California	SAD	<i>Cucurbita moschata</i>	L31350
ZYMV	Knx-11	Australija	<i>Cucurbita maxima</i>	JF792373
ZYMV	Knx-14	Australija	<i>Cucurbita</i> sp.	JF797208
ZYMV	SG	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	AJ316228
ZYMV	WM	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	AJ515911
ZYMV	China 99/246	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	AY611024
ZYMV	CH99/116	Kina	<i>Cucurbita moschata</i>	AY611021
ZYMV	CH99/193	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	AY611023
ZYMV	HN-01	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	AY611026
ZYMV	Shanxi	Kina	<i>Cucurbita moschata</i>	AY074808
ZYMV	KR-PE	Koreja	<i>Cucurbita moschata</i>	AY278999
ZYMV	cu	Koreja	<i>Cucumis sativus</i>	AF062518
ZYMV	TW-NT1	Tajvan	<i>Cucumis sativus</i>	AF127933
ZYMV	TW-TN3	Tajvan	<i>Luffa cylindrica</i>	NC_003224
ZYMV	TW-PT5	Tajvan	<i>Momordica charantia</i>	AF127934
ZYMV	Singapore	Singapur	<i>Cucumis sativus</i>	AF014811
ZYMV	Reunion Island	Reunion (Francuska)	<i>Momordica charantia</i>	L29569
ZYMV ^b	H	Češka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124244
ZYMV	K	Češka	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124245
BCMV ^c	MS1	Australija	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	EU761198
WMV	/	Tonga	<i>Vanilla fragrans</i>	L22907
SMV	/	Kina	/	U25673

^aPodaci preuzeti iz GenBank

^bIzolati ZYMV sa parcijalnim sekvencama CP gena korišćeni samo za poređenje aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP

^cSekvence *Bean common mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* i *Soybean mosaic virus* korišćene kao “outgrupe”

Filogenatske analize su obavljene i poređenjem aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP gena 31 izolata iz Srbije sa 31 drugom sekvencom ZYMV iz Evrope (Tabela 8).

4.7.2.2.2. Filogenetske analize WMV

Za rekonstrukciju filogenetskih stabala korišćeno je 18 sekvenci WMV dobijenih u ovim istraživanjima. Osim sekvenci porijeklom iz Srbije, korišćeno je još i 79 odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka (Tabela 9).

Filogenetske analize obavljene su rekonstrukcijom dva filogenetska stabla. Oba stabla su rekonstruisana Neighbor-Joining metodom, sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja. Prvo filogenetsko stablo rekonstruisano je na osnovu sekvenci dijela CP gena od 739 nt. Za rekonstrukciju ovog stabla upotrijebljene su sekvence četiri izolata WMV iz Srbije 137-08, 159-08, 256-09 i 268-09, kao i 56 odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka. Rekonstrukcija stabla i proračun genetičke udaljenosti u i između grupa koje su se izdvojile u stablu izvršena je na osnovu Tamura 3-parametar modela sa Gamma distribucijom. Drugo filogenetsko stablo rekonstruisano je na osnovu 233 nt 3' kraja N1b i početka CP gena. Za rekonstrukciju ovog stabla takođe je korišćena Neighbor-Joining metoda, sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja na osnovu sekvenci 14 izolata WMV iz Srbije i 73 odabrane sekvence iz GenBank baze podataka. Kao najbolje prilagođen model nukleotidne supstitucije na osnovu kog je rekonstruisano filogenetsko stablo i izračunate vrijednosti genetičke udaljenosti u i između grupa koje su se izdvojile u stablu odabran je Tamura-Nei-parametar modela sa Gamma distribucijom.

Tabela 9. Sekvence izolata *Watermelon mosaic virus* dostupne u GenBank bazi podataka korišćene za filogenetske analize

Izolat*	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
SG99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579518
SG99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579517
SG99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579519
SG99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579481
BAD95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579503
Tonga	Tonga	<i>Vanilla tahitensis</i>	L22907
USA	USA	/**	D13913
/	Novi Zeland	/	AY995215
Pak	Pakistan	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	AB127934
C05-337	Francuska	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	EU660589

BAD95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579502
WMV-FR	Francuska	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	AY437609
MAD95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579506
MAD95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579507
MAD95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579508
MAD95.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579510
MAD95.6	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579509
MAD95.8	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579512
ZAR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579483
ZAR95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579484
BAD95.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579504
ZAR99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579487
ZAR99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579489
MUR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579499
MUR95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579501
MAL99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579520
MAL99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579522
MAL99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579524
MAD95.7	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579511
MAD99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579513
MAD99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579514
MAD99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579515
MAD99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579516
BAR99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579492
BAR99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579493
BAR99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579494
BAR99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579495
BAR99.5	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579496
VAL95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579497
VAL95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579498
BAR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579491
BAD95.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579505
MUR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579500
MAL99.4	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579523
MAL99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579521
ITA00-G	Italija	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	EU660590
ZAR99.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579486
ZAR99.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579485
ZAR99.3	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579488
BAR95.2	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579490
FMF00-LL2	Francuska	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	EU660578
ZAR95.1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ579482
Habenaria	Japan	<i>Habenaria radiata</i>	AB001994
WMV-CHN	Kina	<i>Citrullus lanatus</i>	DQ399708
WMV-HLJ	Kina	/	AY464948
SK20-sq	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (squash)	GQ241716
SK02-sq	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (squash)	GQ241710
SK18-zu	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	GQ241714

SK07-zu	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	GQ241704
SK19-sq	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (squash)	GQ241715
SK10-me	Slovačka	<i>Cucumis melo</i>	GQ241713
SK08-zu	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	GQ241712
SK21-zu	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	GQ241711
SK22-cu	Slovačka	<i>Cucumis sativus</i>	GQ241707
SK23-zu	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	GQ241708
SK15-sq	Slovačka	<i>Cucurbita pepo</i> (squash)	GQ241705
YAZ.MO.2	Iran	<i>Cucurbita pepo</i>	EU667630
YAZ.MO.1	Iran	<i>Cucumis sativus</i>	EU667638
IR06-me	Iran	<i>Cucumis melo</i>	GQ241702
IR10-me	Iran	<i>Cucumis melo</i>	GQ241703
URO.NA.1	Iran	<i>Cucurbita maxima</i>	EU667629
URO.OS.1	Iran	<i>Cucumis melo</i>	EU667631
FMF00-LL1	Francuska	<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	EU660581

* Podaci preuzeti iz GenBank

** /-nema podataka

4.7.2.2.3. Filogenetske analize CMV

Filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem šest sekvenci CMV, koje su dobijene u ovim istraživanjima, kao i 46 sekvenci CMV izolata iz GenBank baze podataka. Sve sekvence su skraćene na dužinu od 657 bp, prema dužini najkraće, što odgovara dužini cijelog CP gena (Tabela 10). Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem Maximum parsimony metode sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja. Izolat *Peanut stunt virus* (PSV; pristupni broj U15730) korišćen je kao „outgrupa“. Prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Kimura 2-parametar modela u okviru programa MEGA 5.0.

Tabela 10. Sekvence izolata *Cucumber mosaic virus* dostupne u GenBank korišćene za filogenetske analize

Izolat**	Zemlja	Domaćin	Pristupni broj
S	Južna Afrika	/*	AF063610
LS	SAD	/	AF127976
trk7	Mađarska	<i>Trifolium repens</i>	L15336
Q	Australija	/	M21464
m2	Japan	<i>Vigna unguiculata</i>	AB006813
Kin	Škotska	/	Z12818
Oahu	SAD	<i>Musa spp.</i>	U31220
P	Indija	<i>Physalis minima</i>	X89652
RB	Kina	<i>Phaseolus angularis</i>	AJ006990
PR36	SAD	/	M98500

P1	Kina	/	AJ006988
ABI	Koreja	<i>Gladiolus</i> sp.	L36525
FC	SAD	/	D10544
P6	Velika Britanija	/	D10545
Ixora	Filipini	<i>Lycopersicon esculentum</i>	U20219
	Kolumbija	<i>Musa</i> spp.	U32859
C7-2	Japan	/	D42079
banana	Izrael	<i>Musa acuminata</i>	U43888
I17F	Francuska	/	X16386
M48	Tajvan	<i>Vigna radiata</i>	D49496
As	Koreja	/	AF013291
NT9	Tajvan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	D28780
Kor	Koreja	/	L36251
KM	Japan	<i>Melon</i>	AB004780
Y	Japan	/	D12499
Cas	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	DQ018286
113	SAD	/	AF523340
Simp2	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	FJ621495
MAD99/1	Španija	<i>Melon</i>	AJ829776
MAD99/4	Španija	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>meloepo</i> (zucchini)	AJ829770
702-07	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ340670
Tfn	Italija	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Y16926
MAD96/1	Španija	<i>Melon</i>	AJ829768
207	Australija	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AJ585517
650-07	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	EU921757
C	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	D00462
Fny	SAD	/	D10538
Sny	SAD	<i>Cucurbita pepo</i>	U66094
M	Velika Britanija	/	D10539
D8	Japan	/	AB004781
Leg	Japan	/	D16405
E5	Japan	/	D42080
Pepo	Japan	/	D43800
SD	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB008777
WL	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	D00463
DRKD	SAD	<i>Spinacia oleracea</i>	U10922

* Podaci preuzeti iz GenBank baze podataka

**/-nema podataka

4.7.2.2.4. Filogenetske analize TSWV

Za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćene su sve četiri sekvence TSWV dobijene u ovim istraživanjima kao i 41 sekvenca TSWV izolata iz GenBank baze podataka (Tabela 11). Sve sekvence su skraćene na dužinu od 744 bp, prema dužini najkraće. Filogenetsko stablo je rekonstruisana korišćenjem maximum parsimony

metode sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja. Izolat *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV; pristupni broj S54325) korišćen je kao „outgrupa“. Prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Tamura 3-parametar modela u okviru programa MEGA 5.0.

Tabela 11. Sekvence N gena izolata *Tomato spotted wilt virus* dostupnih u GenBank bazi podataka korišćene za filogenetske analize

Izolat*	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
Is-56	Crna Gora	<i>Nicotiana tabacum</i>	GU369729
L3	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	D13926
20 Da96/1	Bugarska	<i>Dahlia</i> sp.	AJ296602
GD98	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ297609
BS97	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ297610
97	Bugarska	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ296598
T992	Italija	<i>Nicotiana tabacum</i>	AY848922
P267	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ376180
P105/2006RB	Italija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ915946
C27084	Češka	<i>Calla</i> sp.	AJ296599
LE98/527	Njemačka	<i>Lysimachia</i> sp.	AJ297611
D	Holandija	<i>Dahlia</i> sp.	AF020660
SPAIN-1	Španija	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AY744479
SPAIN-2	Španija	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AY744480
LC	Španija	/	X94550
VE430	Španija	<i>Capsicum annuum</i>	DQ376184
France81	Francuska	<i>Capsicum annuum</i>	FR693053
SO46	Francuska	<i>Lycopersicon esculentum</i>	FR693255
MP	Južna Afrika	<i>Arachis hypogaea</i>	EF059706
GP	Južna Afrika	<i>Arachis hypogaea</i>	EF059705
NC-1	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744476
10	SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AF020659
NC-3	SAD	<i>Dahlia</i> sp.	AY744478
NC-2	SAD	<i>Arachis hypogaea</i>	AY744477
BL	SAD	<i>Lactuca sativa</i>	L20953
H	SAD	/	AF306490
L	SAD	<i>Lactuca sativa</i>	X61799
AC	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064469
MC	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF064472
CA-1	SAD	<i>Aster</i> sp.	AY744468
CA-4	SAD	<i>Chrysanthemum</i>	AY744471
Br20	Brazil	/	DQ915948
Iw	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AB277581
O	Japan	<i>Capsicum annuum</i>	AB277582
Japan	Japan	/	AB010997
KAIxe	Južna Koreja	<i>Ixeris chinensis</i>	EF195227
KAPo	Južna Koreja	<i>Capsicum annuum</i>	EF195228

Sr-603	Srbija	<i>Lycopersicon esculentum</i>	GU369723
53-05	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ373173
33-06	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ355467
39-06	Srbija	<i>Nicotiana tabacum</i>	GQ373172

* Podaci preuzeti iz GenBank

**/-nema podataka

4.7.2.2.2.5. Filogenetske analize CABYV

Za rekonstrukciju filogenetskih stabala korišćene su, parcijalne sekvence CP i MP gena koji se u velikom dijelu preklapaju, odnosno transliraju sa skoro istog dijela RNA, samo što imaju različiti okvir čitanja i MP gen počinje da se „pročitava“ 28 nt nakon CP gena. Stablo je rekonstruisano na osnovu 32 CABYV izolata iz Srbije, kao i 28 sekvenci izolata ovog virusa iz GenBank baze podataka (Tabela 12). Filogenetska stabla su rekonstruisana korišćenjem Maximum parsimony metode sa bootstrap podrškom u 1000 ponavljanja. Četiri sekvence izolata *Melon aphid-borne yellows virus* i tri sekvence *Sukawa aphid-borne yellows virus* su korišćene kao „outgrupe“ (Tabela 12).

Prva dva filogenetska stabla su rekonstruisana u cilju utvrđivanja da li dužina sekvenci dobijenih korišćenjem CE9/10, odnosno CABYV up/down prajmera utiče na izdvajanje grupa u stablu. Za rekonstrukciju ovih stabala korišćeno je 10 sekvenci izolata CABYV iz Srbije (145-08, 157-08, 66-09, 165-09, 194-09, 197-09, 234-09, 237-09, 242-09 i 246-09) kao i 24 sekvence CABYV iz drugih djelova svijeta. Pri rekonstrukciji prvog stabla, korišćenjem sekvenci izolata iz Srbije dobijenih CE9/10 prajmerima, sve sekvence su skraćene na dužinu od 550 nt. Za rekonstrukciju drugog stabla na osnovu sekvenci CABYV iz Srbije dobijenih korišćenjem CABYV up/down sve sekvence su skraćene na dužinu od 248 nt.

Treće filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem 32 CABYV izolata iz Srbije i 28 sekvenci izolata CABYV iz GenBank baze podataka. Sve sekvence su skraćene na dužinu od 195 nt. Prosječne vrijednosti genetičke udaljenosti unutar i između genetičkih grupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu proračunate su korišćenjem Kimura 2-parametar modela u okviru programa MEGA 5.0.

Tabela 12. Sekvence izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* dostupne u GenBank bazi podataka korišćene za filogenetske analize

Virus	Izolat*	Zemlja	Biljka domaćin	Pristupni broj
CABYV	Hunan	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU244322
CABYV	CABYV-AH	Kina	<i>Cucumis sativus</i>	FJ460214
CABYV	/**	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU000535
CABYV	Shandong	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU244318
CABYV	CABYV-JX	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ460216
CABYV	Xinjiang	Kina	<i>Cucumis melo</i>	EU244315
CABYV	CABYV-FJ	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ425880
CABYV	Sichuan	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU244320
CABYV	Shanghai	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	EF063707
CABYV	Inner Mongolia	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU262627
CABYV	36-2	Španija	<i>Cucurbita pepo</i>	AY529653
CABYV	9FB	Tunis	<i>Cucumis melo</i>	EF187338
CABYV	ESH-25	Tunis	<i>Cucurbita pepo</i> (cukini)	EF187340
CABYV	AZ	Tunis	<i>Citrullus lanatus</i>	EF187341
CABYV	Ec3	Tunis	<i>Ecballium elaterium</i>	EF187346
CABYV	N	Francuska	/	NC_003688
CABYV	S89	Italija	<i>Ecballium elaterium</i>	EF029112
CABYV	S23	Italija	<i>Cucumis melo</i>	EF029113
CABYV	S7	Italija	<i>Cucumis melo</i>	EF029114
CABYV	SK-1	Slovačka	<i>Cucumis sativus</i>	FJ428797
CABYV	IR-1	Iran	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ428798
CABYV	IR-2	Iran	<i>Cucumis melo</i>	FJ428799
CABYV	IR-3	Iran	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ428800
CABYV	CABYV-R-TW27	Tajvan	<i>Cucurbita pepo</i>	GU324097
CABYV	CABYV-R-TW36	Tajvan	<i>Cucurbita pepo</i>	GU324099
CABYV	CABYV-BJ	Japan	<i>Cucumis sativus</i>	FJ425879
CABYV	Rak-5	Češka	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>	HM771273
CABYV	Badr1	Egipat	<i>Cucurbita pepo</i>	FR717147
SABYV ^a	Guangdong	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	EU259784
SABYV	Guangxi	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	EU259785
SABYV	Guangxi	Kina	<i>Luffa cylindrica</i>	FJ425878
MABYV	MABYV-JX	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	FJ460215
MABYV	MABYV-AH	Kina	<i>Lagenaria siceraria</i>	FJ460213
MABYV	/	Kina	<i>Benincasa hispida</i>	EU000534
MABYV	Inner Mongolia	Kina	<i>Cucurbita pepo</i>	EU262628

* Podaci preuzeti iz GenBank

**/-nema podataka

^aSekvence *Melon aphid-borne yellows virus* i *Suakwa aphid-borne yellows virus* korišćene kao “outgrupe”

5. REZULTATI

5.1. Simptomi u polju i učestalost oboljenja

Tokom petogodišnjih ispitivanja virusa tikava u Srbiji, u periodu od 2007-2011. godine, pregledima različitih usjeva tikava, krastavca, lubenice i dinje uočena je pojava niza simptoma koji su ukazivali na virusnu infekciju. Simptomi su se javljali na svim nadzemnim djelovima tikava, a najčešće su se javljale promjene opšteg izgleda biljke, zatim morfološke i hromatske promjene na lišću i plodovima tikava.

Tokom pregleda usjeva 2007. godine mozaični simptomi su prvi put uočeni u fenofazi sedam do osam pravih listova. Procijenjena zaraženost pregledanih usjeva kretala se od 30 do 50%. Simptomi virusnih infekcija su se javljali najčešće na listovima i to u vidu mozaika, ali je bila značajna i pojava simptoma na plodovima različitih vrsta tikava. Takođe, usled nepogodnih klimatskih uslova u toku 2007. godine uočena je pojava prijevremenog sušenja lišća koje je bilo mnogo izraženije kod biljaka koje su ispoljavale simptome virusnih infekcija. Prvi simptomi na biljkama tikava tokom 2008. godine uočeni su u fenofazi četiri do šest razvijenih listova. Procijenjeni nivo učestalosti zaraze virusima 2008. godine bio je znatno viši, preko 80%, a u pojedinim usjevima sve biljke su ispoljile virusne simptome. Na svim pregledanim lokalitetima, uočeni su veoma izraženi simptomi na listovima i na plodovima i zaostajanje pojedinih biljaka u porastu, kao posljedica infekcija ostvarenih veoma rano u vegetaciji. Pojedine biljke ispoljile su virusne simptome samo na određenim djelovima vriježa ili samo na mlađem lišću. Sporadično, obično na obodu njiva uočena je pojava žutila i sušenje starijeg lišća. Po uočenim veoma intenzivnim simptomima na mladim, tek zametnutim plodovima i po značajno smanjenom broju plodova po biljci posebno se izdvajao lokalitet Gardinovci, na kom je usjev uljane tikve preoran prije ubiranja plodova. U sljedeće dvije godine ispitivanja uočena je nešto niža učestalost zaraze od oko 40%. Međutim, tokom 2009. godine na lokalitetu Ruma u usjevu cuginija uočeni su veoma destruktivi simptomi na listovima i na plodovima. Prvi simptomi na ovom lokalitetu su se javili u ranim fazama vegetacije tikava, dok su u ostalim lokalitetima prvi simptomi uočeni sredinom vegetacionog perioda. U toku 2010. godine prvi simptomi virusnih zaraza uočeni su kao i 2009. godine sredinom vegetacije. Takođe, za 2010. godinu bilo je karakteristično i to što su u usjevima tikava bile primijećene pojedinačne biljke na

kojima su se javile kolonije pamukove vaši (*Aphis gossypii*). Uočena je i pojava velikog broja biljaka sa žutim listovima koji su na dodir bili veoma krti, što je predstavljalo značajnu promjenu u odnosu na prethodne godine kada je pojava biljaka sa ovakvim simptomima bila rijetka. Tokom poslednje, 2011. godine istraživanja procijenjena učestalost zaraze je značajno porasla i dostigla vrijednost do oko 60%, a prvi simptomi na tikvama su se javili kada su biljke bile u fenofazi pet do sedam pravih listova. Usjev lubenice na lokalitetu Gornji Tavankut, kao i usjev krastavca na lokalitetu Staro Selo bili su u potpunosti kolonizirani pamukovom vaši (slika 1), odnosno *Aphis fabae*-crna repina vaš, dok je i na više drugih lokaliteta uočena kolonizacija pojedinačnih biljaka lisnim vašima.



Slika 1. Kolonija *Aphis gossypii* na naličju lista *C. pepo* 'Olinka'

Tokom 2009. i 2010. godine, osim procjene nivoa zaraženosti usjeva vizuelno, u cilju što preciznije predikcije učestalosti virusnih infekcija, u osam lokaliteta primijenjena je metoda višestrukog transfera. Tom prilikom sakupljeni uzorci od lišća sa 100 biljaka grupisani su u 25 zbirnih grupa u kojima je testirano prisustvo virusa i na osnovu formule **Gibbs and Gower** (1960) utvrđena učestalost oboljenja. Rezultati procjene učestalosti oboljenja ovom metodom u toku 2009. godine prikazani su u tabeli 13, a 2010. godine u tabeli 14. Procijenjeni nivoi infekcije na osnovu metode višestrukog transfera tokom 2009. godine kretali su se od 9,2% do 55,3%, dok je u tri lokaliteta bilo pozitivno svih 25 testiranih zbirnih grupa i u tom slučaju ne može da se procijeni tačan nivo zaraze, već se tada procijenjeni nivo zaraze nalazi u intervalu od 55,3 do 100%. Tokom 2010. godine procijenjeni nivo zaraze kretao se od 3,2 do 41,1%.

Tabela 13. Učestalost infekcije (%) dobijena metodom višestrukog transfera tokom 2009. godine

Lokalitet	Usjev	Br. zbirnih grupa	Virus				Ukupno
			ZYMV	WMV	CMV	ZYMV+WMV	
Budisava	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	24 (55,3) ^a	0	0	1 (1)	25 (55,3-100)
Čenej	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	24 (55,3)	0	0	1 (1)	25 (55,3-100)
Srbobran	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	1 (1)	1 (1)	0	22 (41,1)	24 (55,3)
Zmajevo	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	25 (55,3-100)	0	0	0	25 (55,3-100)
Kisač	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	8 (9,2)	0	0	0	8 (9,2)

^aBroj zaraženih zbirnih grupa. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu formule **Gibbs and Gower** (1960).

Tabela 14. Učestalost infekcije (%) dobijena metodom višestrukog transfera tokom 2010. godine

Lokalitet	Usjev	Br. zbirnih grupa	Virus						Ukupno	
			ZYMV	WMV	CMV	ZYMV+WMV	ZYMV+CMV	WMV+CMV		
Hetin	<i>C. pepo</i> 'Genovese'	25	3 (3,2) ^a	0	0	0	0	0	0	3 (3,2)
	<i>C. pepo</i> 'Wrinkle Bat'	25	3 (3,2)	0	2 (2,1)	0	1 (1)	0	0	6 (6,6)
Bačka Topola	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	25	5 (5,4)	0	4 (4,3)	0	1 (1)	0	0	10 (12)
Horgoš	<i>C. pepo</i> 'Horgoš'	25	0	10 (12)	5 (5,4)	1 (1)	0	5 (5,4)	1 (1)	22 (41,1)

^aBroj zaraženih zbirnih grupa. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu formule **Gibbs and Gower** (1960).

Pregledom usjeva tikava tokom pet godina uočeni su simptomi na svim nadzemnim djelovima biljke. Simptomi su bili veoma raznovrsni i zavisili su od biljke domaćina, vremena ostvarene infekcije i uslova spoljne sredine. Najbrojniji i najraznovrsniji simptomi uočeni su na listovima tikava, a česta je bila pojava više različitih tipova simptoma na istom biljnom organu. Najučestaliji simptomi na listovima bili su različiti vidovi mozaika od blagog, preko žutog (Slika 2) do izraženog, koji je često bio praćen naboranošću lišća (Slika 3), a javljala su se i različita mozaična prošaravanja (Slika 4) koja su podsjećala na simptome prouzrokovane nekim od virusa roda *Tospovirus*. Od ostalih hromatskih promjena najčešće je bilo uočeno zadržavanje zelene boje oko nerava (Slika 5). Pored hromatskih promjena na listu uočene su i morfološke promjene, od kojih je najčešća bila pojava manje ili više izražene klobučavosti često praćena nazubljenošću oboda lista (Slika 6). Takođe, česta je bila i pojava smanjenja lisne površine u vidu duboke nazubljenosti (urezanosti) (Slika 6), a nerijetko je redukcija lisne površine išla do nitavosti (Slika 8). Uočeni simptomi na plodovima umnogome su zavisili od vremena infekcije, pa su u slučaju veoma ranih infekcija biljke bile zakržljale, bez zametnutih plodova ili sa intenzivnim simptomima na plodu u vidu blagih (Slika 9) do izraženih deformacija (Slika 10), kvrgavosti ili nekroze tek formiranih plodova. Kod starijih plodova uočene su pojave bradavičastih izraštaja na površini ploda (Slika 11) ili izraženih deformacija normalnog oblika ploda (Slika 12). Pored promjena oblika na plodovima različitih vrsta tikava uočene su i promjene u obojenosti u vidu mozaika ili šarenila ploda (Slika 13). Simptomi virusnih infekcija uočeni su i na stablu tikava, pa je tako na vriježama najčešće bilo uočeno mozaično prošaravanje vriježa (Slika 10).



Slika 2. CABYV: Žuti mozaik na listu



Slika 3. ZYMV, WMV i CMV: Izraženi mozaik i naboranost lišća



Slika 4. ZYMV i TSWV: Mozaično šarenilo lista



Slika 5. ZYMV: Zadržavanje zelene boje oko nerava



Slika 6. WMV i CMV: Mozaik, blaga klobučavost i nazubljenost oboda lista



Slika 7. ZYMV: Mozaik, nazubljenost i smanjena površina lista



Slika 8. ZYMV: Izražena nitavost



Slika 9. WMV i CMV: Kvrjavost mladog ploda



Slika 10. ZYMV i CMV: Izražena kvrgavost i deformacije mladog ploda i šarenilo vriježe



Slika 11. ZYMV: Bradavičasti izraštaji na plodu



Slika 12. WMV: Deformacije ploda cukinija



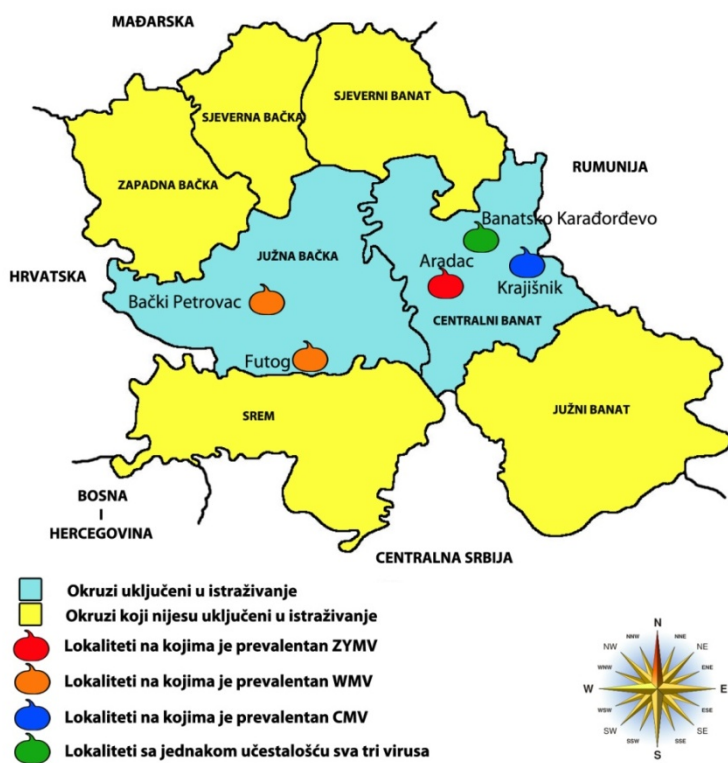
Slika 13. ZYMV, WMV i CMV: Šarenilo ploda

5.2. Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima tikava primjenom DAS-ELISA

U uzorcima sakupljenim u periodu od 2007. do 2011. godine ustanovljeno je prisustvo tri virusa: WMV, ZYMV i CMV. Tokom perioda ispitivanja od pet godina i pregledanih 129 usjeva gajenja iz familije Cucurbitaceae u Srbiji, ukupno je sakupljeno i testirano 1100 uzoraka lišća i plodova tikava i ni u jednom nije detektovano prisustvo PRSV, TRSV ili SqMV. Dobijeni rezultati nijesu zavisili od toga da li je testiran list ili plod tikve.

Pregledom usjeva tikava tokom 2007. godine na šest lokaliteta gajenja tikava u Vojvodini i analizom ukupno 69 uzoraka, ustanovljeno je prisustvo ZYMV, WMV i CMV (Slika 14, Tabela 15, Grafikoni 1a i 1b). Najveći broj testiranih uzoraka bio je zaražen sa WMV (94,2%). Drugi po zastupljenosti bio je CMV (55,1%), a treći ZYMV

(52,2%). Osim pojedinačnih zaraza, u kojima je najčešće detektovan WMV (24,6%), a CMV i ZYMV samo u po jednom testiranom uzorku (po 1,5%), virusi su dokazani i u miješanim infekcijama sa dva, odnosno tri virusa. U najvećem broju uzoraka dokazana je miješana infekcija sa sva tri virusa (29%), mada je ukupna dvostruka infekcija bila znatno viša (43,4%). Od dvostrukih infekcija najbrojnije su bile one sa WMV i CMV (21,7%), zatim WMV i ZYMV (18,8%), dok su treće po zastupljenosti bile infekcije CMV i ZYMV dokazane u 2,9% testiranih uzoraka. Sva tri detektovana virusa bila su prisutna na svih pet ispitivanih lokaliteta. Međutim, ako se razmatra rasprostranjenost po usjevima, samo je WMV dokazan u svih 11 ispitivanih usjeva, dok ZYMV nije dokazan u tri usjeva *L. siceraria* na lokalitetima Bački Petrovac i Futog i jednom usjevu *C. foetidissima* u Bačkom Petrovcu, a CMV nije bio prisutan u jednom usjevu *L. siceraria* na lokalitetu Bački Petrovac. Svi detektovani virusi su se javili u svim ispitivanim vrstama i genotipovima, osim ZYMV koji nije detektovan u uzorcima *C. foetidissima* i *L. siceraria*.



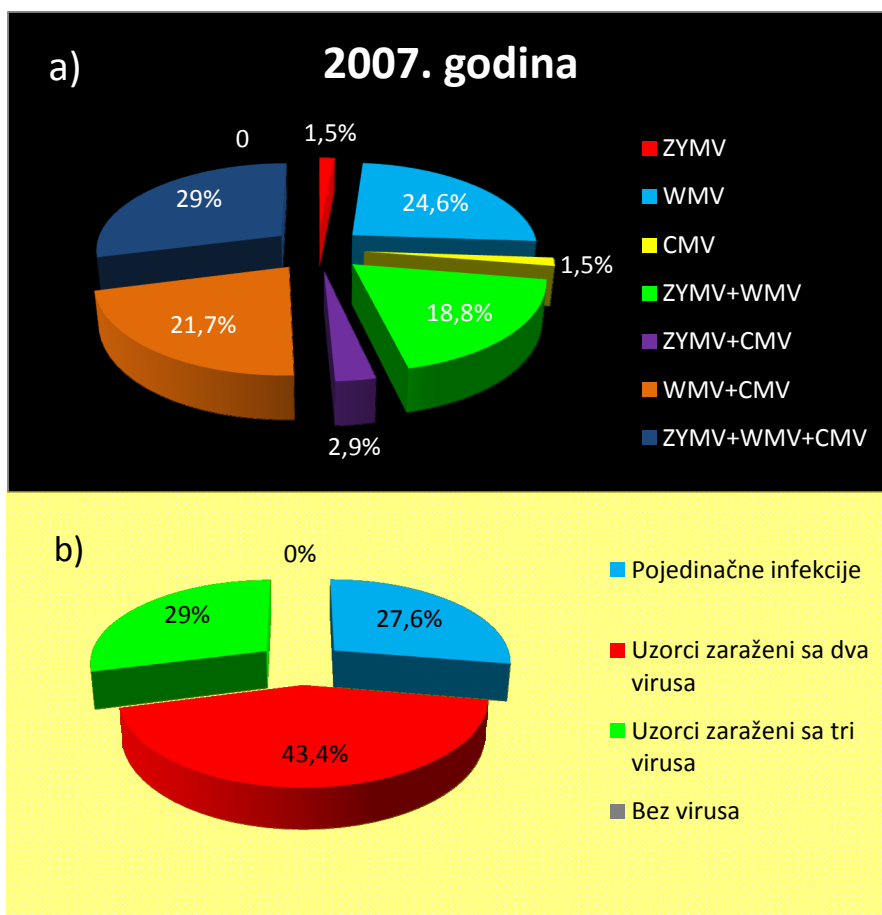
Slika 14. Pregledani lokaliteti tikava u Srbiji tokom 2007. godine

Tabela 15. Prisustvo i rasprostranjenost *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) u usjevima tikava u Srbiji tokom 2007. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. ujeva	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije				% negativnih uzoraka ^a
				ZYMV	WMV	CMV	ZYMV +WMV	ZYMV +CMV	WMV +CMV	ZYMV +WMV +CMV	
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	2	30	0	12 (40) ^b	0	3 (10)	0	10 (33,3)	5 (16,7)	0
	Banatsko										
	Karadorđevo	1	1	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0
	Aradac	1	2	1 (50)	0	0	0	0	0	1 (50)	0
<i>C. maxima</i>	Krajišnik	1	9	0	0	0	0	2 (22,2)	1 (11,1)	6 (66,7)	0
	Bački Petrovac	1	11	0	1 (9,1)	0	6 (54,5)	0	0	4 (36,4)	0
	Futog	1	2	0	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)	0
<i>C. moschata</i>	Bački Petrovac	1	5	0	0	0	3 (60)	0	0	2 (40)	0
<i>C. foetidissima</i>	Bački Petrovac	1	2	0	1 (50)	1 (50)	0	0	0	0	0
<i>L. siceraria</i>	Bački Petrovac	2	6	0	2 (33,3)	0	0	0	4 (66,7)	0	0
	Futog	1	1	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0
Ukupno		11	69	1 (1,5)	17 (24,6)	1 (1,5)	13 (18,8)	2 (2,9)	15 (21,7)	20 (29)	0

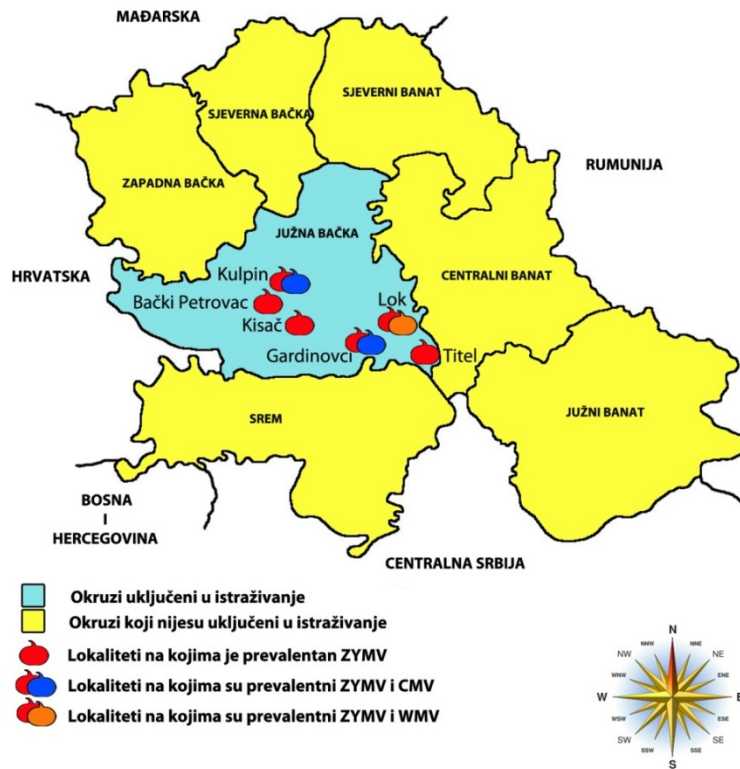
^aUzorci testirani na prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash mosaic virus* i *Tobacco ringspot virus*.

^bBroj zaraženih uzoraka. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.

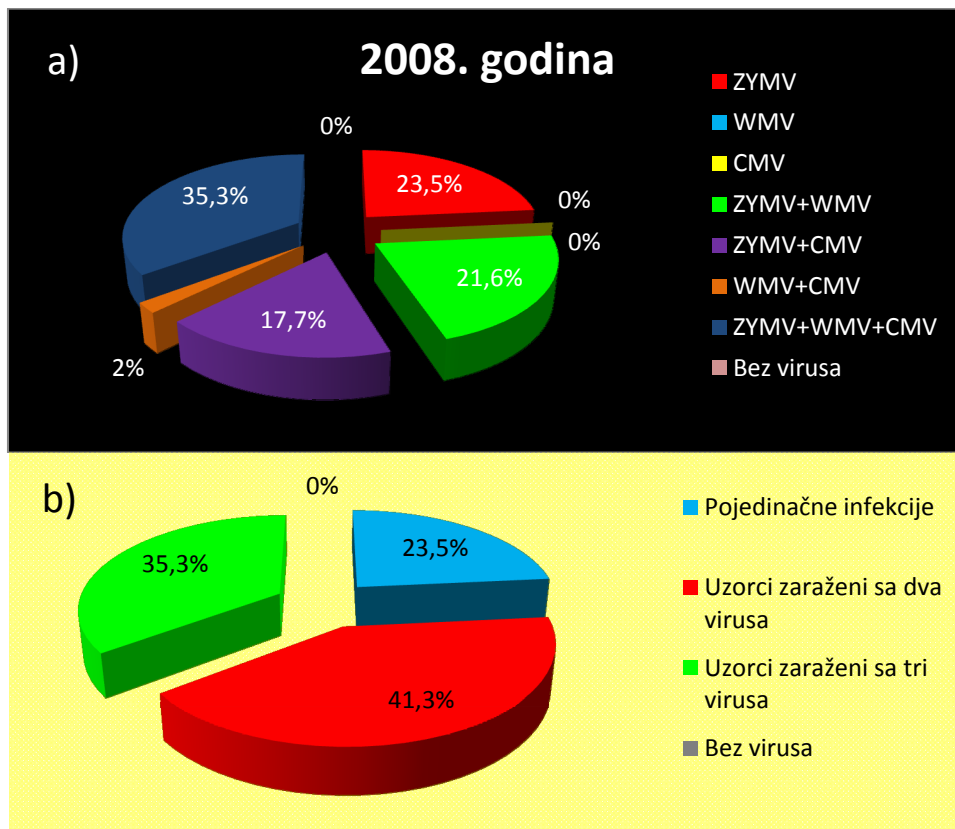


Grafikon 1. Zastupljenost virusa tikava u 2007. godini. a) Zastupljenost ZYMV, WMV i CMV u pojedinačnim i miješanim infekcijama. b) Udio pojedinačnih i miješanih infekcija u ukupnoj zaraženosti testiranih uzoraka.

Najzastupljeniji virus 2008. godine, koji je detektovan u 98% uzoraka bio je ZYMV, drugi po zastupljenosti bio je WMV (58,8%), dok je na trećem mjestu bio CMV koji je otkriven u 54,9% uzoraka. Pojedinačna zaraza (23,5%) ustanovljena je samo sa ZYMV. Najčešće detektovana dvostruka zaraza je bila sa ZYMV i WMV (21,6%), praćena sa dvostrukom zarazom ZYMV i CMV (17,7%) i WMV i CMV (2%) (Grafikon 2). Zabilježena je i istovremena zaraza sa sva tri prisutna virusa, ZYMV, WMV i CMV, u 35,3% uzoraka. Najrasprostranjeniji virusi u toku ispitivanja sprovedenih 2008. godine bili su ZYMV i WMV koji su se javili na svim ispitivanim lokalitetima, dok prisustvo CMV nije detektovano samo na lokalitetu Lok (Slika 15). U svim testiranim vrstama i genotipovima tikava (*C. pepo* 'Olinka', *C. maxima* i *L. siceraria*) bila su prisutna sva tri detektovana virusa (Tabela 16).



Slika 15. Pregledani lokaliteti tikava u Srbiji tokom 2008. godine



Grafikon 2. Zastupljenost virusa tikava u 2008. godini. a) Zastupljenost ZYMV, WMV i CMV u pojedinačnim i miješanim infekcijama. b) Udio pojedinačnih i miješanih infekcija u ukupnoj zaraženosti testiranih uzoraka.

Tabela 16. Prisustvo i rasprostranjenost *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) u usjevima tikava u Srbiji tokom 2008. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. ujevsa	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije				% negativnih uzoraka ^a
				ZYMV	WMV	CMV	ZYMV +WMV	ZYMV +CMV	WMV +CMV	ZYMV +WMV +CMV	
<i>C. pepo</i>	Bački Petrovac	2	10	2 (20) ^b	0	0	1 (10)	3 (30)	0	4 (40)	0
'Olinka'	Gardinovci	1	10	0	0	0	0	3 (30)	0	7 (70)	0
	Lok	1	2	0	0	0	2 (100)	0	0	0	0
	Titel	2	8	5 (62,5)	0	0	2 (25)	1 (12,5)	0	0	0
	Kisač	4	13	5 (38,5)	0	0	6 (46,2)	1 (7,7)	0	1 (7,7)	0
	Kulpin	1	2	0	0	0	0	1 (50)	0	1 (50)	0
	<i>C. maxima</i>	Bački Petrovac	1	4	0	0	0	0	0	1 (25)	3 (75)
<i>L. siceraria</i>	Bački Petrovac	1	2	0	0	0	0	0	0	2 (100)	0
Ukupno		13	51	12 (23,5)	0	0	11 (21,6)	9 (17,7)	1 (2)	18 (35,3)	0

^aUzorci testirani na prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash mosaic virus* i *Tobacco ringspot virus*.

^bBroj zaraženih uzoraka. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.

U uzorcima sakupljenim 2009. godine najzastupljeniji ponovo je bio ZYMV čije je prisustvo dokazano u 80,5% testiranih uzoraka, dok su druga dva detektovana virusa bila prisutna u mnogo nižim procentima u odnosu na prethodne godine istraživanja, WMV u 22,9%, a CMV u 4,4%. Takođe, razlika u odnosu na prethodne dvije godine ispitivanja je što su 2009. godine bile zastupljenije pojedinačne infekcije (82,1% od ukupnih infekcija) u odnosu na miješane (17,9% od ukupnih infekcija), a trostruka infekcija nije ni dokazana (Grafikon 3). U pojedinačnim infekcijama najčešće je dokazan ZYMV (68,9%), a zatim WMV (11,9%), odnosno CMV (1,3%). Od infekcija sa dva virusa najzastupljenija je bila sa ZYMV i WMV koja je dokazana u 9,7% testiranih uzoraka. U 5% simptomatičnih uzoraka nije detektovano prisustvo ni jednog od šest testiranih virusa. ZYMV dokazan je u svim lokalitetima, osim na lokalitetu Ruma, dok WMV nije bio prisutan na tri lokaliteta Bački Petrovac, Zmajevu i Kisač. CMV, koji je detektovan u značajno manjem broju uzoraka u odnosu na 2007. i 2008. godinu, nije detektovan čak na šest lokaliteta (Čenej, Bački Petrovac, Srbobran, Kisač, Sirig i Zmajevu). Najzastupljeniji virus u toku 2009. godine ZYMV detektovan je u svim ispitivanim vrstama i sortama, dok prisustvo WMV nije dokazano u uzorcima *C. maxima* i *C. moschata*, a prisustvo CMV samo u uzorcima *C. moschata* (Slika 16, Tabela 17).



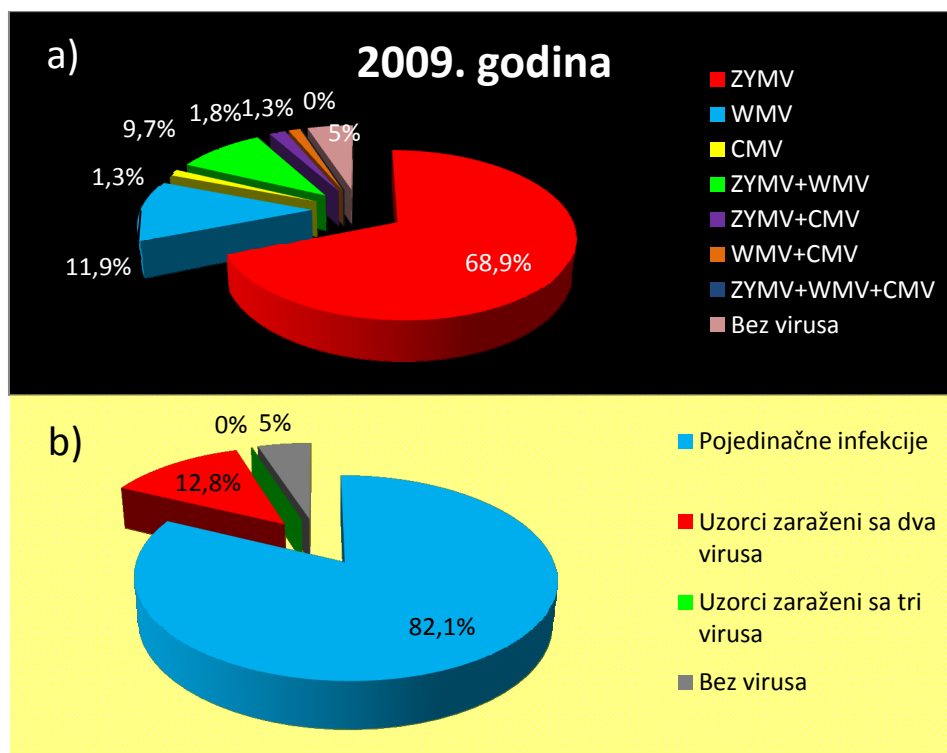
Slika 16. Pregledani lokaliteti tikava u Srbiji tokom 2009. godine

Tabela 17. Prisustvo i rasprostranjenost *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) u usjevima tikava u Srbiji tokom 2009. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. usjeva	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije				% negativnih uzoraka ^a
				ZYMV	WMV	CMV	ZYMV +WMV	ZYMV +CMV	WMV +CMV	ZYMV +WMV +CMV	
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	1	3	1 (33,3) ^b	0	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0	0	0
	Budisava	1	111	91 (82)	0	0	13 (11,7)	7 (6,3)	0	0	0
	Čenej	1	104	102 (98,1)	0	0	2 (1,9)	0	0	0	0
	Srbobran	1	107	1 (0,9)	58 (54,2)	0	37 (34,6)	0	0	0	11 (10,3)
	Zmajev	1	105	105 (100)	0	0	0	0	0	0	0
	Kisač	1	110	94 (85,5)	0	0	0	0	0	0	16 (14,5)
<i>C. pepo</i> 'Tosca'	Bački Petrovac	1	1	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0
	Ruma	3	16	0	7 (43,8)	2 (12,5)	0	0	7 (43,8)	0	0
<i>C. pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	1	5	1 (20)	1 (20)	0	1 (20)	0	0	0	2 (40)
<i>C. maxima</i>	Beška	1	25	7 (28)	5 (20)	5 (20)	5 (20)	2 (8)	1 (4)	0	0
	Bački Petrovac	1	7	5 (71,4)	0	0	0	1 (14,3)	0	0	1 (14,3)
<i>C. moschata</i>	Zmajev	1	3	3 (100)	0	0	0	0	0	0	0
	Bački Petrovac	1	2	2 (100)	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno		15	599	413 (68,9)	71 (11,9)	8 (1,3)	58 (9,7)	11 (1,8)	8 (1,3)	0	30 (5)

^aUzorci testirani na prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash mosaic virus* i *Tobacco ringspot virus*.

^bBroj zaraženih uzoraka. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.

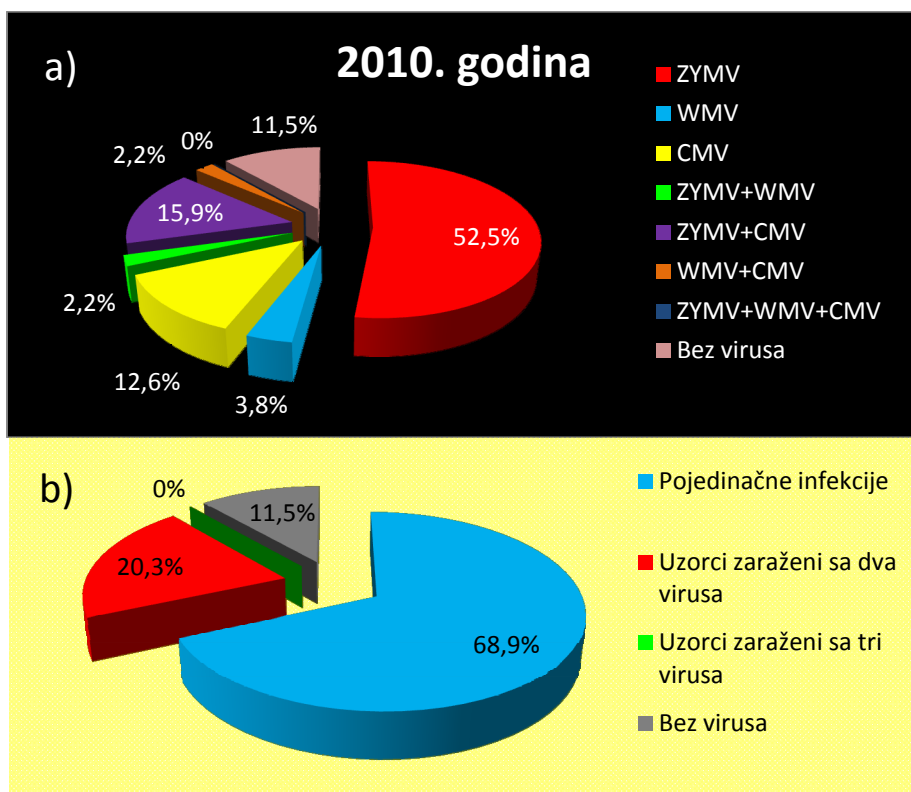


Grafikon 3. Zastupljenost virusa tikava u 2009. godini. a) Zastupljenost ZYMV, WMV i CMV u pojedinačnim i miješanim infekcijama. b) Udio pojedinačnih i miješanih infekcija u ukupnoj zaraženosti testiranih uzoraka.

Tokom 2010. godine u pregledanim usjevima različitih vrsta predstavnika familije Cucurbitaceae ponovo je najzastupljeniji bio ZYMV, kojim je bilo zaraženo 70,5% testiranih uzoraka, dok je drugi po zastupljenosti bio CMV (30,6%), a treći WMV (8,2%) čija se zastupljenost značajno smanjila u odnosu na prethodne godine. Kao i prethodne, tako ni ove godine nijesu detektovane miješane zaraze sa sva tri prisutna virusa, a pojedinačne infekcije (68,9%), naročito ona sa ZYMV (52,5%) su bile dominantne u odnosu na miješane (20,2%). Od miješanih infekcija najzastupljenija je bila ona sa ZYMV i CMV (15,9%), dok su miješane infekcije ZYMV i WMV, kao i WMV i CMV bile zastupljene u po 2,2% testiranih uzoraka. Procenat uzoraka u kojima nije dokazano prisustvo testiranih virusa bio je 11,5% (Grafikon 4). Najrasprostranjeniji virus u toku 2010. godine bio je ZYMV čije prisustvo je dokazano na svih 18 pregledanih lokaliteta, osim na lokalitetima Srbobran, Družetić i Porodin. CMV koji je bio drugi po zastupljenosti nije dokazan na četiri lokaliteta (Doroslovo, Čonoplja, Stanišić i Gakovo), dok prisustvo WMV nije dokazano u čak 11 lokaliteta (Kišač, Srbobran, Mol, Odžaci, Doroslovo, Brestovac, Staničić, Gakovo, Orom, Zmajevo i Družetić). Kod tri ispitivane sorte uljane tikve 'Olinka', 'Gleisdorfer Ölkürbis' i 'Horgoš' detektovana su sva tri virusa, dok prisustvo ni jednog od ispitivanih virusa nije detektovano u uzorcima *C. mixta* 'Striped Cushow' i *C. lanatus* (Slika 17, Tabela 18).



Slika 17. Pregledani lokaliteti tikava u Srbiji tokom 2010. godine



Grafikon 4. Zastupljenost virusa tikava u 2010. godini. a) Zastupljenost ZYMV, WMV i CMV u pojedinačnim i miješanim infekcijama. b) Udio pojedinačnih i miješanih infekcija u ukupnoj zaraženosti testiranih uzoraka.

Tabela 18. Prisustvo i rasprostranjenost *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) u usjevima tikava u Srbiji tokom 2010. godine

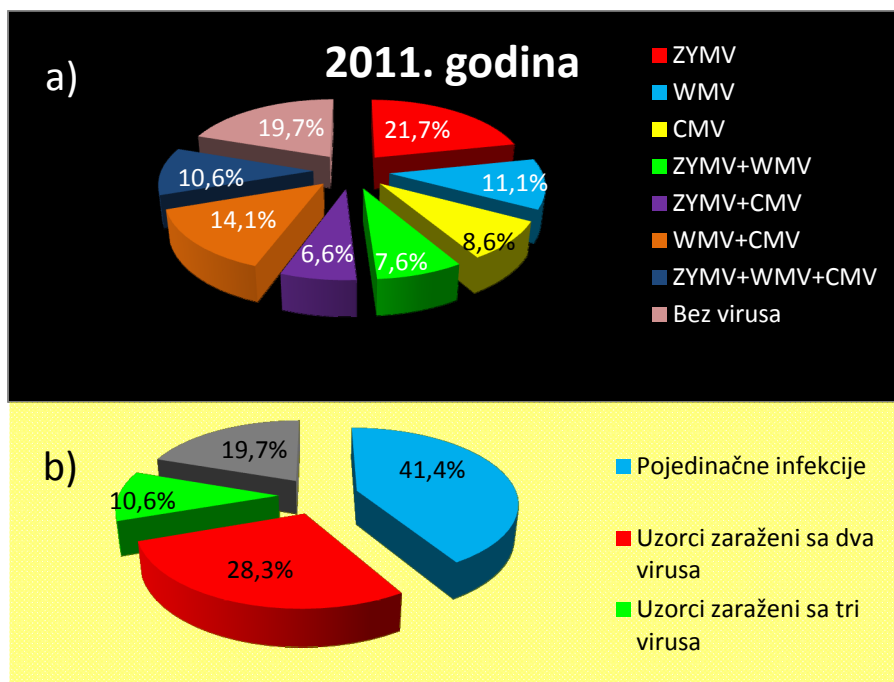
Vrsta	Lokalitet	Br. usjeva	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije			% negativnih uzoraka ^a
				ZYMV	WMV	CMV	ZYMV +WMV	ZYMV +CMV	WMV +CMV	
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	1	3	2 (66,7) ^b	0	0	0	1 (33,3)	0	0
	Kisač	3	16	11 (68,8)	0	3 (18,8)	0	2 (12,5)	0	0
	Čenej	1	8	2 (25)	0	0	2 (25)	4 (50)	0	0
	Zmajev	2	13	6 (46,2)	0	2 (15,4)	0	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)
	Srbobran	1	2	0	0	2 (100)	0	0	0	0
	Mol	1	5	3 (60)	0	0	0	2 (40)	0	0
	Odžaci	1	4	3 (75)	0	0	0	1 (25)	0	0
	Doroslovo	2	6	6 (100)	0	0	0	0	0	0
	Brestovac	1	4	3 (75)	0	0	0	1 (25)	0	0
<i>C. pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Bački Petrovac	1	2	1 (50)	0	1 (50)	0	0	0	0
	Kisač	2	8	5 (62,5)	0	1 (12,5)	0	2 (25)	0	0
	Čonoplja	1	5	4 (80)	1 (20)	0	0	0	0	0
	Stanišić	1	6	6 (100)	0	0	0	0	0	0
	Gakovo	1	10	10 (100)	0	0	0	0	0	0
<i>C. pepo</i> 'Horgoš'	Bački Petrovac	1	1	1 (100)	0	0	0	0	0	0
	Bačka Topola	1	3	2 (66,7)	0	0	0	1 (33,3)	0	0
	Orom	2	12	4 (33,3)	0	3 (25)	0	2 (16,7)	0	3 (25)
	Horgoš	2	13	1 (7,7)	2 (15,4)	4 (30,8)	1 (7,7)	1 (7,7)	2 (15,4)	2 (15,4)
	Bački	1	3	0	0	0	0	3 (100)	0	0
<i>C. pepo</i> 'Wies 371'	Bački	1	3	0	0	0	0	3 (100)	0	0

	Petrovac									
<i>C. pepo</i> 'Genovese'	Hetin	2	17	2 (11,8)	0	3 (17,6)	0	4 (23,5)	0	8 (47,1)
<i>C. pepo</i> 'Long of Nepal'	Hetin	1	3	1 (33,3)	0	0	0	0	0	2 (66,7)
<i>C. pepo</i> 'Wrinkle bat'	Hetin	1	12	11 (91,7)	1 (8,3)	0	0	0	0	0
<i>C. pepo</i> selekcioni materijal	Bački Petrovac	4	6	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	0	0
<i>C. mixta</i> 'Striped Cushow'	Bački Petrovac	1	1	0	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>C. maxima</i> selekcioni materijal	Bački Petrovac	2	5	3 (60)	1 (20)	0	0	0	0	1 (20)
<i>C. maxima</i> 'Big Max'	Zmajev	1	5	4 (80)	0	0	0	1 (20)	0	0
<i>C. maxima</i>	Zmajev	1	2	1 (50)	0	1 (50)	0	0	0	0
	Kisač	1	2	2 (100)	0	0	0	0	0	0
<i>L. siceraria</i> selekcioni materijal	Bački Petrovac	2	2	1 (50)	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>C. sativus</i>	Porodin	1	1	0	1 (100)	0	0	0	0	0
	Družetić	1	1	0	0	1 (100)	0	0	0	0
<i>C. pepo</i>	Porodin	1	2	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)	0
<i>C. lanatus</i>	Porodin	1	1	0	0	0	0	0	0	1 (100)
Ukupno		46	183	96 (52,5)	7 (3,8)	23 (12,6)	4 (2,2)	29 (15,9)	4 (2,2)	21 (11,5)

^aUzorci testirani na prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash mosaic virus* i *Tobacco ringspot virus*.

^bBroj zaraženih uzoraka. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.

Rezultati praćenja prisustva i rasprostranjenosti virusa u usjevima različitih vrsta familije tikava u 2011. godini pokazali su da je prevalentan bio ZYMV koji je dokazan u 46,5% testiranih uzoraka, dok su druga dva virusa takođe dokazana u značajnom broju uzoraka, pa je tako WMV detektovan u 43,4%, a CMV u 39,9% testiranih uzoraka. Pojedinačne infekcije (41,4%) su i ove godine bile zastupljenije od miješanih (38,9%). Od pojedinačnih infekcija ponovo su bile najzastupljenije one sa ZYMV (21,7%). Za razliku od prethodne dvije godine, u toku 2011. ponovo su se javile miješane infekcija sa sva tri detektovana virusa u 10,6% testiranih uzoraka, mada je najzastupljenija miješana infekcija bila ona sa WMV i CMV (14,1%), kao i 2010. godine (Grafikon 5). Po rasprostranjenosti ova godina se značajno razlikuje u odnosu na prethodne, jer je najrasprostranjeniji virus bio CMV koji nije dokazan samo na pet lokaliteta (Kisač, Cerje, Sirig, Maladenovac i Stajkovce) od testiranih 25. Sljedeći po rasprostranjenosti bio je WMV koji nije detektovan na sedam lokaliteta (Kisač, Cerje, Gornji Tavankut, Kraljevica, Donji Tavankut, Debre i Stajkovce). Posljednji po rasprostranjenosti ZYMV detektovan je na deset lokaliteta (Belegiš, Irmovo, Kisač, Silbaš, Kupusina, Dikanovac, Veliko Selo, Bački Petrovac, Gornji Tavankut i Donji Tavankut) (Slika 18). Kod vrste *C. moschata* nije dokazano prisustvo ni jednog od testiranih virusa, dok kod *C. pepo* 'Cue Ball' i *L. siceraria* nije dokazano prisustvo ZYMV (Tabela 19).



Grafikon 5. Zastupljenost virusa tikava u 2011. godini. a) Zastupljenost ZYMV, WMV i CMV u pojedinačnim i miješanim infekcijama. b) Udio pojedinačnih i miješanih infekcija u ukupnoj zaraženosti testiranih uzoraka.



Slika 18. Pregledani lokaliteti tikava u Srbiji tokom 2011. godine

Tabela 19. Prisustvo i rasprostranjenost *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) i *Cucumber mosaic virus* (CMV) u usjevima tikava u Srbiji tokom 2011. godine

Vrsta	Lokalitet	Br. usjeva	Br. uzoraka	Pojedinačne infekcije			Miješane infekcije				% negativnih uzoraka ^a	
				ZYMV	WMV	CMV	ZYMV +WMV	ZYMV +CMV	WMV +CMV	ZYMV +WMV +CMV		
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	Belegiš	1	27	12 (44,4) ^b	1 (3,7)	0	6 (22,2)	3 (11,1)	0	0	5 (18,5)	
	Irmovo	1	41	18 (43,9)	0	1 (2,4)	4 (9,8)	6 (14,6)	0	6 (14,6)	6 (14,6)	
	Kisač	1	4	4 (100)	0	0	0	0	0	0	0	
	Silbaš	1	10	9 (90)	0	0	0	1 (10)	0	0	0	
<i>C. pepo</i>	Staro Selo	1	8	0	1 (12,5)	2 (25)	0	0	0	0	5 (62,5)	
	Mačkovac	2	5	0	1 (20)	3 (60)	0	0	0	0	1 (20)	
	Cerje	1	3	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	
	Sirig	1	2	0	1(50)	0	0	0	0	0	1(50)	
	Kupusina	2	4	0	1 (25)	1 (25)	0	0	0	2 (50)	0	
	Dikanovac	1	1	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0	
	Ratari	1	1	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	
	Cekavica	1	1	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0	
	Veliko Selo	2	25	0	5 (20)	0	5 (20)	0	9 (36)	6 (24)	0	
	Bački Petrovac	1	3	0	0	0	0	0	0	3 (100)	0	
	Porodin	1	6	0	1 (16,7)	0	0	0	5 (83,3)	0	0	
	<i>C. pepo</i> 'Cue Ball'	Slanci	1	3	0	0	0	0	0	3 (100)	0	0
		Surčin	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>C. lanatus</i>	Mačkovac	1	3	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	
	Surčin	1	6	0	4 (66,7)	0	0	0	0	0	2 (33,3)	
	Silbaš	1	2	0	0	1 (50)	0	0	0	0	1 (50)	
	Gornji Tavankut	1	2	0	0	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)	
	Tavankut											

<i>C. melo</i>	Togočevce	1	2	0	1 (50)	0	0	0	0	0	1 (50)
	Porodin	1	1	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0
	Surčin	1	4	0	0	2 (50)	0	0	0	0	2 (50)
	Mačkovac	1	1	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0
	Silbaš	1	7	0	0	1 (14,3)	0	1 (14,3)	1 (14,3)	3 (42,9)	1 (14,3)
	Kupusina	1	2	0	0	0	0	0	2 (100)	0	0
	Kraljevci	1	1	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0
<i>C. sativus</i>	Togočevce	1	3	0	0	1 (33,3)	0	0	1 (33,3)	0	1 (33,3)
	Mladenovac	1	2	0	1 (50)	0	0	0	0	0	1 (50)
	Staro Selo	1	2	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)	0	0
	Mačkovac	3	7	0	2 (28,6)	0	0	0	2 (28,6)	0	3 (42,9)
	Kupusina	2	2	0	0	0	0	0	2 (100)	0	0
	Donji	1	1	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0
	Tavankut										
<i>L. siceraria</i>	Debrč	1	1	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0
	Togočevce	1	1	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0
	Stajkovce	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)
	Porodin	1	2	0	1 (50)	0	0	0	1 (50)	0	0
Ukupno	44	198	43 (21,7)	22 (11,1)	17 (8,6)	15 (7,6)	13 (6,6)	28 (14,1)	21 (10,6)	39 (19,7)	

^aUzorci testirani na prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash mosaic virus* i *Tobacco ringspot virus*.

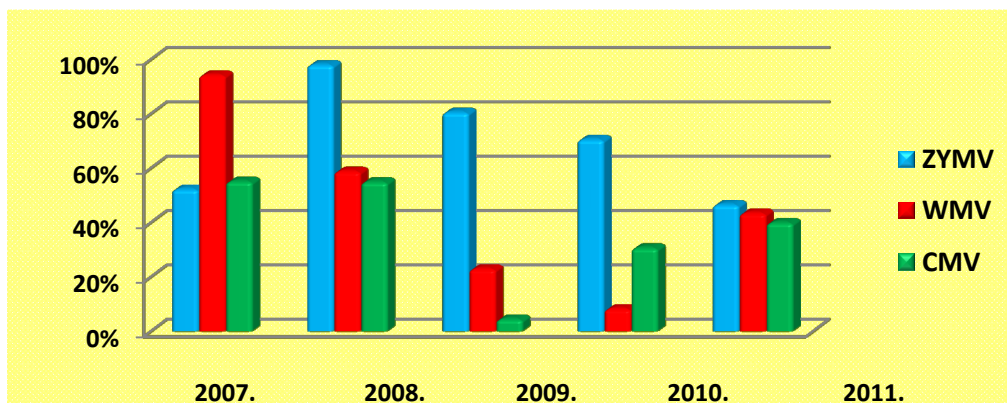
^bBroj zaraženih uzoraka. U zagradama je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.

Ispitivanje prisustva i rasprostranjenosti virusa tikava u Srbiji sprovedeno na 61 lokalitetu gajenja i u 129 usjeva tokom koga je ukupno prikupljeno 1100 uzorka, pokazalo je da su u Srbiji na tikvama stalno prisutna tri virusa ZYMV, WMV i CMV, dok ni u jednom od testiranih uzoraka nije utvrđeno prisustvo PRSV, SqMV, kao ni TRSV virusa koji se nalazi na karantinskoj listi IA dio I štetnih organizama Republike Srbije (**Službeni Glasnik RS**, 7/10). Tokom ispitivanja pokazalo se da je najzastupljeniji virus u tikavama u Srbiji ZYMV (Grafikon 6), kao i da je tokom pojedinih godina istraživanja dolazilo do značajnih izmjena u prisustvu i rasprostranjenosti pojedinih virusa. Tako su prve dvije godine ispitivanja bile sa veoma visokim procentima infekcije svih detektovanih virusa, sa razlikom u tome što je 2007. godine prevalentan bio WMV, a 2008. godine ZYMV. Zajedničko za obje godine istraživanje je da su miješane infekcije bile mnogo više zastupljene u odnosu na pojedinačne. U toku sljedeće dvije godine ispitivanja, prevalentan je bio ZYMV sa veoma visokom zastupljenošću, dok su druga dva detektovana virusa bila zastupljena u nešto manjem, ali ipak značajnom procentu uzoraka. Poslednje godine ispitivanja najzastupljeniji je bio ZYMV, s tim što je udio WMV i CMV u ukupnim infekcijama takođe bio značajan i veoma blizak udjelu najzastupljenijeg virusa. Značajna razlika u odnosu na istraživanja iz 2007. i 2008. godine je i ta što su pojedinačne infekcije bile zastupljenije u odnosu na miješane u periodu od 2009-2011. godine. Ukupno u toku pet godina istraživanja od 2007-2011. godine, ZYMV je dokazan u 71,7% uzoraka, WMV u 30,3%, a CMV u 20,7% (Tabela 20).

Tabela 20. Prisustvo i ukupna zastupljenost virusa tikava po godinama u periodu od 2007-2010. godine

Godina	Br. uzoraka	Virus		
		ZYMV	WMV	CMV
2007.	69	36 (52,2) ^a	65 (94,2)	38 (55,1)
2008.	51	50 (98)	30 (58,8)	28 (54,9)
2009.	599	482 (80,5)	137 (22,9)	27 (4,4)
2010.	183	129 (70,5)	15 (8,2)	56 (30,6)
2011.	198	92 (46,5)	86 (43,4)	79 (39,9)
Ukupno	1100	789 (71,7)	333 (30,3)	228 (20,7)

^aBroj zaraženih uzoraka. U zagradi je procenat infekcije preračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.



Grafikon 6. Ukupna zastupljenost virusa tikava po godinama ispitivanja od 2007. do 2011. godine

Tokom svih pet godina ispitivanja prisustva virusa tikava u usjevima različitih vrsta tikava u Srbiji, moglo se zapaziti da su se često, čak i u istom usjevu javljale biljke sa istim tipom simptoma, a da su u njima dokazani različiti virusi ili njihove kombinacije, kao što je bio slučaj sa simptomom nitavosti (Slike 19-24) ili simptomima izraženog mozaika i klobučavosti (Slike 25 i 26). Takođe, često je jedan isti virus bio detektovan u biljkama koje su pokazivale potpuno različite simptome, pa je tako ZYMV detektovan u biljkama sa simptomima kao što su: nitavost, mozaik i klobučavost, „ozelenjavanje“ nerava, hloroza liske sa zelenim nervima i blagi mozaik (Slike 19,25 i 27-29).



Slika 19. ZYMV: Nitavost



Slika 20. WMV: Nitavost



Slika 21. CMV: Nitavost



Slika 22. ZYMV i CMV: Nitavost



Slika 23. CMV i WMV: Nitavost



Slika 24. ZYMV, WMV i CMV: Nitavost



Slika 25. ZYMV: Izražen mozaik i klobučavost



Slika 26. WMV: Izražen mozaik i klobučavost



Slika 27. ZYMV: Izražena klobučavost



Slika 29. ZYMV: „Ozelenjavanje“ nerava



Slika 29. ZYMV: Blagi mozaik

5.3.1. Reakcije test biljaka prema ispitivanim izolatima ZYMV

Izolati ZYMV dobijeni su mehaničkim inokulacijama biljaka *Cucurbita pepo* 'Ezra F1' uzorcima tikava za koje je primjenom seroloških analiza utvrđeno da su zaraženi ovim virusom. Na inokuliranim biljkama zabilježena je pojava mozaika, hlorotičnih pjega, deformacije listova, povećanja sinusa liski, čime je, osim što su dobijeni izolati ZYMV za dalja ispitivanja i potvrđena virusna priroda oboljenja.

Detaljna biološka karakterizacija četiri izolata ZYMV, 128-08, 140-08, 146-08 i 147-08, obavljena je mehaničkim inokulacijama 45 test biljaka. Sve test biljke uniformno su reagovala na inokulacije ispitivanim izolatima u svim ponavljanjima. Za svaki ispitivani izolat inokulisano je po pet od svih 45 ispitivanih vrsta test biljaka, na kojima su se pojavili različiti simptomi, posle različitog perioda inkubacije (Tabela 21). Izolati odabrani za biološku karakterizaciju razlikovali su se prema ispoljenim simptomima u polju, koje su izazvali na izvornim biljkama uljane tikve, sorte 'Olinka' i prema simptomima na biljkama *C. pepo* 'Ezra F1' koja je poslužila za izdvajanje izolata

iz uzoraka iz polja. Sva četiri izolata prouzrokovali su pojavu hlorotičnog prošaravanja bez izraženih deformacija liske ili izražene kržljivosti biljaka. Ipak, izolati 128-08, 140-08 i 147-08 izazvali su izraženu hlorozu, koja nije bila uočljiva na lišću biljke iz koje je dobijen izolat 146-08. Osim toga, izolat 128-08 izazvao je žutilo, a ostali zadržavanje zelene boje oko nerava. Naboranost liske oko ili između nerava izazvali su samo izolati 128-08 i 147-08. Na *C. pepo* 'Ezra F1' konstatovna je pojava mozaika devet dana po inokulaciji za sva četiri ispitivana izolata (Slika 30). Pored mozaika, izolati 146-08 i 147-08 izazvali su i pojavu hloroze nerava, odnosno hlorotično prošaravanje. Isti izolati su mjesec dana po inokulaciji izazvali i zadržavanja zelene boje oko nerava, a izolat 147-08 i sužavanja listova.

Biljke *C. pepo* 'Olivija' nakon inokulacije ispitivanim izolatima reagovale su pojavom simptoma mozaika posle osam dana. Izolat 146-08 je osim mozaika izazvao 15. dana po inokulaciji i pojavu klobučavosti i zadržavanja zelene boje oko nerava (Slika 31).

Nakon inokulacija biljaka *C. pepo* 'Olinka' ispitivani izolati 128-08 i 140-08 izazvali su pojavu mozaika i prosvjetljavanja nerava osam dana po inokulaciji, dok su izolati 146-08 i 147-08 izazvali mozaik i zadržavanje zelene boje oko nerava (Slika 32). Osim ovih simptoma, izolati 128-08 i 140-08 su 15 dana po inokulaciji izazvali i pojavu klobučavosti.

Sorta uljane tikve 'Slovenačka golica' reagovala je pojavom simptoma mozaika osam dana nakon inokulacije svim ispitivanim izolatima (Slika 33).

Biljke *C. pepo* 'Beogradska' zaražene izolatom 128-08 desetog dana po inokulaciji reagovale su prosvjetljavanjem nerava i zadržavanjem zelene boje oko nerava, a 14.-tog dana zabilježena je i pojava mozaika (Slika 34). Nakon inokulacije izolatom 140-08 desetog dana su se javili simptomi mozaika i zadržavanja zelene boje oko nerava. Po zaražavanju izolatima, 146-08 i 147-08, na istoj test biljci konstatovan je mozaik i prosvjetljavanje nerava desetog dana.

Na biljkama *C. pepo* 'Zucchini' deset dana po inokulaciji izolatom 128-08 primijećeno je prosvjetljavanje nerava (Slika 35), dok je izolat 140-08 izazvao pojavu mozaika, izolat 146-08 prosvjetljavanje nerava i mozaik, a izolat 147-08 blagi mozaik. Simptomi izraženog mozaika, deformacije listova i povećavanja sinusa uočeni su 21 dan po inokulaciji izolatom 147-08.

Biljke *C. maxima* su na inokulacije ispitivanim izolatima reagovale pojavom mozaika i zadržavanja zelene boje oko nerava 13 dana po inokulaciji (Slika 36). Jedino je izolat 140-08 izazvao pojavu blagog mozaika i prosvjetljavanja nerava.



Slika 30. ZYMV-147-08: Mozaik na *C. pepo* 'Ezra F1'



Slika 31. ZYMV-146-08: Klobučavost i zadržavanje zelene boje oko nerava na *C. pepo* 'Olivija'



Slika 32. ZYMV-147-08: Zadržavanje zelene boje oko nerava na *C. pepo* 'Olinka'



Slika 34. ZYMV-128-08: Mozaik na *C. pepo* 'Beogradska'



Slika 33. ZYMV-128-08: Mozaik na *C. pepo* 'Slovenačka golica'



Slika 35. ZYMV-128-08: Prosvjetljavanje nerava na *C. pepo* 'Zucchini'



Slika 36. ZYMV-146-08: Mozaik na *C. maxima*



Slika 37. ZYMV-128-08: Klobučavost na *C. mixta*

Posle zaražavanja biljaka *C. mixta* izolatom 140-08 nakon osam dana javio se mozaik. Isti simptom se javio i nakon inokulacije ostalim izolatima, ali nešto kasnije, nakon 13 dana. Osim simptoma mozaika, izolat 128-08 izazvao je i pojavu klobučavosti (Slika 37), a izolat 146-08 prosvjetljavanje nerava, takođe, nakon 13 dana.

C. moschata 'Beja' reagovala je pojavom simptoma mozaika i prosvjetljavanja nerava 20 dana po inokulaciji samo izolatom 147-08 (Slika 38). Ostali ispitivani izolati, 128-08, 140-08 i 146-08, nijesu izazvali pojavu simptoma na ispitivanoj test biljci.

Na biljkama *C. moschata* 'Lola' inokulisanim izolatima 140-08, 146-08 i 147-08 primijećen je mozaik 12 dana po inokulaciji (Slika 39). Posle inokulacije izolatom 128-08, biljke *C. moschata* 'Lola' reagovala su pored mozaika i deformacijama listova.

Biljke *Cucumis sativus* 'Dugi zeleni' su 12 dana po inokulaciji reagovala prosvjetljavanjem nerava i pojavom mozaika (Slika 40). Opisani simptomi su se javili kod svih ispitivanih izolata, osim kod izolata 128-08.

Na biljkama *C. sativus* 'Sunčani potok', 12 dana po inokulaciji izolatima 140-08, 146-08 i 147-08 došlo je do pojave mozaika (Slika 41). Izolat 147-08 je izazvao i prosvjetljavanja nerava, dok izolat 128-08 nije izazvao pojavu simptoma.



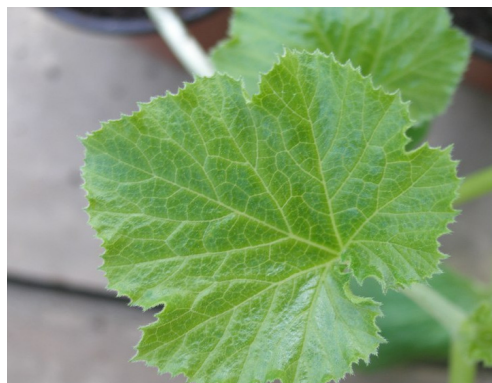
Slika 38. ZYMV-147-08: Mozaik na *C. moschata* 'Beja'



Slika 39. ZYMV-140-08: Mozaik na *C. moschata* 'Lola'



Slika 40. ZYMV-147-08: Mozaik na *C. sativus* 'Dugi zeleni'



Slika 41. ZYMV-147-08: Mozaik na *C. sativus* 'Sunčani potok'

Kod biljaka *C. sativus* 'Regal' konstatovana je pojava mozaika deset dana po inokulaciji izolatima 147-08 (Slika 42) i 146-08. Po inokulaciji izolatom 128-08, kao i izolatom 140-08 nijesu zabilježeni simptomi.

Simptome u vidu nekrotičnih prošaravanja na biljci *C. anguria* izazvao je samo izolat 140-08, 15 dana po inokulaciji (Slika 43). Ostala tri ispitivana izolata 128-08, 146-08 i 147-08 nijesu izazvala pojavu simptoma.

Na biljkama *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet' zabilježena je pojava blagog mozaika 21 dan po inokulaciji izolatom 147-08. Izolati 140-08 i 146-08 su 12 dana po inokulaciji izazvali pojavu mozaika (Slika 44), odnosno mozaika praćenog deformacijama listova. Nakon inokulacije izolatom 128-08 nijesu konstatovani simptomi.

Biljke *Lagenaria siceraria* reagovala su pojavom mozaika i klobučavosti 13 dana po inokulaciji izolatom 128-08 (Slika 45), odnosno simptomima prosvjetljavanja nerava i žutog mozaika po inokulaciji izolatom 146-08. Ostala dva ispitivana izolata nijesu izazvala pojavu simptoma.



Slika 42. ZYMV-147-08: Mozaik na *C. sativus* 'Regal'



Slika 43. ZYMV-140-08: Nekrotične pjege na *C. anguria*



Slika 44. ZYMV-140-08: Mozaik na *C. vulgaris* 'Creamson sweet'



Slika 45. ZYMV-128-08: Mozaik i klobučavost na *L. siceraria*



Slika 46. ZYMV-128-08: Lokalne hlorotične pjege na *C. quinoa*



Slika 47. ZYMV-146-08: Lokalne hlorotične pjege na *C. amaranticolor*

Biljke roda *Chenopodium* reagovala su pojavom lokalnih hlorotičnih pjega na inokulacije ispitivanim izolatima, međutim utvrđena je razlika u reakcijama kako između ispitivanih izolata, tako i između testiranih biljnih vrsta. Na biljkama *C. quinoa* (Slika 46) i *C. amaranticolor* (Slika 47) svi ispitivani izolati izazvali su pojavu lokalnih hlorotičnih pjega devet dana po inokulaciji, dok se isti simptom na biljkama *C. foetidum* javio samo po inokulaciji izolatom 147-08 (Slika 48) posle 11 dana, a ostala tri ispitivana izolata nijesu izazvali pojavu simptoma. Biljke *C. murale*, reagovala su na inokulaciju izolatima 128-08 i 147-08 pojavom lokalnih hlorotičnih pjega, 11 dana po inokulaciji. Izolati 140-08 i 146-08 nijesu izazvali pojavu simptoma.



Slika 48. ZYMV-147-08: Lokalne hlorotične pjege na *C. foetidum*



Slika 49. ZYMV-128-08: Lokalne hlorotične pjege na *Gomphrena globosa*

Gomphrena globosa je reagovala pojavom lokalnih hlorotičnih pjega 12 dana po inokulaciji (Slika 49) svim ispitivanim izolatima.

Tabela 21. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije odbranim izolatima *Zucchini yellow mosaic virus*

Test biljke	Izolati			
	128-08	140-08	146-08	147-08
<i>C. pepo</i> 'Olivija'	M**	M	M, ZBN, K	M
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	M, PN, K	M, PN, K	M, K, ZBN	M, PN, ZBN
<i>C. pepo</i> 'Slovenačka golica'	M	M	M	M
<i>C. pepo</i> 'Beogradska'	PN, ZBN, M	M, ZBN	M, PN	ŽM, PN
<i>C. pepo</i> 'Ezra F1'	M	M	M, PN, ZBN	M, HP, ZBN, SL
<i>C. pepo</i> 'Zucchini'	PN	M	HN, M	M, DL, PS
<i>C. maxima</i>	M	BM, PN	M, ZBN	M, ZBN
<i>C. mixta</i>	M, K	M	M, PN	M
<i>C. moschata</i> 'Beja'	/	/	/	M, PN
<i>C. moschata</i> 'Lola'	M, DL	M	M	M
<i>C. ficifolia</i>	/	/	/	/
<i>C. foetidissima</i>	/	/	/	/
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	/	/	BM	/
<i>C. sativus</i> 'Dugi zeleni'	/	PN, M	PN, M	PN, M
<i>C. sativus</i> 'Sunčani potok'	/	M	M	PN, M
<i>C. sativus</i> 'Regal'	/	/	M	M
<i>C. sativus</i> 'Senzacija'	/	PN, M	PN, M	PN, M
<i>C. melo</i> 'Ananas'	/	/	/	/
<i>C. anguria</i>	/	NP	/	/
<i>C. lanatus</i> 'Creamson sweet'	/	M	M, DL	BM
<i>L. siceraria</i>	M, K	/	PN, ŽM	/
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	/	/	/	/
<i>Cyclanthera pedata</i>	/	/	/	/
<i>Momordica</i> sp.	/	/	/	/
<i>Benincasa hispida</i>	/	/	/	/
<i>Petunia x hybrida</i>	/	/	/	/
<i>Physalis floridana</i>	/	/	/	/
<i>C. quinoa</i>	LHP	LHP	LHP	LHP
<i>C. amaranticolor</i>	LHP	LHP	LHP	LHP
<i>C. foetidum</i>	/	/	/	LHP
<i>C. murale</i>	LHP	/	/	LHP
<i>N. tabacum</i> 'Prilep'	/	/	/	/
<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	/	/	/	/
<i>N. tabacum</i> 'Banat'	/	/	/	/
<i>N. debneyii</i>	/	/	/	/
<i>N. clevelandii</i>	/	/	/	/
<i>N. rustica</i>	/	/	/	/
<i>N. glutinosa</i>	/	/	/	/
<i>S. lycopersicum</i> 'San Pjer'	/	/	/	/
<i>S. nigrum</i>	/	/	/	/

<i>D. metel</i>	/	/	/	/
<i>D. stramonium</i>	/	/	/	/
<i>P. vulgaris</i> 'Poboljšani gradištanac'	/	/	/	/
<i>P. sativum</i> 'Mali provansalac'	/	/	/	/
<i>Gophrena globosa</i>	LHP	LHP	LHP	LHP

Legenda: *- Inokulisano po pet biljaka koje su reagovale uniformno

** - LHP-lokalne hlorotične pjeg, M - mozaik, HN-hloroza nerava, PN-prosvjetljavanje nerava, HP-hlorotično prošaravanje, ZBN-zadržavanje zelene boje oko nerava, K-klobučavost, BM-blagi mozaik, DL-deformacija lišća, SL-sušavanje listova, NP-nekrotične pjeg, PS-povećavanje sinusa; ŽM- žuti mozaik, /- bez simptoma

Posle mehaničkih inokulacija test biljaka roda *Nicotiana* (*N. tabacum* 'Banat', 'Samsun', 'Prilep', *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. debneyii*, *N. clevelandii*) ispitivanim izolatima ZYMV, nijesu zabilježene nikakve promene. Pojava simptoma nije zabilježena ni na biljkama: *Datura stramonium*, *D. metel*, *S. nigrum*, *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Solanum lycopersicum* 'San Pjer', *P. vulgaris* 'Poboljšani gradištanac', *P. sativum* 'Mali provansalac', *C. melo* 'Ananas' i *Benincasa hispida*.

Primjenom serološke metode detekcije, DAS-ELISA testa, u svim korišćenim test biljkama, koje su na inokulacije ispitivanim izolatima reagovale pojavom simptoma, potvrđeno je prisustvo ZYMV, odnosno odsustvo ZYMV u biljkama bez simptoma kod vrsta koje nijesu domaćini ZYMV. Takođe, DAS-ELISA testom nije utvrđeno prisustvo ZYMV ni u biljkama bez simptoma kod domaćina koji su na neke izolate reagovali pojavom simptoma, a na neke nijesu.

5.3.2. Reakcije test biljaka prema ispitivanim izolatima WMV

Posle mehaničkih inokulacija biljaka *C. pepo* 'Ezra F1', inokulumom pripremljenim od uzoraka za koje je primjenom seroloških analiza utvrđeno da su zaražene WMV, zabilježena je pojava lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pjega kao i pojava mozaika i klobučavosti, čime je potvrđena virusna priroda oboljenja i dobijeni izolati virusa.

Sve test biljke su uniformno reagovale na inokulacije ispitivanim izolatima u svim ponavljanjima. Biološka karakterizacija tri odabrana izolata WMV 255-09, 256-09 i 266-09, obavljena je mehaničkim inokulacijama 45 biljaka različitih vrsta ili sorti iste vrste, a dobijeni rezultati i simptomi koji su se razvili na inokulisanim test biljkama prikazani su u tabeli 22. Odabrani izolati razlikovali su se po simptomima koje su

prouzrokovali na izvornim biljkama *C. pepo* 'Tosca' u polju. Svi izolati su ispoljili simptome mozaika na lišću, sa razlikom što je kod izolata 266-09 mozaik bio izraženiji, a kod izolata 255-09 praćen blagom klobučavošću. Osim mozaika, izolat 256-09 prouzrokovao je i simptome izražene nitavosti, praćene zaostajanjem biljke u porastu. Na plodovima je izolat 255-09 takođe prouzrokovao mozaik, dok je izolat 266-09 na plodu izazvao izražena mozaična prošaravanja.

Tabela 22. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije odbranim izolatima *Watermelon mosaic virus*

Test biljke	Izolati		
	255-09	256-09	266-09
<i>C. pepo</i> 'Olivija'	M, ZBN**	M, ZBN	M, ZBN
<i>C. pepo</i> 'Olinka'	M	M	M
<i>C. pepo</i> 'Slovenačka golica'	M	M	M
<i>C. pepo</i> 'Beogradska'	M	M	M
<i>C. pepo</i> 'Ezra F1'	M	M	M
<i>C. pepo</i> 'Zucchini'	M, ZBN	M, ZBN	M, ZBN
<i>C. maxima</i>	/	M, ZBN	/
<i>C. mixta</i>	LNP, M, K	M, K	M, K
<i>C. moschata</i> 'Beja'	M, K	M, IM, DL	/
<i>C. moschata</i> 'Lola'	M	M	M
<i>C. ficifolia</i>	/	/	/
<i>C. foetidissima</i>	/	/	/
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	/	M	M
<i>C. sativus</i> 'Dugi zeleni'	M	/	M
<i>C. sativus</i> 'Sunčani potok'	/	/	M, ZBN
<i>C. sativus</i> 'Senzacija'	/	M	M
<i>C. sativus</i> 'Regal'	/	/	/
<i>C. melo</i> 'Ananas'	/	/	M
<i>C. anguria</i>	/	M	/
<i>C. lanatus</i> 'Creamson sweet'	M	M	/
<i>L. siceraria</i>	M	M, PLND, IM	M
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	/	/	/
<i>Cyclanthera pedata</i>	/	/	/
<i>Momordica</i> sp.	/	/	/
<i>Benincasa hyspida</i>	/	/	/
<i>Petunia x hybrida</i>	/	/	BM
<i>Physalis floridana</i>	SHP	SHP, NP	SHP
<i>C. quinoa</i>	M, SHP	LHP, SHP	LHP
<i>C. amaranticolor</i>	LHP	LHP, LNP	LHP, LNP
<i>C. foetidum</i>	/	/	/
<i>C. murale</i>	/	/	/
<i>N. tabacum</i> 'Prilep'	/	/	/
<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	/	/	/
<i>N. tabacum</i> 'Banat'	/	/	/
<i>N. debneyii</i>	/	/	/

<i>N. clevelandii</i>	/	/	/
<i>N. rustica</i>	/	/	/
<i>N. glutinosa</i>	/	/	/
<i>S. lycopersicum</i> 'San Pjer'	/	/	/
<i>S. nigrum</i>	/	/	/
<i>D. metel</i>	/	/	/
<i>D. stramonium</i>	/	/	/
<i>P. vulgaris</i> 'Poboljšani gradištanac'	/	/	/
<i>P. sativum</i> 'Mali provansalac'	/	/	/
<i>Gophrena globosa</i>	/	/	/

Legenda: * - Inokulisano po pet biljaka koje su reagovale uniformno

** - LHP-lokalne hlorotične pjege, M- mozaik, LNP-lokalne nekrotične pjege, ZBN-zadržavanje zelene boje oko nerava, K-klobučavost, BM-blagi mozaik, PLND-povijanje listova na dolje, IM-izražen mozaik, DL-deformacija lišća, SHP-sistemična hlorotična pjegavost, NP-nekrotične pjege, / - bez simptoma

Biljke *C. pepo* 'Olivija' (Slika 50) i *C. pepo* 'Olinka' (Slika 51) na inokulacije sa sva tri ispitivana izolata nakon sedam dana reagovale su pojavom simptoma u vidu mozaika i zadržavanja zelene boje oko nerava, odnosno samo pojavom mozaika kod *C. pepo* 'Olinka'. Nakon inokulacije izolatima 255-09 i 256-09, biljke *C. pepo* 'Slovenačka golica' reagovale su pojavom mozaika (Slika 52) osam dana po inokulaciji, a sa izolatom 266-09 11 dana po inokulaciji. Po inokulaciji biljaka *C. pepo* 'Beogradska' izolatima 255-09 i 256-09 već nakon osam dana uočena je pojava mozaika, dok je izolat 266-09 izazvao pojavu mozaika (Slika 53) tri dana kasnije, odnosno 11 dana posle inokulacije. Simptomi mozaika kod *C. pepo* 'Ezra F1' javili su se 13 dana nakon inokulacije svim ispitivanim izolatima (Slika 54). Na biljkama *C. pepo* 'Zucchini' ispitivani izolati 255-09 i 256-09 izazvali su pojavu mozaika (Slika 55) nakon osam dana, dok je izolat 266-09 pojavu mozaika izazvao nakon 11 dana. Sva tri ispitivana izolata izazvala su i pojavu zadržavanja zelene boje oko nerava nakon 21 dana.



Slika 50. WMV-266-09: Mozaik i zadržavanje zelene boje oko nerava na lišću *C. pepo* 'Olivija'



Slika 51. WMV-266-09: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Olinka'



Slika 52. WMV-256-09: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Slovenačka golica'



Slika 53. WMV-266-09: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Beogradska tikvica'



Slika 54. WMV-255-09: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Ezra F1'



Slika 55. WMV-256-09: Mozaik i zadržavanje zelene boje oko nerava na lišću *C. pepo* 'Zucchini'

Biljke *C. maxima* nijesu reagovale na inokulacije izolatima 266-09 i 255-09, dok je izolat 256-09 izazvao pojavu mozaika nakon 12 dana. Simptom zadržavanja zelene boje oko nerava javio se 20 dana po inokulaciji izolatom 256-09 (Slika 56).

Izolat 255-09 na biljkama *C. mixta* izazvao je pojavu lokalnih nekrotičnih pjega, mozaika i klobučavosti 12 dana po inokulaciji. Simptomi izraženog mozaika (Slika 57) i klobučavosti primećeni su 11 dana posle inokulacije izolatom 266-09 i 20 dana izolatom 256-09.



Slika 56. WMV-256-09: Zadržavanje zelene boje oko nerava na lišću *C. maxima*



Slika 57. WMV-256-09: Izražen mozaik lišću *C. mixta*



Slika 58. WMV-256-09: Klobučavost i izražen mozaik na lišću *C. moschata* 'Beja'



Slika 59. WMV-255-09: Mozaik na lišću *C. moschata* 'Lola'



Slika 60. WMV-266-09: Mozaik na lišću *C. sativus* 'Delikates'



Slika 61. WMV-266-09: Blagi mozaik na lišću *C. sativus* 'Dugi zeleni'

Dvadeset dana nakon inokulacije biljaka *C. moschata* 'Beja' izolatom 255-09 javili su se simptomi mozaika i klobučavosti, dok su test biljke inokulisane izolatom 256-09 reagovale pojavom izraženog mozaika i deformacija (Slika 58) 24 dana po inokulaciji. Izolat 266-09 nije izazvao pojavu simptoma. Biljke druge ispitivane sorte *C. moschata* 'Lola' reagovale su na sva tri ispitivana izolata pojavom mozaika (Slika 59) nakon 8 dana.



Slika 62. WMV-266-09: Mozaik i zadržavanje zelene boje oko nerava na lišću *C. sativus* 'Sunčani potok'



Slika 63. WMV-266-09: Mozaik na lišću *C. melo* 'Ananas'



Slika 64. WMV-256-09: Mozaik i deformacije lista *C. anguria*



Slika 65. WMV-255-09: Mozaik na lišću *C. lanatus* 'Creamson sweet'

Na biljkama *C. sativus* 'Delikates' uočeni su simptomi u vidu blagog mozaika (Slika 60) 29 dana po inokulaciji izolatima 266-09 i 256-09, dok ispitivani izolat 255-09 nije izazvao pojavu simptoma.

Na biljkama *C. sativus* 'Dugi zeleni' ispitivani izolat 266-09 izazvao je pojavu mozaika (Slika 61) nakon 11 dana. Na inokulacije izolatom 255-09 biljke su reagovale osam dana po inokulaciji simptomima u vidu mozaika, dok izolat 256-09 nije izazvao pojavu simptoma.

Na inokulacije izolatom 266-09, test biljke *C. sativus* 'Sunčani potok' reagovale su pojavom mozaika (Slika 62) i zadržavanja zelene boje oko nerava 21 dan nakon inokulacije. Izolati 255-09 i 256-09 nijesu izazvali pojavu simptoma na inokulisanim biljkama.

Prvi simptomi na biljkama *C. melo* 'Ananas' javili su se 21 dana nakon inokulacije u vidu mozaika (Slika 63) izolatom 266-09. Druga dva ispitivana izolata 255-09 i 256-09 nijesu izazvala pojavu simptoma.

Test biljke *C. anguria* jedino su reagovale na inokulacije izolatom 256-09 simptomima u vidu mozaika (Slika 64) 20 po inokulaciji. Izolati 255-09 i 256-09 nijesu izazvala pojavu simptoma.

Izolati 255-09 i 256-09 na biljkama *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet' izazvali su pojavu mozaika (Slika 65) 30 dana po inokulaciji. Izolat 266-09 nije izazvao pojavu simptoma.

Na biljkama *L. siceraria* izolati 255-09 i 266-09 izazvali su simptome mozaika 11 dana po inokulaciji. Biljke *L. siceraria* inokulisane izolatom 256-09 ispoljile su simptome u vidu povijanja listova na dolje i izraženog mozaika (Slika 66) 20 dana nakon inokulacije.

Biljke *Petunia x hybrida* reagovala su pojavom blagog mozaika (Slika 67) 15 dana po inokulaciji izolatom 266-09. Nakon inokulacije izolatima 255-09 i 266-09 nije zabilježena pojava simptoma.

Na biljkama *Physalis floridana* sva tri izolata izazvala su pojavu sistemične hlorotične pjegavosti (Slika 68), 11 dana po inokulaciji. Pored sistemične hlorotične pjegavosti na inokulisanim biljkama, izolat 256-09 izazvao je i pojavu nekrotičnih pjega 4 dana kasnije, 15 dana nakon inokulacije.

Na biljkama *C. quinoa* ispitivani izolat 266-09 izazvao je pojavu lokalnih hlorotičnih pjega, 11 dana po inokulaciji. Izolati 255-09 i 256-09 su pored lokalnih hlorotičnih (Slika 69) pjega izazvali i pojavu sistemične pjegavosti 3 dana kasnije, ukupno 14 dana nakon inokulacije.

Lokalne hlorotične pjege (Slika 70) na biljkama *C. amaranticolor* pojavile su se 11 dana po inokulaciji ispitivanim izolatima, a kod izolata 256-09 i 266-09 četiri dana kasnije, ukupno 15 dana od inokulacije, javile su se i lokalne nekrotične pjege.

Sljedeće biljke na mehaničke inokulacije ispitivanim izolatima WMV nijesu reagovala pojavom simptoma: *Nicotiana debneyii*, *N. clevelandii*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Samsun', 'Banat' i 'Prilep', *Datura stramonium* *D. metel*, *Solanum lycopersicum* 'San Pjer', *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac', *P. sativum* 'Mali provansalac', *S. nigrum*, *Gophrena globosa*, *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium murale*, *C. foetidissima*, *C. ficifolia*, *Momordica* sp., *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata* i *Benincasa hyspida*.



Slika 66. WMV-256-09: Mozaik i deformacije na lišću *L. siceraria*



Slika 67. WMV-266-09: Blagi mozaik na lišću *Petunia x hybrida*



Slika 68. WMV-266-09: Hlorotične pjege na lišću *Physalis floridana*



Slika 69. WMV-255-09: Lokalne hlorotične pjege na lišću *Chenopodium quinoa*



Slika 70. WMV-255-09: Lokalne nekrotične pjege na lišću *Chenopodium amaranticolor*

Svi rezultati dobijeni primjenom biotesta potvrđeni su primjenom serološke metode detekcije, DAS-ELISA testa. U svim korišćenim test biljkama, koje su na inokulacije ispitivanim izolatima reagovala pojavom simptoma, potvrđeno je prisustvo WMV, odnosno, kod biljka bez simptoma kod vrsta koje nijesu domaćini WMV, kao i biljka bez simptoma kod domaćina koji su na neke izolate reagovali pojavom simptoma a na neke nijesu, DAS-ELISA testom nije utvrđeno prisustvo WMV.

5.3.3. Reakcije test biljaka prema ispitivanom izolatu CMV

Posle dobijanja izolata mehaničkim inokulacija biljaka *N. tabacum* 'Samsun' i razdvajanja od ZYMV i WMV, jer ova test biljka nije njihov domaćin, zabilježena je pojava simptoma mozaika, čime je potvrđena virusna priroda oboljenja i dobijeni izolati virusa. Sve test biljke su uniformno reagovala na inokulacije ispitivanim izolatima u svim ponavljanjima. Detaljna biološka karakterizacija odabranog izolata CMV, 115-08, obavljena je mehaničkim inokulacijama 45 test biljaka (Tabela 23). Izolat 115-08 je

odabran za biološku karakterizaciju jer su svi dobijeni i izolati na izvornim biljkama u polju na *C. pepo* 'Olinka' pokazivali tipične simptome mozaika.

Tabela 23. Reakcija test biljaka na mehaničke inokulacije 115-08 izolatom *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Test biljke	Tip simptoma
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olivija'	M, UL**
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Slovenačka golica'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Ezra F1'	M
<i>Cucurbita pepo</i> 'Zucchini'	M
<i>Cucurbita maxima</i>	M, ZBN
<i>Cucurbita mixta</i>	M, ŽM
<i>Cucurbita moschata</i> 'Beja'	ŽM
<i>Cucurbita moschata</i> 'Lola'	M
<i>Cucurbita ficifolia</i>	/
<i>Cucurbita foetidissima</i>	/
<i>Cucumis sativus</i> 'Delikates'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Dugi zeleni'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Sunčani potok'	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Senzacija'	BM
<i>Cucumis sativus</i> 'Regal'	HN, M
<i>Cucumis melo</i> 'Ananas'	M
<i>Cucumis anguria</i>	M
<i>Citrulus lanatus</i> 'Creamson sweet'	LNPk, NP, M
<i>Lagenaria siceraria</i>	LHPk, M
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	/
<i>Cyclanthera pedata</i>	/
<i>Momordica</i> sp.	/
<i>Benincasa hyspida</i>	/
<i>Petunia x hybrida</i>	/
<i>Physalis floridana</i>	/
<i>Chenopodium quinoa</i>	LNP
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNP
<i>Chenopodium foetidum</i>	DL, Kr
<i>Chenopodium murale</i>	LNP
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Poboljšani gradištanac'	/
<i>Pisum sativum</i> 'Mali provansalac'	/
<i>Solanum lycopersicum</i> 'San Pjer'	/
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Prilep'	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Samsun'	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Banat'	M
<i>Nicotiana debneyii</i>	M
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LNP
<i>Nicotiana rustica</i>	M
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, N, K

<i>Datura stramonium</i>	/
<i>Datura metel</i>	/
<i>Solanum nigrum</i>	/
<i>Gomphrena globosa</i>	LNP

Legenda: * - Inokulisano po pet biljaka koje su reagovale uniformno

** -M-mozaik, ŽM-žuti mozaik, BM-blagi mozaik, ZBN-zelena boja oko nerava, HN-hloroza nerava, K-klobučavost, DL-deformacije, N-nitavost, LNP-lokalne nekrotične pjege, UL-uvijanje lišća, Kr-kržljivost, LHPk-lokalne hlorotične pjege na kotiledonima, LNPk-lokalne nekrotične pjege na kotiledonima, /-bez simptoma

Po inokulaciji ispitivanim izolatom CMV, biljke *C. pepo* 'Olinka' i 'Beogradska' reagovale su pojavom simptoma nakon 8 dana (Slike 71 i 72), a biljke *C. pepo* 'Olivija' ispoljile su simptome mozaika i uvijanja lišća osam dana po inokulaciji (Slika 73). Na uljanoj tikvi sorte Slovenačka golica simptomi u vidu mozaika su se javili 8 dana po inokulaciji (Slika 74). Na inokulisanim biljkama *C. pepo* 'Ezra F1' i 'Zucchini' primijećena je pojava mozaika (Slike 75 i 76) 11, odnosno devet dana po inokulaciji. Inokulisane biljake *C. maxima* ispitivanim izolatom CMV reagovale su pojavom simptoma mozaika i zadržavanja zelene boje oko nerava nakon osam dana (Slika 77), dok su se kod vrste *C. mixta* simptomi u vidu mozaika i žutog mozaika takođe javili osam dana po inokulaciji (Slika 78). Dvije ispitivane sorte *C. moschata* 'Beja' (Slika 79) i 'Lola' (Slika 80) različito su reagovale, pa su se kod prve simptomi u vidu žutog mozaika javili četiri nedjelje po inokulaciji, a kod druge simptomi mozaika 11 posle inokulacije izolatom CMV.

Četiri sorte *C. sativus* na inokulaciju izolatom CMV reagovale su pojavom mozaika, ali se kod sorte 'Delikates' mozaik javio nakon devet dana (Slika 81), kod sorti 'Dugi zeleni' (Slika 82) i 'Sunčani potok' (Slika 83) nakon 11 dana, dok je sorta 'Regal' prvo reagovala pojavom hloroze nerava 21 dan po inokulaciji, a mozaik se javio devet dana kasnije, odnosno 30 dana po inokulaciji (Slika 84). Biljke *C. melo* 'Ananas' inokulisane izolatom CMV, 11 dan po inokulaciji ispoljile su simptome mozaika (Slika 85), dok se kod *C. anguria* mozaika javio četiri nedjelje po inokulaciji ispitivanim izolatom.

Biljke *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet' inokulisane izolatom CMV, sedam dana po inokulaciji, ispoljile su simptome u vidu lokalnih nekrotičnih pjege na kotiledonima. Do pojave sistemične zaraze u vidu mozaika (Slika 86) došlo je 15 dana po inokulaciji. Na inokulisanim biljkama *L. siceraria* simptomi su se takođe javili na

kotiledonima devet dana nakon inokulacije izolatom CMV, ali u vidu brojnih hlorotičnih pjega, dok se mozaik javio tri nedjelje po inokulaciji (Slika 87).

Biljke roda *Chenopodium* na inokulaciju ispitivanim izolatom CMV reagovala su pojavom lokalnih nekrotičnih pjega: četiri dana po inokulaciji *Chenopodium quinoa* (Slika 88), pet dana po inokulaciji *C. murale* (Slika 89), odnosno sedam dana po inokulaciji *C. amaranticolor* (Slika 90). Samo su biljke *C. foetidum* reagovala drugačije, pojavom simptoma kržljivosti i deformacije cijelih biljaka 14 dana nakon inokulacija odabranim izolatom CMV (Slika 91).



Slika 71. CMV-115-08: Mozaik i deformacije na lišću *C. pepo* 'Olinka'



Slika 72. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Beogradska'



Slika 73. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Olivija'



Slika 74. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Slovenačka golica'



Slika 75. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Ezra F1'



Slika 76. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. pepo* 'Zucchini'



Slika 77. CMV-115-08: Zadržavanje zelene boje oko nerava na lišću *C. maxima*



Slika 78. CMV-115-08: Žuti mozaik na lišću *C. mixta*



Slika 79. CMV-115-08: Žuti mozaik na lišću *C. moschata* 'Beja'



Slika 80. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. moschata* 'Lola'



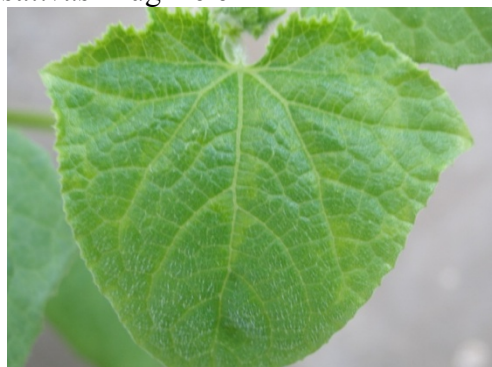
Slika 81. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. sativus* 'Delikates'



Slika 82. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. sativus* 'Dugi zeleni'



Slika 83. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. sativus* 'Sunčani potok'



Slika 84. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. sativus* 'Regal'



Slika 85. CMV-115-08: Mozaik na lišću *C. melo* 'Ananas'



Slika 86. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *C. vulgaris* 'Creamson sweet'



Slika 87. CMV-115-08: Mozaik i deformacije na lišću *L. siceraria*



Slika 88. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *C. quinoa*



Slika 89. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *C. murale*



Slika 90. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *C. amaranticolar*



Slika 91. CMV-115-08: Kržljavost i deformacije *C. foetidum*



Slika 92. CMV-115-08: Mozaik na lišću *N. tabacum* 'Samsun'



Slika 93. CMV-115-08: Mozaik, klobučavost i nitavost na lišću *N. glutinosa rustica*



Slika 94. CMV-115-08: Mozaik na lišću *N.*



Slika 95. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *N. clevelandii*



Slika 96. CMV-115-08: Hlorotične pjege na lišću *N. debneyii*



Slika 97. CMV-115-08: Nekrotične pjege na lišću *G. globosa*

Na biljkama *N. tabacum* 'Prilep', 'Banat' i 'Samsun' simptomi u vidu mozaika (Slika 92) zabilježeni su 30 dana po inokulaciji ispitivanim izolatom CMV. Biljke *N. glutinosa* na inokulacije ispitivanim izolatom CMV reagovale su pojavom mozaika (Slika 93), klobučavosti i nitavosti listova 30 dana po inokulaciji. Mozaik na biljkama *N. rustica* (Slika 94) zabilježen je devet dana po inokulaciji ispitivanim izolatom CMV. Na biljkama *N. clevelandii* ispitivani izolat CMV izazvao je pojavu brojnih nekrotičnih pjege devet dana posle inokulacije (Slika 95), dok su na biljkama *N. debneyii* uočene lokalne hlorotične pjege (Slika 96) sedam dana po inokulaciji, a četiri dana kasnije, odnosno 11 dana po inokulaciji, zabilježena je i pojava mozaika. Po inokulaciji biljaka

Gomphrena globosa ispitivanim izolatom CMV konstatovane su lokalne nekrotične pjege (Slika 97) nakon 11 dana.

Od biljaka porodice Cucurbitaceae, izolat 115-08 nije mogao da zarazi *C. ficifolia*, *C. foetidissima*, *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata*, *Momordica* sp. i *Benincasa hispida*. Biljke *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana*, *Phaseolus vulgaris* 'Poboljšani gradištanac', *Pisum sativum* 'Mali provansalac', *Solanum lycopersicum* 'San Pjer', *Datura stramonium*, *D. metel* i *Solanum nigrum* mehanički nijesu mogle biti zaražene ispitivanim izolatom CMV.

Svi rezultati dobijeni primjenom biotesta potvrđeni su primjenom serološke metode detekcije, DAS-ELISA testa. U svim korišćenim test biljkama, koje su na inokulacije ispitivanim izolatom CMV reagovala pojavom simptoma, potvrđeno je prisustvo CMV, odnosno, kod biljaka bez simptoma nije utvrđeno prisustvo CMV.

5.3.4. Biološka identifikacija izolata TSWV

Posle mehaničkih inokulacija biljaka *N. tabacum* 'Samsun', nakon pojave simptoma lokalnih hlorotičnih i nekrotičnih pjega i prstenova i sistemskih hlorotičnih i nekrotičnih prošaravanja dobijena su dva izolata 236-09 i 240-09 (Slika 98 i 99). Oba ispitivana izolata reagovala su uniformno, a lokalni simptomi su se javili pet dana po inokulaciji, a sistemski 12 dana nakon inokulacije. Zatim su oba izolata, u cilju identifikacije TSWV inokulisana na po pet biljaka *Petunia x hybrida*. Pojava simptoma u vidu lokalnih nekrotičnih pjega na indikator biljkama koji su se javili posle tri dana (Slika 100) potvrdila je pripadnost izolata TSWV. Sve test biljke su uniformno reagovala na inokulacije ispitivanim izolatima u svim ponavljanjima. Svi rezultati dobijeni primjenom biotesta potvrđeni su primjenom DAS-ELISA testa.



Slika 98. TSWV-236-09: Lokalne nekrotične pjege na lišću *N. tabacum* 'Samsun'



Slika 99. TSWV-240-09: Sistemski nekrotična prošaravanja na lišću *N. tabacum* 'Samsun'



Slika 100. TSWV-236-09: Lokalne nekrotične pjege na lišću *Petunia x hybrida*

5.3.5. Biološka identifikacija izolata CABYV

Identifikacija virusa žutila tikava perzistentno prenosivog vašima (*Cucurbit aphid borne yellows virus*, CABYV) obavljena je prenošenjem izolata 145-08 sa lišća sa simptomima žutila, vašima *Aphis gossypii* na biljke *C. pepo* 'Olinka'. Posle perioda od dva dana u toku kojih su vaši ostavljene da se ishranjuju na simptomatičnom lišću, po deset jedinki vaši je preneseno na 20 test biljaka *C. pepo* 'Olinka' i tu ishranjivano pet dana da bi prenijele virus. Na *C. pepo* 'Olinka' simptomi u vidu blagog žutila su se javili posle dvije nedjelje, na šest od 20 test biljaka, čime je potvrđeno perzistentno prenošenje ovog virusa. Prisustvo virusa u biljkama inokulisanim tokom ishrane vaši potvrđeno je RT-PCR metodom sa specifičnim prajmerima, CABYV up/down, za detekciju CABYV.

5.4. Serološka detekcija prisustva ZYMV, WMV i CMV u biljkama odabranim za ispitivanje prenošenja virusa sjemenom

Pregledom tikava tokom 2007. godine na šest lokaliteta gajenja, odabrane su i obilježene simptomatične biljke u kojima je serološkim analizama dokazano prisustvo virusa (Tabela 24). Sa odabranih biljaka na kraju vegetacije sakupljeno je sjeme u cilju utvrđivanja mogućnosti prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom prirodno zaraženih biljaka tikva. U svim izvornim biljkama sa kojih je sakupljeno sjeme za testiranje prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom tikava dokazan je bar jedan od ispitivanih virusa, dok je kod sedam biljaka dokazano prisustvo sva tri ispitivana virusa (Tabela 24).

Tabela 24. Prisustvo *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* i *Cucumber mosaic virus* u izvornim biljkama i broj sakupljenih sjemena po plodu

Vrsta	Genotip	Oznaka uzorka	Broj sjemena	Virus			
				ZYMV	WMV	CMV	
<i>C. maxima</i>	'Domaća siva bundeva'	668	244	+	+	+	
		669	284	-	+	-	
		670	264	+	+	-	
		672	213	+	+	-	
<i>C. pepo</i>	'Olivija'	673	28	+	+	-	
		674	264	-	+	-	
		'F1 Olivija x Olinka'	675	537	-	+	-
			676	544	+	+	-
			677	493	-	+	-
	'Wies 371'	678A	513	+	+	-	
		678B	568	+	+	-	
		686	277	+	+	+	
	'SB'	688A	165	+	+	+	
		688B	197	+	+	+	
		'F1 Olinka x G'	689B	420	-	+	+
	'F1 Olinka x Wies 371'	690B	403	+	+	+	
<i>C. moshata</i>	'Nektar'	679	353	+	+	-	
		680	226	+	+	-	
	'Domaća muskatna tikva'	681	330	+	+	+	
		'Orange'	682A	204	+	+	+
		682B	113	+	+	+	
		683	91	+	+	-	
Ukupno		22	6731	17	22	9	

5.4.1. Simptomi na sijancima, serološka detekcija prisustva ZYMV, WMV i CMV u sijancima tikava i utvrđivanje procenta prenošenja virusa sjemenom

Sijanci različitih sorti *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata* gajeni u kontrolisanim uslovima staklenika Poljoprivrednog fakulteta vizuelno su pregledani 23 dana nakon nicanja u cilju utvrđivanja simptoma koji bi ukazali na virusnu zarazu (Slika 101). Kako simptomi na sijancima nijesu utvrđeni sprovedena su dalja serološka testiranja, primjenom specifičnih antiseruma za detekciju ZYMV, WMV i CMV.

Rezultati seroloških analiza sijanaca uljane tikve, muskatne tikve i bundeve ukazali su na prenošenje ZYMV u različitom procentu kod sve tri ispitivane vrste. Penošenje sjemenom druga dva ispitivana virusa WMV i CMV nije utvrđeno.



Slika 101. Ispitivanje prenošenja virusa sjemenom tikava: Sijanci raznih vrsta tikava u stakleniku

Dobijeni rezultati su zatim obrađeni upotrebom statističke formule koju su predložili **Gibbs and Gower** (1960) u cilju procjene procenta prenošenja ZYMV sjemenom. Kao najbolje prilagođen metod grupisanja odabrano je formiranje zbirnih grupa od po četiri člana (poduzorka) u svakoj. Dobijeni rezultati seroloških analiza prenošenja virusa sjemenom 22 ploda *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata* prikazani su u tabeli 25.

Od 12 ispitivanih uzoraka sjemena različitih sorti ili selekcionog materijala *C. pepo* var. *styriaca* prisustvo ZYMV dokazano je u sijancima jednog uzorka 686 *C. pepo* 'Wies 371' i to u jednoj zbirnoj grupi. Korišćenjem formule koju su predložili **Gibbs and Gower** (1960) izračunat je procenat prenošenja ZYMV sjemenom, koji je za dobijene vrijednosti $i=4$, $N=23$ i $R=1$ iznosio 1,11%.

Prisustvo ZYMV u testiranim uzorcima sjemena *C. maxima* dokazano je u sijancima jednog od četiri ispitivana uzorka. Korišćenjem formule koju su predložili **Gibbs and Gower** (1960) kod uzorka 672 izračunat je procenat prenošenja ZYMV sjemenom, koji je iznosio 2,06% (za dobijene vrijednosti $i=4$, $N=25$ i $R=2$).

Tabela 25. Prenosenje *Zucchini yellow mosaic virus* sjemenom *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata*

Vrsta	Genotip	Oznaka uzorka	Broj sjemena	Broj testiranih sjemenki	Broj testiranih grupa	Broj zaraženih grupa	% infekcije	
<i>C. maxima</i>	'Domaća siva bundeva'	668	244	92	23	0	0	
		669	284	100	25	0	0	
		670	264	100	25	0	0	
		672	213	100	25	2	2,06	
<i>C. pepo</i>	'Olivija'	673	28	28	7	0	0	
		674	264	100	25	0	0	
		'F1 Olivija x Olinka'	675	537	100	25	0	0
			676	544	100	25	0	0

		677	493	100	25	0	0
	'Wies 371'	678A	513	100	25	0	0
		678B	568	100	25	0	0
		686	277	92	23	1	1,11
	'SB'	688A	165	100	25	0	0
		688B	197	92	23	0	0
	'F1 Olinka x G'	689B	420	100	25	0	0
	'F1 Olinka x Wies 371'	690B	403	96	24	0	0
C.	'Nektar'	679	353	100	25	0	0
<i>moshata</i>	'Ponca'	680	226	100	25	0	0
	'Domaća muskatna tikva'	681	330	100	25	10	11,99
	'Orange'	682A	204	80	20	2	2,6
		682B	113	72	18	0	0
		683	91	52	13	0	0
Ukupno		22	6731	2004	501	15	0,76

Od šest testiranih uzoraka četiri sorte *C. moschata*, prenošenje ZYMV sjemenom dokazano je kod dva uzorka i dvije sorte 'Orange' i 'Domaća muskatna tikva'. Procenat prenošenja kod uzorka 681 po formuli **Gibbs and Gower** (1960) iznosio je 11,99% (za vrijednosti $i=4$, $N=25$ i $R=10$), dok je procijenjeni procenat prenošenja kod uzorka 682A bio 2,6% (za vrijednosti $i=4$, $N=20$ i $R=2$).

Ukupna procijenjena vrijednost prenošenja ZYMV iznosila je 0,76%. Procijenjena vrijednost je proračunata na osnovu 2004 testirana sjemena iz 22 ploda *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata*.

5.5. Dokazivanje prisustva virusa u sakupljenim uzorcima korova primjenom DAS-ELISA

U uzorcima korova sakupljenim 2010. godine na 13 lokaliteta u 17 usjeva dokazano je prisustvo ZYMV, WMV, CMV i TSWV (Tabela 26). Najzastupljeniji virus u sakupljenim korovskim biljkama bio je TSWV čije je prisustvo dokazano u 15 (30%) od 50 testiranih uzoraka. Sljedeći po zastupljenosti bili su WMV i CMV, dokazani u po tri uzorka (6%), dok je prisustvo ZYMV dokazano u jednom uzorku (2%). U svim pozitivnim uzorcima infekcije su bile pojedinačne, izuzev u jednom uzorku *L. purpureum*, gdje je dokazana miješana infekcija WMV i CMV. TSWV je dokazan u 14 uzoraka u šest različitih vrsta korova (*A. retroflexus*, *C. album*, *P. aviculare*, *H. trionum*, *C. arvensis* i *S. nigrum*) iz šest različitih familija (Amaranthaceae, Chenopodiaceae,

Polygonaceae, Malvaceae, Convolvulaceae i Solanaceae), kao i u jednom uzorku *Sonchus* sp. iz familije Asteraceae. Sve vrste u kojima je detektovan TSWV pripadaju jednogodišnjim korovima, osim *C. arvensis* koji je višegodišnja biljka. Od 15 biljaka u kojima je TSWV detektovan, 11 su uzorkovane u usjevu, dok su se četiri nalazile po obodu usjeva, a svi uzorci su ispoljavali simptome (Slika 102). TSWV je bio prisutan na pet lokaliteta i u sedam usjeva tikava. WMV je detektovan u pojedinačnim infekcijama u dvije biljke (*H. trionum* i *Polygonum* sp.) (Slika 103) iz dvije različite familije (Malvaceae i Polygonaceae), dok je u *L. purpureum* koji pripada familiji Lamiaceae, WMV detektovan u miješanoj infekciji sa CMV. Sve tri biljke u kojima je detektovan WMV bile su iz grupe jednogodišnjih korova i osim *H. trionum*, koji je bio bez simptoma, ispoljavale simptome virusnih infekcija. Biljke u kojima je detektovan WMV sakupljene su sa tri lokaliteta, iz tri usjeva i sakupljene su u usjevu. CMV je, osim u miješanoj infekciji sa WMV, dokazan još u jednogodišnjoj *P. oleracea* (familija Portulacaceae) bez simptoma i višegodišnjoj *M. arvensis* sa simptomima, koje su uzorkovane sa oboda usjeva dva lokaliteta. ZYMV je dokazan samo na jednom lokalitetu u jednogodišnjoj *C. album* (familija Chenopodiaceae) sakupljenoj u usjevu.



Slika 102. TSWV-214-10: Deformacije lišća *A. retroflexus*



Slika 103. WMV-275-10: Hlorotične pjege na *Polygonum* sp.

U 76 uzoraka korova sakupljenih 2011. godine u osam usjeva, na četiri lokaliteta gajenja tikava, ponovo je detektovano prisustvo sva četiri testirana virusa (Tabela 27). Najzastupljeniji je bio CMV koji je detektovan u šest uzoraka (7,9%), zatim ZYMV dokazan u pet uzoraka (6,6%), pa WMV dokazan u tri uzorka (3,9%) i TSWV dokazan u jednom uzorku (1,3%). U svim uzorcima je dokazana pojedinačna infekcija, osim u uzorku *P. persicaria* u kom je dokazana miješana infekcija TSWV i CMV. CMV je detektovan u pet biljaka iz pet različitih botaničkih familija, *L. seriola*, *S. verticilata*, *D. stramonium* (Slika 104), *H. trionum* i *C. hybridum* (familije Asteraceae, Lamiaceae,

Solanaceae, Malvaceae i Chenopodiaceae) i sve biljke, osim *C. hybridum* su skupljene u usjevu. *D. stramonium*, *H. trionum* i *C. hybridum* su jednogodišnje biljke, dok je *L. seriola* jedno- ili dvogodišnja, a *S. verticilata* višegodišnja. Zaražene biljke su poticale iz četiri usjeva sa dva lokaliteta. U miješanoj infekciji sa TSWV, CMV je dokazan u višegodišnjoj biljci *P. persicaria* iz usjeva sa lokaliteta Irmovo. ZYMV je dokazan u pet pojedinačnih infekcija na dva lokaliteta iz četiri usjeva. U jednogodišnjim biljkama *A. retroflexus* (familija Amaranthaceae) ZYMV je dokazan u dvije biljke, jednoj iz usjeva, a drugoj sa oboda, jednogodišnjoj *C. hybridum* (Slika 105) (familija Chenopodiaceae) iz usjeva i u dvije višegodišnje biljke familije Brassicaceae, *L. draba* (iz usjeva) i *R. austriaca* (sa oboda usjeva). WMV je dokazan u tri jednogodišnje vrste, dvije su predstavnici familije Chenopodiaceae, *C. hybridum* sa oboda usjeva i *C. album* iz usjeva (Slika 106), a jedna je predstavnik familije Malvaceae, *H. trionum*, takođe iz usjeva. Od 14 biljaka u kojima su dokazani virusi, devet su ispoljavale simptome, dok je pet biljaka bilo bez simptoma (Tabela 27). U toku pregleda usjeva i sakupljanja uzoraka korovskih biljaka tokom 2011. godine, često je uočavana pojava kolonizacije korovskih biljaka, u i oko usjeva tikava različitim vrstama biljnih vaši (Slike 107 i 108).



Slika 104. CMV-757-11: Hlorotične pjege na *D. stramonium*



Slika 105. ZYMV-245-11: Hloroza na *C. hybridum*



Slika 106. WMV-692-11: Deformacije lišća *C. album*



Slika 107. Kolonija vaši na *D. stramonium* u usjevu tikava



Slika 108. Kolonija vaši na *S. nigrum* u usjevu tikava

Ukupno, tokom dvije godine istraživanja, virusna infekcija je dokazana u 35 od 126 testiranih korovskih biljaka (27,7%). Najzastupljeniji virus bio je TSWV, koji je dokazan u ukupno 16 testiranih biljaka (12,7%), od čega su 15 bile pojedinačne infekcije, a jedna miješana sa CMV, koji je ujedno bio i drugi po zastupljenosti (7,1%), dokazan u sedam pojedinačnih i dvije miješane infekcije (sa TSWV i WMV). WMV i ZYMV su dokazani u po 6 biljaka (4,8%). Sve infekcije ZYMV bile su pojedinačne, dok je WMV dokazan i u jednoj miješanoj infekciji sa CMV.

Tabela 26. Sakupljeni uzorci korova 2010. godine i virusi detektovani u njima

Lokalitet	Usjev	Oznaka uzorka	Familija	Vrsta	Tip	Virus	Simptomi		
Hetin	<i>C. pepo</i> 'Genovese'	192-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	- ¹	H ² , LHP		
		198-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	WMV	-		
	<i>C. pepo</i> 'Long of Nepal'	202-10	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	TSWV	DL		
		213-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	TSWV	DL		
		214-10	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	TSWV	DL		
		215-10	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	-	H		
		217-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	DL, M		
		220-10	Polygonaceae	<i>P. aviculare</i> *	A	TSWV	DL, M		
		221-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	HP		
		222-10	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	TSWV	LHP		
		223-10	Poligonaceae	<i>P. aviculare</i> **	A	TSWV	M		
		224-10	Brassicaceae	<i>S. arvensis</i> **	A	-	LHP		
		Kisač	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	259-10	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	BH
				296-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	TSWV	HP
<i>C. pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	271-10		Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	-	P, BH		
	273-10		Convolvulaceae	<i>C. arvensis</i> *	P	TSWV	H, PN		
	274-10		Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	TSWV	H		
Čenej	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	275-10	Polygonaceae	<i>Polygonaceae</i> sp.**	/	WMV	HP		
		282-10	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	HP		
		284-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	BHP		
		286-10	Lamiaceae	<i>L. purpureum</i> *	A	WMV, CMV	HOL		
B. Petrovac	<i>C. pepo</i> 'Wies 371'	314-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	HP		
		317-10	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	TSWV	H, KL		
		320-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	TSWV	HP, SL		
		Zmajevo	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	347-10	Lamiaceae	<i>S. annua</i> *	A	-	MP
354-10	Amaranthaceae			<i>A. retroflexus</i> *	A	TSWV	BH		
357-10	Chenopodiaceae			<i>C. album</i> *	A	-	H		

		359-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	H
B. Topola	<i>C. pepo</i> 'Horgoš'	363-10	Lamiaceae	<i>S. annua</i> *	A	-	-
Horgoš	<i>C. pepo</i> 'Horgoš'	379-10	Asteraceae	<i>Sonchus</i> sp.**	/	TSWV	H, NP
		384-10	Polygonaceae	<i>P. aviculare</i> **	A	TSWV	M
		385-10	Portulacaceae	<i>P. oleracea</i> **	A	CMV	-
		386-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	HP
		387-10	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	TSWV	H, KL
Odžaci	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	446-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	HP
Doroslovo	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	449-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	-
Brestovac	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	454-10	Malvaceae	<i>A. theophrasti</i> *	A	-	-
	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	457-10	Asteraceae	<i>A. artemisifolia</i> **	A	-	-
Čonoplja	<i>C. pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	464-10	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	-	DL
		467-10	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	-	-
		468-10	Polygonaceae	<i>P. lapathifolium</i> *	A	-	-
		469-10	Portulacaceae	<i>P. oleracea</i> *	A	-	-
Stanišić	<i>C. pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	474-10	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	HP
Gakovo	<i>C. pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	481-10	Lamiaceae	<i>Mentha arvensis</i> **	P	CMV	PN
		482-10	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	-	KL
		489-10	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	-	-
		490-10	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	ZYMV	-
		491-10	Brassicaceae	<i>S. arvensis</i> *	A	-	-
		493-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	HP
		495-10	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	-

*vrste sakupljene u usjevu; **vrste sakupljene po obodu usjeva; ¹uzorci testirani na prisustvo ZYMV, WMV, CMV i TSWV

²H-hloroza, LHP-lokalne hlorotične pjege, DL-deformacije lišća, M-mozaik, HP-hlorotične pjege, BH-blaga hloroza, P-patuljavost, PN-prosvjetljavanje nerava, BHP-blage hlorotične pjege, HOL-hloroza oboda lista, KL-klobučavost, SL-sužavanje lista, MP-mozaična prošaravanja, NP-nekrotične pjege

Tabela 27. Sakupljeni uzorci korova 2011. godine i virusi detektovani u njima

Lokalitet	Usjev	Oznaka uzorka	Familija	Vrsta	Tip	Virus	Simptomi
Belegiš	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	51-11	Caryophyllaceae	<i>S. alba</i> *	B	-	MP, LŠ, HP
		52-11	Asteraceae	<i>L. seriola</i> *	A/B	CMV	H, NP
		53-11	Brassicaceae	<i>L. draba</i> *	P	ZYMV	H, NP
		54-11	Convolvulaceae	<i>C. arvensis</i> *	P	-	Ni, ZP
		55-11	Asteraceae	<i>E. canadensis</i> *	A	-	HP
		56-11	Asteraceae	<i>A. vulgaris</i> *	P	-	HvL
		57-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	HP, DL
		58-11	Lamiaceae	<i>B. nigra</i> *	P	-	-
		59-11	Lamiaceae	<i>S. verticilata</i> *	P	CMV	HP
		62-11	Chenopodiaceae	<i>A. patula</i> *	A	-	-
		63-11	Plantaginaceae	<i>P. lanceolata</i> *	P	-	LŠ
		334-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	-
		336-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	HP
		65-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> **	A	-	HP
		67-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> **	A	-	-
		68-11	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> **	A	-	-
		69-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> **	A	WMV	-
		70-11	Asteraceae	<i>X. strumarium</i> **	A	-	-
		71-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	ZYMV	-
		375-11	Brassicaceae	<i>B. nigra</i> *	A	-	HP
		378-11	Lamiaceae	<i>S. annua</i> *	A	-	HP
		380-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	-
		381-11	Lamiaceae	<i>L. purpureum</i> *	A	-	-
		382-11	Convolvulaceae	<i>C. arvensis</i> *	P	-	M
		383-11	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	-	M
		390-11	Asteraceae	<i>Stenactis annua</i> **	A	-	H

		391-11	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i> sp. **	/	-	-
		392-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> **	A	-	-
		741-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	-
		744-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	HP
		745-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> *	A	ZYMV	H
		746-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	WMV	DL
		747-11	Lamiaceae	<i>S. annua</i> *	A	-	NP
		748-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	HP
		749-11	Brassicaceae	<i>B. nigra</i> *	A	-	-
		750-11	Boraginaceae	<i>H. europaeum</i> *	A	-	NP, H
		753-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	-	HP
		754-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	ZYMV	M, DL
		755-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> **	A	-	HP
		756-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	-	-
Irmovo	<i>C. pepo</i> 'Olinka'	91-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	-	-
		92-11	Convolvulaceae	<i>C. arvensis</i> *	P	-	N
		93-11	Poligonaceae	<i>P. persicaria</i> *	P	CMV, TSWV	-
		94-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	-
		96-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> *	A	-	-
		97-11	Brassicaceae	<i>R. austriaca</i> **	P	ZYMV	H
		99-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> **	A	-	-
		100-11	Lamiaceae	<i>M. longifolia</i> **	P	-	-
		101-11	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> **	A	-	H
		102-11	Asteraceae	<i>S. annua</i> **	A	-	-
		103-11	Brassicaceae	<i>S. arvensis</i> **	A	-	-
		104-11	Asteraceae	<i>C. arvense</i> **	P	-	H
		105-11	Convolvulaceae	<i>C. arvensis</i> **	P	-	-
		106-11	Euphorbiaceae	<i>E. salicifolia</i> **	P	-	-
		107-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> **	A	-	-
		397-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i> *	A	-	-

		399-11	Asteraceae	<i>X. strumarium</i> *	A	-	-
		412-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> *	A	-	-
		413-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	-	-
		414-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i>	A	-	-
		416-11	Polygonaceae	<i>P. aviculare</i> *	A	-	-
		417-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	-	-
		424-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	-	-
		757-11	Solanaceae	<i>D. stramonium</i> *	A	CMV	HP
		763-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> *	A	-	N
		765-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> **	A	-	H
		766-11	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> *	A	-	-
		769-11	Amaranthaceae	<i>A. retroflexus</i> **	A	-	-
		770-11	Malvaceae	<i>H. trionum</i>	A	CMV	-
		771-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> **	A	CMV	-
		772-11	Solanaceae	<i>S. nigrum</i> **	A	-	-
		773-11	Asteraceae	<i>E. canadensis</i> **	A	-	-
Staro Selo	<i>C. pepo</i>	169-11	Polygonaceae	<i>Rumex</i> sp.*	/	-	M
		174-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> *	A	-	M, SL
		175-11	Chenopodiaceae	<i>C. hybridum</i> *	A	-	M, SL
Veliko Selo	<i>C. pepo</i>	692-11	Chenopodiaceae	<i>C. album</i> *	A	WMV	DL

*vrste sakupljene u usjevu; **vrste sakupljene po obodu usjeva; †uzorci testirani na prisustvo ZYMV, WMV, CMV i TSWV

²H-hloroza, LHP-lokalne hlorotične pjege, DL-deformacije lišća, M-mozaik, HP-hlorotične pjege, BH-blaga hloroza, P-patuljavost, PN-prosvjetljavanje nerava, BHP-blage hlorotične pjege, HOL-hloroza oboda lista, KL-klobučavost, SL-sužavanje lista, MP-mozaična prošaravanja, NP-nekrotične pjege, LŠ-linijsko šarenilo, Ni-nitavost, ZP-zaostajanje u porastu, HvL-hloroza vršnih listova, N-nekroze

5.6. Prisustvo biljnih vaši u usjevima tikava i sastav njihove populacije

U trogodišnjem periodu od 2009-2011. godine na šest lokaliteta u osam usjeva *C. pepo* 'Olinka' u Vojvodini sakupljeno je i pregledano ukupno 11 uzoraka (uzorak podrazumijeva vaši sakupljene u jednoj klopci u toku vegetacije) biljnih vaši. Sakupljanje biljnih vaši obavljeno je na lokalitetu Bački Petrovac u sve tri godine istraživanja, na lokalitetu Čenej u prvoj godini ispitivanja i na lokalitetu Kisač u poslednje dvije godine ispitivanja.

5.6.1. Sastav populacije biljnih vaši sakupljenih u lovnim klopkama

Tokom trogodišnjih ispitivanja sastava populacije biljnih vaši u Vojvodini sakupljeno je ukupno 1447 jedinki. Sakupljene jedinke svrstavaju se u 57 taksona, od kojih je 37 determinisano do nivoa vrste, 17 do nivoa roda, 1 do nivoa potfamilije, a 2 do nivoa familije. Ukupno je u usjevima tikava pronađeno 37 rodova koji se svrstavaju u 7 potfamilija (Tabela 28).

Tabela 28. Taksoni biljnih vaši determinisani iz kloпки tokom tri godine istraživanja

Potfamilija	Rod	Vrsta
Anoecinae	<i>Anoecia</i>	<i>corni</i>
Aphidinae	<i>Aphis</i>	<i>craccivora</i>
		<i>fabae</i>
		<i>gossypii</i>
		<i>pomi/spiraecola</i>
		<i>sambuci</i>
		spp.
	<i>Hyalopterus</i>	<i>pruni</i>
	<i>Protaphis</i>	spp.
	<i>Rhopalosiphum</i>	<i>padi</i>
		<i>nymphaeae</i>
		<i>maidis</i>
	<i>Schizaphis</i>	<i>graminum</i>
	<i>Acyrtosiphon</i>	<i>pisum</i>
	<i>Amphorophora</i>	<i>rubi</i>
		spp.
	<i>Aulacorthum</i>	<i>solani</i>
	<i>Brachycaudus</i>	<i>cardui</i>
		<i>helichrysi</i>
		spp.
	<i>Brevicoryne</i>	<i>brassicae</i>
	<i>Capitophorus</i>	<i>eleagni</i>
		<i>horni</i>
		spp.
	<i>Cavariella</i>	spp.

	<i>Cryptomyzus</i>	<i>galeopsidis</i> <i>ribis</i> spp.
	<i>Diuraphis</i>	<i>noxia</i>
	<i>Dysaphis</i>	spp.
	<i>Hyadaphis</i>	<i>polonica</i>
	<i>Hyperomyzus</i>	<i>lactucae</i>
	<i>Lipaphis</i>	<i>erysimi</i>
	<i>Macrosiphum</i>	<i>euphorbiae</i> <i>rosae</i>
	<i>Metopolophium</i>	<i>dirhodum</i>
	<i>Myzodium</i>	<i>modestum</i>
	<i>Myzus</i>	<i>cerasi</i> <i>persicae</i>
	<i>Phorodon</i>	<i>humuli</i>
	<i>Rhopalomyzus</i>	spp.
	<i>Sitobion</i>	<i>avenae</i>
	<i>Trichosiphonaphis</i>	<i>polygonifoliae</i>
Chaitophorinae	<i>Sipha</i>	<i>maydis</i> spp.
	<i>Chaitophorus</i>	spp.
Lachninae	<i>Cinara</i>	spp.
	<i>Eulachnus</i>	spp.
Myzocallidinae	<i>Euceraphis</i>	spp.
	<i>Therioaphis</i>	<i>trifolii</i>
	<i>Tinocallis</i>	spp.
Pemphiginae	<i>Tetraneura</i>	spp.
	<i>Pemphigus</i>	spp.
Phyllaphidinae	<i>Phyllaphis</i>	<i>fagi</i>

5.6.2. Analiza diverziteta biljnih vaši po usjevima

Analiza diverziteta sakupljenih biljnih vaši obavljena je za 11 usjeva uljane tikve sa osam lokaliteta. Pošto je broj klopki po lokalitetima bio različit, u cilju poređenja diverziteta u različitim usjevima, apsolutne vrijednosti su pretvorene u relativne.

5.6.2.1. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevima u 2009. godini

Analiza diverziteta biljnih vaši u 2009. godini obavljena je na dva lokaliteta. Na lokalitetu Bački Petrovac klopke su bile postavljene u dva usjeva, dok su na lokalitetu Čenej klopke postavljene u jednom usjevu.

5.6.2.1.1. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac I

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 25. maja, a prvi uzorak je uzet 1. juna. U ovom usjevu postavljene su dvije klopke, pa su izračunate i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 29 i Tabela 30). Praćenje vaši u usjevu trajalo je osam nedjelja.

Tabela 29. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji u usjevu Bački Petrovac I

Vrsta	Datum sakupljena uzoraka iz klopki							
	1.6.	8.6.	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.	20.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	31,8	22,5	32	0	0	0	0	0
<i>Amporophora</i> sp.	4,6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	4,6	7,5	0	14,3	30,8	16,7	0	16,7
Aphididae	4,6	0	4	0	2,6	0	0	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	17,5	8	0	0	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	9	2,5	4	3,6	2,6	0	0	0
<i>Aphis gossypii</i>	0	15	4	0	0	0	50	33,3
<i>Aphis pomi</i> (<i>spiraecola</i>)	0	7,5	0	0	0	0	0	0
<i>Aphis</i> sp.	9	7,5	8	17,9	10,3	66,7	0	16,7
<i>Aulacorthum solani</i>	0	2,5	0	3,6	0	0	0	0
<i>Brevicoryne brassicae</i>	4,6	0	4	7,1	2,6	0	0	0
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	0	3,6	17,9	0	0	16,7
<i>Cinara</i> sp.	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptomyzus</i> sp.	0	0	0	0	0	16,7	0	0
<i>Diuraphis noxia</i>	0	0	0	17,9	0	0	0	0
<i>Dysaphis</i> sp.	4,6	0	0	0	2,6	0	0	0
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	2,5	0	0	0	0	50	0
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Metopolodius dirhodum</i>	13,6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Myzodius modestum</i>	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Myzus persicae</i>	4,6	2,5	24	21,4	28,2	0	0	0
Pemphigidae	0	0	0	0	2,6	0	0	0
<i>Pemphigus</i> sp.	0	0	0	3,6	0	0	0	0
<i>Phyllaphis fagi</i>	4,6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Schizaphis graminum</i>	0	2,5	4	3,6	0	0	0	0
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	4	3,6	0	0	0	0
<i>Tetraneura</i> sp.	4,6	0	0	0	0	0	0	16,7
Ukupan broj jedinki (168)	22	40	25	28	39	6	2	6

Najzastupljenija vrsta u prve tri nedjelje bila je *Acyrtosiphon pisum* koja se u kasnijim nedjeljama više nije javljala. U četvrtoj nedjelji je najzastupljenija bila *Myzus persicae*, a u petoj *Anoecia corni*. Sljedeće dvije nedjelje praćenja su bile sa niskim

diverzitetom vrsta, dok je u poslednjoj najzastupljenija bila *Aphis gossypii*. Od ukupno sakupljenih 168 jedinki najviše je bila zastupljena *Myzus persicae* koja je svoj maksimum imala u periodu od treće do šeste nedjelje.

Tabela 30. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) u usjevu Bački Petrovac I

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz kloпки								Ukupan br. jedinki
	1.6.	8.6.	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.	20.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	29,2	37,5	33,3	0	0	0	0	0	24
<i>Amporophora</i> sp.	100	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Anoecia corni</i>	4,5	13,6	0	18,2	54,5	4,5	0	4,5	22
Aphididae	33,3	0	33,3	0	33,3	0	0	0	3
<i>Aphis craccivora</i>	0	77,8	22,2	0	0	0	0	0	9
<i>Aphis fabae</i>	33,3	16,7	16,7	16,7	16,7	0	0	0	6
<i>Aphis gossypii</i>	0	60	10	0	0	0	10	20	10
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	3
<i>Aphis</i> sp.	9,1	13,6	9,1	22,7	18,2	18,2	0	9,1	22
<i>Aulacorthum solani</i>	0	50	0	50	0	0	0	0	2
<i>Brevicoryne brassicae</i>	20	0	20	40	20	0	0	0	5
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	0	11,1	77,8	0	0	11,1	9
<i>Cinara</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cryptomyzus</i> sp.	0	0	0	0	0	100	0	0	1
<i>Diuraphis noxia</i>	0	0	0	100	0	0	0	0	5
<i>Dysaphis</i> sp.	50	0	0	0	50	0	0	0	2
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	50	0	0	0	0	50	0	2
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Metopolodium dirhodum</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Myzodium modestum</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Myzus persicae</i>	4	4	24	24	44	0	0	0	25
Pemphigidae	0	0	0	0	100	0	0	0	1
<i>Pemphigus</i> sp.	0	0	0	100	0	0	0	0	1
<i>Phyllaphis fagi</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Schizaphis graminum</i>	0	33,3	33,3	33,3	0	0	0	0	3
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	50	50	0	0	0	0	2
<i>Tetraneura</i> sp.	50	0	0	0	0	0	0	50	2

Ukupno tokom osam nedjelja praćenja determinisano je 29 taksona, najveća brojnost taksona bila je u drugoj nedjelji praćenja, kada se javilo 15 različitih taksona. Veliki broj taksona se javio i u prvoj, trećoj i četvrtoj nedjelji praćenja. Takođe, i Shannon-Weaver-ov indeks ima najveću vrijednost u drugoj nedjelji praćenja (2,3380) što je prikazano u tabeli 31. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za usjev

Bački Petrovac I iznosio je 2,7536, tako da ovaj usjev možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 31. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja u usjevu Bački Petrovac I

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	12	2,1961
2.	15	2,3380
3.	11	2,0125
4.	11	2,1259
5.	9	1,7312
6.	3	0,8676
7.	2	0,6931
8.	5	1,5607

Tokom osmonedjeljnog praćenja nijedan takson se nije javio u svim nedjeljama, samo su se *Anoecia corni* i *Myzus persicae* javili u više od četiri nedjelje. Prva vrsta se javila u prvih šest nedjelja sa izuzetkom druge, dok se druga vrsta javila u prvih pet nedjelja, gdje se moglo uočiti i povećanje njene brojnosti po nedjeljama. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u drugoj nedjelji praćenja (Tabela 32).

Tabela 32. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku u usjevu Bački Petrovac I

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	5	8	66,7
2.	7	9	60
3.	1	7	63,6
4.	3	6	54,4
5.	4	5	55,5
6.	1	2	66,7
7.	0	2	100
8.	0	4	80

Često su se javljali taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u drugoj nedjelji, kada je determinisano devet taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 32).

5.6.2.1.2. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac II

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 25. maja, kao i u usjevu Bački Petrovac I, međutim usled vremenskih nepogoda prvi uzorak je uzet 15. juna, iz

klopki koje su postavljene 8. juna. U ovom usjevu postavljene su dvije klopke, pa su izračunate i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 33 i Tabela 34).

Praćenje vaši u usjevu trajalo je pet nedjelja.

Tabela 33. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji u usjevu Bački Petrovac II

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki				
	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	20,5	19,3	2,2	9,4	0
<i>Amporophora</i> sp.	1,1	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	1,1	5,3	15,2	0	1,8
Aphididae	2,3	3,5	0	1,9	5,3
<i>Aphis craccivora</i>	4,5	5,3	6,5	5,7	8,8
<i>Aphis fabae</i>	8	3,5	3,3	5,7	8,8
<i>Aphis gossypii</i>	4,5	0	1,1	20,8	12,3
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	1,1	5,3	2,2	1,9	0
<i>Aphis</i> sp.	33	8,8	12	24,5	19,3
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	1,1	0	0	0	0
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	3,5	0	3,8	0
<i>Capitophorus eleagni</i>	0	0	15,2	3,8	0
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	3,3	5,7	8,8
<i>Chiatophorus</i> sp.	1,1	0	1,1	0	0
<i>Cryptomyzus ribis</i>	0	0	0	1,9	0
<i>Diuraphis noxia</i>	0	1,8	0	0	3,5
<i>Dysaphis</i> sp.	0	0	0	1,9	0
<i>Hyadaphis polonica</i>	2,3	0	1,1	1,9	8,8
<i>Hyalopterus pruni</i>	1,1	0	2,2	1,9	0
<i>Myzus persicae</i>	15,9	42,1	27,1	5,7	3,5
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	0	0	1,9	0
<i>Protaphis</i> sp.	1,1	0	0	0	0
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	1,1	0	1,8
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	2,2	0	3,5
<i>Schizaphis graminum</i>	0	1,8	1,1	0	8,8
<i>Sipha</i> sp.	0	0	0	0	1,8
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	3,3	0	0
<i>Tetraneura</i> sp.	0	0	0	0	1,8
<i>Therioaphis trifolii</i>	0	0	0	1,9	1,8
<i>Trichosiphonaphis polygonifoliae</i>	1,1	0	0	0	0
Ukupan broj jedinki (347)	88	57	92	53	57

Najzastupljenija vrsta u prvoj nedjelji bila je *Acyrtosiphon pisum*, u drugoj i trećoj *Myzus persicae*, dok je u četvrtoj i petoj nedjelji najzastupljenija bila *Aphis gossypii*. Od ukupno sakupljenih 347, ponovo je sa najviše jedinki bila zastupljena *Myzus persicae* koja je svoj maksimum imala u prve tri nedjelje, ali je utvrđena i u ostalim nedjeljama praćenja.

Tabela 34. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) u usjevu Bački Petrovac II

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki					Ukupan br. jedinki
	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	50	30,6	6,67	13,8	0	36
<i>Amporophora</i> sp.	100	0	0	0	0	1
<i>Anoecia corni</i>	5,3	15,8	73,7	0	5,3	19
Aphididae	25	25	0	12,5	37,5	8
<i>Aphis craccivora</i>	19	14,3	28,6	14,3	23,8	21
<i>Aphis fabae</i>	35	10	15	15	25	20
<i>Aphis gossypii</i>	17,4	0	4,3	47,8	30,4	23
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	14,3	42,9	28,6	14,3	0	7
<i>Aphis</i> sp.	42	7,2	15,9	18,8	15,9	69
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	100	0	0	0	0	1
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	50	0	50	0	4
<i>Capitophorus eleagni</i>	0	0	87,5	12,5	0	16
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	27,3	27,3	45,5	11
<i>Chiatophorus</i> sp.	50	0	50	0	0	2
<i>Cryptomyzus ribis</i>	0	0	0	100	0	1
<i>Diuraphis noxia</i>	0	33,3	0	0	67,3	3
<i>Dysaphis</i> sp.	0	0	0	100	0	1
<i>Hyadaphis polonica</i>	22,2	0	11,1	11,1	55,5	9
<i>Hyalopterus pruni</i>	25	0	50	25	0	4
<i>Myzus persicae</i>	20,6	35,3	36,8	4,4	2,9	68
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	0	0	100	0	1
<i>Protaphis</i> sp.	100	0	0	0	0	1
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	50	0	50	2
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	50	0	50	4
<i>Schizaphis graminum</i>	0	14,3	14,3	0	71,4	7
<i>Sipha</i> sp.	0	0	0	0	100	1
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	100	0	0	3
<i>Tetraneura</i> sp.	0	0	0	0	100	1
<i>Therioaphis trifolii</i>	0	0	0	50	50	2
<i>Trichosiphonaphis poligonifoliae</i>	100	0	0	0	0	1

Tokom pet nedjelja praćenja determinisano je 30 taksona, najveća brojnost taksona bila je u drugoj i trećoj nedjelji praćenja, kada se javilo po 17 različitih taksona. U svim nedjeljama praćenja javio se veliki broj taksona. Shannon-Weaver-ov indeks ima najveću vrijednost u petoj nedjelji praćenja (2,5046) što je prikazano u tabeli 35. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za usjev Bački Petrovac II iznosio je 2,6165, tako da i ovaj usjev možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 35. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja u usjevu Bački Petrovac II

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	16	2,0443
2.	11	1,8546
3.	17	2,2726
4.	17	2,3906
5.	16	2,5046

Čak tri takson su se javila u svim nedjeljama praćenja, a to su *Aphis craccivora*, *Aphis fabae* i *Myzus persicae*. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u prvoj i petoj nedjelji praćenja, po sedam (Tabela 36).

Tabela 36. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku u usjevu Bački Petrovac II

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	7	8	50
2.	1	2	18,1
3.	4	5	29,4
4.	4	8	47,1
5.	7	5	31,3

Taksoni koji su imali samo jednu jedinku su se javljali u manjem broju u odnosu na usjev Bački Petrovac I. Najviše ih je bilo u prvoj i četvrtoj nedjelji, kada je determinisano po osam taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 36).

5.6.2.1.3. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Čenej

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 25. maja, a prvi uzorak je uzet 1. juna. U ovom usjevu postavljene su dvije klopke, pa su izračunate i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 37 i Tabela 38). Praćenje vaši na ovom lokalitetu trajalo je sedam nedjelja.

Tabela 37. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji na lokalitetu Čenej

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki						
	1.6.	8.6.	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	17,8	12,5	23,5	0	0	0	0
<i>Amporophora</i> sp.	0	0	1,5	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	4,2	13,2	18,5	0	0	0
<i>Aphis craccivora</i>	4,4	7,3	4,4	3,7	0	0	0

<i>Aphis fabae</i>	8,8	7,3	8,8	3,7	0	0	50
<i>Aphis gossypii</i>	17,8	4,2	5,9	14,8	0	0	0
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	11,1	6,3	0	0	0	0	0
<i>Aphis sp.</i>	15,5	20,8	20,6	22,2	100	0	50
<i>Aulacorthum solani</i>	2,2	4,2	0	0	0	0	0
<i>Brachycaudus cardui</i>	2,2	0	0	0	0	0	0
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Brevicoryne brassicae</i>	2,2	2,1	0	0	0	0	0
<i>Cinara sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Diuraphis noxia</i>	2,2	0	0	3,7	0	0	0
<i>Dysaphis sp.</i>	0	5,2	0	0	0	100	0
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	1,5	0	0	0	0
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	0	1	1,5	0	0	0	0
<i>Metopolodius dirhodum</i>	0	1	1,5	0	0	0	0
<i>Myzus cerasi</i>	0	0	0	7,4	0	0	0
<i>Myzus persicae</i>	11,1	13,5	14,7	18,5	0	0	0
<i>Pemphigus sp.</i>	2,2	2,1	0	0	0	0	0
<i>Protaphis sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Rhopalomyzus sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	2,9	0	0	0	0
<i>Sipha maydis</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Sitobion avenae</i>	0	1	0	7,4	0	0	0
<i>Tetraneura sp.</i>	2,2	0	0	0	0	0	0
<i>Therioaphis trifolii</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Tinocallis sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0
Ukupan broj jedinki (240)	45	96	68	27	1	1	2

Najzastupljenije vrsta u prvoj nedjelja bile su *Acyrtosiphon pisum* i *Aphis gossypii*. Druge nedjelje najzastupljenija je bila *Myzus persicae*, a treće *Acyrtosiphon pisum*. U četvrtoj nedjelji najzastupljenije su bile *Myzus persicae* i *Anoecia corni*. Sljedeće tri nedjelje praćenja su bile sa veoma malim brojem ulovljenih jedinki. Od ukupno sakupljenih 240 jedinki najviše je bila zastupljena *Acyrtosiphon pisum* koja je svoj maksimum imala u trećoj nedjelji, posle koje se više nije javljala.

Tabela 38. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) na lokalitetu Čenej

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopi							Ukupan br. jedinki
	1.6.	8.6.	15.6.	22.6.	29.6.	6.7.	13.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	22,2	33,3	44,4	0	0	0	0	36
<i>Amporophora sp.</i>	0	0	100	0	0	0	0	1
<i>Anoecia corni</i>	0	22,2	50	27,7	0	0	0	18
<i>Aphis craccivora</i>	15,4	53,8	23,1	7,8	0	0	0	13
<i>Aphis fabae</i>	21	36,8	31,6	5,3	0	0	5,3	19
<i>Aphis gossypii</i>	40	20	20	20	0	0	0	20
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	45,5	54,5	0	0	0	0	0	11

<i>Aphis</i> sp.	14,3	40,8	28,6	12,2	2	0	2	49
<i>Aulacorthum solani</i>	20	80	0	0	0	0	0	5
<i>Brachycaudus cardui</i>	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Brevicoryne brassicae</i>	33,3	66,7	0	0	0	0	0	3
<i>Cinara</i> sp.	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Diuraphis noxia</i>	50	0	0	50	0	0	0	2
<i>Dysaphis</i> sp.	0	83,3	0	0	0	16,7	0	6
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	100	0	0	0	0	1
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	0	50	50	0	0	0	0	2
<i>Metopolodium dirhodum</i>	0	50	50	0	0	0	0	2
<i>Myzus cerasi</i>	0	0	0	100	0	0	0	2
<i>Myzus persicae</i>	15,2	39,4	30,3	15,2	0	0	0	33
<i>Pemphigus</i> sp.	33,3	66,7	0	0	0	0	0	3
<i>Protaphis</i> sp.	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Rhopalomyzus</i> sp.	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	100	0	0	0	0	2
<i>Sipha maydis</i>	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Sitobion avenae</i>	0	33,3	0	66,7	0	0	0	3
<i>Tetraneura</i> sp.	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Therioaphis trifolii</i>	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Tinocallis</i> sp.	0	100	0	0	0	0	0	1

Ukupno tokom osam nedjelja praćenja determinisano je 29 taksona, najveća brojnost taksona bila je u drugoj nedjelji praćenja, kada su se javila 22 različita taksona. Veći broj taksona javio se i u prvoj, trećoj i četvrtoj nedjelji praćenja. Takođe, i Shannon-Weaver-ov indeks ima najveću vrijednost u drugoj nedjelji praćenja (2,6005) što je prikazano u tabeli 39. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za lokalitet Čenej iznosio je 2,5681, tako da ovaj usjev možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 39. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja na lokalitetu Čenej

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	13	2,2529
2.	22	2,6005
3.	12	2,0859
4.	9	1,9935
5.	1	0
6.	1	0
7.	2	0,6931

Tokom sedam nedjelja praćenja nijedan takson se nije javio u svim nedjeljama, a zanimljivo je i to da su se u posljednje tri nedjelje javila samo tri taksona koja su bila

zastupljena sa ukupno četiri jedinke. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u drugoj nedjelji praćenja (Tabela 40).

Tabela 40. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku na lokalitetu Čenej

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maksimum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	2	6	46,2
2.	14	10	45,5
3.	5	4	33,3
4.	2	3	33,3
5.	0	1	100
6.	0	1	100
7.	0	2	100

Ponovo su se često javljali taksoni koji su imali samo po jednu jedinku. Najviše ih je bilo u drugoj nedjelji, kada je determinisano deset taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 40).

5.6.2.2. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevima u 2010. godini

Analiza diverziteta biljnih vaši u 2010. godini obavljena je kao i 2009. godine na dva lokaliteta. Pored lokaliteta Bački Petrovac na kom su klopke su bile postavljene u dva usjeva, klopke su postavljene i u jednom usjevu na lokalitetu Kisač.

5.6.2.2.1. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac I

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 26. maja, a prvi uzorak je uzet 2. juna. U ovom usjevu postavljena je jedna klopka, a izračunate su i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 41 i Tabela 42). Praćenje vaši u usjevu trajalo je šest nedjelja.

Tabela 41. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji u usjevu Bački Petrovac I

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki					
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	40	27,7	44,4	0	0	0
<i>Amporophora rubi</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	1,5	0	0	100	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	9,2	11,1	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	10	16,9	22,2	0	0	0

<i>Aphis gossypii</i>	0	4,6	0	0	0	0
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	3,1	0	0	0	0
<i>Aphis sp.</i>	10	12,3	0	0	0	100
<i>Brachycaudus helycrisi</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Brevicoryne brassicae</i>	10	0	0	0	0	0
<i>Capitophorus sp.</i>	0	0	11,1	0	0	0
<i>Capitophorus horni</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Dysaphis sp.</i>	10	0	0	0	0	0
<i>Eucarapis sp.</i>	20	0	0	0	0	0
<i>Hyalopterus pruni</i>	0	6,2	0	0	0	0
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	3,1	0	0	0	0
<i>Myzus persicae</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Pemphigus sp.</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	1,5	0	0	0	0
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	11,1	0	0	0
<i>Tetraneura sp.</i>	0	6,2	0	0	0	0
Ukupan broj jedinki (87)	10	65	9	0	1	2

Najzastupljenija vrsta u prve tri nedjelje bila je *Acyrtosiphon pisum*, koja se u kasnijim nedjeljama više nije javljala. U četvrtoj nedjelji nijedna vrsta nije uhvaćena. U sljedeće dvije nedjelje praćenja u klopka je nađen veoma mali broj jedinki. Od ukupno sakupljenih 87 jedinki najviše je bila zastupljena *Acyrtosiphon pisum*.

Tabela 42. Relativna brojnost taksona (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) u usjevu Bački Petrovac I

Vrsta	Datum sakupljena uzoraka iz klopki						Ukupan br. jedinki
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	15,4	69,2	15,4	0	0	0	26
<i>Amporophora rubi</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Anoecia corni</i>	0	50	0	0	50	0	2
<i>Aphis craccivora</i>	0	85,7	14,3	0	0	0	7
<i>Aphis fabae</i>	7,1	78,6	14,3	0	0	0	14
<i>Aphis gossypii</i>	0	100	0	0	0	0	3
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	100	0	0	0	0	2
<i>Aphis sp.</i>	9,1	72,7	0	0	0	18,2	11
<i>Brachycaudus helycrisi</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Brevicoryne brassicae</i>	100	0	0	0	0	0	1
<i>Capitophorus sp.</i>	0	0	100	0	0	0	1
<i>Capitophorus horni</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Dysaphis sp.</i>	100	0	0	0	0	0	1
<i>Eucarapis sp.</i>	100	0	0	0	0	0	2
<i>Hyalopterus pruni</i>	0	100	0	0	0	0	4
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	100	0	0	0	0	2
<i>Myzus persicae</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Pemphigus sp.</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	100	0	0	0	0	1

<i>Sitobion avenae</i>	0	0	100	0	0	0	1
<i>Tetraneura sp.</i>	0	100	0	0	0	0	4

Tokom šest nedjelja praćenja determinisan je 21 taksona, najveća brojnost taksona bila je u drugoj nedjelji praćenja, kada se javilo 16 različitih taksona. Takođe, i Shannon-Weaver-ov indeks ima najveću vrijednost u drugoj nedjelji praćenja (2,2829) što je prikazano u tabeli 43. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za usjev Bački Petrovac I iznosio je 2,3787, tako da ovaj usjev možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 43. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja u usjevu Bački Petrovac I

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	6	1,6094
2.	16	2,2829
3.	5	1,4271
4.	0	0
5.	1	0
6.	1	0

Tokom šest nedjelja praćenja nijedan takson se nije javio u svim nedjeljama, samo su se *Acyrtosiphon pisum* i *Aphis fabae* javili u tri nedjelje i to u prve tri nedjelje praćenja. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u drugoj nedjelji praćenja (Tabela 44).

Tabela 44. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku u usjevu Bački Petrovac I

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	3	5	83,3
2.	15	6	37,5
3.	2	3	60
4.	0	0	0
5.	0	1	100
6.	0	0	0

Često su se javljali taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u drugoj nedjelji, kada je determinisano šest taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 44).

5.6.2.2.2. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevu Bački Petrovac II

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 26. maja, a prvi uzorak je uzet 2. juna. U ovom usjevu postavljena je jedna klopka, a izračunate su i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 45 i Tabela 46). Praćenje vaši u usjevu trajalo je šest nedjelja.

Tabela 45. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji u usjevu Bački Petrovac II

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki					
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0	27,3	13,8	0	0	5,6
<i>Amporophora</i> sp.	0	6,1	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	0	0	0	4,8	2,8
Aphididae	33,3	0	0	0	4,8	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	6,1	0	0	0	5,6
<i>Aphis fabae</i>	0	12,1	3,4	0	14,3	0
<i>Aphis gossypii</i>	0	0	6,9	0	0	5,6
<i>Aphis pomi</i> (<i>spiraecola</i>)	0	0	0	0	9,5	0
<i>Aphis</i> sp.	33,3	9,1	55,2	0	33,3	58,3
<i>Brachycaudus helycrisi</i>	0	3	3,4	0	4,8	5,6
<i>Brevicoryne brassicae</i>	33,3	0	0	0	0	0
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	0	0	0	2,8
<i>Cavariella</i> sp.	0	0	0	0	4,8	0
<i>Dysaphis</i> sp.	0	6,1	0	0	0	0
<i>Hyalopterus pruni</i>	0	0	0	0	0	5,6
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	10,3	0	4,8	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	0	3,4	0	0	0
<i>Myzus cerasi</i>	0	3	0	0	0	0
<i>Myzus persicae</i>	0	0	0	0	0	2,8
<i>Phorodon humuli</i>	0	3	0	0	0	0
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	0	3,4	0	4,8	0
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	0	0	9,5	0
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	0	0	0	2,8
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	0	0	4,8	0
<i>Tetraneura</i> sp.	0	12,1	0	0	0	0
<i>Trichosiphonaphis poligonifoliae</i>	0	0	0	0	0	2,8
Ukupan broj jedinki (87)	3	33	29	0	21	36

Najzastupljenije vrste u prvoj nedjelji bile su *Aphis craccivora* i *Brevicoryne brassicae*, dok je u drugoj i trećoj nedjelji najzastupljenija bila *Acyrtosiphon pisum*. U četvrtoj nedjelji nijedna vrsta nije uhvaćena. Tokom pete nedjelje najzastupljenija je bila *Aphis fabae*, da bi u poslednjoj nedjelji pet vrsta imalo

jednaku zastupljenost. Od ukupno sakupljenih 87 jedinki najviše je bila zastupljena *Acyrtosiphon pisum*.

Tabela 46. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) u usjevu Bački Petrovac II

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki						Ukupan br. jedinki
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0	60	26,7	0	0	13,3	15
<i>Amporophora</i> sp.	0	100	0	0	0	0	2
<i>Anoecia corni</i>	0	0	0	0	50	50	2
Aphididae	50	0	0	0	50	0	2
<i>Aphis craccivora</i>	0	50	0	0	0	50	4
<i>Aphis fabae</i>	0	50	12,5	0	37,5	0	8
<i>Aphis gossypii</i>	0	0	50	0	0	50	4
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	0	0	0	100	0	2
<i>Aphis</i> sp.	1,9	13,5	30,8	0	13,5	40,4	52
<i>Brachycaudus helycrisi</i>	0	10	10	0	10	20	5
<i>Brevicoryne brassicae</i>	100	0	0	0	0	0	1
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	0	0	0	100	1
<i>Cavariella</i> sp.	0	0	0	0	100	0	1
<i>Dysaphis</i> sp.	0	100	0	0	0	0	2
<i>Hyalopterus pruni</i>	0	0	0	0	0	100	2
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	75	0	25	0	4
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	0	100	0	0	0	1
<i>Myzus cerasi</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Myzus persicae</i>	0	0	0	0	0	100	1
<i>Phorodon humuli</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Phyllaphis fagi</i>	0	0	50	0	50	0	2
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	0	0	0	0	100	0	2
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	0	0	0	100	1
<i>Sitobion avenae</i>	0	0	0	0	100	0	1
<i>Tetraneura</i> sp.	0	100	0	0	0	0	4
<i>Trichosiphonaphis poligonifoliae</i>	0	0	0	0	0	100	1

Ukupno je tokom šest nedjelja praćenja determinisano 26 taksona, najveća brojnost taksona bila je u petoj i šestoj nedjelji praćenja, kada se javilo po 11 različitih taksona. Dok je Shannon-Weaver-ovi indeks imao najveću vrijednost u petoj nedjelji praćenja (2,1069) što je prikazano u tabeli 47. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za usjev Bački Petrovac II iznosio je 2,2065, tako da ovaj usjev možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 47. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja u usjevu Bački Petrovac II

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	3	1,0986

2.	10	2,0224
3.	8	1,4849
4.	0	0
5.	11	2,1069
6.	11	1,6150

Tokom šest nedjelja praćenja nijedan takson se nije javio u svim nedjeljama, samo su se *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* i *Brachycaudus helycrisi* javili u tri nedjelje. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u drugoj i šestoj nedjelji praćenja (Tabela 48).

Tabela 48. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku u usjevu Bački Petrovac II

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	1	3	100
2.	7	3	30
3.	3	4	50
4.	0	0	0
5.	4	7	63,6
6.	7	5	45,5

Često su se javljali taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u petoj nedjelji, kada je determinisano sedam taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 48).

5.6.2.2.3. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Kisač

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 26. maja, a prvi uzorak je uzet 2. juna. U ovom usjevu postavljena je jedna klopka, a izračunate su i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 49 i Tabela 50). Praćenje vaši u usjevu trajalo je šest nedjelja.

Tabela 49. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji na lokalitetu Kisač

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki					
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0	58,3	9,1	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	0	0	0	33,3	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	16,7	0	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	100	0	18,2	0	0	0
<i>Aphis gossypii</i>	0	8,3	0	0	0	0

<i>Aphis</i> sp.	0	16,7	54,5	0	33,3	100
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	0	9,1	0	0	0
<i>Rhopalosiphum nymphae</i>	0	0	0	0	33,3	0
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	9,1	0	0	0
Ukupan broj jedinki (29)	1	12	11	0	3	2

Najzastupljenija vrsta u prvoj i trećoj nedjelji bila je *Aphis fabae*, u drugoj *Acyrtosiphon pisum*. U četvrtoj nedjelji nijedna vrsta nije uhvaćena. U sljedeće dvije nedjelje praćenja, kao i u prvoj u klopama je nađen veoma mali broj jedinki. Od ukupno sakupljenih 29 jedinki najviše je bila zastupljena *Acyrtosiphon pisum*.

Tabela 50. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) na lokalitetu Kisač

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki						Ukupan br. jedinki
	2.6.	9.6.	16.6.	23.6.	30.6.	7.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0	87,5	12,5	0	0	0	8
<i>Anoecia corni</i>	0	0	0	0	100	0	1
<i>Aphis craccivora</i>	0	100	0	0	0	0	2
<i>Aphis fabae</i>	33,3	0	66,7	0	0	0	3
<i>Aphis gossypii</i>	0	100	0	0	0	0	1
<i>Aphis</i> sp.	0	18,2	54,5	0	9,1	18,2	11
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	0	100	0	0	0	1
<i>Rhopalosiphum nymphae</i>	0	0	0	0	100	0	1
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	100	0	0	0	1

Tokom šest nedjelja praćenja deteminisano je 9 taksona, najveća brojnost taksona bila je u drugoj i trećoj nedjelji praćenja, kada se javilo po 5 različitih taksona, dok Shannon-Weaver-ov indeks ima najveću vrijednost u petoj nedjelji praćenja (0,7324) što je prikazano u tabeli 51. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta za lokalitet Kisač iznosio je 1,7227, tako da je ovaj lokalitet možemo da kažemo da ne spada u kategoriju bogatih po diverzitetu vaši.

Tabela 51. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja na lokalitetu Kisač

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	1	0
2.	5	0,5306
3.	5	0,6406
4.	0	0
5.	3	0,7324
6.	1	0

Tokom šest nedjelja praćenja nijedan takson se nije javio u svim nedjeljama. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u trećoj nedjelji praćenja (Tabela 52).

Tabela 52. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku na lokalitetu Kisač

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	0	1	100
2.	3	1	20
3.	4	3	30
4.	0	0	0
5.	2	3	100
6.	0	0	0

Iako se na ovom lokalitetu javio veoma mali broj taksona, javljali su se i taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u trećoj i petoj nedjelji, kada je determinisano po pet taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 52).

5.6.2.3. Analiza diverziteta biljnih vaši u usjevima u 2011. godini

Analiza diverziteta biljnih vaši u 2011. godini obavljena je kao i prve dvije godine na dva lokaliteta. Dva usjeva u kojima su postavljene klopke bili su u Bačkom Petrovcu i Kisaču.

5.6.2.3.1. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Bački Petrovac

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 30. maja, a prvi uzorak je uzet 6. juna. U ovom usjevu postavljena je jedna klopka, a izračunate su i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 53 i Tabela 54). Praćenje vaši u usjevu trajalo je sedam nedjelja.

Tabela 53. Relativna brojnost taksona vaši (%) i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji na lokalitetu Bački Petrovac

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki						
	6.6.	13.6.	20.6.	27.6.	4.7.	11.7.	18.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	31,6	20	5,4	0,83	0,53	0	0
<i>Amporophora</i> spp.	5,3	0	0	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	0	1,8	5	10,1	0	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	0	1,8	9,2	5,8	0	0
<i>Aphis fabae</i>	21,1	20	35,7	27	37	33,3	25
<i>Aphis gossypii</i>	0	13,3	3,6	5	2,1	0	0
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	0	0	1,7	1,1	0	25
<i>Aphis sambuci</i>	0	6,67	0	0	0	0	0
<i>Aphis</i> sp.	21,1	6,67	3,6	17,5	5,3	33,3	50

Aphididae	0	26,7	8,9	6,7	4,2	33,3	0
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	0	0	1,7	0	0	0
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	1,8	2,5	2,7	0	0
<i>Caetophorus</i> sp.	0	0	0	0	0,53	0	0
<i>Cryptomyzus galeopsidi</i>	0	0	0	0,83	0	0	0
<i>Cryptomyzus ribis</i>	0	0	0	0,83	2,1	0	0
<i>Hyalopterus pruni</i>	10,5	0	1,8	0	0,53	0	0
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	0	1,7	1,1	0	0
<i>Eulachnus</i> sp.	0	0	0	0	0,53	0	0
<i>Lipaphis erysimi</i>	0	0	0	0	1,6	0	0
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	5,3	0	0	0	3,2	0	0
<i>Metopolophium dirhodum</i>	0	0	8,9	3,3	2,1	0	0
<i>Myzus persicae</i>	5,3	0	19,6	17,5	29	0	0
Myzocalidinae	0	0	0	0,83	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	7,1	1,7	2,7	0	0
<i>Sitobion avenae</i>	0	6,67	0	0	0,53	0	0
<i>Shizaphis graminum</i>	0	0	0	0	0,53	0	0
<i>Tetraneura</i> sp.	0	0	0	0,83	0	0	0
<i>Trichosiphonaphis polygonifoliae</i>	0	0	0	0	0,53	0	0
Ukupan broj jedinki (410)	19	15	56	120	189	3	8

Najzastupljenija vrsta u prvoj nedjelji bila je *Acyrtosiphon pisum*, koja je zajedno sa *Aphis fabae* bila najzastupljenija u drugoj nedjelji. U trećoj, četvrtoj i petoj nedjelji najzastupljenija je bila *Aphis fabae*. U posljednje dvije nedjelje praćenja u klopama je nađen veoma mali broj jedinki. Od ukupno sakupljenih 410 jedinki najviše je bila zastupljena *Aphis fabae*.

Tabela 54. Relativna brojnost taksona vaši (%) kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) na lokalitetu Bački Petrovac

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki							Ukupan br. jedinki
	6.6.	13.6.	20.6.	27.6.	4.7.	11.7.	18.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	42,9	21,4	21,4	7,1	7,1	0	0	14
<i>Amporophora</i> spp.	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Anoecia corni</i>	0	0	3,9	20,7	73,1	0	0	26
<i>Aphis craccivora</i>	0	0	4,3	47,8	47,8	0	0	23
<i>Aphis fabae</i>	3,1	2,4	15,7	21,3	55,1	0,79	1,6	127
<i>Aphis gossypii</i>	0	14,3	14,3	42,9	28,6	0	0	14
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	0	0	33,3	33,3	0	33,3	6
<i>Aphis sambuci</i>	0	100	0	0	0	0	0	1
<i>Aphis</i> sp.	9,3	2,3	4,7	48,8	23,3	2,3	9,3	43
Aphididae	0	15,4	19,2	30,8	30,8	3,8	0	26
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	0	0	100	0	0	0	2
<i>Capitophorus</i> sp.	0	0	11,1	33,3	55,5	0	0	9
<i>Caetophorus</i> sp.	0	0	0	0	100	0	0	1
<i>Cryptomyzus galeopsidi</i>	0	0	0	100	0	0	0	1
<i>Cryptomyzus ribis</i>	0	0	0	20	80	0	0	5

<i>Hyalopterus pruni</i>	50	0	25	0	25	0	0	4
<i>Hyadaphis polonica</i>	0	0	0	50	50	0	0	4
<i>Eulachnus</i> sp.	0	0	0	0	100	0	0	1
<i>Lipaphis erysimi</i>	0	0	0	0	100	0	0	3
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	14,3	0	0	0	85,7	0	0	7
<i>Metopolophium dirhodum</i>	0	0	38,5	30,8	30,8	0	0	13
<i>Myzus persicae</i>	1,6	0	17,7	33,9	46,8	0	0	62
Myzocalidinae	0	0	0	100	0	0	0	1
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0	0	36,4	18,2	45,5	0	0	11
<i>Sitobion avenae</i>	0	50	0	0	50	0	0	2
<i>Shizaphis graminum</i>	0	0	0	0	100	0	0	1
<i>Tetraneura</i> sp.	0	0	0	100	0	0	0	1
<i>Trichosiphonaphis polygonifoliae</i>	0	0	0	0	100	0	0	1

Tokom sedam nedjelja praćenja determinisano je 28 taksona, najveća brojnost taksona bila je u petoj nedjelji praćenja, kada su se javila 22 različita taksona. Veliki broj taksona javio se i u četvrtoj nedjelji u kojoj najveću vrijednost ima i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta (2,3228) što je prikazano u tabeli 55. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta lokaliteta Bački Petrovac iznosio je 2,4129, tako da ovaj lokalitet možemo da svrstamo u kategoriju srednjih po bogatstvu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 55. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja na lokalitetu Bački Petrovac

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	7	1,7220
2.	7	1,8065
3.	12	1,9896
4.	18	2,3228
5.	22	2,2440
6.	3	1,0986
7.	3	1,0397

Tokom sedam nedjelja praćenja samo se *Aphis fabae* javio u svim nedjeljama, a najveću zastupljenost imao je u petoj nedjelji praćenja. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u petoj nedjelji praćenja (Tabela 56).

Tabela 56. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku na lokalitetu Bački Petrovac

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maximum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	3	3	42,9
2.	1	3	42,9
3.	1	4	33,3

4.	6	5	27,8
5.	12	7	31,8
6.	0	3	100
7.	0	0	0

Često su se javljali taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u petoj nedjelji, kada je determinisano sedam taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 56).

5.6.2.3.2. Analiza diverziteta biljnih vaši na lokalitetu Kisač

Ispitivani lokalitet se nalazi u okrugu Južna Bačka, klopke su bile postavljene u usjevu *C. pepo* var. *styriaca*. Postavljanje klopki obavljeno je 30. maja, a prvi uzorak je uzet 6. juna. U ovom usjevu postavljena je jedna klopka, a izračunate su i prikazane relativne brojnosti svih vrsta vaši (Tabela 57 i Tabela 58). Praćenje vaši u usjevu trajalo je sedam nedjelja.

Tabela 57. Relativna brojnost (%) taksona vaši i ukupan broj jedinki u svakoj nedjelji na lokalitetu Bački Petrovac

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki						
	6.6.	13.6.	20.6.	27.6.	4.7.	11.7.	18.7.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	13,8	17,4	6,7	14,3	0	0	0
<i>Amporophora</i> spp.	3,4	4,3	6,7	0	0	0	0
<i>Anoecia corni</i>	0	0	6,7	14,3	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	48,3	43,5	0	0	33,3	0	100
<i>Aphis gossypii</i>	6,9	8,7	6,7	14,3	0	0	0
<i>Aphis pomi</i> (<i>spiraecola</i>)	0	0	0	0	66,7	0	0
<i>Aphis</i> sp.	3,4	17,4	20	14,3	0	0	0
<i>Aulacorthum solani</i>	3,4	4,3	0	0	0	0	0
Aphididae	0	4,3	46,7	28,6	0	100	0
<i>Brachycaudus</i> sp.	3,4	0	0	0	0	0	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	0	6,7	0	0	0	0
<i>Myzus persicae</i>	10,3	0	0	0	0	0	0
<i>Tetraneura</i> sp.	6,9	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosiphonaphis poligonifoliae</i>	0	0	0	14,3	0	0	0
Ukupan broj jedinki (79)	29	23	15	7	3	1	1

Najzastupljenija vrsta u prve dvije nedjelje bila je *Aphis fabae*. Od vrsta uhvaćenih u trećoj nedjelji jednako su zastupljene bile *Acyrtosiphon pisum*, *Anoecia corni* i *Macrosiphum rosae*, dok je u ostalim nedjeljama do kraja praćenja u klopka uhvaćen veoma mali broj vrsta. Od ukupno sakupljenih 79 jedinki najviše je bila zastupljena *Aphis fabae*.

Tabela 58. Relativna brojnost (%) taksona vaši kroz nedjelje (vremenska dinamika svakog taksona) na lokalitetu Bački Petrovac

Vrsta	Datum sakupljana uzoraka iz klopki							Ukupan br. jedinki
	6.6.	13.6.	20.6.	27.6	4.7.	11.7.	18.7.	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	40	40	10	10	0	0	0	10
<i>Amporophora</i> spp.	33,3	33,3	33,3	0	0	0	0	3
<i>Anoecia corni</i>	0	0	50	50	0	0	0	2
<i>Aphis fabae</i>	53,8	38,5	0	0	3,8	0	3,8	26
<i>Aphis gossypii</i>	33,3	33,3	16,7	16,7	0	0	0	6
<i>Aphis pomi (spiraecola)</i>	0	0	0	0	100	0	0	2
<i>Aphis</i> sp.	11,1	44,4	33,3	11,1	0	0	0	9
<i>Aulacorthum solani</i>	50	50	0	0	0	0	0	2
Aphididae	0	9,1	63,6	18,2	0	9,1	0	11
<i>Brachycaudus</i> sp.	100	0	0	0	0	0	0	1
<i>Macrosiphum rosae</i>	0	0	100	0	0	0	0	1
<i>Myzus persicae</i>	100	0	0	0	0	0	0	3
<i>Tetraneura</i> sp.	100	0	0	0	0	0	0	2
<i>Trichosiphonaphis polygonifoliae</i>	0	0	0	100	0	0	0	1

U toku sedam nedjelja praćenja determinisano je 14 taksona, najveća brojnost taksona bila je u prvoj nedjelji praćenja, kada se javilo devet različitih taksona. Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta je pokazao najveću vrijednost u četvrtoj nedjelji praćenja (1,7479) što je prikazano u tabeli 59. Ukupan Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta lokaliteta u Kisaču iznosio je 2,3629, tako da ovaj lokalitet ne možemo svrstati u kategoriju bogatih po sastavu i ujednačenosti afidofaune.

Tabela 59. Apsolutni broj taksona vaši i Shannon-Weaver-ov indeks diverziteta u svakoj nedjelji praćenja na lokalitetu Kisač

Nedjelja	Apsolutni broj	Shannon-Weaver indeks
1.	9	1,6928
2.	7	1,5919
3.	7	1,5802
4.	6	1,7479
5.	2	0,6365
6.	1	0
7.	1	0

Tokom sedam nedjelja praćenja nijedna takson se nije javio u svim nedjeljama. Najveći broj taksona imao je svoj maksimum u prvoj nedjelji praćenja (Tabela 60).

Tabela 60. Broj taksona vaši koji imaju maksimum u određenoj nedjelji i broj taksona koji imaju samo po jednu jedinku na lokalitetu Kisač

Nedjelja	Broj taksona koji imaju maksimum u određenoj nedjelji	Apsolutni broj taksona sa 1 jedinkom	Relativni broj taksona sa 1 jedinkom (%)
1.	4	4	44,4
2.	1	3	42,9
3.	2	5	71,4
4.	1	5	83,3
5.	1	1	50
6.	0	1	100
7.	0	1	100

Često su se javljali taksoni koji su imali samo jednu jedinku. Najviše ih je bilo u trećoj i četvrtoj nedjelji, kada je determinisano po pet taksona sa samo po jednom jedinkom (Tabela 60).

5.6.2.4. Usporedna analiza afidofaune po usjevima uljane tikve, lokalitetima i godinama

Tokom trogodišnjih ispitivanja sastava populacije biljnih vaši u Vojvodini sakupljeno je ukupno 1447 jedinki. Uzorci su sakupljeni iz osam usjeva koji su se nalazili u šest lokaliteta u okrugu Južna Bačka u Vojvodini. Najveći broj jedinki uhvaćen je na lokalitetu Bački Petrovac 2011. godine, kad je uhvaćeno 410 jedinki, što predstavlja 28,3% od ukupnog broja uhvaćenih jedinki, dok je najmanje jedinki 29 (2%) uhvaćeno na lokalitetu Kisač 2010. godine. U tabeli 61 prikazan je raspored jedinki uhvaćenih po usjevima, lokalitetima i godinama.

Tabela 61. Raspored uhvaćenih jedinki po usjevima

Godina	Lokalitet	Usjev	Broj uhvaćenih jedinki (%)	Broj uhvaćenih taksona
2009.	Bački Petrovac	Bački Petrovac I	168 (11,6)	29
		Bački Petrovac II	347 (24)	17
		Čenej	240 (16,6)	29
2010.	Bački Petrovac	Bački Petrovac I	87 (6)	21
		Bački Petrovac II	87 (6)	26
		Kisač	29 (2)	9
2011.	Bački Petrovac	Bački Petrovac	410 (28,3)	22
		Kisač	79 (5,6)	14

Od pojedinačnih vrsta, u klopnama najčešće su se nalazile jedinke *Aphis fabae* (15%), zatim *Myzus persicae* (13,4%), treća po zastupljenosti bila je *Acyrtosiphon pisum* (11,7%). Od ostalih detektovanih vrsta zastupljenost veću od 5% imale su još

Anoecia corni i *Aphis gossypii* (6,4 i 5,6%). Prve dvije vrste po zastupljenosti nađene su u svim ispitivanim usjevima, izuzev u po jednom, *Aphis fabae* nije nađena u usjevu Bački Petrovac I 2009. godine, dok *Myzus persicae* nije nađena u usjevu na lokalitetu Kisač 2010. godine. Usjev na lokalitetu Kisač 2010. godine, inače je bio usjev u kojem je u toku ovih istraživanja pronađen najmanji broj jedinki, samo 29 i najmanji broj taksona, samo 9. Sljedeće tri vrste po zastupljenosti *Acyrtosiphon pisum*, *Anoecia corni* i *Aphis gossypii* nađene su u svim ispitivanim usjevima i na svim lokalitetima.

Tokom sve tri godine ispitivanja u svim usjevima javljao se veliki broj taksona sa samo jednom uhvaćenom vrstom (Tabela 62). Ukoliko posmatramo relativne vrijednosti, najviše taksona sa samo po jednom uhvaćenom vrstom u svim nedjeljama ispitivanja bilo je na lokalitetu Kisač (55,6%), dok ukoliko posmatramo apsolutne vrijednosti, najviše taksona sa samo po jednom vrstom je bilo u usjevu na lokalitetu Čenej 2009. godine i u usjevu Bački Petrovac II na lokalitetu Bački Petrovac 2010. godine.

Tabela 62. Raspored taksona vaši sa samo po jednom uhvaćenom jedinkom i broj taksona po usjevima

Godina	Lokalitet	Usjev	Broj taksona sa po jednom jedinkom (%)	Broj uhvaćenih taksona
2009.	Bački Petrovac	Bački Petrovac I	9 (31)	29
		Bački Petrovac II	9 (52,9)	17
		Čenej	11 (37,9)	29
2010.	Bački Petrovac	Bački Petrovac I	11 (52,4)	21
		Bački Petrovac II	10 (38,5)	26
		Kisač	5 (55,6)	9
2011.	Bački Petrovac	Bački Petrovac	9 (40,9)	22
		Kisač	3 (21,4)	14

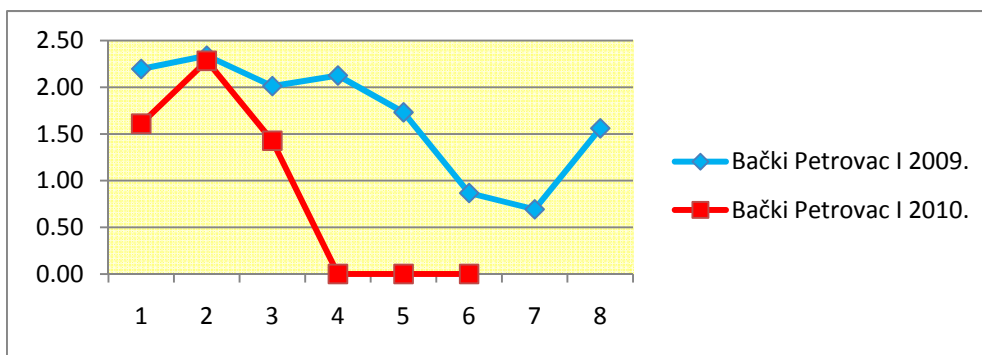
5.6.2.4.1. Promjene Shannon-Weaver-ovog indeksa kroz nedjelje po usjevima i lokalitetima

Kako su promjene u populaciji vaši veoma dinamične i u funkciji vremena i u funkciji prostora, tako su i sastav i brojnost vaši na istim lokalitetima u različitim godinama veoma različiti. Zbog toga se konstantno mijenjaju i vrijednosti Shannon-Weaver-ovog indeksa diverziteta.

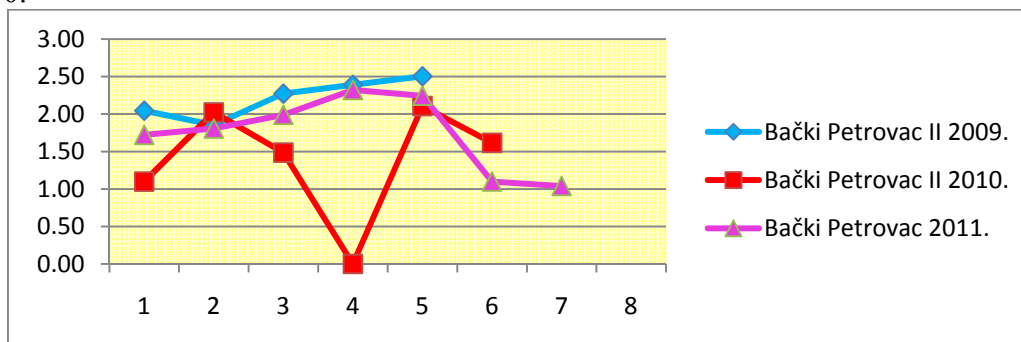
Na grafikonima 7, 8, 9 i 10 su prikazane promjene Shannon-Weaver-ovog indeksa diverziteta po nedjeljama praćenja. Grafikon 1 prikazuje indekse diverziteta za lokalitet Bački Petrovac, za usjeve Bački Petrovac I iz 2009. i 2010. godine. Na

grafikonu 2 prikazani su indeksi diverziteta za lokalitet Bački Petrovac, za usjeve Bački Petrovac I iz 2009., 2010. godine i usjev Bački Petrovac iz 2011. godine. Na grafikonu 3 su prikazane promjene indeksa diverziteta tokom nedjelja praćenja na lokalitetu Čenej 2009. godine. Grafikon 4 pokazuje indekse diverziteta na lokalitetu Kisač tokom 2010. i 2011. godine.

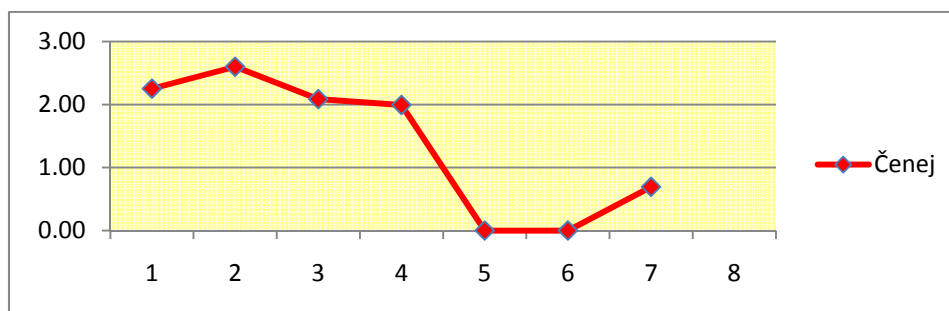
Usjevi Bački Petrovac I 2009. i Bački Petrovac I 2010. godine imali su tokom obje godine praćenja najveći diverzitet u drugoj nedjelji praćenja. Međutim, 2010. godine posle druge nedjelje naglo je opao diverzitet da bi na kraju praćenja došao do 0, a 2009. godine mogu se uočiti još dva pika indeksa diverziteta u četvrtoj, odnosno poslednjoj nedjelji praćenja.



Grafikon 7. Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta kroz nedjelje tokom 2009. i 2010. godine na lokalitetu Bački Petrovac, usjevi Bački Petrovac I 2009. i Bački Petrovac I 2010.



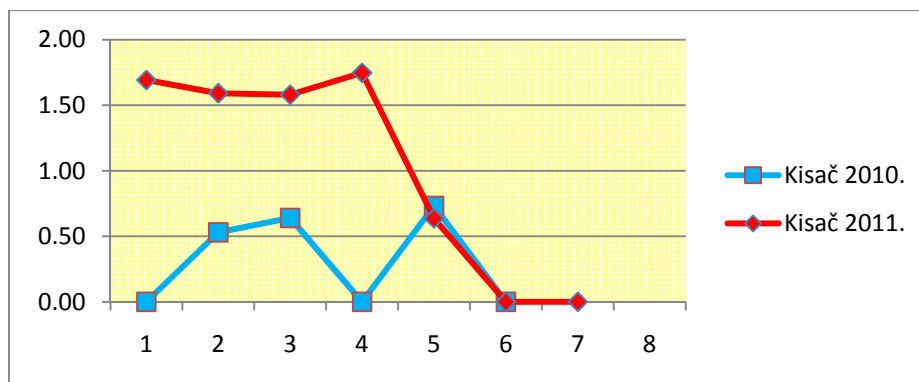
Grafikon 8. Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta kroz nedjelje tokom 2009., 2010. i 2011. godine na lokalitetu Bački Petrovac, usjevi Bački Petrovac II 2009., Bački Petrovac II 2010. i Bački Petrovac 2011.



Grafikon 9. Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta kroz nedjelje tokom 2009. godine na lokalitetu Čenej

U usjevima Bački Petrovac II 2009., Bački Petrovac II 2010. i Bački Petrovac 2011. godine tokom čitavog perioda praćenja indeksi diverziteta su bili visoki, i samo je 2010. godine u četvrtoj nedjelji opao do 0. U prvoj i drugoj godini praćenja maksimum je postignut u petoj nedjelji, dok je u trećoj godini maksimum dostignut u četvrtoj nedjelji praćenja.

Na lokalitetu Čenej 2009. godine indeks diverziteta je svoju maksimalnu vrijednost dostigao u drugoj nedjelji praćenja. Posle druge nedjelje je uočen nagli pad indeksa, da bi u petoj i šestoj nedjelji dostigao 0, a zatim u poslednjoj nedjelji neznatno porastao.

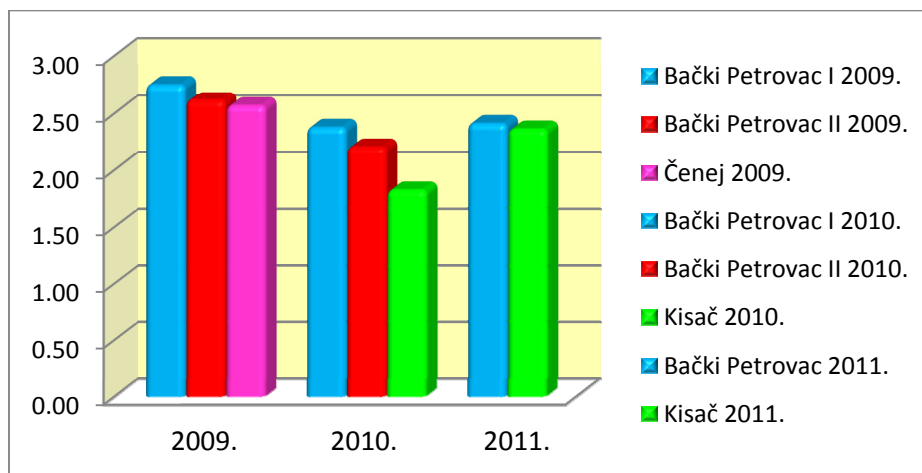


Grafikon 10. Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta kroz nedjelje tokom 2010. i 2011. godine na lokalitetu Kisač, usjevi Kisač 2010. i Kisač 2011.

Na lokalitetu Kisač, u usjevima Kisač 2010. i Kisač 2011. indeksi diverziteta tokom dvije godine istraživanja su bili niski. Prve godine ispitivanja uočljiva su dva pika u trećoj i petoj nedjelji, ali sa niskim vrijednostima indeksa, dok je u drugoj godini u prve četiri nedjelje praćenja indeks bio ujednačen, da bi zatim naglo opao.

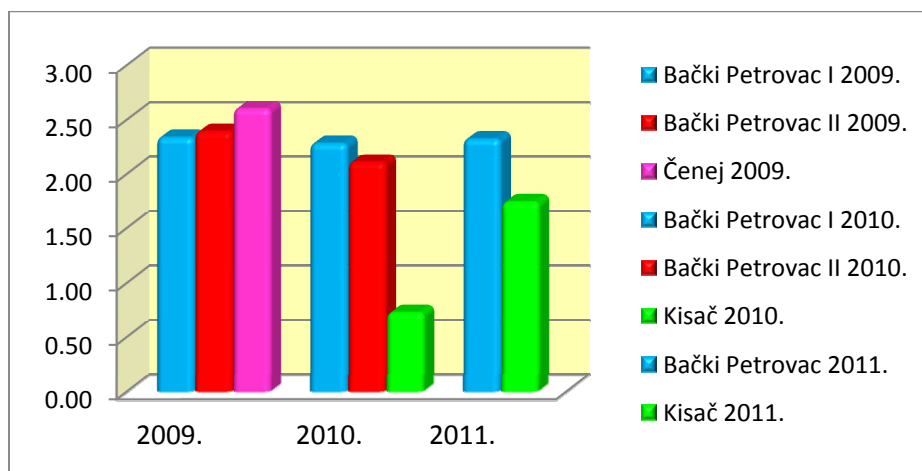
Ukoliko posmatramo ukupne indekse diverziteta za usjeve, uočava se da su oni najveći u 2009. godini. Pojedinačno je najveći indeks diverziteta u usjevu Bački

Petrovac I 2009. Najmanji indeks diverziteta zabilježen je na lokalitetu Kisač 2010. godine (Grafikon 11).



Grafikon 11. Ukupni Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta po godinama za sve usjeve

Najveći maksimalni indeks diverziteta uočen je na lokalitetu Čenej u prvoj godini ispitivanja, dok je najmanji maksimalni indeks diverziteta zabilježen u usjevu na lokalitetu Kisač 2009. godine (Grafikon 12).



Grafikon 12. Maksimalni Shannon-Weaver-ovi indeksi diverziteta po godinama za sve usjeve

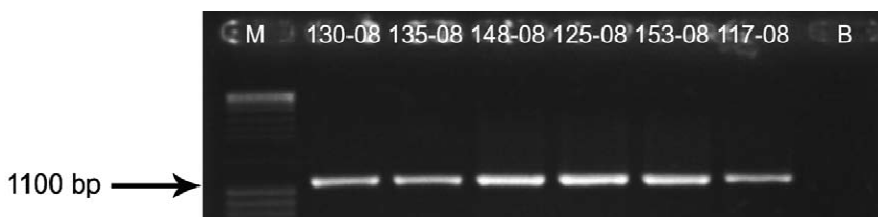
5.7. Molekularno dokazivanje najznačajnijih virusa tikava

Korišćenjem RT-PCR metode dokazano je prisustvo ZYMV, WMV, CMV, TSWV ili CABYV u 16 različitih vrsta, sorti i varijeteta tikava i TSWV u dvije vrste korovskih biljaka u Srbiji. Svi uzorci u kojima su odgovarajući virusi molekularno dokazani bili su serološki pozitivni, osim što je prisustvo TSWV i CABYV molekularo dokazano u uzorcima u kojima je TSWV prethodno detektovan primjenom biotesta, a

CABYV testom perzistentnog prenošenja vašima. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća tikava, kao ni u negativnoj kontroli (PCR smješa sa molekularnom vodom).

5.7.1. Molekularna detekcija ZYMV

U cilju molekularne detekcije ZYMV u lišću tikava prvo je optimizovan protokol za RT-PCR prilagođavanjem potrebne koncentracije specifičnih prajmera ZYMV CPfwd/CPrev. Nakon optimizacije protokola, potvrđeno je prisustvo ZYMV kod svakog od 31 testiranih uzorka tikava sa različitih lokaliteta. ZYMV je uspješno detektovan u svim uzorcima, bilo da se radilo o pojedinačnim ili miješanim infekcijama. Do nespecifične amplifikacije nije došlo ni u jednom slučaju miješanih infekcija. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 1100 bp (Slika 109).



Slika 109 Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Zucchini yellow mosaic virus* specifičnog seta prajmera ZYMV CPfwd/CPrev. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-4 pojedinačne infekcije ZYMV izolatima: 130-08 (lokalitet Titel), 135-08 (lokalitet Kisač), 148-08 (lokalitet Bački Petrovac); 5-miješana infekcija ZYMV i WMV-izolat 125-08 (lokalitet Aleksandrovo); 6-miješana infekcija ZYMV i CMV-izolat 153-08 (lokalitet Bački Petrovac); 7- miješana infekcija ZYMV, WMV i CMV-izolat 117-08 (lokalitet Gardinovci), 8-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

Drugi par specifičnih prajmera ZY-2/3 primijenjen je u cilju ispitivanja njihove pogodnosti za rutinsku detekciju izolata ZYMV, na svih 31 ispitivanih izolata. Kod 31 ispitivanog izolata, došlo je do amplifikacije fragmenta, za koji je poređenjem sa primijenjenim markerom (M), utvrđeno da su veličine od oko 1186 bp (Slika 110), što je i očekivana veličina fragmenta za primijenjene prajmere. Ni kod jednog ispitivanog uzorka nije došlo do pojave nespecifičnih reakcija. Ovim je potvrđena pogodnost i ovog para prajmera za rutinsku detekciju ZYMV u tikvama.

Svi ispitivani izolati amplifikovani su korišćenjem oba para prajmera. Tako da su se i par prajmera ZYMV CPfwd/Cprev i par prajmera ZY-2/3 pokazali uspješnim i pogodnim za rutinsku detekciju izolata ZYMV iz tikava porijeklom iz Srbije.



Slika 110. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Zucchini yellow mosaic virus* specifičnog seta prajmera ZY-2/3. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-4 pojedinačne infekcije ZYMV izolatima: 130-08 (lokalitet Titel), 135-08 (lokalitet Kisač), 148-08 (lokalitet Bački Petrovac); 5-miješana infekcija ZYMV i WMV-izolat 125-08 (lokalitet Aleksandrovo); 6-miješana infekcija ZYMV i CMV-izolat 153-08 (lokalitet Bački Petrovac); 7- miješana infekcija ZYMV, WMV i CMV-izolat 117-08 (lokalitet Gardinovci), 8-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

5.7.2. Molekularna detekcija WMV

Molekularna detekcija četiri izolata WMV obavljena je upotrebom šest različitih parova prajmera u cilju utvrđivanja najpogodnijeg para za rutinsku detekciju. Za ova ispitivanja korišćeni su izolati 137-08, 159-08, 256-09 i 268-09 prethodno serološki okarakterisani kao WMV.

Primjenom prajmera WMV-5'/3', uspješno su amplifikovana sva četiri ispitivana izolata (Slika 111a). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 400 bp bez nespecifičnih amplifikacija.

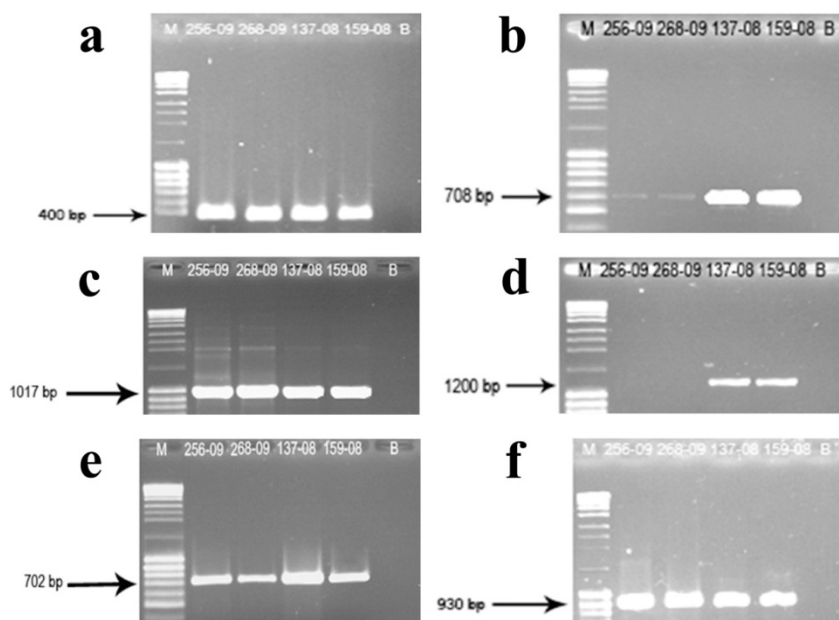
Primjenom para prajmera WP1d/r uspješno su amplifikovana sva četiri ispitivana izolata (Slika 111b). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 708 bp bez nespecifičnih amplifikacija. Međutim, reakcija kod izolata 256-09 i 268-09 je bila slabog intenziteta, u vidu jedva vidljivih traka.

Uspješna amplifikacija sva četiri ispitivana izolata obavljena je i primjenom para prajmera WMVCPfwd/rev (Slika 111c). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 1017 bp bez nespecifičnih amplifikacija.

Prajmeri WMV-1-5'/1190-3' omogućili su amplifikaciju samo izolata 137-08 i 159-08 (Slika 111d). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 1200 bp bez nespecifičnih amplifikacija. Do amplifikacije nije došlo kod izolata 256-09 i 268-09.

Primjenom prajmera WCId/r uspješno su amplifikovana sva četiri ispitivana izolata, samo što je kod izolata 268-09 dobijena nešto tanja traka, odnosno amplifikacija je bila slabijeg intenziteta, u odnosu na ostala tri ispitivana izolata (Slika 111e). Poređenjem dobijenih amplicona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 702 bp bez nespecifičnih amplifikacija.

Primjenom para prajmera WCPd/r koji amplifikuju kraj N1b, cijeli CP i dio 3' UTR uspješno su amplifikovana sva četiri ispitivana izolata (Slika 111f). Poređenjem dobijenih amplicona sa korišćenim markerom (M) utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 930 bp bez nespecifičnih amplifikacija. Do amplifikacije nije došlo u ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća tikava, kao ni u negativnoj kontroli (PCR smješa sa molekularnom vodom).



Slika 111. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem šest *Watermelon mosaic virus* specifičnih setova prajmera: a) WMV-5'/3'; b) WP1d/r; c) WMVCPfwd/rev; d) WMV-1-5'/1190-3'; e) WCId/r; f) WCPd/r. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-izolat 256-09 (*C. pepo* 'Tosca'); 3-izolat 268-09 (*C. pepo* 'Tosca'); 4-izolat 137-08 (*C. pepo* 'Olinka'); 5-izolat 159-08 (*C. maxima*); 6-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

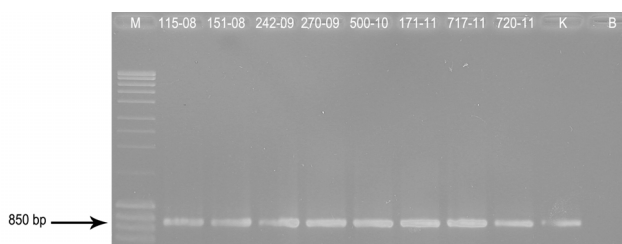
Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da su se kao pogodni prajmeri za rutinsku detekciju WMV pokazali svi korišćeni parovi, sa nešto manjom pogodnošću WP1d/r i WMV-1-5'/1190-3', a kako ova oba para prajmera amplifikuju dio gena za P1 protein, takođe se može zaključiti da ovaj dio genoma nije pogodan za detekciju WMV. Ipak, kao najpogodniji prajmeri za rutinsku detekciju i dalji rad odabrani su WMV-5'/3'

zbog toga što amplifikuju fragment koji obuhvata djelove Nib i CP gena koji su visoko varijabilni kod virusa *Potyvirus* roda.

Molekularna detekcija WMV u uzorcima sakupljenim 2009., 2010. i 2011. godine, prethodno serološki okarakterisanim kao WMV obavljena je upotrebom prajmera WMV-5'/3'. Kod svih 14 ispitivanih izolata, kao i pozitivne kontrole uspješno su amplifikovani fragmenti očekivane veličine od 400 bp.

5.7.3. Molekularna detekcija CMV

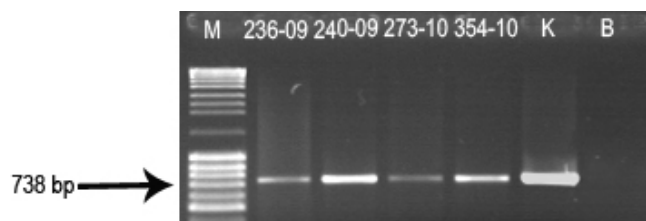
Molekularna detekcija CMV obavljena je primjenom prajmera CMV Au1u/Au2d. Uspješno su amplifikovani fragmenti svih osam ispitivanih izolata (115-08, 151-08, 242-09, 270-09, 500-10, 171-11, 717-11, 720-11) (Slika 112). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) i pozitivnom kontrolom, izolatom 746-07 iz paradajza, utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 850 bp bez nespecifičnih amplifikacija.



Slika 112. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Cucurbit mosaic virus* specifičnog seta prajmera CMV Au1u/Au2d. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-izolat 115-08 (*C. pepo* 'Olinka'); 3-izolat 151-08 (*C. pepo* 'Olinka'); 4-izolat 242-09 (*C. maxima*); 5-izolat 270-09 (*C. pepo* 'Tosca'); 6-izolat 500-10 (*C. pepo*); 7-izolat 171-11 (*C. pepo*); 8-izolat 717-11 (*C. pepo*); 9-izolat 720-11 (*C. pepo*); 10-pozitivna kontrola, izolat 746-07; 11-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

5.7.4. Molekularna detekcija TSWV

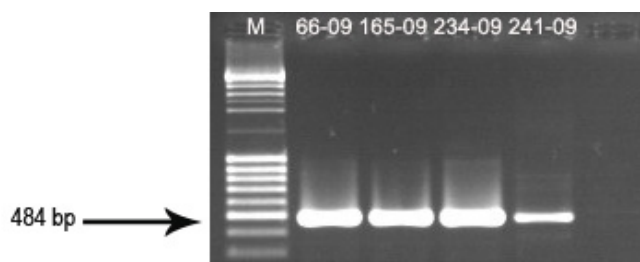
Molekularna detekcija TSWV obavljena je primjenom prajmera TSWVCP-f/r. Uspješno su amplifikovani fragmenti sva četiri ispitivana izolata, od čega su dva bila izolati iz tikava, 236-09 i 240-09, a dva izolati iz korovskih biljaka, 273-10 i 354-10 (Slika 113). Poređenjem dobijenih amplikona sa korišćenim markerom (M) i pozitivnom kontrolom, izolatom iz duvana 33-06 (GQ355467), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine od 738 bp bez nespecifičnih amplifikacija.



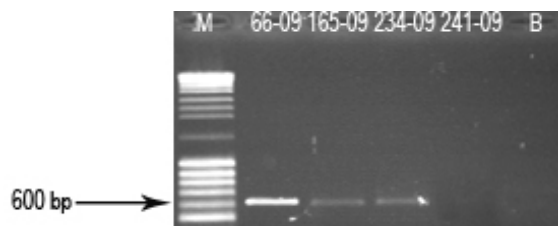
Slika 113. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Tomato spotted wilt virus* specifičnog seta prajmera TSWVCP-f/r. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-izolat 236-09 (*C. maxima*); 3-izolat 240-09 (*C. pepo* 'Beogradska'); 4-izolat 273-10 (*C. arvensis*); 5-izolat 354-10 (*A. retroflexus*); 6-pozitivna kontrola, izolat 33-06 (GQ355467); 7-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

5.7.5. Molekularna detekcija izolata kompleksa virusa koji izaziva žutilo tikava

Molekularna detekcija virusa koji izazivaju simptome žutila na tikvama sprovedena je u četiri uzorka sa tipičnim simptomima, 66-09, 165-09, 234-09 i 241-09 primjenom specifičnih prajmera za detekciju četiri virusa, CABYV, BPYV, CYSDV i CVYV. U cilju molekularne detekcije CABYV upotrijebljeni su prajmeri CABYV up/down i CE9/10, u cilju detekcije BPYV prajmeri BPYV I/II, u cilju detekcije CYSDV prajmeri CYSDV 1/2 i CYSCPf/r, a u cilju detekcije CVYV prajmeri CVYV CP1/2. Samo sa prajmerima za CABYV došlo je do uspješne amplifikacije očekivanih fragmenata. Sa prajmerima CABYV up/down uspješno su amplifikovani svi ispitivani izolati, pri čemu su dobijeni amplikoni čijim je poređenjem sa markerom (M) utvrđeno da odgovaraju očekivanoj dužini fragmenta od 484 bp (Slika 114), dok su sa prajmerima CE9/10 amplifikovani fragmenti očekivane veličine 600 bp, kod svih izolata, osim kod izolata 241-09 (Slika 115).



Slika 114. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Cucurbit aphid-borne yellows virus* specifičnog seta prajmera CABYV up/down. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-izolat 66-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 3-izolat 165-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 4-izolat 234-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 5-izolat 241-09 (*C. maxima*); 6-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

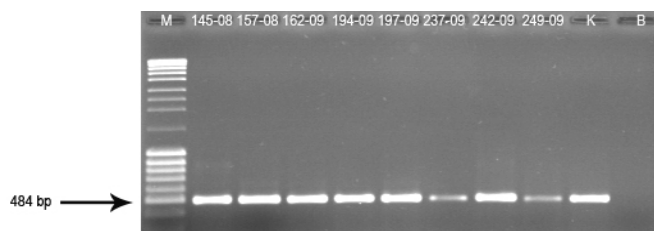


Slika 115. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Cucurbit aphid-borne yellows virus* specifičnog seta prajmera CE9/10. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-izolat 66-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 3-izolat 165-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 4-izolat 234-09 (*C. pepo* 'Olinka'); 5-izolat 241-09 (*C. maxima*); 6-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

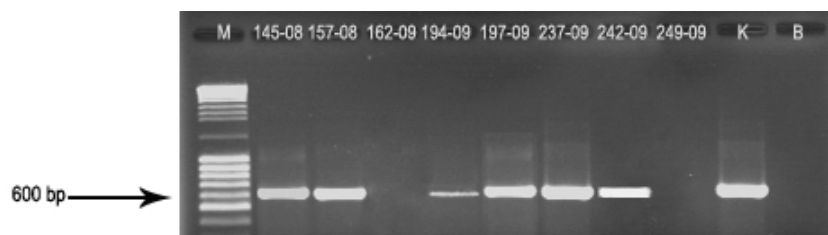
5.7.5.1. Molekularna detekcija CABYV

U cilju utvrđivanja pogodnosti korišćenih parova prajmera za rutinsku detekciju detekciju CABYV, pored rezultata dobijenih korišćenjem četiri izolata 66-09, 165-09, 234-09 i 241-09, primijenjena je RT-PCR reakcija sa specifičnim prajmerima za detekciju CABYV, CABYV up/down i CE9/10 na još osam uzoraka biljaka da simptomima žutila, 145-08, 157-08, 162-09, 194-09, 197-09, 237-09, 242-09 i 249-09. Kod svih osam uzoraka su amplifikovani fragmenti očekivane veličine 484 bp sa prajmerima CABYV up/down (Slika 116). Korišćenjem prajmera CE9/10 nije došlo do amplifikacije kod uzoraka 162-09 i 249-09, dok je kod uzorka 194-09 ostvarena amplifikacija odgovarajuće veličine, ali sa veoma niskim prinosom. Kod ostalih pet testiranih izolata došlo je do amplifikacije fragmenta očekivane veličine od 600 bp (Slika 117).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključilo se da su prajmeri CABYV up/down pogodniji za rutinsku detekciju CABYV, pa su oni korišćeni za detekciju CABYV kod ostalih 46 uzoraka tikava u toku ovih istraživanja (Tabela 7).



Slika 116. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Cucurbit aphid-borne yellows virus* specifičnog seta prajmera CABYV up/down. Kolone: M-MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-9 izolati 145-08, 157-08, 162-09, 194-09, 197-09, 237-09, 242-09, 249-09; 10-pozitivna kontrola izolat 66-09; 11-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom



Slika 117. Elektroforetska analiza RT-PCR proizvoda dobijenih korišćenjem *Cucurbit aphid-borne yellows virus* specifičnog seta prajmera CABYV up/down. Kolone: M-MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania); 2-5 izolati 162-09, 165-09, 237-09, 242-09, 249-09; 6-pozitivna kontrola izolat 66-09; 7-negativna kontrola-PCR mix sa molekularnom vodom

Kod svih 46 ispitivanih izolata iz 2008., 2009., 2010. i 2011. godine upotrebom CABYV up/down amplifikovani su fragmenti očekivane veličine 484 bp.

5.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata virusa tikava

Za sekvencioniranje i poređenje sekvenci sa sekvencama izolata iz drugih dijelova svijeta u cilju molekularne identifikacije i karakterizacije odabrani su izolati najvažnijih virusa tikava iz Srbije, za koje je primjenom molekularnih, seroloških i/ili bioloških metoda utvrđeno da pripadaju ZYMV, WMV, CMV, TSWV i CABYV.

5.8.1. Molekularna identifikacija izolata virusa tikava

Po obavljenom sekvencioniranju sekvence, odabranih izolata virusa tikava su obrađene, a zatim su identifikovane korišćenjem BLAST analize i proračunom genetičke sličnosti.

5.8.1.1. Molekularna identifikacija izolata ZYMV

Molekularna identifikacija ZYMV izvršena je na osnovu osobina dijela genoma koji pokriva dio N1b, cijeli CP i dio 3' UTR, parnim i višestrukim poređenjima sekvenci odabranih izolata ZYMV iz Srbije i drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ova istraživanja odabran je i sekvencioniran 31 izolat ZYMV iz Srbije. Kako i prajmeri ZYMV CPfwd/CPprev i prajmeri ZY-2/3 pokrivaju isti dio genoma ZYMV, to su svi izolati sekvencionirani sa ZYMV CPfwd/CPprev, a samo izolati iz 2011. godine sa parom prajmera ZY2/3. Svi sekvencionirani izolati deponovani su u GenBank bazu podataka, a pristupni brojevi su prikazani u tabeli 63.

Tabela 63. Spisak izolata *Zucchini yellow mosaic virus* iz Srbije sekvencioniranih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	GenBank pristupni broj
125-07	2007.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	JN315856
164-07	2007.	<i>Lagenaria siceraria</i>	JN315858
244-07	2007.	<i>Cucurbita moschata</i>	JN315859
441-07	2007.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	JN315857
115-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	+
128-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	HM072431
147-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	HM072432
151-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	JN315860
161-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	+
162-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	JN315861
163-08	2008.	<i>Lagenaria siceraria</i>	+
128-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	JN315862
199-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	+
226-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	JF308188
237-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	+
239-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	JF308189
243-09	2009.	<i>Cucurbita moschata</i>	JN315863
216-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Wrinkle bat'	+
230-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Genovese'	+
300-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	+
308-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> selekcionirani materijal	+
328-10	2010.	<i>Lagenaria siceraria</i>	+
390-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	+
472-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	+
492-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	+
431-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	+
435-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	+
550-11	2011.	<i>Citrullus lanatus</i>	+
681-3	/**	<i>Cucurbita moschata</i> 681-3	+
686-31	/	<i>Cucurbita pepo</i> 686-31	+
670-40	/	<i>Cucurbita maxima</i> 670-40	+

*- sekvence deponovane u GenBank, dostupne najkasnije od 31.12.2012. godine

** - izolati dobijeni testiranjem prenošenja sjemenom

BLAST analizom dobijenih sekvenci ispitivanih izolata utvrđeno je da oni dijele od 92 do 100% sličnosti sa izolatima ZYMV iz drugih dijelova svijeta. Najveću genetičku sličnost od 99 ili 100%, uz 100% pokrivenosti ispitivanih sekvenci, svi izolati porijeklom iz Srbije su pokazali sa šest izolata iz *C. pepo* iz Austrije (AJ420012-17). Detaljnim poređenjem šest austrijskih sekvenci sa sekvencama iz Srbije, korišćenjem MEGA 5.0. programa na osnovu fragmenta veličine 960 bp, pokazalo se da sekvence izolata ZYMV iz Srbije dijele 99,5-100% nukleotidne identičnosti sa austrijskim,

odnosno da se razlikuju maksimalno u 5 nukleotida. Ukoliko se posmatra 837 nt koji kodiraju cijeli CP, sekvence porijeklom iz Srbije sa austrijskim sekvencama imaju 99,6-100% nukleotidne i aminokiselinske sličnosti, a maksimalno se razlikuju u 3 nukleotida. Međutim, ukoliko posmatramo razliku u broju aminokiselina onda se samo dvije sekvence iz Srbije, 670-40 i HM072432, razlikuju u po jednoj aminokiselini u odnosu na šest sekvenci ZYMV iz Austrije.

5.8.1.2. Molekularna identifikacija izolata WMV

Molekularna identifikacija WMV izvršena je na osnovu osobina dijela genoma koji pokriva dio NIB, CP i dio 3' UTR. Sekvencioniranje izolata WMV obavljeno je sa tri para prajmera WMV-5'/3', WMVCPfwd/rev i WCPd/r. Izolati WMV dobijeni u toku ovih istraživanja, kao i pristupni brojevi pod kojim su deponovani u GenBank bazi podataka prikazani su u tabeli 64. Identifikacija 18 izolata WMV, dobijenih u ovim istraživanjima obavljena je parnim i višestrukim poređenjima sekvenci odabranih izolata WMV iz Srbije i drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

BLAST analiza 18 izolata WMV sekvencioniranih parom prajmera WMV-5'/3' koji pokrivaju dio NIB i dio CP, pokazala je da izolati porijeklom iz Srbije sa izolatima WMV iz drugih djelova svijeta deponovanim u GenBank bazi podataka dijele od 90-99% sličnosti uz 99 ili 100% pokrivenosti sekvenci. Detaljnim poređenjem sa izolatima iz BLAST-a, četiri izolata iz Srbije (499-10, 500-10, 613-11 i 717-11) dijele najveću sličnost od 97,2-97,8% na nukleotidnom nivou (8 i 10 nukleotidnih razlika), odnosno 98,3-99,2% na aminokiselinskom (1 i 2 aminokiselinske razlike) sa sekvencama izolata iz Francuske (EU660586) i Kine (EF127832). Ostali izolati najveću sličnost dijele sa izolatima iz Slovačke (GQ241712, GQ241713 i GQ241705) i Italije (EU660590) od 97,1-100% na nukleotidnom nivou, odnosno razlikuju se u najviše 10 nukleotida, dok je sličnost na aminokiselinskom nivou 96,5-100%, odnosno razlikuju se u najviše 4 aminokiselinske pozicije.

Tabela 64. Pregled izolata *Watermelon mosaic virus* iz Srbije sekvencioniranih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	GenBank pristupni broj		
				WMV-5'/3'	WMVCPfwd/rev	WCPd/r
137-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	JF325890	GQ259958	/
159-08	2008.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	JF325891	GU144020	/
160-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Čenej	+	/	/
256-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	+	/	+
268-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Ruma	+	/	+
381-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	Horgoš	+	/	/
466-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Gleisdorfer Ölkürbis'	Čonoplja	+	/	/
499-10	2010.	<i>Cucumis sativus</i>	Porodin	+	/	/
500-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	+	/	/
170-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Staro Selo	+	/	/
485-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Greycetini F1'	Kupusina	+	/	/
541-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Dikanovac	+	/	/
571-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Ratari	+	/	/
613-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Togočevce	+	/	/
680-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Novo Selo	+	/	/
693-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Veliko Selo	+	/	/
714-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	+	/	/
717-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Porodin	+	/	/

*- sekvence deponovane u GenBank, dostupne najkasnije od 31.12.2012. godine

BLAST analiza dva izolata sekvencionirana korišćenjem WCPd/r prajmera otkrila je da je sličnost izolata porijeklom iz Srbije sa izolatima WMV iz drugih djelova svijeta od 95 do 99%. Detaljnim poređenjem ispitivanih sekvenci sa sekvencama iz GenBank baze podataka, izolati iz Srbije najveću sličnost pokazuju sa sekvencom iz Španije (AJ579490) i dvije sekvence iz Francuske (JF273462 i EU660578), s tim što izolat 256-09 pokazuje 99% sličnosti, odnosno razliku u 8 nukleotida, dok izolat 268-09 pokazuje 98,8% sličnosti, odnosno razliku u 10 nukleotida. Na aminokiselinskom nivou izolat 256-09 ima 100% sličnost sa izolatima iz Španije i Francuske, dok izolat 268-09 pokazuje 99,6% sličnosti, odnosno razliku u jednoj aminokiselini u odnosu na izolate iz Španije i Francuske.

Analiza sekvenci dva izolata dobijena korišćenjem WMVCPfwd/rev, sprovedena upotrebom BLAST algoritma pokazala je da izolati iz Srbije dijele 93-99% sličnosti sa izolatima WMV iz drugih djelova svijeta. Detaljnom analizom utvrđeno je da naši izolati najveću sličnost od 99,4% dijele sa izolatom iz Francuske (JF273462) sa kojim se u dijelu CP gena i 3' UTR razlikuju u šest nukleotida, dok su na aminokiselinskom nivou u dijelu CP identični.

5.8.1.3. Molekularna identifikacija izolata CMV

Molekularna identifikacija izolata CMV obavljena je na osnovu kompletnog gena za proteinski omotač i djelove 5' i 3' neprepisujućih regiona koji su umnoženi upotrebom CMV Au1u/2d para prajmera. Sekvencionirano je ukupno šest izolata koji su prijavljeni u GenBank bazu podataka, dodijeljeni su im pristupni brojevi koji su za izolate 115-08 i 151-08 objavljeni (HM065510, odnosno HM065509), a za četiri izolata, 270-09, 500-10, 717-11, 720-11 će biti dostupni od 31.12.2012. godine. Identifikacija šest izolata CMV, dobijenih u ovim istraživanjima obavljena je parnim i višestrukim poređenjima sekvenci dobijenih izolata iz Srbije i drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

Analiza sekvenci šest izolata, sprovedena upotrebom BLAST algoritma pokazala je da izolati iz Srbije dijele 94-99% sličnosti sa izolatima CMV iz drugih djelova svijeta. Detaljnom analizom utvrđeno je da izolati porijeklom iz Srbije: 115-08 (HM065510), 151-08 (HM065509), 270-09, 500-10 i 720-11 najveću sličnost od 99,6-99% na nukleotidnom nivou dijele sa izolatima iz Australije (AJ585517 i U22821) i

Mađarske (AM114273 i AJ517802) sa kojima se razlikuju u 3 do 8 nukleotida, dok se na aminokiselinskom nivou samo izolat 115-08 razlikuje u 2 aminokiselinske pozicije (99,1% sličnosti). Izolat 717-11 najveću nukleotidnu (97,7%) i aminokiselinsku (97,7%) sličnost ima sa izolatom iz Australije (AJ585517) od koga se razlikuje u 18 nukleotidnih pozicija, koje rezultiraju promjenom 5 aminokiselina.

5.8.1.4. Molekularna identifikacija izolata TSWV

Molekularna identifikacija TSWV obavljena je na osnovu dijela gena za nukleokapsid (N). U toku ovih istraživanja sekvencionirana su četiri izolata TSWV korišćenjem para prajmera TSWVCP-f/r. Sekvence izolata TSWV dobijene u toku ovih istraživanja deponovane su u GenBank bazu podataka gdje su dobili pristupne brojeve. Izolatu 236-09 iz *C. maxima* dodijeljen je pristupni broj JF303080, izolatu 240-09 iz *C. pepo* 'Beogradska' JF303081, dok će pristupni brojevi za izolate 273-10 iz *Convolvulus arvensis* i 354-10 iz *Amaranthus retroflexus* biti dostupni od 31.12.2012. godine. Identifikacija četiri izolata TSWV, dobijena u ovim istraživanjima obavljena je parnim i višestrukim poređenjima sekvenci dobijenih izolata iz Srbije i drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

BLAST analiza četiri izolata TSWV dobijena u ovim istraživanjima, pokazala je da oni dijele 98-100% sličnosti uz 100% pokrivenosti sekvenci, sa izolatima TSWV iz drugih djelova svijeta. Detaljnom analizom sekvenci utvrđeno je da izolati TSWV porijeklom iz Srbije pokazuju najveću sličnost od 100% na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou, sa izolatom TSWV iz Crne Gore (GU369729) i tri izolata iz Srbije, dva iz duvana (GQ373173 i GQ355467) i jednim iz crnog luka (JQ619234).

5.8.1.5. Molekularna identifikacija izolata CABYV

Molekularna identifikacija CABYV izvršena je na osnovu osobina dijela genoma koji pokriva dio intergenskog regiona ispred CP gena, CP i MP gen. Sekvencioniranje izolata obavljeno je sa dva para prajmera CABYV up/down i CE9/10. Izolati CABYV dobijeni u toku ovih istraživanja, kao i pristupni brojevi pod kojim su sekvence deponovane u GenBank bazi podataka prikazani su u tabeli 65. Molekularna identifikacija 32 izolata CABYV dobijenih u ovim istraživanjima obavljena je parnim i

višestrukim poređenjima sekvenci odabranih izolata CABYV iz Srbije i drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

BLAST analiza sekvenci izolata CABYV koji su sekvencionirani sa oba korišćena para prajmera CABYV up/down i CE9/10 i čije su sekvence zatim spojene, pokazala je da su izolati iz Srbije pokazuju 93-99% sličnosti, uz 99 i 100% pokrivenosti sekvenci, sa izolatima CABYV iz drugih djelova svijeta. Detaljnom analizom sekvenci utvrđeno je da su izolati CABYV porijeklom iz Srbije najbližiji, 94,9-98,8% na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou, sa izolatom iz Francuske (X76931), od koga se razlikuju u 9 do 38 nukleotidnih pozicija. U dijelu sekvence koja kodira CP, odnosno MP gen razlika između naših izolata i izolata X76931 bila je 94,3-99% (2 do 11 aminokiselinskih razlika), odnosno 91,2-97,3% (5 do 15 aminokiselinskih razlika).

Analiza sekvenci izolata dobijenih sa CE9/10 sprovedena BLAST algoritmom, pokazala je da izolati iz Srbije pokazuju sličnost od 94-99% sa izolatima CABYV iz drugih djelova svijeta. Detaljna analiza sekvenci otkrila je da izolati CABYV porijeklom iz Srbije najveću sličnost pokazuju sa izolatima iz Češke (HM771271-13), sa kojima pokazuju 99,6-99,8% nukleotidne sličnosti, odnosno razlikuju se u samo 1 ili 2 pozicije, u dijelu genoma koji kodira CP i preklapajući MP. Na aminokiselinskom nivou u dijelu CP gena sličnost je 100%, dok je u dijelu MP gena sličnost 99,6-99,8% na aminokiselinskom nivou, odnosno u translaciji se razlikuju u jednoj ili dvije aminokiseline.

BLAST analiza izolata CABYV koju su sekvencionirani sa CABYV up/down, pokazala je da su izolati iz Srbije 93-99% sličnosti uz 99 i 100% pokrivenosti sekvenci, sa izolatima CABYV iz drugih djelova svijeta. Detaljnom analizom sekvenci utvrđeno je da su izolati CABYV iz Srbije najbližiji, 97,3-99,1% na nukleotidnom nivou, sa izolatom iz Francuske (X76931), od koga se razlikuju u 4 do 12 nukleotida. U dijelu sekvence koja kodira CP, odnosno MP gen razlika između naših izolata i izolata X76931 bila je 97,8-98,9% (1 ili 2 aminokiselinske razlike), odnosno 96,4-98,8% (1 ili 3 aminokiselinske razlike).

Tabela 65. Pregled izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* iz Srbije sekvencioniranih u ovim istraživanjima

Izolat	Godina izolacije	Domaćin	Lokalitet	GenBank pristupni broj prajmeri	
				CABYV up/down	CE9/10
145-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	/	HQ202745

157-08	2008.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Bački Petrovac	/	JF303079
66-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Budisava	+*	+
162-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Beogradska'	Sirig	+	/
165-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Srbobran	+	+
194-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	/	+
197-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	+
234-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	+	+
237-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Tosca'	Bački Petrovac	/	+
241-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	+	/
242-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	/	+
246-09	2009.	<i>Cucurbita maxima</i>	Bački Petrovac	/	+
249-09	2009.	<i>Cucurbita pepo</i>	Bački Petrovac	+	/
298-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Kisač	+	/
336-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajev	+	/
343-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	/
346-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	/
349-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	/
350-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	/
351-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Zmajev	+	/
356-10	2010.	<i>Cucurbita maxima</i>	Zmajev	+	/
378-10	2010.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgoš'	Orom	+	/
168-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Staro Selo	+	/
422-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Irmovo	+	/
432-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	+	/
433-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Silbaš	+	/
441-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Silbaš	+	/
439-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	Silbaš	+	/
488-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i> 'Greycetini F1'	Kupusina	+	/
570-11	2011.	<i>Cucumis sativus</i>	Debr	+	/
610-11	2011.	<i>Cucumis melo</i>	Togočevce	+	/
694-11	2011.	<i>Cucurbita pepo</i>	Veliko Selo	+	/

*- sekvence deponovane u GenBank, dostupne najkasnije od 31.12.2012. godine

5.8.2. Molekularna karakterizacija najznačajnijih virusa tikava

Molekularna karakterizacija najvažnijih virusa tikava obavljena je proračunom genetičke sličnosti između dobijenih izolata i filogenetskim analizama izolata dobijenih u Srbiji sa izolatima deponovanim u GenBank bazi podataka.

5.8.2.1.1. Proračun genetičke sličnosti izolata ZYMV

Sekvence svih, od 31 amplifikovanih izolata ZYMV, međusobno su poravnate i skraćene na dužinu od 960 nt, što odgovara dužini najkraće sekvence. Sličnost izolata porijeklom iz Srbije, u dijelu genoma od 960 nt, koji obuhvata dio N1b, cijeli CP i dio 3'

UTR na nukleotidnom nivou kretala se od 99,2-100%, odnosno kod njih nije bilo razlike u nukleotidima ili su se razlikovali u najviše osam nukleotida. Sličnost u dijelu od 855 nt koji kodira dio poliproteina se na aminokiselinskom nivou kretala od 99,3-100%, odnosno naše proteinske sekvence se ili nijesu razlikovale ili su se razlikovale u najviše dvije aminokiseline. Ako posmatramo dio genoma od 837 nt koji kodira kompletan proteinski omotač virusa, razlika na nukleotidnom nivou bila je 99,4-100% (5-0 nukleotidnih razlika), dok je na aminokiselinskom nivou razlika bila 99,3-100% (2-0 aminokiselinskih razlika).

5.8.2.1.2. Proračun genetičke sličnosti izolata WMV

Svih 18 izolata WMV dobijenih sekvencioniranjem sa prajmerima WMV 5'/3', međusobno je poravnato i skraćeno na dužinu od 352 nt, što odgovara dužini najkraće sekvence. Sličnost naših izolata, u dijelu genoma od 352 nt, koji obuhvata 5' dio NIB i 3' dio CP kretala od 89-100%, odnosno kod njih je bilo od 0 do 38 razlika u nukleotidima. Sličnost na aminokiselinskom nivou kretala od 90-100%, odnosno proteinske sekvence se ili nijesu razlikovale ili su se razlikovale u najviše 11 aminokiselina.

Sličnost dva izolata (256-09 i 268-09) sekvencionirana sa WCPd/r u dužini od 855 nt koji kodiraju skoro cijeli CP gen, na nukleotidnom nivou bila je 99,8% (razlika u dvije nukleotidne pozicije), dok je razlika u proteinu bila u samo jednoj aminokiselini (99,6%).

Sličnost izolata GQ259958 (159-08) i GU144020 (159-08) sekvencioniranih sa WMVCPfwd/rev prajmerima, koji obuhvataju dio CP i dio 3' UTR na osnovu fragmenta dužine 928 nt, na nukleotidnom nivou iznosila je 99,6% (četiri nukleotida razlike). Poređenje sekvenci izolata 137-08 i 159-08 u dijelu od 753 nt koji kodira dio CP gena pokazalo da su ova dva izolata 100% identična u aminokiselinskom sastavu.

5.8.2.1.3. Proračun genetičke sličnosti izolata CMV

Sličnost šest izolata CMV dobijenih u ovim istraživanjima, u dijelu genoma od 752 nt koji obuhvata dio 5' UTR, cijeli CP gen i dio 3' UTR, na nukleotidnom nivou bila je od 96,6-99,6%. Odnosno, izolati porijeklom iz Srbije su se razlikovali u 3-26 nukleotidnih pozicija. Sličnost ispitivanih šest izolata u dijelu od 657 nt koji kodira

cijeli CP gen na aminokiselinskom nivou bila je od 96,8-100%, dok je razlika u broju promijenjenih aminokiselinskih pozicija bila od 0-7.

5.8.2.1.4. Proračun genetičke sličnosti izolata TSWV

Četiri dobijena izolata TSWV, međusobno su poravnata i skraćena na dužinu od 698 nt, što odgovara dužini najkraće sekvence. Sličnost izolata porijeklom iz Srbije, u dijelu genoma od 698 nt, koji obuhvata dio N gena na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou bila je 100%.

5.8.2.1.5. Proračun genetičke sličnosti izolata CABYV

Sličnost između sekvenci četiri izolata CABYV iz Srbije, dobijenih spajanjem sekvenci amplifikovanih i sekvencioniranih prajmerima CE9/10 i CABYV up/down, na nukleotidnom nivou u dijelu CP gena kretala se od 94,8-99,8% (1-30 promjena na nukleotidnim pozicijama), dok je na aminokiselinskom nivou bila od 94,8-99,5% (1-10 promjena aminokiselina). U dijelu MP gena, koji se u najvećem dijelu preklapa CP genom (okvir čitanja MP gena je pomjeren za 28 nt pozicija u odnosu na početak CP gena) sličnost na nukleotidnom nivou bila je od 94,8-99,8% (1-29 promjena na nukleotidnim pozicijama), dok je na aminokiselinskom nivou bila od 89-99,5% (1-20 promjena aminokiselina).

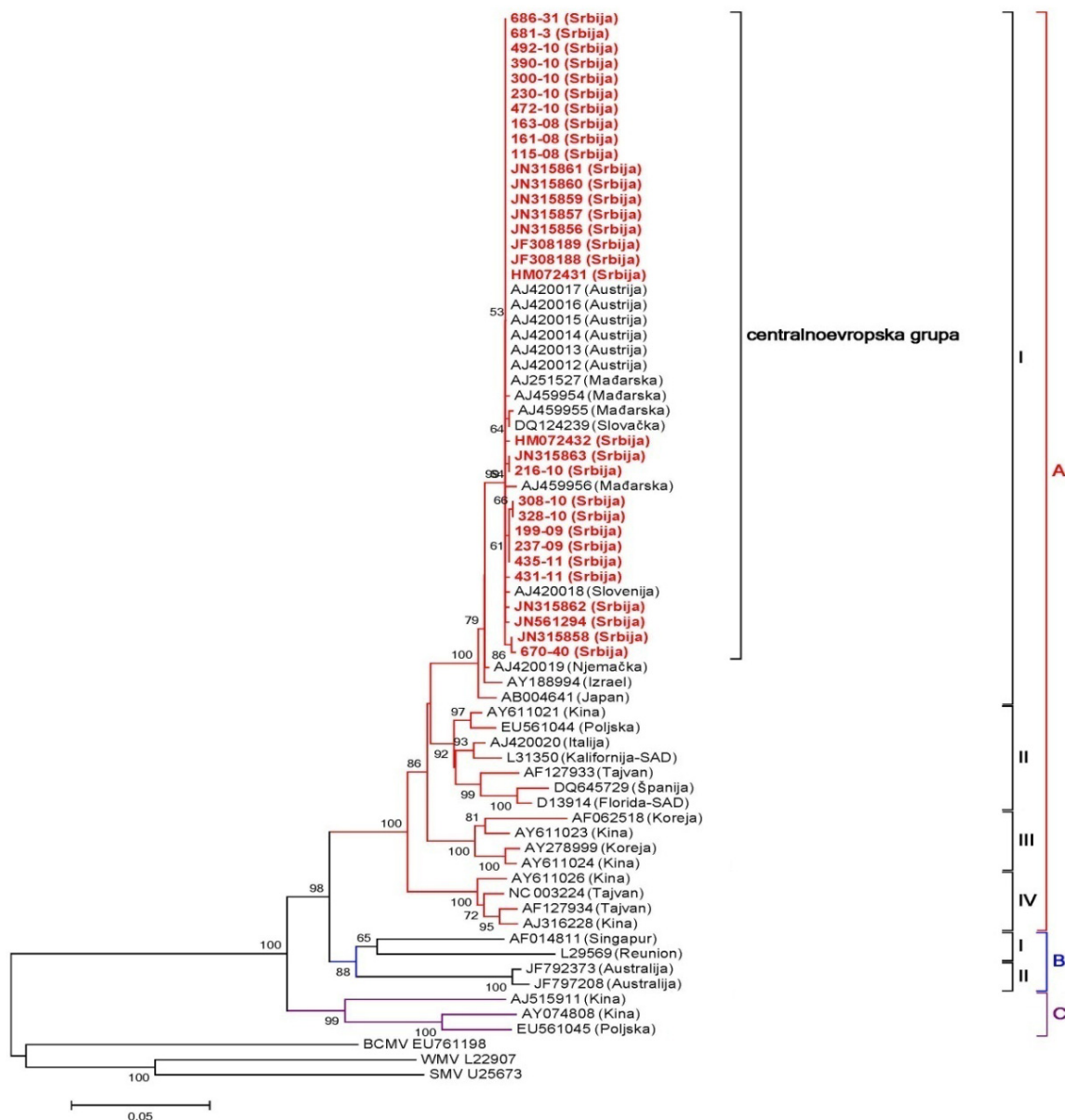
Analiza šest izolata CABYV iz Srbije sekvencioniranih korišćenjem CE9/CE10 prajmerima pokazala je od 99,8-100% (0-1 nukleotidna promjena) i u dijelu CP i u dijelu MP gena. Na aminokiselinskom nivou u dijelu CP gena svi izolati su pokazivali 100% identičnosti među sobom, dok se u dijelu MP gena sličnost kretala od 99,5-100% (0-1 aminokiselinska promjena).

Sekvence 22 izolata CABYV iz Srbije dobijene sekvencioniranjem sa CABYV up/down prajmerima, pokazale su 93,5-100% identičnosti (0-29 nukleotidnih razlika) na nukleotidnom nivou i u dijelu koji kodira CP i u dijelu koji kodira MP gen. Na aminokiselinskom nivou kod CP gena sličnost se kretala od 91,4-100% (0-8 promijenjenih aminokiselina), a kod MP gena od od 91,7-100% (0-7 promijenjenih aminokiselina).

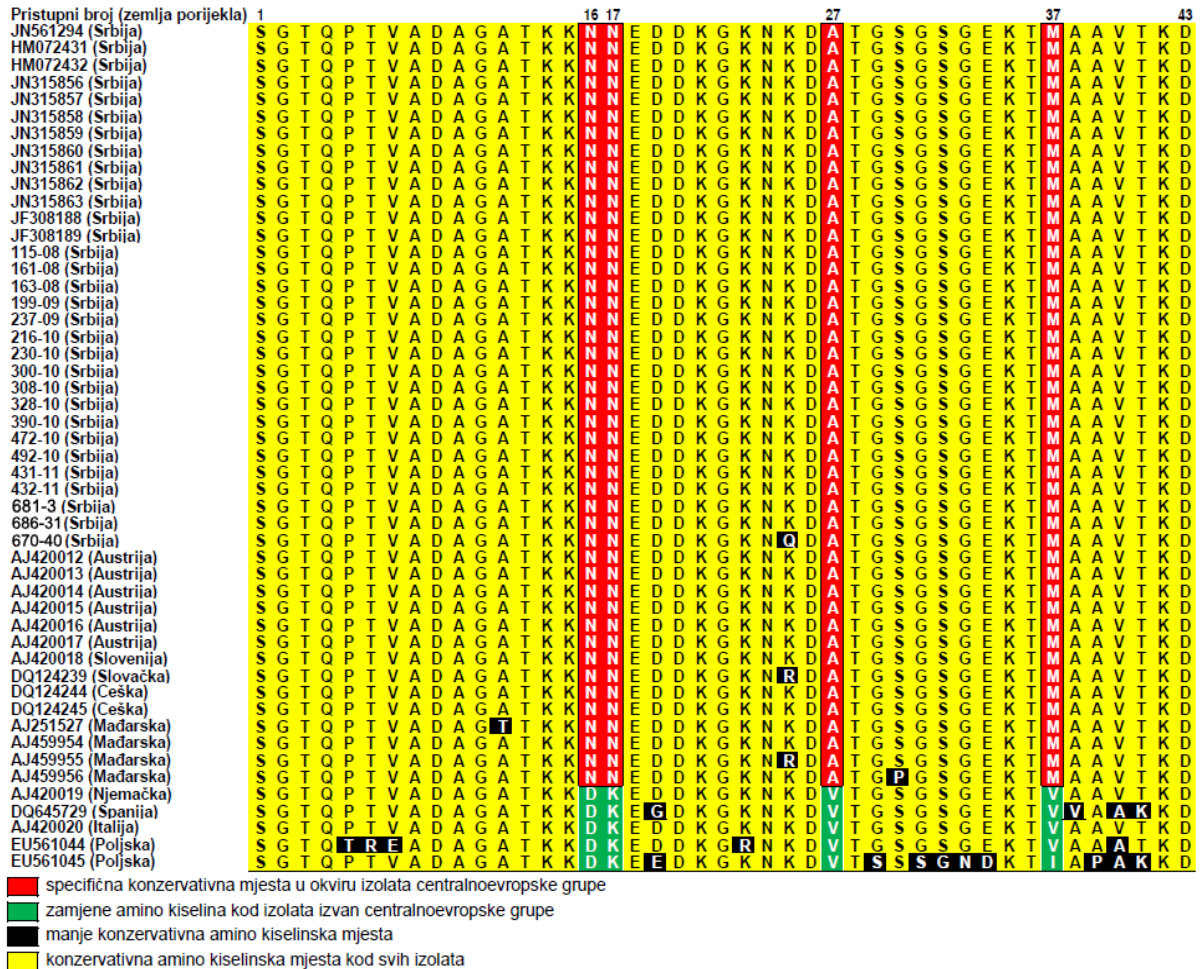
5.8.2.2.1. Filogenetske analize ZYMV

Filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbor-Joining metodom na osnovu 837 bp cijelog CP gena 31 sekvence izolata iz Srbije i 37 sekvenci odabranih izolata iz drugih djelova, prikazano na slici 118, jasno pokazuje izdvajanje tri molekularne grupe (A-C). Ovakovo grupisanje ZYMV izolata je podržano visokom homologijom sekvenci iste grupe i visokim bootstrap vrijednostima (100, 88 i 99%). Grupa A sastoji se od četiri podgrupe (I-IV) koje takođe karakteriše visoka bootstrap podrška, 100% za podgrupe A-I, A-III i A-IV, i 92% za podgrupu A-II. Ukupan diverzitet sekvenci ZYMV u stablu je iznosio $0,065 \pm 0,005$. Genetički diverzitet između tri glavne grupe iznosi od $0,185 \pm 0,016$ do $0,224 \pm 0,020$, a unutar grupa i podgrupa je $0,033 \pm 0,003$ (A), $0,003 \pm 0,001$ (A-I), $0,038 \pm 0,005$ (A-II), $0,034 \pm 0,005$ (A-III), $0,023 \pm 0,004$ (A-IV), $0,134 \pm 0,012$ (B), $0,142 \pm 0,018$ (B-I), $0,010 \pm 0,003$ (B-II) i $0,127 \pm 0,013$ (C). Grupa A sadrži izolate iz Azije (Izrael, Kina, Japan, Koreja i Tajvan), Evrope (Austrija, Njemačka, Mađarska, Italija, Poljska, Srbija, Slovačka i Slovenija) i Amerike. Svi 31 ZYMV izolata iz Srbije grupisu se u zajedničku granu sa ostalim izolatima iz Centralne Evrope (Austrija, Mađarska, Slovačka i Slovenija) u okviru podgrupe A-I, koja osim ovih izolata sadrži još po jedan izolat iz Njemačke, Japana i Izraela. Ovo filogenetsko stablo, pokazuje i da se svi evropski izolati grupišu u okviru grupe A, osim jednog izolata iz Poljske (Zug), koji se grupisao sa nekoliko kineskih izolata u grupu C. Izolati iz centralnoevropske grane dijele visoku sličnost u dijelu CP gena na nukleotidnom, odnosno aminokiselinskom nivou.

Poređenje prve 43 pozicije aminokiselinskih sekvenci N terminalnog kraja CP gena 31 ZYMV izolata iz Srbije, sa 31 izolatom ovog virusa iz Srbije i drugih djelova Evrope pokazalo je da izolati ZYMV iz Srbije, kao i ostali izolati koji pripadaju centralnoevropskoj grupi, na pozicijama 16 i 17 imaju dva specifično konzervativna mjesta sa dva ostatka aminokiseline asparagin (NN), umjesto asparaginske kiseline i lizina (DK) koji su karakteristični za ostale izolate iz Evrope. Takođe, pozicije 27 i 37 kod izolata iz Centralne Evrope, uključujući i izolate iz Srbije specifično su promijenjene, tako da izolati iz Centralne Evrope na poziciji 27 imaju ostatak alanina (A) umjesto valina (V), odnosno metionin (M) umjesto valina (V) ili izoleucina (I) na poziciji 37 (Slika 119).



Slika 118. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci cijelog CP gena 68 izolata *Zucchini yellow mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0. softvera upotrebom Tamura 3-parametar modela sa Gamma distribucijom i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence BCMV, WMV i SMV su korišćene kao „outgroup“. Izolati ZYMV iz Srbije su naznačen i crveni



Slika 119. Poređenje aminokiselinskih sekvenci N-terminalnog kraja proteinskog omotača izolata *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) iz Srbije i drugih djelova Evrope

5.8.2.2.2. Filogenetske analize WWV

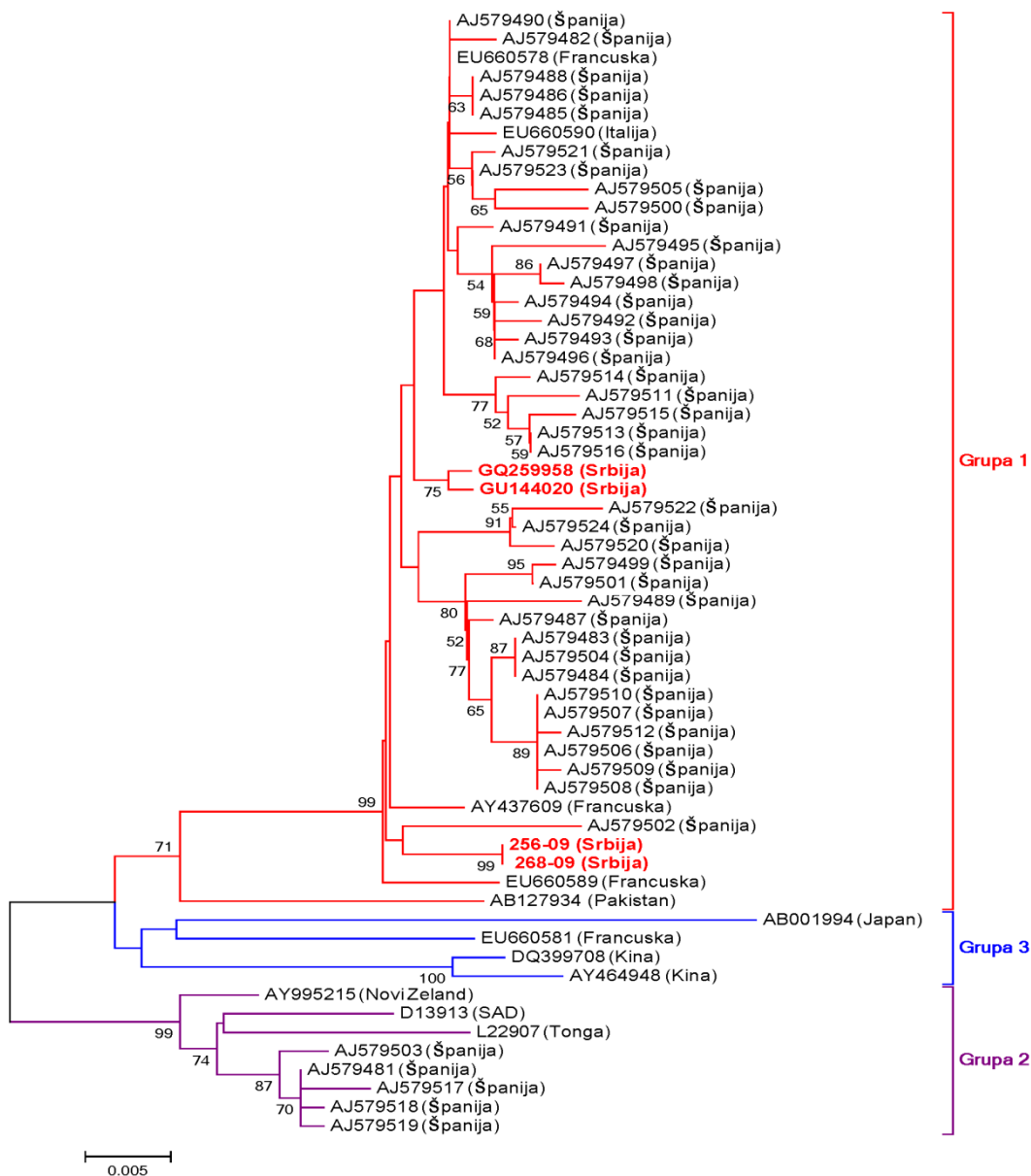
Filogenetske analize WMV obavljene su rekonstruisanjem dva filogenetska stabla, prvog na osnovu sekvenci većeg dijela CP gena, a drugog na osnovu dijela sekvence koja kodira 3' kraja N1b i početak CP gena.

Filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbor-Joining metodom, na osnovu 739 bp parcijalnog CP gena 4 sekvence izolata iz Srbije i 56 sekvenci odabranih izolata iz drugih djelova svijeta, prikazano je na slici 120. Ukupni diverzitet u stablu bio je $0,028 \pm 0,003$. U stablu se jasno izdvajaju tri molekularne grupe sojeva (1-3). Bootstrap podrška za ovo grupisanje je visoka samo za grupu 3, dok je za ostale grupe niža (71% (Grupa 1), 32% (Grupa 2) i 99% (Grupa 3)), zbog toga što su sve tri grupe polifiletičkog porijekla. Sekvence iz Srbije grupisale se u okviru grupe 1, s tim što su se sekvence iz 2008. godine 137-08 i 159-08, grupisale odvojeno od sekvenci iz 2009. godine 256-

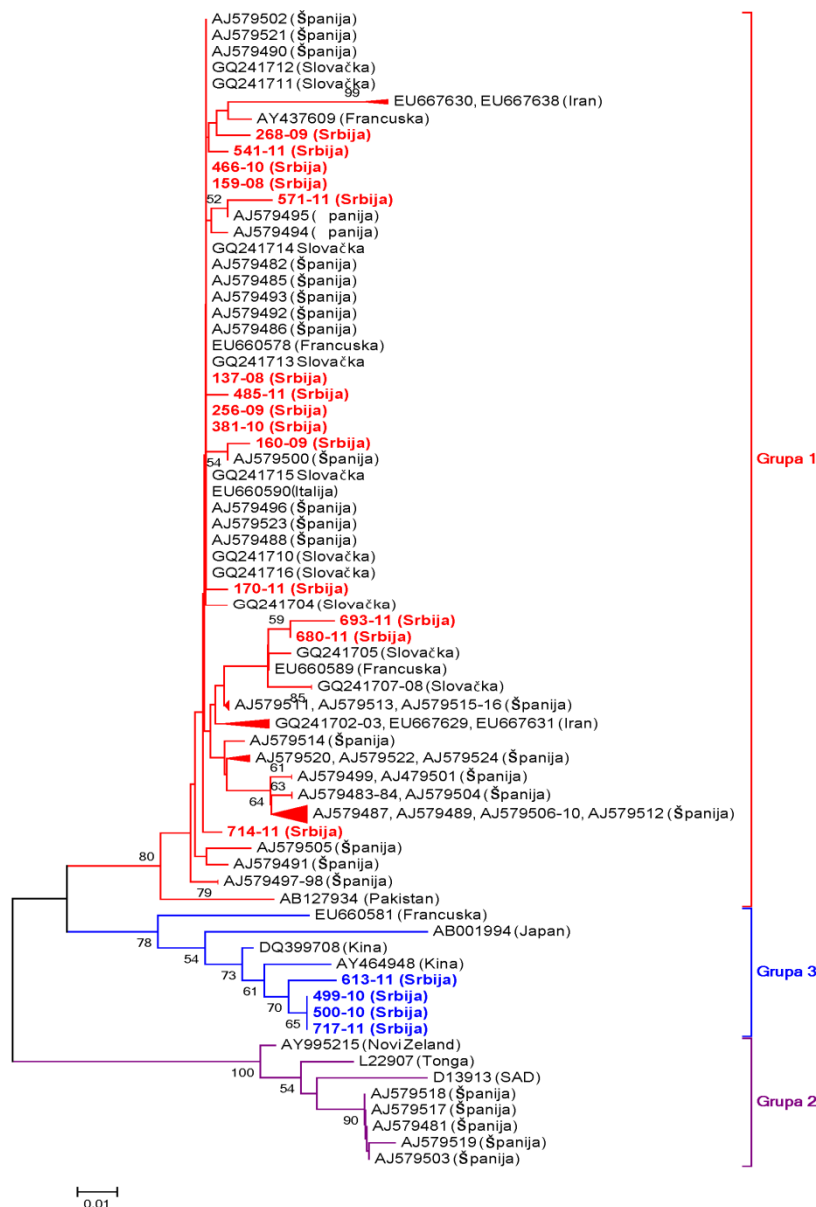
09 i 268-09. Genetički diverzitet između tri grupe iznosi od $0,055\pm 0,008$ do $0,058\pm 0,008$, a unutar $0,014\pm 0,003$ (Grupa 1), $0,013\pm 0,002$ (Grupa 2) i $0,049\pm 0,007$ (Grupa 3). U okviru Grupe 1 su sekvence iz Evrope (Srbija, Italija, Francuska, Španija) i Pakistana. Grupa 2 ima sekvence iz Azije (Japan i Kina) i Francuske, a Grupa 3 iz Tonge, Novog Zelanda, SAD i Španije.

Drugo filogenetsko stablo, takođe je rekonstruisano Neighbor-Joining metodom, na osnovu 233 bp 3' kraja NIB i početka CP gena gena 18 sekvenci izolata WMV iz Srbije i 73 sekvence odabranih izolata iz drugih djelova svijet, prikazano na slici 121. U stablu se, kao i kod stabla za CP gen, jasno izdvajaju tri molekularne grupe sojeva (1-3). Ovakvo grupisanje podržavaju i visoke vrijednosti bootstrap (80% (Grupa 1), 78% (Grupa 3) i 100% (Grupa 2)). Sekvence iz Srbije grupisale su se u okviru grupa 1 i 3. U grupi sojeva 1, svrstalo se 14 sekvenci izolata iz Srbije, ova grupa se još i naziva grupa „klasičnih“ sojeva, dok su se u grupu 3 svrstala četiri izolata iz Srbije, grupa 3 je poznata i kao „emerging“ grupa sojeva. Ukupni diverzitet u stablu je bio $0,058\pm 0,010$. Genetički diverzitet između tri grupe iznosi od $0,114\pm 0,026$ do $0,189\pm 0,043$, a unutar $0,022\pm 0,005$ (Grupa 1), $0,022\pm 0,007$ (Grupa 2) i $0,055\pm 0,013$ (Grupa 3). U okviru Grupe 1 su sekvence iz Evrope (Srbija, Italija, Francuska, Španija, Slovačke i Irana) i Pakistana. Grupa 3 ima sekvence iz Azije (Japan i Kina) i Evrope (Srbija i Francuska), a Grupa 2 iz Tonge, Novog Zelanda, SAD i Španije.

Aminokiselinska sekvenca početka CP gena od 3-5 pozicije kod svih „klasičnih“ izolata, pa tako i kod 14 izolata iz Srbije ima KEA motiv, dok kod „emerging“ izolata posle 5. pozicije umetnute su još dvije aminokiseline, pa ovi izolati imaju KEKET motiv.



Slika 120. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog CP gena 60 izolata *Watermelon mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0. softvera upotrebom Tamura 3-parametar modela sa Gamma distribucijom i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati WMV iz Srbije su naznačeni i crveni



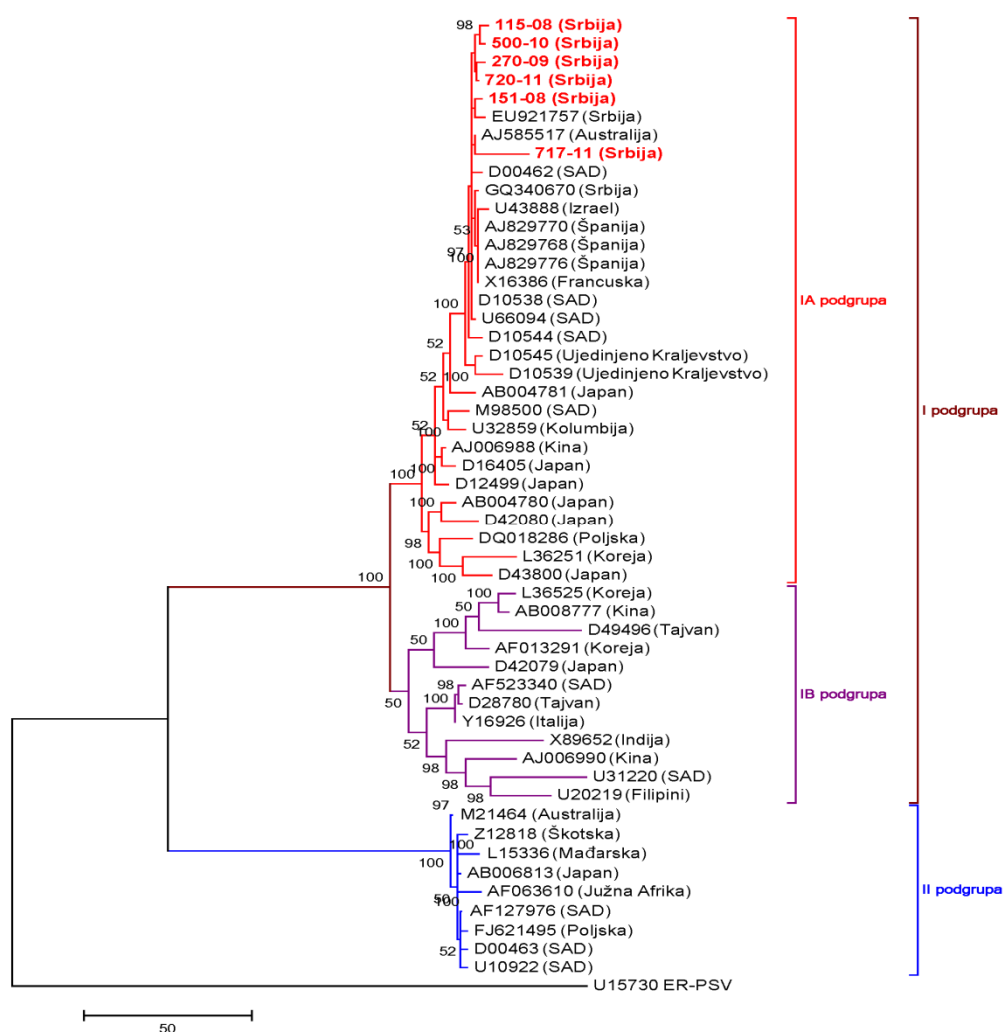
Slika 121. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci parcijalnog kraja Nib gena i početka CP gena 91 izolata *Watermelon mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0. softvera upotrebom Tamura-Nei-parametar modela sa Gamma distribucijom i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati WMV iz Srbije su naznačeni i crveni u Grupi 1, odnosno plavi u Grupi 3

5.8.2.2.3. Filogenetske analize CMV

Filogenetsko stablo rekonstruisano je Maximum parsimony metodom na osnovu 52 sekvence izolata CMV. Na slici 122 je prikazano konsenzus stablo dobijeno od 73 generisanog stabala. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci CP gena u stablu je bio 0,177 ($\pm 0,013$). U stablu su se izdvojile dvije podgrupe I (unutargrupni diverzitet

0,048±0,005) i II (0,010±0,002). Međugrupna variranja između I i II podgrupa u stablu bila su 0,361±0,035. Ovakva podjela podržana je visokom bootstrap podrškom (I-100%, II-100%).

Podgrupa I se dalje dijeli u dvije podgrupe IA i IB, prva sa izolatima iz raznih dijelova svijeta, u koju su se svrstali i izolati iz Srbije, čiji unutargrupni diverzitet iznosi 0,025±0,003 i druga sa izolatima iz Azije (Kina, Tajvan, Koreja, Japan, Indija i Filipini), uz dva izuzetka iz SAD (AF523340) i Italije (Y16926) unutargrupnim diverzitetom 0,070±0,007. Diverzitet između ove dvije podgrupe iznosio je 0,073±0,008.



Slika 122. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci CP gena 52 izolata *Cucumber mosaic virus* korišćenjem MEGA 5.0. Maximum-parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca PSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati CMV iz Srbije su naznačen i crveni

5.8.2.2.4. Filogenetske analize TSWV

Filogenetsko stablo je rekonstruisano Maximum parsimony metodom na osnovu 45 sekvenci izolata TSWV. Na slici 123 prikazano je konsenzus stablo dobijeno od 261 generisanog stabala. Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci N gena u stablu bio je 0,022 ($\pm 0,003$). U stablu su se izdvojile četiri grupe: Evropska (unutargrupni diverzitet $0,008 \pm 0,002$), Sjeverno-američka ($0,017 \pm 0,003$), Brazilska i Azijska ($0,017 \pm 0,004$). Međugrupna variranja u stablu kretala su se od $0,029 \pm 0,005$ do $0,035 \pm 0,006$.

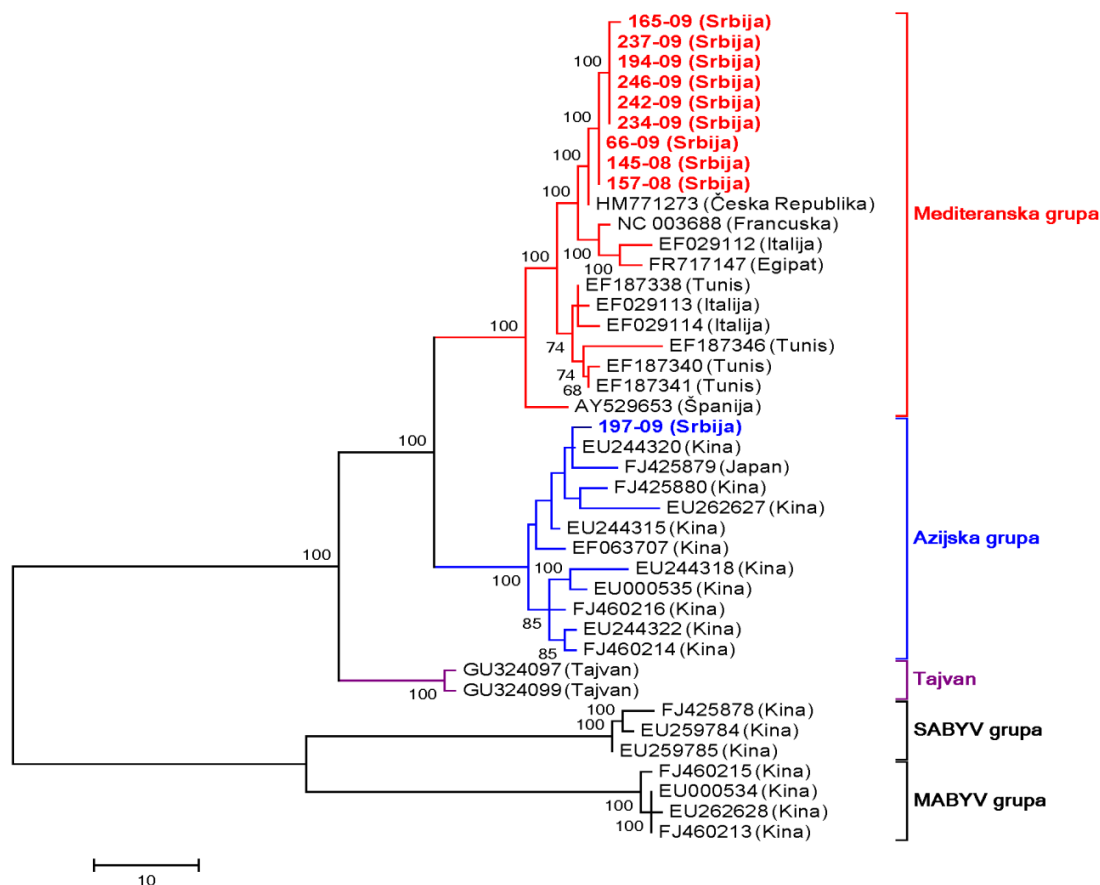


Slika 123. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci N gena 44 izolata *Tomato spotted wilt virus* korišćenjem MEGA 5.0. Maximum-parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti ($>50\%$) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvenca TCSV je korišćena kao „outgroup“. Izolati TSWV iz Srbije su naznačeni i crveni

Evropska grupa se dalje dijeli u dvije geografski različite subpopulacije, prva sa izolatima iz Srbije, Crne Gore i Bugarske, čiji unutargrupni diverzitet iznosi $0,006\pm 0,001$ i druga sa izolatima iz Holandije, Češke, Njemačke i Italije, uz izuzetke iz SAD (AY744476 i AY744478) i Sjeverne Afrike sa unutargrupnim diverzitetom $0,006\pm 0,002$. Diverzitet između ove dvije podgrupe iznosio je $0,010\pm 0,002$. Na osnovu ovog stabla izolati TSWV iz Srbije bliži su izolatima iz Crne Gore i Bugarske, nego ostalim evropskim izolatima. Bootstrap podrška za razdvajanje podgrupa 1 i 2 bila je niža (85 i 42%) jer su ove grupe polifiletičkog porijekla. Izolati u okviru Sjeverno-američkog klastera podijelili su se u tri podgrupe. U podgrupi 3 su izolati iz Španije ($0,004\pm 0,002$), u podgrupi 4 su izolati iz Italije i Japana ($0,003\pm 0,002$), dok su u podgrupi 5 izolati iz Sjedinjenih Američkih Država ($0,017\pm 0,003$). Diverzitet između ove tri podgrupe varirao je od $0,015\pm 0,005$ do $0,020\pm 0,004$. Brazilski klaster čini samo jedan izolat. U okviru azijske grupe našli su se izolati iz Francuske, Japana i Južne Koreje ($0,017\pm 0,004$).

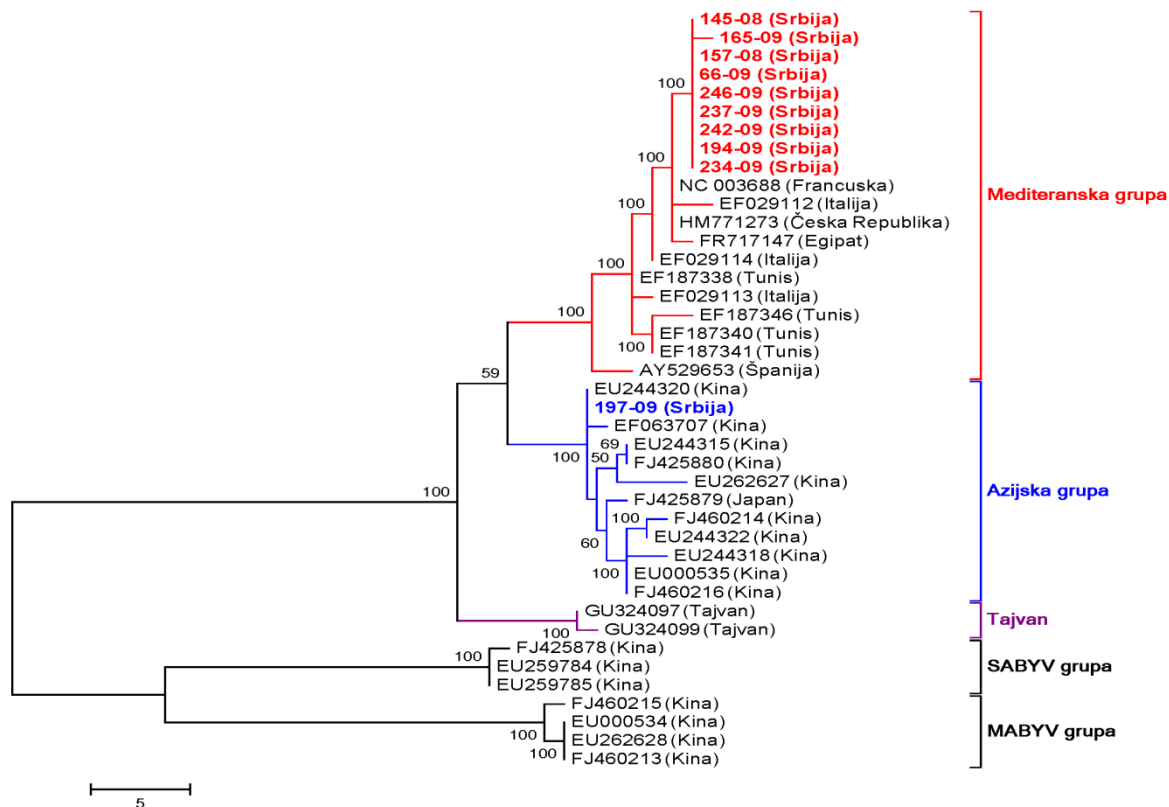
5.8.2.2.5. Filogenetske analize CABYV

Pošto su se prajmeri CABYV up/down pokazali kao osjetljiviji za detekciju izolata CABYV iz Srbije u odnosu na prajmere CE9/10, da bi utvrdili da li postoji razlika u grupisanju u filogenetskim stablima sekvenci CABYV dobijenih sa jednim, odnosno drugim parom prajmera, rekonstruisana su dva filogenetska stabla prikazana na slikama 124 i 125. Prvo filogenetsko stablo je rekonstruisano na osnovu sekvenci dužine 550 nt 10 izolata CABYV iz Srbije i 24 sekvence CABYV iz različitih djelova svijeta, dok je drugo rekonstruisano na osnovu sekvenci istih izolata ali dužine 248 nt. Oba filogenetska stabla su rekonstruisana Maximum parsimony metodom, a za „outgrup“ je izabrano sedam sekvenci izolata *Melon aphid-borne yellows virus* i *Suakwa aphid-borne yellows virus*, koji kao i CABYV pripadaju rodu *Polerovirus*. Kod oba filogenetska stabla vidi se da se izolati CABYV grupišu u tri grupe označene kao Mediteranska, Azijska i grupa izolata sa Tajvana, što je podržano visokim „bootstrap“ vrijednostima od 100% za sve izdvojene grupe.



Slika 124. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 550 nt nukleotidnih sekvenci dijela CP i MP gena 34 izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* korišćenjem MEGA 5.0. Maximum-parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence SABYV i MABYV su korišćene kao „outgroup“. Izolati CABYV iz Srbije su naznačeni i u različitim bojama ako pripadaju različitim grupama

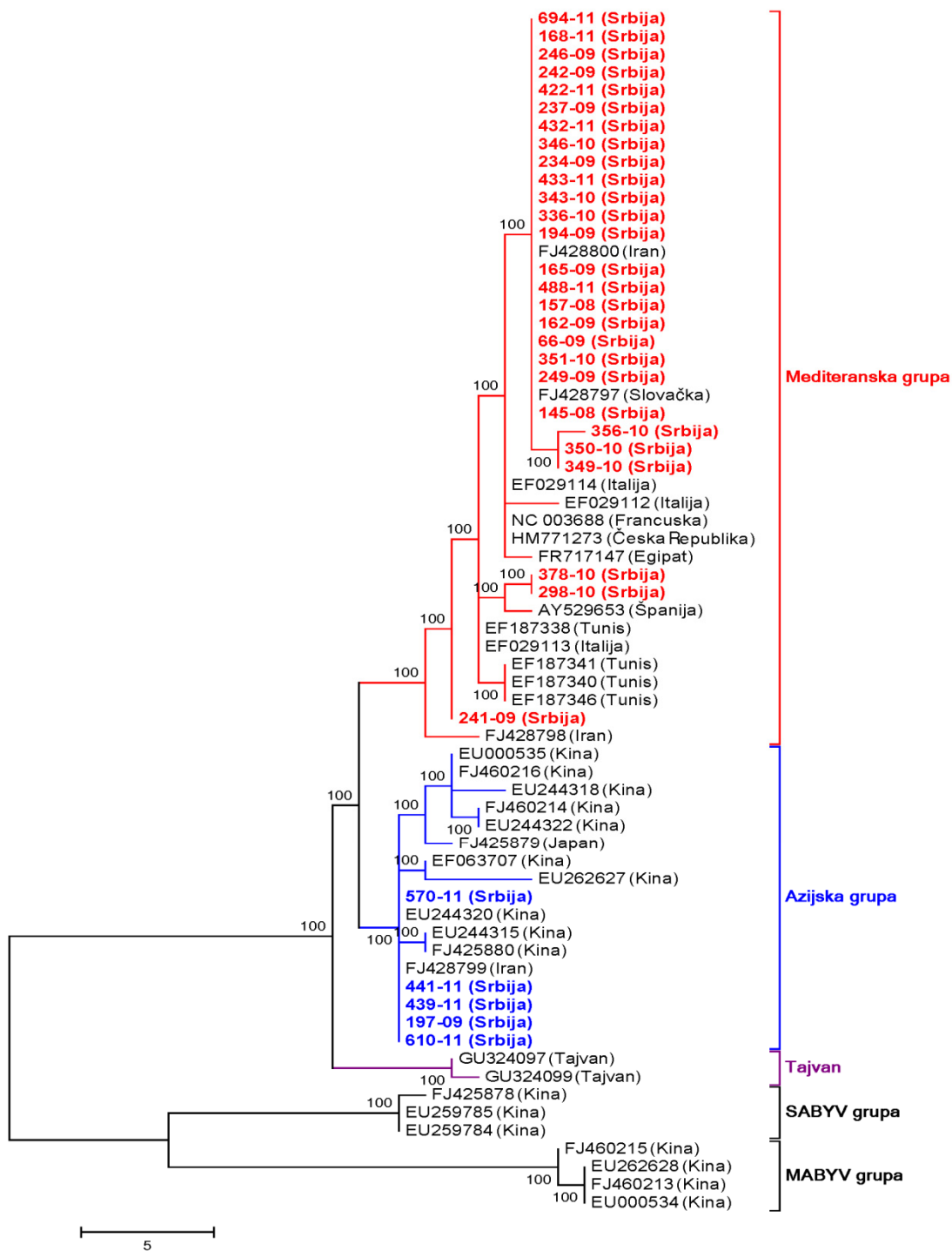
Pošto je utvrđeno da dužina sekvenci dobijenih korišćenjem prajmera CE9/10, odnosno CABYV up/down nije od značaja prilikom grupisanja izolata u filogenetskom stablu, dalje je sekvencioniranje izolata CABYV iz Srbije obavljeno prajmerima CABYV up/down za koje je utvrđeno da su pogodniji. Dalje filogenetske analize su obavljene na osnovu sekvenci dobijenih amplifikacijom sa ovim prajmerima.



Slika 125. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 248 nt nukleotidnih sekvenci dijela CP i MP gena 34 izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* korišćenjem MEGA 5.0. Maximum-parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence SABYV i MABYV su korišćene kao „outgroup“. Izolati CABYV iz Srbije su naznačeni i u različitim bojama ako pripadaju različitim grupama

Filogenetsko stablo je rekonstruisano Maximum parsimony metodom na osnovu 60 sekvenci izolata CP i MP gena CABYV (Slika 126). Ukupni nukleotidni diverzitet sekvenci CABYV u stablu bio je 0,028 ($\pm 0,007$). U stablu su se izdvojile tri grupe: Mediteranska (unutargrupni diverzitet $0,009 \pm 0,003$), Azijska ($0,012 \pm 0,004$) i Tajvanska ($0,005 \pm 0,005$). Međugrupna variranja u stablu kretala su se od $0,042 \pm 0,014$ do $0,052 \pm 0,015$. Bootstrap podrška za ovakvo grupisanje bila je 100% za sve tri grupe.

Najviše izolata CABYV iz Srbije, 27, grupisalo se u okviru Mediteranske grupe, dok se pet izolata grupisalo u Azijskoj grupi. U Mediteranskoj grupi, osim izolata iz Srbije su i drugi izolati iz Evrope (Italija, Francuska, Španija, Češka i Slovačka), izolati iz Afrike (Tunis i Egipat) i tri izolata iz Irana. U okviru Azijske grupe su, osim izolata iz Srbije, svi izolati iz Azije (Kina, Japan i Iran), dok Tajvansku grupu čine dva izolata iz Tajvana.



Slika 126. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 195 nt nukleotidnih sekvenci dijela CP i MP gena 60 izolata *Cucurbit aphid-borne yellows virus* korišćenjem MEGA 5.0. Maximum-parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gdje su bootstrap vrijednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Sekvence SBYV i MABYV su korišćene kao „outgroup“. Izolati CABYV iz Srbije su naznačeni i u različitim bojama ako pripadaju različitim grupama

6. DISKUSIJA

Na tikvama se javlja veliki broj prouzrokovaca bolesti i štetočina, ali ekonomski najznačajnije gubitke prouzrokuju virusi (**Provvidenti and Schroeder, 1970; Blanchard et al., 1994; Lecoq et al., 2003; Sevik and Arli-Sokmen, 2003**), kojih je do sada na različitim vrstama familije tikava opisano preko 50 (**Kucharek and Purcifull, 1997**). Međutim, ekonomski najznačajnije štete, koje pojedinih godina mogu potpuno da unište proizvodnju, u većini regiona gajenja ovih kultura prouzrokuju virusi koji se na neperzistentan način prenose velikim brojem vrsta biljnih vaši. Značajne štete mogu da nanesu i virusi koji se prenose sjemenom tikava, kao što je SqMV (**Lovisolo, 1980; Kucharek and Purcifull, 1997; Dukić et al., 2001; Tóbiás and Tulipán, 2002**). Posljednji h godina, veliki problem u proizvodnji tikava u nekim regionima gajenja, izazivaju virusi, kao što su virus žute kržljivosti tikava (CYSDV), virus žutila nerava krastavca (CVYV), virus infektivnog žutila salate (LIYV) i virus lažnog žutila repe (BPYV), koji se prenose leptirastim vašima, prije svega vrstom *Bemisia tabaci*, dok se, od gore navedenih, samo za BPYV kao vektor navodi *Trialeurodes vaporariorum* (**Duffus, 1965; Duffus and Flock, 1982; Lecoq et al., 2000; Rubio et al., 2001; Boubourakas et al., 2006**).

Iako u Srbiji postoji dugogodišnja tradicija gajenja biljaka familije tikava i one se gaje na značajnim površinama, proučavanja vezana za virusne bolesti biljaka familije Cucurbitaceae sprovedena u prošlosti u našoj zemlji bila su malobrojna i odnosila su se na izučavanje WMV na dinji i lubenici (**Stakić i Nikolić, 1966**) i virusnih oboljenja krastavca (**Tošić et al., 1996**). Međutim, pojava epidemijske razmjere viroza na ljetnjim tikvama tokom 2000. godine koja je gotovo uništila proizvodnju na nekim lokalitetima gajenja, skrenula je pažnju na ovaj značajan problem i podstakla opsežna istraživanja. Tada je kao prouzrokovac oboljenja identifikovan, pored do tada prisutnih WMV i CMV, novi virus za Srbiju-ZYMV (**Dukić et al., 2001**). Novija istraživanja kao i istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije, obavljena prije svega u cilju utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa na tikvama u Srbiji posle 2000. godine, takođe ukazuju da su kod nas najučestaliji i najrasprostranjeniji virusi koji se prenose biljnim vašima na neperzistentan način, ZYMV, WMV i CMV (**Krstić et al., 2002; Dukić et al., 2004; Duduk, 2008; Vučurović i sar., 2009a, 2009b**). Istraživanja

sprovedena od 2001. do 2004. godine ukazuju da je najzastupljeniji virus u usjevima tikava bio ZYMV, koji je bio prevalentan tokom 2001., 2002. i 2004. godine, dok je tokom 2003. godine ovaj virus bio iste zastupljenosti kao WMV. CMV je bio drugi po zastupljenosti 2001., a treći od 2002. do 2004. godine, dok je WMV bio treći 2001., a drugi 2002. i 2004. godine (**Krstić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2004; **Duduk**, 2008). U istraživanjima sprovedenim tokom 2007. godine ZYMV je bio treći po zastupljenosti, posle WMV i CMV, dok je tokom 2008. godine ponovo bio dominantan, ispred WMV i CMV (**Đekić et al.**, 2007b; **Vučurović et al.**, 2008, 2009a, 2009b). Obzirom na značaj viroza u proizvodnji tikava i značaj biljaka porodice Cucurbitaceae za poljoprivrednu proizvodnju u Srbiji, u okviru ove disertacije sprovedena su dalja detaljna ispitivanja virusa tikava koja su se odnosila kako na utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti pojedinih virusa na različitim lokalitetima gajenja, tako i na rasvjetljavanje brojnih epidemioloških aspekata, a koja zbog njihovog širokog kruga domaćina, osim tikava, mogu značajno da unaprijede proizvodnju i selekciju na otpornost i nekih drugih značajnih biljnih kultura u Srbiji (**Đekić et al.**, 2007b; **Vučurović i sar.**, 2008, 2009a, 2009b, 2010, 2011b). Takođe, osim ova tri virusa, ZYMV, WMV i CMV, u toku ovih istraživanja je na tikvama u Srbiji detektovano prisustvo dva nova virusa, a to su virus žutila tikava perzistentno prenosiv vašima (CABYV) čije je prisustvo prvi put detektovano u Srbiji i virus bronzavosti paradajza (TSWV) koji je prisutan u Srbiji, ali je ovim istraživanjima prvi put dokazan u usjevu tikava. Zastupljenost CABYV se, od kada je prvi put detektovan 2008. godine kada se javljao sporadično, do kraja istraživanja značajno povećala, dok je TSWV detektovan samo 2009. godine u pojedinačnim biljkama. Prisustvo ova dva nova virusa na tikvama u Srbiji, može da bude veoma značajno, naročito CABYV, jer se za ovaj virus često navodi da ima izražen sinergistički efekat, posebno sa najdestruktivnijim virusom tikava ZYMV (**Bourdin and Lecoq**, 1994), dok je TSWV jedan od ekonomski najznačajnijih virusa za proizvodnju mnogih poljoprivrednih kultura (**Pappu et al.**, 2009).

6.1. Simptomi u polju

Na biljkama tikava uočeni su brojni i raznovrsni simptomi na svim nadzemnom djelovima. Poznato je da simptomi na biljkama porodice tikava variraju u zavisnosti od

biljne vrste, genotipa, vremena ostvarene infekcije, kao i uslova spoljne sredine (Provvidenti and Schroeder, 1970; Lecoq et al., 1983; Provvidenti, 1996a; Zitter, 1996; Desbiez and Lecoq, 1997; Dukić et al., 2001; Krstić et al., 2002; Wang et al., 2002; Tóbiás and Tulipán, 2002; Đekić i sar., 2007b; Vučurović et al., 2008). Tokom čitavog perioda istraživanja, nije se mogla uočiti povezanost između simptoma i virusa koji ga prouzrokuje, kako u slučaju pojedinačnih infekcija, tako ni u slučaju miješanih infekcija, bez obzira o kojoj vrsti familije tikava se radi. Upravo zbog takve raznovrsnosti, simptomi nemaju praktični dijagnostički karakter, već se samo na osnovu simptomatologije može tvrditi da li se radi o virusnoj infekciji ili ne.

Ponekad su se na istoj biljci, na različitim djelovima vriježe, javljali različiti simptomi, od resastih i nitavih listova do listova na kojima su se ispoljavali simptomi blagog mozaika. Ovakva pojava objašnjava se različitim temperaturnim uslovima u vrijeme infekcije i replikacije virusa u biljci (Desbiez and Lecoq, 1997). Takođe, veliku ulogu u ispoljavanju simptoma imala je i starost biljke u vrijeme ostvarene infekcije, pa su ponekada na jako zaraženim biljkama tikava, plodovi bili ili bez simptoma ili samo sa blagim promjenama u obojenosti. U takvim slučajevima prinos nije bio značajno ugrožen, jer su plodovi uspijevali normalno da sazru i nalivenost sjemenki je bila dobra, dok su se nekada javljali plodovi koju su bili jako deformisani i često usled toga otpadali sa vriježe prije vremena, a broj sjemenki u njima je bio veoma mali (Vučurović et al., 2012, Berenji Janoš, lična komunikacija). Posebno velike štete nastaju prilikom ranih infekcija osjetljivih biljaka, ali i u slučajevima miješanih zaraza sa dva ili tri virusa. Pri miješanim infekcijama sa dva ili više virusa na zaraženim biljkama često dolazi do sinergističkog dejstva, tako da se intenzitet bolesti povećava usled čega su i štete u usjevu mnogo značajnije (Desbiez and Lecoq, 1997; Wang et al., 2002; Zeng et al., 2007). Tako su mešane infekcije virusima ZYMV i CMV izazvale pojavu jakih simptoma bolesti na zaraženim biljkama dinje i kukuruz (Wang et al., 2002; Massumi et al., 2007), što je uočeno i na tikvama, posebno uljanoj kod nas 2008. godine (Vučurović et al., 2009a; Vučurović et al., 2012). Osim direktnog smanjenja prinosa, zaraze virusima smanjuju i tržišnu vrijednost plodova i do 94% (Blua and Perring, 1989).

Iako su se u toku ovih istraživanja na tikvama javili brojni i raznovrsni simptomi, nijesu mogli da se dovedu u vezu niti sa biljkom domaćinom, niti sa

lokalitetom, osim u slučaju simptoma mozaičnih prošaravanja, koja su podsjećala na infekciju nekim od virusa *Tospovirus* roda kada je dokazan TSWV. Međutim, uočena je promjena u zastupljenosti pojedinačnih i miješanih infekcija po godinama. Tokom prve, druge i posljednje godine ispitivanja, dominantne su bile miješane infekcije, da bi u trećoj i četvrtoj godini ispitivanja preovladale pojedinačne, naročito one sa ZYMV. Ovakva situacija se može povezati sa činjenicom da su u godinama kada su dominirale miješane infekcije ukupni nivoi zaraze bili veći, a da je jedna od tih godina, 2008. godina, predstavljala epidemijsku godinu i simptomi su bili izraženiji, dok u godinama u kojima su preovladavale pojedinačne infekcije i simptomi, čak i oni izazvani veoma destruktivnim, ZYMV bili blaži. Pojava periodičnih epidemija u usjevima tikava, naročito onih prouzrokovanih ZYMV je često navođena i od strane drugih autora (**Lelley and Hengmuller, 2000; Riedle-Bauer et al., 2002; Tóbiás and Tulipán, 2002**). Pojava epidemijskih godina najvjerovatnije je uslovljena klimatskim faktorima, prije svega blagim zimama i toplim proljećima sa umjerenom količinom padavina, koje se ne izlučuju u kratkom vremenskom periodu i koje pogoduju prezimljavanju vektora ovih virusa-biljnih vaši.

Osim simptoma tipa mozaika, u početku istraživanja na pojedinačnim biljkama po obodima parcela tokom 2008. godine, a sljedećih godina na sve većem broju biljaka uočeni su simptomi, koji do tada nijesu bili tipični za viruse tikava u Srbiji. Simptomi su uključivali žutilo prvo starijeg lišća, a kasnije bi cijela biljka dobila žutu boju, a lišće je postajalo zadebljalo i krto. Ovi simptomi takođe su zabilježeni od strane drugih autora (**Lecoq et al., 1992; Abou-Jawdah et al., 2000; Boubourakas et al., 2006; Bananej and Vahdat, 2008**). U ovakvim uzorcima detektovan je novi virus za Srbiju virus žutila tikava perzistentno prenosiv vašima (CABYV), što predstavlja dodatni problem i opasnost za proizvodnju tikava u Srbiji (**Vučurović et al., 2011a**). Takođe, zabilježen je i sinergistički efekat između CABYV i najdestruktivnijeg virusa tikava ZYMV, gdje se u miješanim infekcijama sa ova dva virusa, koncentracija ZYMV povećala i do 20 puta, dok je koncentracija CABYV ostala ista, a inficirane biljke su razvijale jače simptome u odnosu na biljke sa pojedinačnim infekcijama (**Bourdin and Lecoq, 1994**). Tako da ovaj novi nalaz CABYV predstavlja značajnu prijetnju, već ugroženoj, proizvodnji tikava u Srbiji.

6.2. Učestalost oboljenja

Procjena učestalosti oboljenja izvršena je, vizuelno, zatim brojanjem i utvrđivanjem procenta simptomatičnih biljaka i/ili serološkim testiranjem po 100 nasumično sakupljenih biljaka u pregledanim usjevima. Na osam lokaliteta gajenja tokom 2009. i 2010. godine procijenjena je učestalost virusnih infekcija upotrebom metode višestrukog transfera grupisanjem 100 biljaka u 25 zbirnih grupa od po četiri biljke. Sve tri primijenjene metode procjene učestalosti dale su slične rezultate. Učestalost se po godinama mijenjala i kretala se od 30-50% u 2007. godini, preko izuzetno visokih 80% u epidemijskoj 2008. godini, da bi tokom naredne dvije godine bila konstantna i kretala se oko 40%, a u posljednjoj godini ispitivanja ponovo dostigla visokih 60%. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji navode da u različitim uslovima procenat zaraženih biljaka u polju može varirati u zavisnosti od lokaliteta i gajene vrste od 10% pa čak do 100% (**Tóbiás and Tulipán, 2002**). Takođe, mnogi autori sugerišu da se epidemije u usjevima tikava javljaju ciklično i da su prije svega povezane sa ZYMV, jer je ovaj virus samo nekoliko godina nakon otkrića, pronađen u mnogim zemljama Evrope, Azije, Bliskog Istoka, Sjeverne i Južne Amerike i Okeanije i zbog toga se izdvaja kao primjer „emerging“ biljnog virusa (**Desbries and Lecoq, 1997**). Danas je ZYMV prisutan u skoro svim zemljama gdje se gaje biljke porodice Cucurbitaceae i predstavlja jedan od najdestruktivnijih virusa ove grupe gajenih kultura (**Gal-On, 2007; Bananej et al., 2008**). U Mađarskoj do 1995. godine, kad je ZYMV prvi put otkriven, najvažniji virusi tikava bili su CMV i WMV (**Tóbiás et al., 1996**). Međutim, za kratko vrijeme, ZYMV se raširio u sve djelove zemlje izazivajući zastrašujuće epidemije u usjevu različitih vrsta tikava, pa i *C. pepo* var. *styriaca* (**Tóbiás and Tulipán, 2002**). U Austriji, gdje se uljana tikva golica tradicionalno gaji već više od 100 godina, epidemijska pojava virusnog oboljenja izazvanog sa ZYMV prvi put se javila 1997. godine kada je nanijela takve štete da je prepolovila ukupan prinos *C. pepo* var. *styriaca* (**Lelley and Hengmuller, 2000; Riedle-Bauer et al., 2002**). Narednih godina, ekonomski gubici su bili manji i pored toga što su biljke u skoro 100% usjeva širom zemlje ispoljavale virozne simptome (**Riedle-Bauer et al., 2002**). Takođe, i u Srbiji je prva pojava epidemije i uništena proizvodnja u velikom broju usjeva tikava vezana za prvo otkriće otkriće ZYMV (**Dukić et al., 2001**), a nova epidemijska pojava je zabilježena tek 2008. godine.

6.3. Identifikacija virusa tikava primjenom DAS-ELISA testa

Pojava i rasprostranjenost virusa infektivnih za tikve praćena je u usjevima 14 različitih vrsta, sorti i varijeteta tikava, koje se intenzivno gaje kod nas, takođe, testirane su i četiri vrste tikava koje se ne gaje masovno, ali koje ukoliko su zaražene virusima predstavljaju izvor zaraze za uljanu tikvu i druge ekonomski značajne domaćine detektovanih virusa iz familije Cucurbitaceae. Kako bi se izvršila inventarizacija prisutnih virusa tikava u našoj zemlji pregledan je ukupno 61 lokalitet gajenja, od čega se 47 nalazilo u šest okruga u Vojvodini, koja je i glavno proizvodno područje tikava u Srbiji, dok je 14 pregledanih lokaliteta izvan Vojvodine smješteno u osam okruga centralne, južne i istočne Srbije.

Rezultati petogodišnjeg praćenja pojave i rasprostranjenosti virusa tikava u našoj zemlji, ustanovili su prisustvo ZYMV, WMV i CMV, čija se učestalost po godinama i lokalitetima mijenjala. U svakoj godini ispitivanja dokazano je prisustvo sva tri virusa. U prve dvije godine ispitivanja češće su otkrivene miješane nego pojedinačne zaraze, dok su u preostale tri godine ispitivanja bile zastupljenije pojedinačne infekcije. Ni u jednom od sakupljenih uzoraka tokom petogodišnjih istraživanja nije utvrđeno prisustvo TRSV, što je očekivano s obzirom na njegov status na karantinskoj EPPO A2 listi (**Anonymus**, 1997) i na karantinskoj listi IA dio I štetnih organizama Republike Srbije (**Službeni Glasnik RS**, 7/10). Iako se SqMV širi sjemenom tikava i iako je osim u Španiji (**Luis-Arteaga**, 1994), ovaj virus prisutan u Grčkoj (**Avgelis and Katis**, 1989), Bugarskoj (**Dikova**, 2005) i Češkoj Republici (**Svoboda and Leisova-Svobodova**, 2011), nama geografski veoma bliskim zemljama, prisustvo SqMV nije utvrđeno u Srbiji. Takođe, u testiranim uzorcima nije utvrđeno prisustvo PRSV, koji se smatra jednim od najštetnijih virusa tikava (**Oliveira et al.**, 2003) i čije se epidemije javljaju povremeno u umjerenom klimatu, a čija pojava je zabilježena u Njemačkoj (**Hein**, 1977), Italiji (**Ragozzino and Stefanis**, 1977), Francuskoj (**Lecoq et al.**, 1992), Španiji (**Luis-Arteaga et al.**, 1998), Bugarskoj (**Dikova**, 2005). Najskoriju pojavu ovog virusa u Evropi utvrdili su 2009. godine u Poljskoj **Hasiów-Jaroszewska et al.** (2010).

Pojava, rasprostranjenost, kao i relativna zastupljenost sva tri detektovana virusa tokom istraživanja sprovedenih od 2007-2011. godine značajno je varirala i prije svega zavisila je od godine ispitivanja, lokaliteta i tipa infekcije. Prema tome, WMV je bio prevalentan i najrasprostranjeniji u toku prve godine testiranja, a narednih godina

učestalost njegove pojave se smanjivala, iako je bio drugi po zastupljenosti i prisutan u visokom procentu testiranih uzoraka. Tokom 2010. godine, WMV je bio detektovan u manje od 10% testiranih uzoraka, što je bila njegova najmanja učestalost u ovom petogodišnjem istraživanju i jedino u toj godini je bio treći virus po zastupljenosti u tikvama. Međutim, u poslednjoj godini istraživanja WMV je ponovo dokazan u skoro polovini testiranih uzoraka i bio drugi virus po zastupljenosti. Iako prvi podaci o prisustvu ovog virusa kod nas datiraju iz 1966. godine (**Stakić i Nikolić**), prije desetak godina u usjevima tikava se javljao sporadično (**Krstić et al.**, 2002), međutim već 2002. godine je bio drugi po zastupljenosti, a 2003. godine je bio prvi po zastupljenosti i detektovan u istom broju uzoraka kao i ZYMV, dok je 2004. godine bio takođe drugi po zastupljenosti, ali prisutan u veoma velikom broju uzoraka (**Dukić et al.**, 2004; **Duduk**, 2008). Iako je ZYMV 2007. godine dokazan u gotovo jednakom procentu testiranih uzoraka kao i CMV u narednim godinama istraživanja njegova zastupljenost je naglo porasla, a 2008. godine je dokazan u skoro 100% testiranih uzoraka i bio prvi po zastupljenosti virus u tikvama, što je ostao i do kraja ovih istraživanja. Ovakva zastupljenost ZYMV ne iznenađuje i potpuno je u skladu sa rezultatima drugih autora, po kojima je ovaj virus u period od 2001-2004. godine takođe bio najzastupljeniji virus na tikvama u Srbiji (**Krstić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2004; **Duduk**, 2008). Suprotno 2007. i 2008. godini kada je CMV detektovan u više od polovine testiranih uzoraka i bio drugi, odnosno treći virus po zastupljenosti, procenat infekcija u kojima je dokazan CMV u 2009. godini je bio veoma mali, čak ispod 5% testiranih uzoraka. To je najmanja zastupljenost nekog virusa u ovim petogodišnjim ispitivanjima. Međutim u 2010. i 2011. godini procenat uzoraka u kojima je ustanovljena infekcija sa CMV, ponovo je značajno porastao. Ova variranja u zastupljenosti CMV donekle se razlikuju od ranijih istraživanja virusa tikava u Srbiji u kojima je u periodu od 2001-2004. godine CMV uvijek bio zastupljen u oko 50% testiranih uzoraka. Međutim, zajedničko za sve godine istraživanja ovog virusa u Srbiji je da on nikada nije bio najzastupljeniji virus na tikvama u Srbiji (**Krstić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2002; **Dukić et al.**, 2004; **Duduk**, 2008).

Pojava ovakvih konstantnih promjena i variranja u zastupljenosti pojedinih virusa koji izazivaju simptome mozaika na tikvama zabilježena je i u Brazilu (**Yuki et al.**, 2000), Kaliforniji (**Grafton-Cardwell et al.**, 1996), na Havajima (**Ullman et al.**,

1991), Illinoisu (**Jossey and Babadoost, 2008**), Španiji (**Luis-Arteaga et al., 1998**) i Turskoj (**Sevik and Arli-Sokmen, 2003**). Sva tri virusa detektovana u ovim istraživanjima prenose se na neperzistentan način vašima, pa je zbog toga veoma značajno naglasiti da je tokom pregleda često uočena i jaka infestacija tikava biljnim vašima, naročito u posljednje dvije godine ispitivanja. Prisustvo efikasnog/efikasnih vrsta vektora vjerovatno ima presudan uticaj na ovako visoke procenete infekcije virusima tikava. Takođe, prostorne ili vremenske promjene u populaciji vektora mogu značajno uticati na efikasnost prenošenja virusa, a tako i na učestalost pojave oboljenja u polju (**Castle et al., 1992**). Dominantna zastupljenost ZYMV u uzorcima sakupljenim u ovim petogodišnjim istraživanjima, može da predstavlja značajan problem u proizvodnji tikava u Srbiji, jer se ovaj virus smatra jednim od ekonomski najznačajnijih patogena na tikvama. Ovaj virus se javlja u preko 50 država širom svijeta, prouzrokujući epidemije koje nerijetko potpuno uništavaju proizvodnju odražavajući se kako na prinos, tako i na kvalitet plodova (**Luis-Arteaga et al., 1998; Papayiannis et al., 2005; Lecoq et al., 2009**). Međutim, ni zastupljenost drugog po redu virusa u ovim petogodišnjim istraživanjima ni u kom slučaju ne smije biti zanemarena, jer pored toga što je on jedan od virusa sa veoma širokim rasprostranjenjem i velikim krugom domaćina, WMV se često javlja i u miješanim infekcijama, od kojih su naročito značajne one sa ZYMV (**Lovisol, 1980; Dijkstra, 1992; Shukla et al., 1994**). Takođe, pažnju treba obratiti i na prisustvo CMV koji je, iako dokazan u najmanjem broju testiranih uzoraka, virus sa veoma širokim rasprostranjenjem i jednim od najširih krugova domaćina od svih biljnih virusa i stalno je prisutan u usjevima različitih vrsta tikava u Srbiji.

Razlike u pojavi, rasprostranjenosti i učestalosti virusa koji se prenose vašima na neperzistentan način u zavisnosti od godine i lokaliteta često se javljaju kod virusa tikava i u drugim djelovima svijeta (**Tóbiás and Tulipán, 2002; Lecoq et al., 2003**). Ipak, veoma niska zastupljenost pojedinih virusa u periodu od 2007-2011. godine, naročito CMV 2009. godine i WMV godinu dana kasnije bila je neočekivana i najvjerovatnije vezana za smanjeno prisustvo određenih vrsta vektorskih vaši koje ove viruse efikasno prenose na neperzistentan način. Za viruse i biljke iz familije tikava kao njihove domaćine, navodi se da su ne samo složen već i izrazito promjenljiv patološki sistem zbog stalne pojave novih vrsta ili sojeva u okviru vrsta (**Lecoq et al., 2009**).

U svim sakupljenim uzorcima tokom prve dvije godine testiranja detektovan je bar jedan od testiranih virusa. Međutim, u ukupno 9,1% simptomatičnih uzoraka sakupljenih u periodu od 2009-2011. godine nije detektovano prisustvo ni jednog od šest testiranih virusa. Ovakva situacija se može objasniti time da je simptome na sakupljenim biljkama izazvao neki virus koji nije uključen u ova testiranja, smanjenom koncentracijom virusa u biljkama, usled čega virus nije mogao biti serološki dokazan ili čak nekim od abiotskih činilaca koji mogu da indukuju simptome koji ponekad liče na virusne infekcije, a što navode u svojim istraživanjima i drugi autori (**Gholamalizadeh et al., 2008; Jossey and Babadoost, 2008; Sevik and Arli-Sokmen, 2003; Yuki et al., 2000**).

6.4.1. Biološka identifikacija i karakterizacija ZYMV

Biološko testiranje četiri odabrana izolata ZYMV iz Titela (128-08), Kisača (140-08 i 146-08) i Bačkog Petrovca (147-08) ukazali su na fenotipsku varijabilnost ovog virusa u našoj zemlji. Sve forme i varijeteti obične tikve (*C. pepo*) uključene u ova ispitivanje pokazale su izuzetnu osjetljivost prema ZYMV. Između ispitivanih izolata postojala je razlika u tipu i vremenu ispoljavanja simptoma, iako su uglavnom izazvali tipove simptoma koji su ranije zabilježeni u literaturi na *C. pepo* (**Wong et al., 1994; Prieto et al., 2001; Dukić et al., 2002; Svoboda and Polak, 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Yakoubi et al., 2008; Vučurović et al. 2009c**). *C. mixta*, *C. maxima* i *C. moschata*, takođe su pokazale u literaturi opisane simptome (**Tóbiás et al., 1996; Tóbiás and Palkovics, 2003; Vučurović et al. 2009c**) i bile osjetljive prema ZYMV, samo je kod *C. moschata* 'Beja' zabilježen izvjesni stepen otpornosti, jer je ovu sortu uspio da zarazi samo izolat 147-08. *C. mixta* i *C. moschata* 'Lola' su reagovale na infekciju izolatom 128-08 osim hromatskim promjenama i deformacijom oblika lista.

Komercijalno dostupne sorte krastavaca u Srbiji bile su sistemično zaražene ZYMV što je u skladu sa rezultatima drugih autora (**Wong et al., 1994; Prieto et al., 2001; Dukić et al., 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Yakoubi et al., 2008; Vučurović i sar. 2009c**). Međutim, sve sorte krastavca pokazale su manju osjetljivost od biljaka roda *Cucurbita*. Ipak, uočene su značajne razlike između ispitivanih izolata na osnovu toga što su pojedini izolati uspjeli da zaraze samo određene

sorte krastavca, a izolat 128-08 nije uspio da indukuje pojavu simptoma ni na jednoj od ispitivanih sorti krastavca. Slične rezultate su zabilježili i **Svoboda and Polak (2002)**.

Biljke *C. melo* 'Ananas' pokazale su se otpornim na inokulacije izolatima ZYMV, za razliku od drugih istraživanja koja ovu biljku navode kao osjetljivu na vještačke inokulacije ZYMV (**Wong et al., 1994; Prieto et al., 2001; Dukić et al., 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Yakoubi et al., 2008**). Takođe, i vrsta *C. anguria* je ispoljila određeni stepen otpornosti na inokulacije ZYMV, jer je samo izolat 140-08 izazvao pojavu simptoma, iako do sada ova vrsta nije ispitivana kao eksperimentalni domaćin ZYMV, mada je zabilježena prirodna infekcija sa ZYMV (**Sai Gopal and Johnson, 2009 loc. cit. Özer et al., 2012**).

Pojava sistemskih simptoma na *C. lanatus* 'Creamson sweet' i *L. siceraria* posle inokulacije sa izolatima ZYMV je u skladu sa rezultatima drugih autora (**Wong et al., 1994; Dukić et al., 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Yakoubi et al., 2008; Vučurović et al., 2009c**). Ispitivani izolati su se međusobom razlikovali po tome što samo izolat 128-08 nije izazvao pojavu simptoma na *C. lanatus* 'Creamson sweet', a najizraženije simptome je izazvao izolat 146-08. *L. siceraria* nijesu zarazila dva od četiri ispitivana izolata, 140-08 i 147-08, dok je izolat 128-08 izazvao najizraženije simptome. Slične rezultate zabilježili su **Dukić et al. (2002)** i **Vučurović et al. (2009c)**.

Biljke roda *Chenopodium*, kao i *Gomphrena globosa* reagovala su pojavom tipičnih lokalnih simptoma, kao što navode i drugi autori (**Dukić et al., 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Vučurović et al., 2009c**). Ipak, *C. foetidum* i *C. murale* su bile nešto otpornije na ZYMV u odnosu na druge ispitivane vrste roda *Chenopodium*, jer je kod *C. foetidum* samo izolat 147-08 izazvao pojavu simptoma, a za *C. murale* osim 147-08 infektivna je bio i 128-08. Rezultate slične ovima dobili su i **Dukić et al. (2002)** u okviru ispitivanja kruga domaćina ZYMV.

Ova istraživanja su pokazala da biljke roda *Nicotiana*, *D. stramonium*, *Trichosanthes cucumerina*, *Cyclanthera pedata*, *Momordica* sp., *Benincasa hispida*, *Petunia x hybrida*, *Physalis floridana* nijesu domaćini ZYMV, kao što su naveli i drugi autori (**Wang et al., 1992; Wong et al., 1994; Prieto et al., 2001; Dukić et al., 2002; Tóbiás and Palkovics, 2003; Hosseini et al., 2007; Yakoubi et al., 2008; Vučurović et al., 2009c**). Kako su među biljkama, za koje se u ovim, ali i u istraživanjima drugih

autora ispostavilo da nijesu domaćini ZYMV, četiri predstavnika familije Cucurbitaceae, posebnu pažnju treba posvetiti tim biljkama u cilju traženja i pronalaženja gena rezistentnosti prema ZYMV.

Iako je fenotipska varijabilnost ZYMV intenzivno proučavana u svijetu (**Lecoq and Pitrat**, 1984; **Desbriez et al.**, 1996; **Bananej et al.**, 2008), još uvijek nema dovoljno informacija za populaciju ovog virusa u regionu Evrope (**Glasa et al.**, 2007). Biološka varijabilnost izolata ZYMV zabilježena je i ranije između izolata različitog geografskog porijekla ili između izolata koji su dug vremenski period održavani u uslovima staklenika (**Desbriez et al.**, 1996). Takođe, proučavajući varijabilnost izolata porijeklom iz Slovačke i Češke (**Glasa et al.**, 2007) i Irana (**Bananej et al.**, 2008) uočene su razlike između ispitivanih izolata, koje su se uglavnom odnosile na jačinu ispoljenih simptoma testiranih prirodnih ili eksperimentalnih domaćina.

Razlike u ispoljavanju simptoma na test biljakama inokulisanim različitim izolatima ukazuju na fenotipsku varijabilnost populacije ZYMV (**Bananej et al.**, 2008), a različiti odgovori pojedinih vrsta obične tikve ili drugih biljaka familije Cucurbitaceae na inokulacije određenim izolatima ZYMV, sa druge strane, ukazuju na postojanje različitog nivoa otpornosti u biljkama osjetljivim prema ZYMV (**Pfossen and Baumann**, 2002; **Glasa et al.**, 2007).

Biološko testiranje sprovedeno u ovom radu je, na osnovu ispoljavanja i tipa simptoma ispitivanog kruga domaćina, otkrilo razlike između četiri izolata ZYMV porijeklom iz Srbije. Interesantno je da su se izolati razlikovali ne samo po jačini ispoljenih simptoma već i po ispitivanom krugu domaćina. Razlike u intenzitetu simptoma i razlike u krugu domaćina, koje su izazvali ispitivani izolati, ukazuju da varijabilnost u okviru populacije ZYMV može da ima velike praktične posljedice u proizvodnji i ispoljavanju određenog nivoa otpornost gajenih genotipova tikava.

Objekti ove činjenice treba uzeti u obzir i dati im ključno mjesto u programima selekcije tikava na otpornost. Utvrđivanje fenotipske raznovrsnosti u okviru populacije jednog virusa određenog geografskog područja, osnova je za utvrđivanje genetičkog diverziteta virusnih izolata jedne populacije. Buduća ispitivanja treba da uključe karakterizaciju velikog broja izolata u cilju određivanja prevalentnih koji bi dalje bili korišćeni u budućim programima selekcije. Na osnovu identifikacije dominantnih patotipova virusa stvaraju se preduslovi za uspješni skrining osnova rezistentosti koje je

potrebno identifikovati u germplazmi tikava, jer je gajenje otpornih genotipova najefikasniji i najuspješniji način kontrole svih bolesti koje izazivaju biljni virusi koji se neperzistentno prenose vašima.

Biološka varijabilnost, na osnovu simptoma u polju, utvrđena je između izolata iz jugoistočne Francuske, koji su ispoljavali izraženije simptome u odnosu na izolate iz jugozapadne Francuske (**Lisa and Lecoq**, 1984). Ova istraživanja su pokazala i razliku između ove dvije grupe izolata i tipičnog soja ZYMV prisutnog u Italiji. Sličnu varijabilnost na osnovu simptoma u polju između izolata ZYMV iz različitih djelova SAD-a utvrdili su i **Provoidenti et al.** (1984). Na osnovu simptoma u polju, koje su izolati 128-08, 140-08, 146-08 i 147-08 izazvali na uljanoj tikvi sorte Olinka, nije uočena drastična razlika između izolata. Svi izolati su izazvali pojavu hlorotičnog prošaravanja sa neznatnom varijacijom simptoma. Obzirom da ispoljavanje tipa simptoma zavisi od vremena infekcije, a da je između ispitivanih izolata uočena fenotipska varijabilnost, buduća biološka karakterizacija izolata ZYMV u našoj zemlji treba da uključi i mehaničke inokulacije u kontrolisanim uslovima *C. pepo* var. *styriaca* i to u različitim fazama razvoja biljke.

Utvrdjivanje fenotipske raznovrsnosti u okviru populacije jednog virusa određenog geografskog područja, osnova je za utvrđivanje genetičkog diverziteta virusnih izolata jedne populacije. Međutim, iako su se ispitivani izolati međusobno razlikovali po tipu i vremenu ispoljavanja na test biljkama, nije postojala korelacija između fenotipske i genotipske varijabilnosti na osnovu dijela genoma ZYMV koji je u ovim istraživanjima proučavan.

6.4.2. Biološka identifikacija i karakterizacija WMV

Nakon mehaničkih inokulacija biljaka *C. pepo* 'Ezra F1', inokulumom pripremljenim iz uzorka *C. pepo* 'Tosca', zabilježena je pojava mozaika i klobučavosti, čime je potvrđena virusna priroda oboljenja i dobijeni izolati virusa. Odabrani izolati sa lokaliteta Ruma u polju su ispoljavali razlike u simptomatologiji: mozaik i blaga klobučavosti na listu, kao i mozaik na plodovima (izolat 255-09), mozaik i nitavost na listovima (256-09), zadržavanje zelene boje oko nerava na listu i mozaik na plodu (266-09).

Detaljnijom biološkom karakterizacijom ispitivanih izolata, zabilježena je pojava mozaika na inokulisanom lišću *C. pepo* 'Olinka', 'Beogradska tikvica', 'Ezra F1', 'Slovenačka golica', *C. moschata* 'Lola', a na *C. pepo* 'Olivia' i 'Zucchini' i pojava zadržavanja zelene boje oko nerava. Razlike su ispoljene na: (i) *C. maxima* za koju je samo jedan od ispitivanih izolata bio infektivan, (ii) *C. mixta* na kojoj je samo jedan izolat, osim mozaika izazvao i simptome lokalnih nekrotičnih pjega i (iii) *C. moschata* 'Beja' na kojoj jedan izolat nije izazvao pojavu simptoma. Simptome sistemskih infekcija, kao i razliku u jačini ispoljenih simptoma, na biljkama roda *Cucurbita* zabilježili su i drugi autori (**Web and Scott, 1965; Rahiman and Izadpanah, 1978; Purcifull and Hiebert, 1979; Provvidenti and Schroeder, 1970; Dukić et al., 2002; Moreno et al., 2004; Sharifi et al., 2008; Srinivasulu et al., 2010; Lecoq et al., 2011**).

Kod biljaka roda *Cucumis* simptomi posle vještačkih inokulacija su bili nešto slabije izraženi, a kod *C. sativus* 'Regal' simptomi se nijesu pojavili.

Takođe, uočavale su se i značajne razlika između izolata. Izolati su se razlikovali po infektivnosti za *C. anguria*, *C. lanatus* 'Creamson sweet', ili po jačini i tipu simptoma na *L. siceraria*. Ovakve reakcije test biljaka navode se i u literaturi (**Web and Scott, 1965; Rahiman and Izadpanah, 1978; Dukić et al., 2002; Lecoq et al., 2011**).

U saglasnosti sa literaturnim podacima je i pojava hlorotičnih lokalnih pjega na *C. quinoa* i *C. amaranticolor*, kao i pojava sistemskih hlorotičnih pjegavosti na *C. quinoa* (**Web and Scott, 1965; Rahiman and Izadpanah, 1978; Provvidenti and Schroeder, 1970; Davis, 1986; Tošić et al., 1998; Dukić et al., 2002; Moreno et al., 2004; Sharifi et al., 2008; Lecoq et al., 2011**). Upravo *C. quinoa* pokazala se kao pogodna test biljka za biološko razdvajanje izolata WMV od ZYMV. Takođe, u skladu sa rezultatima drugih autora zabilježeno je i odsustvo simptoma na *C. foetidum* i *C. murale* (**Davis, 1986; Tošić et al., 1998**). Izolat 266-09 na *C. quinoa* nije izazvao pojavu sistemskih simptoma, dok su druga dva izolata 255-09 i 356-09 izazvala pojavu sistemskih simptoma u vidu mozaika i sistemskih hlorotičnih pjega. Ovakve simptome na *C. quinoa* izazivaju izolati WMV koji su svrstani u grupu „emerging“ izolata koji su se pojavili u Francuskoj 1999. godine (**Desbiez et al., 2007**) koji na tikvama i dinjama izazivaju veoma destruktivne simptome. Po najnovijim istraživanjima populacije izolata WMV u Francuskoj, smatra se da „emerging“ polako zamjenjuju do sada prisutne „classic“ sojeve (**Moreno et al., 2004; Desbiez et al., 2011; Lecoq et al., 2011**).

Detaljnijom biološkom karakterizacijom izolata zabilježeno je odsustvo reakcije na test biljkama *D. stramonium* i *G. globosa* što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Davis, 1986; Tošić et al., 1998). Biljke iz roda *Nicotiana* (*N. debneyii*, *N. clevelandii*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Samsun', 'Banat', 'Prilep') nijesu reagovala pojavom simptoma nakon inokulacije ispitivanim WMV izolatima, što je u skladu sa krugom domaćina ovog virusa zabilježenom i od strane drugih autora (Web and Scott, 1965; Davis, 1986; Srinivasulu et al., 2010). Međutim, u Iranu su zabilježeni izolati koji mogu da zaraze *N. debneyii* (Sharifi et al., 2008), kao i izolati koji izazivaju sistemsku zarazu u vidu blagog mozaika na biljkama *N. benthamiana* (Moreno et al., 2004).

Kako ovi rezultati pokazuju da su biljke porodice Cucurbitaceae veoma osjetljive na infekciju WMV, kao i da su simptomi na izvornim biljkama u polju bili veoma jaki, što do ovih istraživanja nije bilo karakteristično za infekciju ovim virusom u Srbiji, na njega u budućnosti treba obratiti posebnu pažnju. Pojava „emerging“ izolata u Jugoistočnoj Francuskoj posle 2000. godine još jedan je od primjera tzv. „the invasion paradox“ (Sax and Brown, 2000; Fabre et al., 2010) gdje lokalni sojevi, za koje je očekivano da budu dobro adaptirani u određenim uslovima sredine, bivaju brzo zamijenjeni novim. Česta pojava je i da se u istoj biljci nađu i „classic“ i „emerging“ soj, što može znatno da oteža mogućnost unakrsne zaštite i zbog čega se smatra da je ona samo djelimično uspješna. Takođe, smatra se da česte pojave miješanih infekcija sa oba soja značajno favorizuju „emerging“ sojeve koji su bolji kompetitori i koji se bolje i efikasnije prenose i lakše šire na druge usjeve i domaćine u kojima prezimljavaju (Lecoq et al., 2011; Fabre et al., 2010).

6.4.3. Biološka identifikacija i karakterizacija CMV

Nakon mehaničkih inokulacija biljaka roda *Nicotiana*, ispitivanim izolatima zabilježena je pojava mozaika, nitavosti, klobučavosti, nekrotičnih pjega čime je potvrđena pripadnost ispitivanih izolata CMV. Detaljnom biološkom karakterizacijom odabranog izolata 115-08 iz *C. pepo* 'Olinka' zabilježena je pojava karakterističnih sistemskih simptoma opisanih za izolate CMV, kao što je mozaik i prosvijetljavanje nerava na različitim vrstama kao i sortama jedne vrste biljaka porodice Cucurbitaceae.

Simptomi koji su se pojavili na inokuliranim test biljkama odgovarali su simptomima zabilježenim za CMV i od strane drugih autora (**Provvidenti and Schroeder, 1970; Rahimian and Izadpanah, 1978; Francky et al., 1979; Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002; Tóbiás and Tulipan, 2002**). Međutim, uočene su i razlike u odnosu na krug domaćina koji su opisali **Dukić et al., (2002)**. Biljke *Solanum lycopersicum* 'San Pjer' koje su u istraživanjima **Dukić et al., (2002)** reagovale pojavom sistemičnog mozaika, deformacija i nekroze nijesu mogle biti zaražene izolatom 115-08, dok je ispitivani izolat izazvao lokalne nekrotične pjege na *Gomphrena globosa* za razliku od izolata (**Dukić et al., 2002**) koji nijesu zaražavali ovu vrstu. Biljke *C. foetidum* su reagovale pojavom deformacija i kržljivosti, za razliku od istraživanja **Krstić et al. (2002)** kada su se na ovim biljkama javili simptomi nekroze i mozaika.

Izolati CMV se razlikuju od izolata ZYMV i WMV na osnovu reakcija na biljkama roda *Nicotiana*. *N. glutinosa* je često korišćena kao dijagnostička vrsta (**Edwards and Gonsalves, 1983; Owen and Palukaitis, 1988; Chou et al., 2009**) i reaguje različitim simptomima u zavisnosti od soja virusa. Neki sojevi izazivaju blagi, neki izraženi mozaik, a neki izazivaju žućenje nerava i mozaik, a neki klobučavost i mozaik ili nitavost. U skladu sa ovim je i reakcija ispitivanog izolata CMV u ovom radu. Na drugim vrstama roda *Nicotiana*, *N. clevelandii* i *N. tabacum* ovaj virus izaziva sistemično šarenilo ili mozaik, dok *N. benthamiana* reaguje latentnom infekcijom (**Dukić et al., 2002**). Reakcije kruga domaćina mogu se koristiti za razlikovanje CMV od drugih virusa (**Cohen and Nitzany, 1963; Lastra, 1968; Palukaitis et al., 1992; Tóbiás and Tulipan, 2002**), ali na osnovu njih ne može se utvrditi pripadnosti bilo kojeg izolata određenoj podgrupi ovog virusa.

Iako je u našoj zemlji ranije ispitivan krug domaćina ovog virusa (**Dukić et al., 2002; Krstić et al., 2002**), značajan doprinos istraživanja sprovedenih u ovom radu je taj što je obuhvaćen veliki broj biljaka porodice Cucurbitaceae, pa će ova ispitivanja značajno doprinijeti sticanju potpunijeg uvida u osjetljivost/otpornost prije svega komercijalno dostupnih sorti tikava i krastavaca u našoj zemlji što može biti od velikog značaja poljoprivrednim proizvođačima. Rezultati ovih ispitivanja mogu biti od velike pomoći selekcionerima u programima selekcije tikava na otpornost, jer je gajenje otpornih genotipova najefikasniji i najuspješniji način kontrole svih bolesti koje izazivaju biljni virusi koji se neperzistentno prenose vašima. Pored toga, istraživanja u

okviru ove disertacije ukazala su na moguću biološku varijabilnost u okviru populacije CMV iz tikava, a vjerovatno i iz drugih domaćina što bi u budućnosti trebalo detaljnije istražiti.

6.4.4. Biološka identifikacija TSWV

Posle inokulacija biljka *N. tabacum* 'Samsun' zabilježena je pojava simptoma hlorotičnih i nekrotičnih pjega i sistemskih prošaravanja, čime je potvrđena virusna priroda oboljenja i dobijeni izolati virusa. Dobijeni su izolati 236-09 iz *C. maxima* i 240-09 *C. pepo* 'Beogradska', koje su pokazivale za *Tospovirus*-e karakteristična hlorotična prošaravanja, a u kojima nije dokazano prisustvo nijednog od šest serološki testiranih virusa. Identifikacija ovih izolata, kao izolata TSWV, obavljena je posle pojave simptoma u vidu lokalnih nekrotičnih pjega, na *Petunia x hybrida* tri dana posle inokulacije. Biljka *Petunia x hybrida* predstavlja jednu od najkorisnijih test biljaka za dokazivanje TSWV, a primjenjuje se i kao indikator biljka, jer na infekciju TSWV reaguje pojavom tipičnih simptoma u vidu smeđih lokalnih nekrotičnih pjega dva do četiri dana posle inokulacija (Allen and Matteoni, 1991).

6.4.5. Biološka identifikacija CABYV

U testu perzistentnog prenošenja sa *Aphis gossypii*, uspješno su reprodukovani simptomi na *C. pepo* 'Olinka', čime je potvrđena virusna priroda oboljenja, dobijeni izolati virusa i potvrđena vektorska uloga vrste *Aphis gossypii*. Simptomi na izvornim i na test biljkama, dokazan perzistentan način prenošenja ukazali su da je prouzrokovalac simptoma žutila na tikvama CABYV. U literaturi se navodi da ovaj virus na tikvama prouzrokuje simptome jakog žutila i zadebljavanja starijeg lišća (Lecoq et al., 1992, Bananej and Vahdat, 2008), a kao veoma efikasni vektor navodi se vrsta *Aphis gossypii* (Lecoq et al., 1992; Lecoq, 1999; Reinbold et al., 2003).

6.5. Prenosjenje ZYMV, WMV i CMV sjemenom tikava

Mogućnost prenošenja fitopatogenih virusa sjemenom gajenih i korovskih biljaka predstavlja značajnu kariku u epidemiološkom lancu bolesti, pa su zbog toga u ovom radu i obavljena istraživanja prenošenja ZYMV, WMV i CMV sjemenom *C. pepo* var. *styriaca*, *C. maxima* i *C. moschata*. Iako je uloga prenošenja virusa sjemenom

tikava veoma značajna, u literaturi još uvijek postoje oprečni podaci kako uopšte o prenošenju ZYMV, CMV i WMV, tako i o procentu u kom se ovi virusi prenose sjemenom biljaka familija tikava i značaju tog prenošenja.

Procenti prenošenja ZYMV sjemenom sve tri testirane vrste tikava dobijeni u ovom radu potvrđuju da je upravo prenošenje sjemenom najvjerojatiji način kako se ovaj destruktivni virus brzo širi na velike udaljenosti (**Davis and Mizuki, 1986; Schrinjwerkers et al., 1991; Fletcher et al., 2000; Simmons et al., 2011**) čemu je doprinijela i međunarodna trgovina zaraženim sjemenom. Iako je ZYMV relativno „nov“ virus, opisan 1981. godine (**Lisa et al., 1981; Lecoq et al., 1981**) za samo jednu deceniju od opisa, njegovo prisustvo je ustanovljeno na svim kontinentima što ga, zajedno sa štetama koje prouzrokuje na tikvama, svrstava u veoma agresivne viruse (**Lecoq et al., 2009**). Međutim, pored brojnih naučnih dokaza da je upravo prenošenje sjemenom način kako ZYMV dolazi u nova područja (**Davis and Mizuki, 1986; Schrinjwerkers et al., 1991; Desbiez and Lecoq, 1997; Fletcher et al., 2000; Lecoq et al., 2003; Tóbiás and Palkovics, 2003; Simmons et al., 2011**), još uvijek postoje brojna neslaganja u pogledu značaja ovog prenošenja, jer u literaturi postoje podaci da se ZYMV prenosi sjemenom različitih vrsta tikava od 0 do 18,9% (**Davis and Mizuki, 1986; Gleason and Provvidenti, 1990; Schrinjwerkers et al., 1991; Robinson et al., 1993; Desbiez and Lecoq, 1997; Fletcher et al., 2000; Riedle-Bauer et al., 2002; Lecoq et al., 2003; Tóbiás and Palkovics, 2003; Müller et al., 2006; Bulajić i sar., 2008; Simmons et al., 2011**). **Schrinjwerkers et al. (1991)** utvrdili su prenošenje ZYMV u veoma niskom procentu (0,047%) i to je virus bio prisutan na sjemenu egzogeno, na površini sjemenjače obične tikve. Tako nizak procenat prenosivosti sjemenom obične tikve utvrdili su i drugi istraživači (**Robinson et al., 1993; Greber et al., 1988; Tóbiás and Palkovics, 2003**). **Robinson et al. (1993)** su u toku sedam godina proučavanja ovog aspekta uglavnom dobijali negativne rezultate. Ispitivanja sprovedena u kontrolisanim uslovima nijesu dokazala prenošenje virusa sjemenom obične tikve, a u poljskim uslovima je utvrđen veoma nizak procenat (0,07%) prenosivosti. **Riedle-Bauer et al. (2002)** i **Tóbiás et al. (2008)** utvrdili su prenošenje ZYMV sjemenom *C. pepo* var. *styriaca* uglavnom u niskom procentu (ispod ili oko 1%), ali i u visokom od 5-15,3%, u zavisnosti od ispitivanog lota sjemena. **Simmons et al. (2011)** utvrdili su procenat prenošenja ZYMV sjemenom *C. pepo* subsp. *texana* od 1,6%. Ispitujući

zaraženost sjemena tri sorte *C. maxima* sa ZYMV, **Fletcher et al.** (2000) su utvrdili nivo zaraženosti od 1-7% u zavisnosti od sorte i starosti biljke u vrijeme infekcije u toku vegetacije. Visok prosječan procenat prenosivosti (18,9%) utvrdili su **Davis and Mizuki** (1986). Prenošenje ZYMV sjemenom obične tikve se kretao od 0 do 80,7% prilikom testiranja sjemena individualnih plodova. **Bulajić et al.** (2008) utvrdili su prenosivost od 12,5% sjemenom *C. moschata*. Kako je prenošenje ZYMV dokazano u ovom radu utvrđeno u sijancima koji nijesu pokazivali simptome, što je u skladu sa nalazima **Simmons et al.** (2011), moguće je da su niski procenti prenošenja ili izostanak prenošenja prijavljen od strane nekih autora, zapravo posljedica manjkavosti primijenjenih dijagnostičkih metoda, jer na primjer **Gleason and Provvidenti** (1990) su utvrđivali procenat prenošenja ZYMV sjemenom dinje na osnovu vizuelnog pregleda simptoma na sijancima. Bez obzira na procenat prenošenja, **Desbiez and Lecoq** (1997), **Kucharek and Purcifful** (1997) i **Simmons et al.** (2011) ukazali su da i mali procenti prenošenja, u kombinaciji sa neperzistentnim prenošenjem biljnim vašima može da prouzrokuje epidemije u usjevima tikava, jer sjetva takvog sjemena zaraženog virusom, čak i u niskom procentu, dovodi do pojave žarišta neravnomjerno raspoređenih u polju, odakle se putem vektora obavljaju rane sekundarne infekcije koje su i najštetnije po prinos.

Obzirom da je ZYMV infektivan za najmanje 16 biljnih vrsta koje ne pripadaju familiji Cucurbitaceae i 26 vrsta tikava (**Robinson et al.**, 1993), neophodno je ispitati prenošenje ZYMV sjemenom ovih biljaka, jer upravo prenošenje sjemenom može doprinijeti unošenju ZYMV u nove regione, ali i širenju ovog virusa u regionima gdje je već prisutan. Međutim, ova oblast je slabije proučena i postoji samo jedno saopštenje o tome da se ZYMV prenosi sjemenom *Ranunculus sardous*, uz nivo zaraze od 1,33% (**Al-Musa**, 1989).

Rezultati ovih istraživanja nijesu pokazali prenošenje WMV sjemenom tikava, što je u skladu sa literaturnim podacima, koji takođe upućuju na to da se WMV ne prenosi sjemenom gajenih tikava. **Purcifful et al.** (1984) i **Shukla et al.** (1994) navode da se ovaj virus ne može prenijeti, ni u embrionu, ni kontaminacijom na površini sjemena. Ispitivanja **Tóbiás et al.** (2003) i **Tóbiás et al.** (2008) nijesu dokazala prenosivost ovog virusa sjemenom *C. pepo* var. *styriaca*. Jedini podatak o prenošenju

WMV sjemenom zabilježen je na Novom Zelandu i to sjemenom tri različite sorte *C. maxima* sa procentom zaraze od 0,5-6% (Fletcher et al., 2000).

U toku ovih istraživanja nije potvrđeno prenošenje CMV sjemenom prirodno zaraženih biljaka *C. pepo*, *C. maxima* i *C. moschata*, iako je potvrđeno je da se CMV prenosi sjemenom 19 različitih gajenih i korovskih biljnih vrsta u promjenljivom procentu (Providenti, 1996a). Najčešće se prenošenje CMV sjemenom vezuje za gajene biljke iz familija Fabaceae i Brassicaceae, ali postoje podaci i za neke biljne vrste iz familije Cucurbitaceae (Gallitelli, 2000). Od gajenih biljaka koje pripadaju familiji tikava, Palukaitis et al. (1992) navode da su neka ispitivanja pokazala da se CMV prenosi sjemenom *C. melo* (2,1%), *C. moschata* (0,7%), *C. sativus* (1,4%), kao i sjemenom *C. pepo* var. *styriaca*. Takođe, u proučavanju prenošenja CMV sjemenom *C. pepo* var. *styriaca* postoje oprečni literaturni podaci. Nekim ispitivanjima nije potvrđeno prenošenje CMV (Tóbiás et al., 2003), dok druga potvrđuju tu mogućnost (Tóbiás et al., 2008). Gumus et al. (2004) potvrdili su prenošenje CMV sjemenom krastavca (36,8%), dinje (18,5%) i obične tikve (18,5%).

Bez obzira na konfliktne rezultate i veliki broj ispitivanja kojima nije utvrđeno prenošenje ZYMV, WMV i CMV, zaraženo sjeme je po svemu sudeći jedan od važnijih, ako ne i najvažniji faktor koji omogućava brzo i efikasno širenje i veliku geografsku rasprostranjenost ovih virusa. Značaj prenošenja sjemenom je naročito veliki kada je u pitanju ZYMV što je vjerovatno doprinelo tako brzom širenju ovog destruktivnog virusa tikava širom svijeta.

6.6. Detekcija ZYMV, WMV, CMV i TSWV u korovskim biljkama primjenom DAS-ELISA testa

Istraživanja prisustva virusa na korovskim biljkama u Srbiji, potvrdila su da ove biljke predstavljaju značajan izvor inokuluma za viruse tikava prisutne kod nas. Najzastupljeniji virus na testiranim korovskim biljkama u i na površinama pored usjeva bio je TSWV. Drugi po zastupljenosti je bio CMV, dok su ZYMV i WMV dokazani u jednakom broju korovskih biljaka. Takođe, osim što su domaćini virusima tikava, korovske biljke su biljke hraniteljke za veliki broj vaši, ali i tripsa koji prenose viruse tikava i odakle ih šire u usjeve. Korovske i samonikle biljke raznih vrsta tikava, koje predstavljaju primarni inokulum virusa, obično se nalaze ili u samom usjevu ili u

neposrednoj blizini. Virusi se često unose u usjev uljane tikve ili drugih gajenih vrsta tikava preletom vaši sa korova ili sa usjeva ranije vegetacije. Opšte je mišljenje da zbog kratkog retencionog vremena, odnosno vremena zadržavanja virusa na stiletu vektora-vaši (2-4 časa), za viruse koji se na neperzistentan način prenose, izvor inokuluma mora da bude u blizini usjeva. Smatra se da postojanje fizičkih barijera, u vidu visokih i dugih planinskih vijenaca, sprečava brzo prenošenje vaši na veću udaljenost, a time onemogućava njihovu vektorsku ulogu (**Margaritopoulos et al.**, 2009). Međutim, kako je retenciono vrijeme u nekim slučajevima značajno duže 20–30 časova, i mnogo udaljeniji izvori zaraze mogu da imaju značaj kao izvor inokuluma.

Iako je krug domaćina najznačajnijeg virusa tikava ZYMV uglavnom ograničen na predstavnike porodice Cucurbitaceae, u toku ovih istraživanja njegovo prisustvo je dokazano u predstavnicima još tri porodice Chenopodiaceae, Amarantaceae i Brassicaceae, koje su kasno-proljećni ili višegodišnji korovi i veoma česti u usjevima tikava. Dosadašnja proučavanja ZYMV u svijetu, pokazala su da postoji veoma mali broj prirodnih rezervoara ovog virusa. Za pojedine korove, kao što su *Ranunculus sardous* i *Lamium amplexicaule* ili gajene biljke, kao što je *Sesamum indicum*, pokazano je da mogu biti sistemski zaraženi u eksperimentalnim uslovima (**Lecoq et al.**, 1981; **Mahgoub et al.**, 1997), a time potencijalno značajni rezervoari virusa. ZYMV je prvo izolovan iz divljeg višegodišnjeg krastavca (*Melothria pendula*) (**Adlerz et al.**, 1983), a kasnije je ustanovljeno na Floridi da je ova korovska vrsta važan prirodni domaćin i služi kao rezervoar ZYMV (**Schubert and Ritchie**, 1984; **Kucharek et al.**, 1996). U Jordanu vrsta *Moluccella laevis* opisana je kao prirodni rezervoar virusa (**Al-Musa**, 1989). Nekoliko drugih divljih vrsta fam. Cucurbitaceae služe kao prirodni domaćini ZYMV u SAD (**Perring et al.**, 1992) ili Sudanu (**Mahgoub et al.**, 1997). Istraživanja sprovedena u zemljama umjerenog klimata, kome pripada i Srbija, ukazivala su da najvažniju ulogu u održavanju ZYMV tokom zime imaju usjevi koji se gaje u zaštićenom prostoru ili da su izvori inokuluma stari usjevi ili samonikle biljke tikava. Sličnu situaciju utvrdili su **Perring et al.** (1992) u uslovima Kalifornije. Međutim, u Oklahomi **Ali et al.** (2012) utvrdili su da osim divlje vrste *Cucurbita foetidissima*, prirodni domaćin ZYMV i eventualni izvor inokuluma može da bude i *Amaranthus palmeri*, koji je čest korov u usjevima tikava. Međutim, novija proučavanja, sprovedena u Austriji i Češkoj Republici su protivrečna. **Svoboda and**

Polák (2002) utvrdili su da su korovi *Tripleurospermum maritimum*, *Stellaria media* i *Trifolium repens* osnovni izvori infekcije, da se na njima ZYMV održava u toku zime i odatle se u proljeće vašima prenosi na usjev tikava. Za razliku od ovih istraživanja, gdje je ZYMV dokazan i u biljkama *Amaranthus retroflexus*, *C. hybridum* i *C. album*, **Riedle-Bauer et al.** (2002) detektovali su samo sporadične prirodne zaraze nekih korovskih vrsta: *Chenopodium album*, *Lamium purpureum*, *Plantago major*, *Capsella bursa-pastoris* i *Rumex obtusifolius*, a mehaničkim inokulacijama uspjeli su da izazovu samo lokalnu zarazu *C. album* i sistemičnu asimptomatičnu zarazu *C. quinoa*. Ovi autori navode da nijesu detektovali prirodne zaraze *Amaranthus* sp., *Stellaria media*, *Galium aparine* i *Trifolium repens*, niti su ih mogli zaraziti mehaničkim inokulacijama, mada su ovi korovi opisani kao prirodni rezervoari ZYMV na Novom Zelandu. **Riedle-Bauer et al.** (2002) ukazali su da genetička varijabilnost različitih partija sjemena nekih korova utiče na njihovu različitu osjetljivost. Na ovaj način mogli bi se objasniti konflikti literaturni podaci o osjetljivosti određenih korovskih biljaka na infekciju sa ZYMV. Na osnovu dosadašnjih proučavanja očigledno je da biljne vrste koje ne pripadaju fam. Cucurbitaceae imaju neznatnu ulogu kao prirodni rezervoari ZYMV i da prenošenje sjemenom tikava obezbjeđuje primarni inokulum dovoljan za iniciranje epidemijske pojave ZYMV. Međutim, kako je u ovim istraživanjima ZYMV dokazan i u predstavnicima familije Brassicaceae, *Lepidium draba* i *Roripa austriaca*, koje su višegodišnje biljke i česti korovi u našim poljima, na kojima u svijetu, do sada nije opisan ovaj virus, ipak ulogu korovskih biljaka u epidemiologiji ZYMV treba još proučiti. S obzirom da je ZYMV dokazan i u kasno-proljećnim i višegodišnjim korovima, koji su prisutni u vrijeme zasnivanja usjeva tikava i u početnim fazama vegetacije, ovi korovi mogu da služe kao izvor inokuluma u najosjetljivijim fazama usjeva tikava.

Prisustvo WMV u korovima predstavnicima tri različite botaničke familije, dokazano u ovim istraživanjima u skladu je sa širokim krugom domaćina ovog virusa, koji nije ograničen samo na biljke iz familije Cucurbitaceae, što mu omogućava prezimljavanje i održavanje u mnogim leguminozama, kao što su djetelina i lupina (**Purcifull et al.**, 1984; **Kucharek et al.**, 1996). WMV može eksperimentalno da zarazi 170 biljnih vrsta, uključujući više korova koji mogu da služe za održavanje virusa između dvije vegetacije (**Sharifi et al.**, 2008). Suprotno ovim istraživanjima, **Massumi**

et al. (2007) nijesu detektovali WMV u biljkama koje ne pripadaju porodici Cucurbitaceae u Iranu, osim u nekoliko korova. **Sharifi et al.** (2008) su od 31 testirane korovske biljke utvrdili prisustvo ovog virusa samo u *Citrullus colocynthis*. Iako je krug domaćina WMV širok, **Kucharek and Purcifull** (1997) ustanovili su da se virus održava i prenosi u usjev dinje iz usjeva drugih tikava i okolnih korovskih biljaka. Najvažniji primarni domaćin WMV u Floridi je *Alysicarpus vaginalis*, mada i *Lupinus* spp., *Indigofera hirsuta* i *Pisum sativum* mogu da posluže kao biljke za održavanje virusa, odakle ga vaši prenose na usjeve tikava (**Kucharek et al.**, 1996).

Za razliku od ZYMV i WMV, CMV je virus koji se održava u mnogobrojnim korovskim vrstama koje pripadaju i samoj porodici Cucurbitaceae i mnogim drugim biljnim porodicama. Izrazito širok krug prirodnih domaćina, koji uključuje i mnogobrojne korovske vrste, jedan je od glavnih razloga opšte rasprostranjenosti CMV. S ovom činjenicom je u skladu i prisustvo CMV u korovima sedam različitih botaničkih porodica dokazano u ovom istraživanju. Korovi u kojima je dokazan CMV imaju takvu dinamiku javljanja, da su stalno prisutni za vrijeme vegetacije tikava. Međutim, treba znati i da efikasnost prenošenja CMV vašima zavisi od mnogih faktora kao što su soj virusa, vrsta i biotip vektora, biljna vrsta na koju ishranom prenosi virus, ali i biljna vrsta koja predstavlja izvor zaraze. Tako je ustanovljeno da se CMV vrlo brzo širi i javlja sa visokom učestalošću ukoliko se u blizini usjeva nalaze različite vrste *Commelina* (*C. communis*, *C. nudiflora* i *C. benghalensis*). Ove vrste, koje mogu da budu i višegodišnje, povezane su i sa epidemijskom pojavom CMV u usjevima tikava, duvana i paprike (**Kucharek and Purcifull**, 1997; **Kucharek et al.**, 1998).

Prisustvo TSWV u korovima devet botaničkih porodica dokazano u ovim istraživanjima, u skladu je sa njegovom izraženom polifagnošću i opštom rasprostranjenošću, jer se kao prirodni domaćini ovog virusa navode preko 1000 monokotiledonih, dikotiledonih, pa čak i biljke iz razdjela paprati (**Parella et al.**, 2003). TSWV se prenosi na perzistentan-cirkulativan način sa više od sedam vrsta tripsa, predstavnika porodice Tripsidae (**Ullman et al.**, 2002), međutim da bi prenijeli virus, tripsi ga moraju usvojiti u stadijumu larve, najčešće u prvom larvalnom stadijumu (**Van de Wetering et al.**, 1996). Od kada je TSWV, ponovo, postao jedan od ekonomski najznačajnijih virusa, sprovedena su brojna istraživanja njegovog prisustva u korovskim biljkama. Tako je **Wilson** (1998), dokazao da je TSWV prisutan u deset jednogodišnjih,

dvogodišnjih i višegodišnjih korova, gdje su se procenti infekcije kretali od 0,4% do 22,5%. **Martinez-Ochoa et al.** (2007) i **Mullis and Martinez-Ochoa** (2009) su u Džordžiji (SAD) dokazali prisustvo TSWV u zimskim i proljećnim korovima: *Oenothera laciniata*, *Spergula arvensis*, *Raphanus raphanistrum*, *Gnaphalium pensylvanicum*, *Gamochaeta pensylvanica*, *G. falcata*, *G. purpureum*, *Eupatorium capillifolium*, *Stellaria media*, *Verbena rigida*, *Lepidium virginicum*, *Solidago canadensis* i *Geranium carolinianum*. Od ljetnijih i jesenjih korova TSWV je dokazan u *Jacquemontia tamnifolia*, *Ipomoea hederacea* Jacq. var. *integriuscula*, *Richardia scabra*, *Sida rhombifolia*, *Senna obtusifolia*, *Croton glandulosus* var. *septentrionalis*, *Acanthospermum hispidum*, *Eclipta prostrata*, *Portulaca pilosa*, *Desmodium tortuosum*, *Amaranthus retroflexus* i *Wahlenbergia marginata*. Učestalost pojave TSWV je bila vrlo visoka, za korove, i kretala se od 3,7% do čak 31,5%, a većina korova u kojim je dokazan virus nijesu ispoljavali simptome. U svojim istraživanjima **Mullis and Martinez-Ochoa** (2009) navode ključnu ulogu zimskih korova, i da se na osnovu prisustva TSWV u njima može predvidjeti nivo zaraze usjeva ovim vrusom, a takođe smatraju da su upravo korovi, prije svih zimski, ključni za epidemiologiju TSWV. U istraživanjima TSWV u korovima u Turskoj (**Özdemir et al.**, 2009), utvrđena je zaraza sa TSWV u preko 80% testiranih korovskih biljaka, od čega su najčešće bile zaražene *Convolvulus arvensis* i *Portulaca oleracea*, ali je značajno prisustvo dokazano i u *Geranium rotundifolium* i *Amaranthus retroflexus*. Svi ovi rezultati ukazuju da su korovske biljke te u kojima se TSWV održava, a osim toga na korovima se često održavaju i tripsi vektori.

Prisustvo, veliki značaj virusa tikava koji se prenose vašima na neperzistentan način u našoj zemlji, kao i mnoge nedoumice u pogledu ekologije i epidemiologije ovih virusa uslovljavaju potrebu daljeg sprovođenja istraživanja u pravcu utvrđivanja načina njihovog održavanja u prirodi u periodu mirovanja vegetacije, načina njihovog unošenja u usjev i daljeg širenja u toku vegetacije. Takođe, neophodno je ispitati i značajnost korova kao izvora inokuluma za novi virus za Srbiju, CABYV, koji se prenosi vašima na perzistentan način. Posebnu pažnju treba obratiti i na prisustvo TSWV u velikom broju korovskih biljaka, jer iako se ovaj virus ne javlja u tikvama u visokom procentu, on je jedan od ekonomski najznačajnijih virusa, za koji je dokazano da kod nas nanosi velike štete u usjevima duvana, paprike, paradjza i ukrasnih biljaka.

6.7. Ispitivanje prisustva biljnih vaši u usjevima tikava i sastav njihove populacije

Trogodišnja ispitivanja praćenja prisustva i specijskog diverziteta biljnih vaši, pomoću žutih lovnih posuda u usjevima tikava u Vojvodini, pokazala su veliki diverzitet vrsta biljnih vaši, na šta ukazuje 57 determinisanih taksona. Ovako veliki diverzitet biljnih vaši u tikvama nije neuobičajen, obzirom da su u sličnim opsežnim istraživanjima populacije ovih insekata sprovedenim u našoj zemlji dobijeni slični rezultati u pogledu sastava i brojnosti taksona afidofaune. Tako **Vučetić** (2011) navodi prisustvo 106 različitih taksona vaši u usjevima sjemenskog krompira u Srbiji. Sve vrste vaši uhvaćene u klopama u usjevima tikava u ovom istraživanju, detektovane su i u usjevima krompira. Takođe, istraživanja u Mađarskoj i Hrvatskoj, koje se graniče sa Vojvodinom, ukazuju na sličan sastav afidofaune (**Basky**, 1993; **Čujak et al.**, 2005). Ovakvi rezultati su bili i očekivani, prije svega zbog izgleda reljefa ovog područja i načina migracija biljnih vaši. Međutim, na lokalitetu Kisač u obje godine praćenja utvrđena je značajno manja brojnost, a i diverzitet biljnih vaši, što je moguće objasniti činjenicom, da su ovi usjevi bili sa sve četiri strane okruženi izolacionim pojasom kukuruza. Osim kukuruza, kao biljka pogodna za formiranje izolacionog pojasa, navodi se i gajeni sirak. Pored toga što smanjuju brojnost vaši, na biljkama izolacionog pojasa krilate forme vaši koje su najefikasniji vektori tokom probne ishrane gube infektivnost (**Damicone et al.**, 2007). Vrijednosti Shannon-Weaver-ovog indeksa koji, takođe opisuje diverzitet vrsta, bile su preko 2 za većinu lokaliteta, što je ove lokalitete svrstalo u red srednje bogatih, jer po **McDonald** (2003), Shannon-Weaver-ov indeks 1,5 ukazuje na nizak diverzitet, a Shannon-Weaver-ov indeks od 3,5 ukazuje na visok diverzitet.

Osim što nanose direktne štete biljkama tikava ishranom u floemu, biljne vaši su, za usjeve tikava širom svijeta, još značajnije kao vektori biljnih virusa (**Luis-Arteaga et al.**, 1998; **Sevik and Arli-Sokmen**, 2003). Tri, kod nas i u svijetu najrasprostranjenija i ekonomski najvažnija virusa tikava, ZYMV, WMV i CMV, prenose se na neperzistentan način biljnim vašima. Utvrđeno je da CMV može da bude prenijet sa najmanje 80, WMV 42, a ZYMV sa najmanje 26 vrsta vaši (**Palukaitis et al.**, 1992; **Kucharek and Purcifull**, 1997; **Katis et al.**, 2006). Novi virus, koji je u toku ovih istraživanja otkriven na tikvama u Srbiji, CABYV, takođe se prenosi biljnim vašima, ali za razliku od prethodna tri na perzistentan način (**Lecoq et al.**, 1992).

Od pet najzastupljenijih vrsta vaši u ovim istraživanjima, *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Anoecia corni* i *Aphis gossypii*, a dvije vrste *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* se najčešće navode kao najznačajniji i najefikasniji vektori ZVMV, WMV, CMV i CABYV (Castle et al., 1992; Lecoq et al., 1992; Palukaitis et al., 1992; Desbiez and Lecoq, 1997; Provvidenti, 2000; Katis et al., 2006). Naročito je značajno i to što su navedene vrste u toku ovih istraživanja dostizale maksimum brojnosti i maksimum diverziteta u prvim fenofazama biljke ili oko periodu cvjetanja tikava, kada su i tikve najosjetljivije na virusne infekcije. *Myzus persicae* predstavlja posebnu opasnost za prenošenje neperzistentnih virusa zato što veoma rijetko kolonizira usjev tikava, i radije isprobava pogodnost ishrane na mnogobrojnim biljkama u usjevu, čime obezbjeđuje visok stepen i primarnog i sekundarnog širenja virusa (Perring and Farrar, 1993).

U toku ovih istraživanja, naročito u periodu od 2009-2011. godine često je uočavana jaka infestacija usjeva tikava sa *Aphis gossypii*, nekada su bile kolonizirane samo pojedinačne biljke u usjevu, a nekada, kao što je bio slučaj 2011. godine sa usjevom lubenice na lokalitetu Gornji Tavankut i jednim usjevom uljane tikve na lokalitetu Kisač, na svim biljkama u usjevu nalazile su se veoma brojne kolonije *Aphis gossypii*, što je u skladu sa podacima koji ukazuju da ova vrsta često pravi kolonije na tikvama (Perring et al., 1992; Webb, 2007). Međutim, kolonizacija usjeva krastavca na lokalitetu Staro Selo 2011. godine sa *Aphis fabae*, usled koje je došlo do potpunog propadanja usjeva, do sada nije zabilježena u literaturi, ali taj podatak je u skladu sa nalazima dobijenim postavljanjem lovni posuda 2011. godine, gdje je upravo ova vrsta bila daleko najbrojnija.

Pored utvrđivanja sastava populacija biljnih vaši u usjevima tikava, jedan od ciljeva ovih istraživanja bio je i utvrđivanje dinamike populacije biljnih vaši u periodu vegetacije, odnosno utvrđivanje maksimuma leta. Dobijeni rezultati ukazuju da u našim agro-ekološkim uslovima najveći broj vrsta, a naročito one koje se u literaturi opisuju kao najefikasniji vektori *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* i *A. fabae* ima maksimum leta na početku vegetacije, kada su biljke tikava u fenofazi 5-6 pravih listova ili u fazi cvjetanja. Ovaj podatak naročito dobija na značaju zbog toga što eventualne infekcije ostvarene u ovom periodu razvoja tikava, mogu da prouzrokuju veoma velike štete, jer za viruse tikava važi pravilo da što su infekcije ranije ostvarene, to su štete veće (Blua

and Perring, 1989; Lecoq et al., 1992; Walkey et al., 1992; Desbiez and Lecoq, 1997; Fletcher et al., 2000). Rane infekcije ZYMV često dovode i do potpunih gubitaka u proizvodnji (Lecoq et al., 1981; McLeod et al., 1986; Blua and Perring, 1989; Al-Shahwan et al., 1995).

Ova istraživanja su pokazala da postoji značajan diverzitet u populaciji biljnih vaši koje posjećuju usjeve tikava u Srbiji. U sve tri godine ispitivanja pokazalo se da je najveći diverzitet i najveća brojnost vrsta u prvim nedjeljama po nicanju biljaka, što je naročito značajno, jer su i usjevi tikava u tom periodu u početnim fazama razvoja i mnogo osjetljiviji na virusne infekcije. Takođe, direktne i indirektne štete usled ranih infekcija su mnogo veće. Naročito treba obratiti pažnju na najzastupljenije vrste *A. fabea*, *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Anoecia corni* i *Aphis gossypii* koje se navode kao najznačajniji i najefikasniji vektori virusa tikava, a čija se dinamika pojavljivanja kod nas, uglavnom poklapa sa najosjetljivijim fazama razvoja tikava, tako da je od velikog značaja na neki način izbjeći nalet vaši u osjetljivim fazama za usjeve tikava, bilo prilagodbom rokova sjetve ili korišćenjem zaštitnih pojaseva, kao što je na primjer kukuruz, koji se u ovim istraživanjima indirektno pokazao kao veoma koristan.

6.8.1. Molekularna detekcija i identifikacija izolata ZYMV

Dva različita para prajmera, ZYMV CP_{fwd}/CP_{rev} (Pfosser and Baumann, 2002) i ZY-2/3 (Thomson et al., 1995) omogućila su amplifikaciju svih ispitivanih izolata ZYMV bilo da se virus javio u pojedinačnim ili u miješanim infekcijama. Primijenjeni prajmeri omogućavaju amplifikaciju dijela N_{1b} (gen za nuklearne inkluzije), čitavog CP (proteinskog omotača) gena i dijela 3' UTR (Thomson et al., 1995; Pfosser and Baumann, 2002).

Intraspecijska varijabilnost, posebno u okviru gena za proteinski omotač, povlači za sobom problem pouzdane dijagnostičke tehnike, jer se mnoge od tih tehnika zasnivaju na antigenim karakteristikama proteinskog omotača (CP) ili gena koji ga kodira (CP gen) (Desbiez et al., 1996, Desbiez and Lecoq, 1997). Prema tome, pravilan odabir prajmera za amplifikaciju fragmenata genoma izolata iz nekog geografskog područja koji se prvi put molekularno detektuju jedan je od ključnih momenata uspješnog molekularnog dokazivanja. Zbog toga su odabrani prajmeri ZYMV

CPfwd/CPrev (**Pfusser and Baumann, 2002**) i ZY-2/3 (**Thomson et al., 1995**), kojim se amplifikuje značajan dio genoma ZYMV. Ovi prajmeri dizajnirani su tako da imaju 4-8 različitih nukleotida na prajmerskim mjestima u odnosu na druge *Potyvirus*-e, a da nemaju neslaganja u prajmerskim mjestima sa većinom poznatih sekvenci ZYMV deponovanih u GenBank bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Kako su svi ispitivani izolati ZYMV BLAST analizom pokazali 92 do 100% sličnosti sa izolatima ZYMV iz drugih dijelova svijeta, potvrđena je njihova pripadnost vrsti *Zucchini yellow mosaic virus* po predlogu **Adams et al. (2004)** da 76-77% nukleotidne identičnosti CP gena predstavlja optimalan demarkacioni kriterijum za razdvajanje vrsta roda *Potyvirus* i prema predlogu **Aleman-Verdaguer et al. (1997)** i **Shukla and Ward (1988)** da je identičnost aminokiselinske sekvence između izolata istog *Potyvirus*-a veća od 90%, a između različitih vrsta manja od 70%.

Na osnovu utvrđene pogodnosti primijenjenih prajmera i prilagođavanja protokola za detekciju, ova istraživanja omogućavaju brzo, pouzdano i rutinsko molekularno dokazivanje ZYMV. Usvajanje ovih protokola, treba da pomogne u razvijanju novih protokola za detekciju ZYMV u korovskim biljkama, ali i u vašima vektorima, što će značajno doprinijeti još detaljnijem upoznavanju epidemiologije oboljenja prouzrokovanog ovim virusom u Srbiji, ali i unapređivanju metoda detekcije, uvođenjem i standardizovanjem metoda kao što su Real-time RT-PCR. Takođe, rezultati ovih ispitivanja omogućići će dalju molekularnu karakterizaciju ZYMV u Srbiji.

6.8.2. Molekularna detekcija i identifikacija izolata WMV

Molekularna detekcija WMV obavljena je primjenom šest različitih parova prajmera sa ciljem utvrđivanja najpogodnijih i najosjetljivijih prajmera za rutinsku detekciju.

Par prajmera WMV 5'/3' (**Desbiez et al., 2007**) koji amplifikuju 3' kraj NIB i 5' početak CP gena, pokazao se izuzetno uspješnim i povoljnim za rutinsku detekciju WMV, gdje su umnoženi fragmenti očekivane veličine od 402-408 nt u zavisnosti od grupe kojoj amplifikovani izolat pripada.

Prajmeri WMVCPfwd/rev (**Duduk i sar., 2008**) omogućili su amplifikaciju fragmenta od 1017 nt koji pokriva dio CP i dio 3' UTR kod svih ispitivanih izolata i takođe se mogu koristiti u detekciji WMV. Međutim, ovi prajmeri pokrivaju manje

varijabilan dio CP gene, i u GenBank bazi podataka, nema mnogo sekvenci radi eventualnog poređenja u svrhu molekularne karakterizacije.

Par prajmera WCPd/r (**Moreno et al.**, 2004), kao i prethodna dva para, omogućio je uspješnu amplifikaciju svih ispitivanih izolata, pri čemu su dobijeni fragmenti od 930 nt koji obuhvataju cijeli CP, ali nukleotidne sekvence ovih prajmera su veoma dugačke i zbog toga bi oni mogli pri testiranju većeg broja izolata da pokažu suviše visoku specifičnost i ne amplifikuju izolate veće varijabilnosti i zbog toga se ne preporučuju za rutinsku detekciju.

N-terminalni kraj proteinskog omotača, kod svih virusa roda *Potyvirus* opisuje se kao visoko varijabilan (**Shukla et al.**, 1994; **Desbiez et al.**, 2002), pa su zbog toga i zbog njihove osjetljivosti i specifičnosti, prajmeri WMV 5'/3' odabrani i korišćeni kao najbolji za dalja rutinska testiranja, ali i karakterizaciju WMV.

Primijenjeni parovi prajmera WMV-1-5'/1190-3' (**Desbiez et al.**, 2007) i WP1d/r (**Moreno et al.**, 2004) koji amplifikuju dio genoma od 1200, odnosno 708 nt koji kodira P1 protein, na osnovu izolata testiranih u ovim ispitivanjima, pokazali su se manje dobrim za rutinsku detekciju u odnosu na prajmere koji amplifikuju CP gen. Međutim, **Desbiez and Lecoq** (2004) navode da je WMV nastao rekombinacijom dva virusa *Potyvirus* roda, *Soybean mosaic virus* (SMV) i *Bean common mosaic virus* (BCMV), i da je do rekombinacije došlo upravo u ovom dijelu genoma, koji je i po drugim autorima najmanje konzervativan u okviru roda *Potyvirus* (**Domier et al.**, 1987; **Vance et al.**, 1992; **Aleman-Verdaguer et al.**, 1997). Ovaj dio genoma bi u budućnosti bio veoma značajan za dalju karakterizaciju WMV izolata iz Srbije.

Par prajmera WCId/r (**Moreno et al.**, 2004) koji amplifikuju dio genoma od 702 nt za cilindrične inkluzije takođe se pokazao uspješnim za detekciju testiranih izolata. U ovom dijelu genoma takođe se nalaze rekombinantne tačke (**Desbiez and Lecoq**, 2008) pa bi pored detekcije, ovi prajmeri mogli da se koriste i za karakterizaciju WMV porijeklom iz Srbije u cilju dobijanja što potpunije slike o strukturi populacije WMV kod nas.

BLAST analizom CP gena četiri ispitivana izolata WMV iz Srbije pokazali su 93 do 99% sličnosti sa izolatima WMV, dok je 18 sekvenci dijela N1b i CP gena izolata WMV iz Srbije pokazalo 90 do 99%, čime je potvrđena je njihova pripadnost vrsti

Watermelon mosaic virus po predlogu **Adams et al.** (2004), **Aleman-Verdaguer et al.** (1997) i **Shukla and Ward** (1989).

6.8.3. Molekularna detekcija i identifikacija izolata CMV

Molekularna detekcija CMV obavljena je primjenom para specifičnih prajmera CMV Au1u/Au2d (**Stanković et al.**, 2011) koji su uspješno amplifikovali očekivani fragment od 847 nt kod svih ispitivanih izolata. Ovi prajmeri pokazali su se uspješnim i za detekciju CMV u usjevu duvana (**Stanković et al.**, 2011), pa se mogu preporučiti za rutinsku detekciju ovog virusa u dijagnostičkim laboratorijama, osim u usjevima tikava i duvana, i u drugim usjevima, pošto je ovo jedan od ekonomski najznačajnijih virusa i virus sa najširim krugom domaćina kako gajenih biljaka, tako i korova (**Garcia-Arenal and Palukaitis**, 2008).

Rezultati molekularne identifikacije BLAST analizom, potvrdili su pripadnost svih ispitivanih izolata CMV iz tikava na osnovu pokazane sličnosti od 94 do 99% sa izolatima CMV iz drugih djelova svijeta. Na osnovu dobijenog stepena sličnosti ispitivanih izolata sa izolatima CMV iz GenBank baze podataka može se zaključiti da izolati CMV iz tikava iz Srbije pripadaju podgrupi I, jer im je nukleotidna sličnost veća od 88% sa GenBank izolatima iz podgrupe I (**Palukaitis and Garcia-Arenal**, 2003; **Yu et al.**, 2005). **Bonnet et al.** (2005) ističu da većina izolata CMV (98%) iz različitih djelova svijeta pripada S–I podgrupi, a čak 64% izolata S–IA podgrupi.

6.8.4. Molekularna detekcija izolata i identifikacija TSWV

Specifični prajmeri TSWVCP-f/r (**Vučurović et al.**, 2012) koji amplifikuju 738 nt dijela genoma koji kodira nukleokapsid TSWV uspješno su primijenjeni za detekciju TSWV u simptomatičnim uzorcima tikava, u kojima prethodno nije dokazan ni jedan od šest serološki testiranih virusa, ali i u uzorcima korovskih biljaka nađenim u usjevima tikava, a u kojima je prethodno serološki dokazan TSWV. Prajmeri TSWVCP-f/r dizajnirani su tako da nemaju neslaganja u prajmerskim mjestima sa 194 sekvence TSWV koje su deponovane u GenBank bazi podataka.

BLAST analiza četiri sekvence TSWV dobijene u ovim istraživanjima pokazala je 98 do 100% sličnosti izolata iz Srbije sa izolatima TSWV iz drugih djelova svijeta, čime je dokazana pripadnost ispitivanih izolata vrsti *Tomato spotted wilt virus*. Izvedena

aminokiselinska sličnost sa najbližim izolatima iz BLASTA u dijelu N proteina bila je 100%. Međunarodno usaglašeno pravilo je da se neki izolat može izdvojiti u posebnu vrstu virusa ukoliko njegova aminokiselinska sekvenca N proteina u poređenju sa drugim *Tospovirus*-ima pokazuje manje od 90% homologije (**Goldbach and Kuo, 1996**). Filogenetska proučavanja zasnovana na sekvenci gena za N protein pokazala su da je ovaj dio genoma dovoljno varijabilan i informativan za razlikovanje vrsta u okviru roda *Tospovirus*, pa se koristi za određivanje taksonomskog statusa na nivou vrsta ovog roda.

Iako TSWV predstavlja jedan od značajnih ograničavajućih faktora u proizvodnji mnogih povrtarskih i ukrasnih biljaka, kao i duvana u mnogim zemljama, do sada o njegovoj pojavi u prirodnim infekcijama u tikvama nije bilo mnogo podataka (**Pappu et al., 2009**). Do sada je TSWV detektovan u lubenici (**Iwaki et al., 1984**), dinji (**Marchoux et al., 2000**), krastavcu (**Nagata et al., 1995; Massumi et al., 2007**), tikvi (**Nagata et al., 1995**) i šajotu (**Silveira et al., 1985**). Detekcija TSWV u tikvici (*C. pepo* 'Beogradska') i bundevi (*C. maxima*) ukazuje da se krug domaćina TSWV u Srbiji proširuje i na biljke familije Cucurbitaceae. Usjevi tikava u kojima je detektovan TSWV, nalazili su se u blizini usjeva duvana sa visokim procentom biljaka zaraženih sa TSWV i brojnou populacijom tripsa. Nalaz TSWV u bundevi predstavlja prvi nalaz ovog virusa u prirodnoj infekciji u svijetu, iako su **Iwaki et al. (1984)** dokazali da je TSWV sposoban da vještački zarazi ovu biljku. Takođe, nalaz TSWV u tikvici predstavlja prvi nalaz ovog virusa u prirodnoj infekciji u Evropi.

6.8.5. Molekularna detekcija i identifikacija izolata CABYV

Molekularna detekcija CABYV obavljena je sa dva različita para prajmera u cilju utvrđivanja pogodnijeg para za rutinsku detekciju. Kao pogodniji prajmeri za rutinsku detekciju pokazali su se CABYV up/down (**Boubourakas et al., 2006**), koji amplifikuju dio NCR koji prethodi CP genu i početak CP i MP gena, a koji su omogućili uspješnu amplifikaciju svih ispitivanih izolata iz različitih vrsta tikava i sa različitih lokaliteta, u odnosu na CE9/10 (**Juarez et al., 2004**), koji amplifikuju CP i MP gene, a kod kojih nije došlo do amplifikacije nekih od ispitivanih izolata ili je prinos reakcije bio nizak.

BLAST analiza dobijenih sekvenci pokazala je 93-99% sličnosti sa drugim sekvencama izolata CABYV iz GenBank baze podataka. Sekvence izolata CABYV su pokazale od 91,2-100% sličnosti na aminokiselinskom nivou sa izolatima CABYV iz GenBank baze podataka, što potvrđuje njihovu pripadnost vrsti *Cucurbit aphid-borne yellows virus* po pravilu da izolati jedne vrste familije *Luteoviridae*, kojoj pripada i CABYV, mogu da imaju najviše 10% razlike u aminokiselinskoj sekvenci (D'Arcy et al., 2005). BLAST analiza ukazuje da je na osnovu nukleotidne sličnosti izolate CABYV iz Srbije moguće podijeliti u dvije grupe. Prva, po broju izolata veća grupa najveću nukleotidnu sličnost pokazala je sa izolatima iz Evrope, a druga grupa, od pet izolata, najveću sličnost pokazala je sa izolatima CABYV iz Kine.

6.9.1. Molekularna karakterizacija izolata ZYMV

Analiza sekvenci 31 izolata ZYMV dobijenog u ovim istraživanjima pokazala je da u dijelu genoma koji obuhvata 3' kraj Nib, CP gen i 3' UTR, izolati iz Srbije pokazuju visoku nukleotidnu i aminokiselinsku sličnost međusobom, čak preko 99%, a ukoliko se posmatra samo kodirajući dio sličnost je i nešto veća, iako se N-terminalni kraj CP gena, koji je obuhvaćen ovom analizom navodi kao najvarijabilniji u okviru roda *Potyvirus* (Shukla et al., 1988; Desbiez et al., 2002). Međutim, ovako visoka homologija između izolata ZYMV iz Srbije, nije iznenađujuća, jer je zabilježena i u analizama drugih autora (Pfosser and Baumann, 2002; Kwon et al., 2005; Glasa et al., 2007; Bananej et al., 2008). Pfosser and Baumann (2002) i Glasa and Pittnerová (2006) navode takođe visoku sličnost i na nukleotidnom i na aminokiselinskom nivou kod izolata koji geografski pripadaju Centralnoj Evropi, a takođe i Coutts et al. (2011) za australijske izolate iz Kvinslanda i Viktorije i Desbiez et al. (1996) za izolate sa ostrva Martinik.

Oblik rekonstruisanog filogenetskog stabla podsjeća na ona dobijena i od strane drugih autora (Zhao et al., 2003; Ha et al., 2008; Simmons et al., 2008), međutim u stablu se izdvajaju tri glavne grupe obilježene slovima od A-C, kao što je navedeno u posljednjim istraživanjima Coutts et al. (2011). Filogenetsko stablo rekonstruisano u ovom istraživanju na osnovu sekvenci kompletnog CP gena 68 izolata ZYMV, uključujući i 31 izolat iz Srbije, podržava grupisanje izolata ZYMV u četiri podgrupe u okviru glavne grupe A (A-I do A-IV) i dvije podgrupe u okviru glavne grupe B (B-I and

B-II), što su takođe predložili **Coutts et al.** (2011). Najveća grupa u stablu A, sastoji se od izolata iz raznih djelova svijeta (Evropa, Azija i Amerika), ali po **Coutts et al.** (2011) tu su još izolati iz Australije i Novog Zelanda.

Svi od 31 izolata ZYMV iz Srbije grupišu se u okviru jedne grane u podgrupi A-I zajedno sa izolatima iz Centralne Evrope. Visoki diverzitet između sekvenci izolata ZYMV zabilježen je u Australiji (**Coutts et al.**, 2011), Vijetnamu (**Ha et al.**, 2008) i Iranu (**Bananej et al.**, 2008) ukazujući da se najveće filogenetsko razdvajanje desilo u Aziji (posebno u Kini) (**Simmons et al.**, 2008). Nasuprot tome nizak diverzitet između izolata zabilježen je među izolatima iz Centralne Evrope (**Tóbiás and Palkovics**, 2003; **Glasa et al.**, 2007) i Martinika (**Desbiez et al.**, 1996). Analize sprovedene u ovim istraživanjima, takođe pokazuju nizak diverzitet između sekvenci izolata ZYMV iz Srbije iz različitih domaćina i/ili različitih lokaliteta, što ukazuje na njihovu blisku povezanost sa izolatima iz Centralne Evrope. Filogenetske analize, takođe ukazuju da izolati iz Srbije, kao i ostali izolati iz Centralne Evrope, na šta su ukazali i **Pfossier and Baumann** (2002), dijele zajedničkog pretka i da se ZYMV proširio u zemljama Centralne Evrope posle samo jedne introdukcije. Posle te inicijalne introdukcije, ZYMV se dalje brzo širio u područja gajenja biljaka porodice Cucurbitaceae u Austriji, Mađarskoj, Sloveniji, Slovačkoj, Češkoj i Srbiji, što potvrđuje gotovo istovremena pojava epidemija u Srbiji (**Dukić et al.**, 2002) i Austriji, Mađarskoj i Sloveniji (**Pfossier and Baumann**, 2002).

Dalje, izolate iz Srbije karakterišu četiri specifično konzervativna aminokiselinska mjesta u N-terminalnom kraju CP gena, što je prethodno utvrđeno za ostale izolate iz Centralne Evrope od strane **Glasa et al.** (2007), **Tóbiás and Palkovics** (2003) i **Vučurović et al.** (2012).

Rezultati filogenetskih analiza sprovedenih u ovom radu pokazali su da, posle inicijalne introdukcije, nije bilo novih introdukcija ZYMV u Srbiju, što se može objasniti činjenicom da se proizvodnja tikava u Srbiji zasniva na korišćenju sjemena koje se uglavnom i proizvede u našoj zemlji. Uzimajući u obzir dvije činjenice, da je širenje ZYMV na velike udaljenosti najvjerovatnije posljedica vertikalnog prenošenja zaraženim sjemenom (**Desbiez et al.**, 2002; **Tóbiás and Palkovics**, 2003; **Simmons et al.**, 2011), i prenošenje ZYMV sjemenom tri vrste tikava utvrđeno u ovim

istraživanjima, posebnu pažnju treba obratiti kako na zdravstveno stanje sjemena tikava koje se uvozi, tako i na ono koje se proizvodi kod nas.

6.9.2. Molekularna karakterizacija izolata WMV

Analiza nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci izolata WMV iz Srbije obuhvatila je dva dijela genoma ovog virusa: NIB-CP i CP gene. Karakteristično za oba testirana dijela genoma je da sadrže N-terminalni kraj CP gena, koji je visoko varijabilan u okviru roda *Potyvirus* (Shukla et al., 1988; Shukla et al., 1994; Desbiez et al., 2002). Sekvence 18 izolata kod kojih je sekvencioniran NIB-CP dio genoma pokazale su veću nukleotidnu i aminokiselinsku razliku (89-100% nukleotidne homologije, 90-100% aminokiselinske homologije) u odnosu na izolate kod kojih je sekvencioniran CP gen (99,6-99,8% nukleotidne, 99,6-100% aminokiselinske homologije), pri čemu su se u ostalih po sličnosti izdvojila četiri izolata. Veća varijabilnost, kao što je slučaj sa NIB-CP sekvencama izolata iz Srbije, zabilježena je između sekvenci izolata WMV u Iranu (Sharifi et al., 2008), dok su varijabilnost koja je bila bliska varijabilnosti CP sekvenci izolata iz Srbije zabilježili u svojim istraživanjima Moreno et al. (2004) i Glasa et al. (2011).

Rekonstruisana filogenetska stabla na NIB-CP dio genoma i na CP gen potvrdila su postojanje diverziteta u okviru populacije WMV u Srbiji. Oba rekonstruisana filogenetska stabla jasno pokazuju tri različite grupe izolata koje odgovaraju genetičkim sojevima WMV. Saglasno rezultatima ovih ispitivanja, kao i ispitivanjima drugih autora (Moreno et al., 2004; Desbiez et al., 2007; Sharifi et al., 2008; Glasa et al., 2011) najveći broj izolata WMV pripada Grupi 1, pa se smatra da su izolati ove grupe najrasprostranjeniji u svijetu. Shodno tome, izolati WMV iz Srbije u stablu rekonstruisanom na osnovu CP gena se grupišu, pored većine izolata iz Evrope, u okviru Grupe 1. Isti izolati se, očekivano, zajedno sa još 10 izolata iz Srbije, grupišu u okviru Grupe 1 i u stablu rekonstruisanom na NIB-CP dio genoma. Međutim, četiri izolata WMV iz Srbije su se grupisala u okviru Grupe sojeva 3 na osnovu NIB-CP dio genoma, što predstavlja prvi nalaz nekog izolata iz ove grupe u Srbiji. Molekularna grupa 3 obuhvata izolate uglavnom iz Azije (Kina i Japan), međutim, u Francuskoj 1999. godine je pojava veoma destruktivnih simptoma na kukuruzu povezana sa izolatom WMV za kojeg je kasnije dokazano da pripada u Grupu 3 zajedno sa Azijskim izolatima

(**Desbiez et al.**, 2007). **Desbiez et al.** (2009) su izolate grupe 3 zbog intenzivnih simptoma koje izazivaju označili kao „emerging“ (EM), dok su izolati Grupe 1 označeni kao „klasični“ (CL). Posljednja istraživanja **Finetti-Sialer et al.** (2012) ukazuju na širenje EM izolata u Evropi i u Italiju. Ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su da molekularnoj grupi 2 pripadaju izolati WMV iz udaljenih djelova svijeta, čak sa tri kontinenta, što je pokazano i od strane **Glasa et al.** (2011). Analiza sekvenci cijelog ili šireg regiona CP gena, koji uključuje i N-terminalni (NIB) dio CP gena (**Desbiez et al.**, 2007; **Sharifi et al.**, 2008), kao i filogenetske analize zasnovane na genu za CI i P1 proteine (**Moreno et al.**, 2004; **Desbiez et al.**, 2007; **Glasa et al.**, 2011) pokazale su da se izolati sa dva ili tri različita kontinenta nalaze u svakoj od tri molekularne grupe, potvrđujući da molekularno grupisanje izolata WMV nije u korelaciji sa njihovim geografskim porijeklom. **Moreno et al.** (2004) utvrdili su da evropski izolati izvan prve grupe sojeva pripadaju Grupi sojeva 2, ali za sada su u ovoj grupi samo izolati porijeklom iz Španije. Na osnovu CP gena, od evropskih izolata WMV, trećoj grupi sojeva pripadaju samo izolati iz Francuske (**Desbiez et al.**, 2007), izolat iz Italije (**Finetti-Sialer et al.**, 2012) i četiri izolata iz Srbije dobijena u ovim istraživanjima. Smatra se da je vjerovatno ovaj izolat na evropski kontinent došao putem nove introdukcije iz Azije, iako put introdukcije još uvijek nije utvrđen, nego da je nastao evolucijom lokalnih populacija ovog virusa (**Desbiez et al.**, 2007, 2009). Posle 2000. godine, u Francuskoj je, suprotno očekivanjima, zabilježena pojava zamjene CL sojeva, za koje se pretpostavljalo da su dobro adaptirani u datim uslovima, EM sojevima u nekoliko područja gdje su se nalazili zajedno (**Desbiez et al.**, 2011), što je još jedan od primjera tzv. „the invasion paradox“ (**Sax and Brown**, 2000; **Fabre et al.**, 2010). **Joannon et al.** (2010) na osnovu nedostatka jasne veze između geografske lokacije i genetičke udaljenosti između izolata u populaciji EM sojeva smatraju da trenutna populacija EM sojeva u Francuskoj nije nastala diferenciranjem posle jedne introdukcije, već posle više introdukcija u različite lokalitete. Iako su rekombinacije zastupljene u prirodnim populacijama WMV sojeva svih grupa (**Moreno et al.**, 2004; **Desbiez and Lecoq**, 2008; **Desbiez et al.**, 2011) i nije isključeno da na ovaj način nastanu novi sojevi, koji će prouzrokovati veće štete, **Desbiez et al.** (2011) navode da su novi sojevi ovako nastali za sada sa manjom sposobnosti (lower fitness) da se duže održe i ustale u jednoj populaciji.

Grupisanje u filogenetskim stablima je u skladu i sa motivom u N-terminalnom kraju CP gena. Izolati grupe 1 imaju od treće do pete pozicije obično motiv KEA, koji se javio i kod naših izolata iz ove grupe, dok je kod izolata grupe 2, motiv KET, a kod izolata iz grupe 3, u odnosu na 2, došlo je do insercije dvije aminokiseline pa se kod njih javlja KEKET motiv, koje je zabilježen i kod izolata WMV iz Srbije koji su se na osnovu rekonstruisanog filogenetskog stabla svrstali u grupu 3 (**Yoshioka et al.**, 1996; **Gara et al.**, 1997; **Desbiez et al.**, 2007; **Sharifi et al.**, 2008). Jedini izuzeci od ovog pravila su izolat iz Kine CHN-LJ koji pripada grupi 3 i izolati iz Izraela ISR i Irana URO.OS.1 koji pripadju grupi 1, koji imaju motiv KET umjesto KEKET, odnosno KEA (**Desbiez et al.**, 2007; **Sharifi et al.**, 2008). **Desbiez et al.**, (2011) navode da rekombinantni izolat C07-349 iz Francuske, koji u N-terminalnom kraju CP ima KEA motiv, za razliku od drugog rekombinantnog izolata C05-463 koji ima KEKET motiv, ima mogućnost da sistemično zarazi *Chenopodium quinoa*-biljku na osnovu čije reakcije je moguće razlikovati CL i EM izolata, odnosno da upravo KEA motiv može biti značajan za sistemičnu infekciju *C. quinoa*.

Vrijednosti genetičke udaljenosti između izolata u okviru 1 i 2 grupe relativno su niske, kod oba filogenetska stabla, što ukazuje na nizak nivo različitosti, dok više vrijednosti genetičke udaljenosti između izdvojenih grupa sojeva ukazuju na viši stepen divergentnosti i potvrđuju grupisanje u filogenetskom stablu. Prosječna vrijednost genetičke udaljenosti unutar 3 (EM) grupe sojeva je viša u odnosu na grupe 1 i 2, i nešto je niža od vrijednosti između grupa. Viši stepen divergentnosti u okviru grupe 3 može biti rezultat starije populacije izolata WMV. Po teoriji, očekuje se da starije populacije imaju veći genetski diverzitet od mlađih (**Garcia-Arenal et al.**, 2001).

Utvrđivanje varijabilnosti, kod neke vrste virusa i razumijevanje mehanizama i faktora koji do nje dovode veoma je značajno, prije svega zbog razvoja strategija kontrole zasnovanih na genima rezistentnosti, jer obično prirodna rezistentnost biva brzo prevaziđena od strane virusa. Shodno tome, pouzdano i brzo određivanje varijabilnosti sojeva virusa, naročito u dijelu CP gena, veoma je važan korak koji doprinosi poznavanju populacija virusa prisutnog u našoj zemlji što bi uz dobro poznavanje ekoloških faktora moglo značajno da umanja širenje neperzistentno prenosivih biljnih virusa (**Dallot et al.**, 2003, 2004). Istraživanje varijabilnosti u okviru CP gena je naročito važno i zbog toga što se brojne dijagnostičke metoda zasnivaju

upravo na antigenim svojstvima ovog gena (**Desbiedz et al.**, 1996; **Desbiedz and Lecoq**, 1997).

6.9.3. Molekularna karakterizacija izolata CMV

Analiza nukleotidne sličnosti umnoženih djelova koji obuhvataju dio 5' UTR, cijeli CP gen i dio 3' UTR izolata CMV iz Srbije, utvrdila je da izolati CMV iz tikava iz Srbije pokazuju malu varijabilnost u okviru ovog dijela genoma. Sličnost izolata CMV u ovom regionu genoma utvrđena je i prilikom ispitivanja CMV iz duvana u Srbiji (**Đekić**, 2009), ali i u ispitivanjima CMV na ljiljanima (**Berniak et al.**, 2010). Međutim, CMV je vrlo varijabilan virus (**Francki et al.**, 1979) i opisan je veliki broj sojeva virusa koji se međusobno razlikuju po krugu domaćina i simptomima koje izazivaju na biljkama, a samim tim i štetama koje nanose u proizvodnji brojnih usjeva širom svijeta. **Palukaitis et al.** (1992) su, u odnosu na biološke, serološke i molekularne osobine, sve sojeve CMV podijelili u dvije podgrupe, a najveći broj sojeva pripada podgrupi I. Na osnovu homologije sekvenci nukleinskih kiselina sojeva podgrupe I, **Palukaitis and Zaitlin** (1997) predložili su izdvajanje podgrupe IB u koju bi bili svrstani sojevi porijeklom iz Azije i podgrupe IA gdje bi bili svrstani svi ostali sojevi. Ranija istraživanja populacije CMV kod nas bila su usmjerena na izolate porijeklom iz paradajza, paprike, obične tikve i duvana i pokazala su pripadnost ispitivanih izolata podgrupi sojeva IA (**Dukić et al.**, 2004; **Đekić**, 2009).

Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazuje grupisanje svih izolata u dvije podgrupe I i II. U okviru podgrupe I izdvajaju se dvije podgrupe IA i IB. Ovakvo grupisanje izolata CMV u filogenetskom stablu rekonstruisanom na osnovu sekvenci CP gena zabilježili su i drugi autori (**Roossinck et al.**, 1999; **Lin et al.**, 2003; **Lin et al.**, 2004; **Yu et al.**, 2005; **Hareesh et al.**, 2006; **Parrella and Sorrentino**, 2009; **Berniak et al.**, 2010; **Koundal et al.**, 2011). Izolati CMV iz Srbije su se grupisali u okviru podgrupe IA, gdje pripada i većina poznatih izolata CMV (**Bonnet et al.**, 2005). Smatra se da se u okviru podgrupe IB uglavnom nalaze izolati iz Istočne Azije, osim dva izuzetka iz Italije, odnosno SAD, dok su u podgrupama IA i II izolati iz različitih djelova svijeta (**Gallitelli**, 2000; **Lin et al.**, 2003; **Moury**, 2004). Međutim, skorašnja istraživanja ukazuju da se izolati iz podgrupe II javljaju češće i šire su rasprostranjeni nego što se ranije pretpostavljalo (**Yu et al.**, 2005; **Tian et al.**, 2009), što se može

objasniti činjenicom, da izolati podgrupe I izazivaju izraženije simptome u odnosu na izolata podgrupe II, zbog čega su teži za uočavanje u polju, manje biološki stabilni i teži za detekciju (Xu et al., 1999; Tian et al., 2009). Kao posljedica ovih činjenica, moguće je da trenutno manja brojnost izolata podgrupe II nije realno stanje i da su ovi izolati mnogo brojniji, nego što pretpostavljamo (Tian et al., 2009). Međutim, Roossinck et al. (1999) pretpostavljaju da je manja brojnost izolata podgrupe II posljedica brže evolucije izolata u okviru podgrupe I, i da zbog toga izolati podgrupe I imaju širi krug domaćina i veću zastupljenost. Diverzitet između izolata podgrupe IB u stablu je bio značajno veći u odnosu na diverzitet ostalih podgrupa, što je u skladu sa rezultatima Lin et al. (2003) i ne čudi, s obzirom da izolati ove podgrupe potiču iz različitih biljaka, različitih geografskih područja, a i sakupljeni su u različitim periodima. Ipak, genetička varijabilnost izolata iz ove grupe nije bila u vezi ni sa geografskim porijeklom, ni sa vremenom uzorkovanja, kao ni sa biljkom domaćinom (Lin et al., 2003; Liu et al., 2009). Fraile et al. (1997) i Garcia-Arenal et al. (2001) su ustanovili postojanje matepopulacija CMV u Španiji, koje je karakterisala sopstvena lokalna dinamika u pogledu nestajanja i nasumičnih rekolonizacija iz lokalnih ili udaljenih virusnih rezervoara (izvora).

6.9.4. Molekularna karakterizacija izolata TSWV

Iako, TSWV predstavlja jedan od ekonomski veoma značajnih virusa za proizvodnju ratarskih, povrtarskih i ukrasnih biljaka u Srbiji (Krstić i Bulajić, 2007) nema puno podataka o molekularnim karakteristikama sekvenci izolata ovog virusa u Srbiji (Stanković et al., 2011), a do ovih istraživanja nijesu postojali podaci o TSWV na tikvama i korovima u usjevima tikava. Sekvence N gena TSWV izolata dobijene u ovim istraživanjima bile su identične i ovako visok stepen homologije je u skladu sa rezultatima Stanković et al. (2011) koji su ispitali populaciju TSWV na duvanu u Srbiji, a takođe i sa ranijim istraživanjima N gena TSWV iz pojedinačnih usjeva (Kaye et al., 2011), kao i njegove globalne populacije (Pappu et al., 1998; Tsompana et al., 2005; Sivparsad and Gubba, 2008).

I pored visokog stepena nukleotidne sličnosti globalne populacije TSWV na osnovu N gena, filogenetske analize su pokazale da manje razlike mogu biti od značaja, jer je u rekonstruisanom filogenetskom stablu došlo do grupisanja izolata na osnovu

geografskog porijekla, uz manje izuzetke. Ukupna nukleotidna divergencija za sve izolate u stablu bila je slična globalnoj divergenciji populacije TSWV koju navode **Tsompana et al.** (2005). Takođe, grupisanje izolata TSWV na osnovu geografskog porijekla zabilježeno je i od strane **Pappu et al.** (1998) i **Tsompana et al.** (2005), kao i nemogućnost grupisanja australijskih izolata (**Dietzgen et al.**, 2005). Četiri izolata TSWV, dva porijeklom iz tikava, dva iz korovskih biljaka nađenih u usjevima tikava u Srbiji, grupišu se zajedno sa ostalim izolatima iz Srbije, Crne Gore i Bugarske, dok drugi evropski izolati formiraju blisku, ali odvojenu subpopulaciju. Ovakvo grupisanje evropskih izolata u dvije geografske subpopulacije je vjerovatno posljedica paralelne evolucije dvije različite grupe sekvenci u okviru prirodne populacije TSWV u Evropi. Visoka nukleotidna sličnost između sekvenci iz Srbije, Crne Gore i Bugarske ukazuje na intenzivan protok gena ("gene flow"), koji je doveo do smanjenja varijabilnosti između populacija TSWV u ovim zemljama. Slično, **Tsompana et al.** (2005) navode da izolati iz Džordžije i Sjeverne Karoline formiraju poseban klaster u odnosu na ostale isolate iz SAD i drugih dijelova svijeta. Izolati iz tikava i korova, pored toga što su identični među sobom, veoma su slični na nukleotidnom nivou i sa drugim izolatima TSWV iz Srbije, iz duvana i paradajza. Međutim, da bi se došlo do potpunih podataka o prirodnoj populaciji TSWV u Srbiji, neophodno je sekvencionirati i filogenetski analizirati veći broj izolata iz različitih biljaka domaćina i iz različitih lokaliteta. Na osnovu rezultata dobijenih rekonstruisanjem filogenetskog stabla može se zaključiti da je populacija TSWV definisana po geografskom porijeklu, sa izuzetkom dva izolata iz Sjeverne Karoline i dva izolata iz Južne Afrike, koji su se grupisali u evropskom klasteru, potvrđujući da su evropskog porijekla, kao što su naveli **Tsompana et al.** (2005) i **Sivparsad and Gubba** (2008). Dva Francuska izolata grupišu se zajedno sa izolatima iz Južne Koreje ukazujući na genetičku razmjenu između Azijske i Evropske grupe. **Tentchev et al.** (2011) ukazuju da se Evropski i Azijski klasteri jasno izdvajaju od Sjeverno-Američkog usled lokalnog razvoja autohtonih populacija. Grupisanje nekih izolata iz Italije i Španije u Sjeverno-Američku grupu, kao i Francuskih izolata u Azijsku grupu upućuje na činjenicu da je došlo do tri nezavisne introdukcije TSWV u Evropu, kako su naveli i **Tsompana et al.** (2005) u svojim pionirskim istraživanjima, ali i **Tentchev et al.** (2011) u njihovim najnovijim sveobuhvatnim istraživanjima evolucije i strukture populacije ovog virusa.

6.9.5. Molekularna karakterizacija izolata CABYV

Kako je CABYV u Srbiji prvi put pronađen 2008. godine (**Vučurović et al.**, 2011a) nije bilo očekivano da sekvence izolata ovog virusa pokažu veliki stepen varijabilnosti. Međutim, analiza nukleotidne i aminokiselinske sličnosti sekvenci CABYV iz Srbije iz različitih biljaka porodice Cucurbitaceae, pokazala je da postoji velika varijabilnost izolata ovog virusa kod nas. Na nukleotidnom nivou sličnost se kretala od 93,5-100%, a na aminokiselinskom nivou sličnost u dijelu koji kodira CP gen bila je 91,4-100%, a u dijelu koji kodira MP gen 89-100%. Slične vrijednosti dobili su i **Knierim et al.** (2010) ispitujući varijabilnost CP i MP gena izolata CABYV iz Tajvana.

Sva tri rekonstruisana filogenetska stabla ukazuju na podjelu populacije CABYV u svijetu na tri grupe izolata, što je podržano visokim „bootstrap“ vrijednostima, kao i niskim vrijednostima diverziteta u okviru grupa koje su se izdvojile u stablu. Takođe, na osnovu rekonstruisanih stabala može se zaključiti da dužina fragmenta na osnovu kojeg se rekonstruiše stablo ne igra značajnu ulogu, odnosno da je i segment od 200 nt na početku CP gena dovoljno informativan i da se na osnovu njega izolati grupišu identično kao i kad se stablo rekonstruiše na osnovu skoro kompletnog CP gena. Skoro identično grupisanje izolata CABYV u tri grupe dobili su i **Omar and Bagdady** (2012), a razlika u odnosu na grupisanje koje su predložili **Shang et al.** (2009) je postojanje treće grupe sa sekvencama CABYV sa Tajlanda čije su sekvence objavljene u studiji **Knierim et al.** (2010). **Mnari-Hattab et al.** (2009) takođe navode da je sličnost između izolata povezana sa geografskim porijeklom, prije nego sa biljkom domaćinom. **Shang et al.** (2009) su za najveću grupu izolata CABYV predložili naziv Mediteranska, jer se u njoj nalaze sekvence izolata iz Evrope i iz zemalja koje okružuju basen Sredozemnog mora, a za drugu grupu u koju su se svrstale sekvence iz Azije predložili su naziv Azijska. Izolati CABYV iz Srbije se svrstavaju u okviru Mediteranske grupe, zajedno sa ostalim evropskim sekvencama, ali i u okviru Azijske grupe što predstavlja prvi nalaz sekvenci ove grupe izvan Azije. Ovakvo grupisanje izolata CABYV iz Srbije ukazuje da je najvjerojatnije došlo do dvije nezavisne introdukcije ovog virusa u Srbiju, ili da je u Srbiji od ranije postojala jedna grupa izolata (Mediteranska), a da je došlo do skorašnje introdukcije novih azijskih izolata. Izuzeci u grupisanju na osnovu geografskog porijekla mogu da budu posljedica protoka gena između pojedinih geografskih područja do koga neminovno dolazi usred intenzivne razmjene biljnog materijala (**Mnari-Hattab et al.**, 2009).

7. ZAKLJUČCI

Virusi su stalno prisutni u usjevima tikava u Srbiji. Procijenjeni intenzitet zaraze mijenjao se tokom pet godina, od veoma visokog u prve dvije godine ispitivanja, preko relativno niskog 2009. godine, do visokog tokom 2010. i 2011. godine.

Pregledom 129 različitih usjeva tikava, na 61 lokaliteta gajenja u Srbiji, zabilježena je pojava raznovrsnih simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu. Najčešće su se simptomi ogledali u promjenama opšteg izgleda biljke, deformacijama i promjenama u obojenosti lista, vriježa i plodova.

Serološkim analizama 1100 uzoraka sakupljenih od 2007. do 2011. godine utvrđeno je prisustvo ZYMV, WMV i CMV na tikvama u Srbiji. Nije utvrđeno prisustvo PRSV, SqMV, kao ni TRSV koji se nalazi na karantinskoj listi IA dio 1 štetnih organizama Srbije.

Pojava i zastupljenost virusa tikava varirali su od godine do godine. Tokom prve dvije godine ispitivanja miješane infekcije su bile zastupljenije, dok su u posljednje tri godine dominirale pojedinačne infekcije. U odnosu na ukupan broj testiranih uzoraka i pregledanih lokaliteta i usjeva ZYMV je bio prevalentan i najrasprostranjeniji.

Virusna priroda oboljenja potvrđena je biotestom za ZYMV, WMV, CMV i TSWV, odnosno testom perzistentnog prenošenja vašima za CABYV. Biološka karakterizacija ZYMV i WMV ukazala je na postojanje fenotipske varijabilnosti između izolata ovih virusa.

Prvi put je dokazano prisustvo CABYV, novog virusa za Srbiju, čije je prisustvo utvrđeno na 16 vrsti, sorti i varijeteta tikava.

Prvi put je dokazana infekcija dvije vrste tikava sa TSWV u Srbiji, pri čemu je pojava ovog virusa na *C. maxima* prvi nalaz ovog virusa u prirodnoj infekciji u svijetu.

Nije ustanovljeno postojanje veze između detektovanog virusa i tipa simptoma na tikvama, osim u slučaju TSWV, koji izaziva karakteristične simptome.

Utvrđeno je prenošenje ZYMV sjemenom *C. pepo*, *C. moschata* i *C. maxima*, dok prenošenje sjemenom WMV i CMV nije dokazano.

Dokazano je prisustvo ZYMV, WMV, CMV i TSWV u jednogodišnjim i višegodišnjim korovskim biljkama u i oko usjeva tikava, čime je potvrđena uloga korova kao izvora inokuluma za ove viruse.

Utvrđeno je prisustvo 57 taksona biljnih vaši u tikvama čiji se maksimum leta i diverziteta poklapao sa fenofazama u kojima su tikve najosjetljivije na virusne infekcije. Najzastupljenije vrste vaši u tikvama bile su: *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Anoecia corni* i *Aphis gossypii*.

Detekcija svih pet virusa prisutnih na tikvama u Srbiji obavljena je do nivoa vrste korišćenjem odgovarajućih specifičnih prajmera i RT-PCR metode. Uspostavljeni su pouzdani, brzi i jednostavni protokoli za detekciju svih pet virusa koji omogućavaju dalju karakterizaciju ovih virusa kod nas.

Molekularna identifikacija svih pet prisutnih virusa obavljena je sekvencioniranjem, a svi dobijeni izolati deponovani su u GenBank bazu podataka.

Sekvence dijela N1b, CP gena i dijela 3' UTR svih izolata ZYMV iz Srbije pokazale su visok stepen homologije. Filogenetska analiza CP gena izolata ZYMV pokazala je grupisanje populacije ovog virusa u tri grupe A-C, a izolati iz Srbije, zajedno sa izolatima iz Centralne Evrope formiraju poseban klaster u okviru grupe A.

Filogenetske analize WMV na osnovu N1b-CP gena pokazale su grupisanje populacije ovog virusa u tri grupe 1-3, a izolati iz Srbije grupišu se u okviru grupa 1 i 3. U okviru grupe 3 nalaze se izolati nazvani „emerging“ koji izazivaju pojavu veoma destruktivnih simptoma na tikvama i koji do sada nijesu bili prisutni u Srbiji.

Sekvence izolata CMV iz Srbije pokazale su visok stepen homologije, a filogenetske analize CMV pokazale su da se populacija ovog virusa dijeli u tri podgrupe, a izolati porijeklom iz Srbije nalaze se u najzastupljenijoj IA podgrupi.

Izolati TSWV su se na osnovu filogenetskih analiza grupisali u pet grupa, a izolati TSWV iz tikava i korova iz Srbije grupisali su se u okviru Evropske podgrupe 1, zajedno sa ostalim izolatim ovog virusa iz Srbije.

Analiza sekvenci izolata novog virusa za Srbiju, CABYV, ukazala je na izdvajanje dvije grupe izolata, što je potvrđeno filogenetskim analizama. Populacija CABYV se dijeli u tri grupe, Mediteransku, Azijsku i Tajvansku, a izolati iz Srbije su se grupisali u prve dvije. Svrstavanje dijela izolata CABYV iz Srbije u okviru Azijske grupe predstavlja prvi nalaz nekog izolata ove grupe izvan Azije.

Rezultati ove disertacije predstavljaju nova sveobuhvatna saznanja o virusima tikava i omogućavaju dalji rad na izučavanju diverziteta populacija virusa i epidemiologiji oboljenja koje oni prouzrokuju.

8. LITERATURA

Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., El-Zammar, S., Fayyad, A., Lecoq, H. (2000): Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon. *Crop Protection*, 19: 217-224.

Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brung, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., Frauquet, C. M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149: 1045-1060.

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.

Agrios, G. N. (2005): *Plant Pathology*, Academic Press, Inc, San Diego/Toronto.

Aleman-Verdaguer, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N., Fauquet, C. (1997): Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, N1b and CP genomic regions of several *Yam mosaic potyvirus* isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of poty-viruses. *Journal of General Virology*, 78: 1253-1264.

Ali, A., Mohammad, O., Khattab, A. (2012): Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Disease*, 96: 243-248.

Ali, A., Natsuaki, T., Okuda, S. (2004): Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. *Journal of Phytopathology*, 152: 677-682.

Allen, W. R., Matteoni, J. A. (1991): Petunia as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the *Tomato spotted wilt virus* in greenhouses. *Plant Disease*, 75: 78-82.

Al-Musa, A. M. (1989): Overwintering hosts for some cucurbit viruses in the Jordan Valley. *Journal of Phytopathology*, 127: 49-54.

Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., Al-Saleh, M. A. (1995): Response of greenhouse-grown cucumber cultivars to an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). *Plant Disease*, 79: 898-901.

Anonymous (1997): *Tobacco ringspot nepovirus*. In: I. M. Smith, D. G. McNamara, P. R. Scott, M. Holderness (eds.) *Quarantine pests for Europe*, 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1357-1362.

Avgelis, A. D., Katis, N. (1989): Occurrence of *Squash mosaic virus* in melons in Greece. *Plant Pathology*, 38:111-113.

Bananej, K., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Vahdat, A., Kheyr-Pour, A., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H. (2006): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Iran causing yellows on four cucurbit crops. *Plant Disease*, 90: 526.

Bananej, K., Keshavaraz, T., Vahdat, A., Hosseini Salkdeh, G., Glasa, M. (2008): Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156: 654-659.

Bananej, K., Vahdat, A. (2008): Identification, distribution and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. *Phytopathologia mediterranea*, 47: 247-257.

- Bananej, K., Vahdat, A., Predajna, L. and Glasa, M. (2009): Molecular characterization of geographically different *Cucurbit aphid-borne yellows virus* isolates. *Acta virologica*, 53: 61-64.
- Basky, Z. (1993): Identification key for alate aphids caught in yellow pan traps. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 28: 71-121.
- Bavec, F., Grobelnik-Mlakar, S., Rozman, Č., Bavec, M. (2007): Oil Pumpkins: Niche for Organic Producers. In: Janick, J., Whipkey, A. (eds.), *Issues in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 366.
- Berenji, J. (1999): Tikve-hrana, lek i ukras. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad*, 31: 63-75.
- Berenji, J. (2010): Uljana tikva i njena prizvodnja. *Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad*, str. 63.
- Berenji, J., Sabadoš, V., Ivan, J. (2004): Uljana tikva korisna i unosna kultura. „Tamnograf“, Novi Sad.
- Berenji, J., Sikora, V. (2011): Sisitematika, morfologija, poreklo, genetika i oplemenjivanje uljane tikve. U: Berenji, J. (eds.), *Uljana tikva Cucurbita pepo L.* Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, str: 7-82.
- Berényi, J., Karlovits, G. (1995): Az olajtök származása, rendszertana és alaktana. *Olaj, szappan, kozmetika*, 44: 54-59.
- Berniak, H., Kaminska, M., Malinowski, T. (2010): *Cucumber mosaic virus* groups IA and II are represented among isolates from naturally infected lilies. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 305-309.
- Bisognin, D. A. (2002): Origin and Evolution of Cultivated Cucurbits. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32: 715-723.
- Blanchard, D., Lecoq, H., Pitrat, M. (1994): A color atlas of cucurbit diseases. New York. Manson Publishing, John Wiley, pp. 299.
- Blua, M. J., Perring, T. M. (1989): Effect of *Zucchini yellow mosaic virus* on development and yield of cantaloupe (*Cucumis melo*). *Plant Disease*, 73: 317-20.
- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristan, S., Malpica, J. M., Garcia-Arenal, F. (2005): Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 332: 359-368.
- Boubourakas, I. N., Avgelis, A. D., Kyriakopoulou, P. E., Katis, I. (2006): Occurrence of yellowing viruses (*Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucurbit aphid-borne yellows virus*) affecting cucurbits in Greece. *Plant Pathology*, 55: 276-283.
- Bucher, H. (2010): Die Entwicklung der chinesischen Kürbiskerne! Reifezeit, die offizielle Information der Fördergemeinschaft für integrierte Production (FIP), Unterpremstätten (Austria), 1: 10.
- Bourdin, D., Lecoq, H. (1994): Increase in *Cucurbit aphid-borne yellows virus* concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. *Journal of Phytopathology*, 141: 143-152.
- Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Vučurović, A., Ristić, D., Krstić, B. (2008): Prenošenje *Zucchini yellow mosaic virus*-a semenom tikava. *Zbornik rezimea IX savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor*, str. 94-95.
- Castle, S. J., Perring, T. M., Farrar, C. A., Kishaba, A. N. (1992): Field and laboratory transmission of *Watermelon mosaic virus 2* and *Zucchini yellow mosaic virus* by various aphid species. *Phytopathology*, 82: 235-240.

- Chou, C., Chen, C., Wu, M., Su, H., Yeh, H. (2009): Biological and molecular characterization of Taiwanese isolates of *Cucumber mosaic virus* associated with banana mosaic disease. *Journal of Phytopathol*, 157: 85-93.
- Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 44-50.
- Cohen, S., Nitzany, F. E. (1963): Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. *Phytopathology*, 53: 193-196.
- Coutts, B. A., Kehoe, M. A., Webster, C. G., Wylie, S. J., Jones, R. A. C. (2011): *Zucchini yellow mosaic virus*: biological properties, detection procedure and comparison of coat protein gene sequences. *Archives of Virology*, 156: 2119–2131.
- Čujak, G. T., Barčić, I. J., Bažok, D., Grubišić, D. (2005): Aphid fauna (Hemiptera: Aphidoidea) in Croatia. *Entomologia Croatica*, 9: 57-69.
- D'Arcy, C., Domer, L. (2005): Luteoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London, UK, pp. 891-900.
- Dalot, S., Gottwald, T., Labonne, G., Quiot, J. B. (2003): Spatial pattern analysis of sharka disease (*Plum pox virus* strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology*, 93: 1543-1552.
- Dalot, S., Gottwald, T., Labonne, G., Quiot, J. B. (2004): Factors affecting the spread of *Plum pox virus* strain M in peach orchards subjected to roguing in France. *Phytopathology*, 94: 1390-1398.
- Damicone, J. P., Edelson, J. V., Sherwood, J. L., Myers, L. D., Motes, J. E. (2007): Effects of border crops and intercrops on control of cucurbit virus diseases. *Plant Disease*, 91: 509-516.
- Davis, R. F., Mizuki, M. K. (1986): Seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash. *Phytopathology*, 76: 1073.
- Davis, R. F. (1986): Partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from squash in Turkey. *Plant Disease*, 70: 735-738.
- Desbiez, C., Costa, C., Wipf-Scheibel, C., Girard, M., Lecoq, H. (2007): Serological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* (genus *Potyvirus*). *Archives of Virology*, 152: 775-781.
- Desbiez, C. B., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., Lecoq, 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, 201-208.
- Desbiez, C., Lecoq, H. (1997): *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathology*, 46: 809-829.
- Desbiez, C., Lecoq, H. (2004): The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 50 part of the genome. *Archives of Virology*, 149: 1619-1632.
- Desbiez, C., Lecoq, H. (2008): Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*). *Archives of Virology*, 153, 1749-1754.
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T., Lecoq, H. (1996): Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in the island of Martinique. *Plant Disease*, 80: 203-207.

Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Lecoq, H. (2002): Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Carribean islands. *Virus Research*, 85: 5-16.

Desbiez, C., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., Lecoq, H. (2011): Recombination in natural populations of *Watermelon mosaic virus*: new agronomic threat or damp squib? *Journal of General Virology*, 92: 1939-1948.

Dietzgen, R. G., Twin, J., Taltz, J., Selladurai, S., Carroll, M. L., Coutts, B. A., Berryman, D. I., Jones, R. A. (2005): Genetic variability of *Tomato spotted wilt virus* in Australia and validation of real time RT-PCR for its detection in single and bulked leaf samples. *Annals of Applied Biology*, 146: 517-530.

Dijkstra, J. (1992): Importance of host range and other biological properties for the taxonomy of plant viruses. *Archives of Virology (Suppl)*, 5: 279-289.

Dikova, B. (2005): Establishment of economically important viruses on watermelons by ELISA method in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19 (Suppl.): 22-29.

Dogimont, C., Slama, S., Martin, J., Lecoq, H., Pitrat, M. (1996): Sources of resistance to *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* in a melon germ plasm collection. *Plant Disease*, 80: 1379-1382.

Domier, L. L. (2011): Luteoviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier, pp. 1045-1053.

Domier, L. L., Shaw, J. G., Rhoads, R. E. (1987): Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como- and caulimoviral proteins. *Virology*, 158: 20-27.

Duduk, N. (2008): Identifikacija, molekularna karakterizacija i načiniprenošenja virusa gajenih biljaka familije Cucurbitaceae u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 1-134.

Duduk, N., Finetti Sialer, M. M., Gallitelli, D., Krstić, B. (2008): Unapređenje detekcije virusa mozaika lubenice dizajniranjem novih prajmera. Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 99.

Duffus, J. E. (1965): *Beet pseudo-yellows virus*, transmitted by the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Phytopathology*, 55: 450-453.

Duffus, J. E., Flock, R. A. (1982): Whitefly-transmitted disease complex of the desert southwest. *California Agriculture*, 36: 4-6.

Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I., Bulajić, A. (2004): Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 35/36: 71-79.

Dukić, N., Krstić, B., Katis, N. I., Papavassiliou, C., Berenji, J., Vico, I. (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. Zbornik rezimea V jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 85.

Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N. I., Papavssilious, C., Berenji, J. (2006): First report of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in bottlegourd (*Lagenaria siceraria*) in Serbia. *Plant Disease*, 90: 380.

Dukić, N., Krstić, B., Vico, I., Katis, N. I., Papavssilious, C., Berenji, J. (2002): Biological and serological characterization of viruses on summer squash crops in Yugoslavia. *Journal of Agricultural Science*, 47: 149-160.

Dekić, I. (2009): Prisustvo, rasprostranjenost i karakterizacija virusa duvana u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 1-141.

Dekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B. (2007a): Neravnomerna distribucija *Tomato spotted wilt virus* u duvanu, paradajzu i paprici. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 117-118.

Dekić, I., Bulajić, A., Berenji, J., Krstić, B. (2007b): Epidemijska pojava viroza tikava (*Cucurbita* spp.) u Srbiji. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 118-119.

Dekić, I., Bulajić, A., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Zastupljenost i molekularna karakterizacija virusa mozaika krastavca u usevu duvana. Bilten za sirak, hmelj i lekovito bilje, 40: 70-82.

Edwards, M. C., Gonsalves, D. (1983): Grouping of 7 biologically defined isolates of *Cucumber mosaic virus* by peptide-mapping. *Phytopathology*, 73: 1117-1120.

Fabre, F., Chadoeuf, J., Costa, C., Lecoq, H., Desbiez, C. (2010): Asymmetrical over-infection as a process of plant virus emergence. *Journal of Theoretical Biology*, 265: 377-388.

Finetti-Sialer, M. M., Mascia, T., Cillo, F., Vovlas, C., Gallitelli, D. (2012): Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Watermelon mosaic virus* associated with a watermelon necrotic disease in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 317-322.

Fletcher, J. D., Wallace, A. R., Rogers, B. T. (2000): Potyvirus in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV2 virus infections. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 17-26.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010): FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. Dostupno na adresi: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>

Fraile, A., Alonso-Prados, J. L., Aranda, M. A., Bernal, J. J., Malpica, J. M., Garcia-Arenal, F. (1997): Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology*, 71: 934-940.

Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Shkula, D. D. (1979): *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213.

Fruhworth, G. O., Hermetter, A. (2007): Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 1128-1140.

Gaba, V., Zelcer, A., Gal-On, A. (2004): Cucurbit biotechnology: The importance of virus resistance. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40: 346-358.

Gallitelli, D. (2000): The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71: 9-21.

Gal-On, A. (2007): *Zucchini yellow mosaic virus*: insect transmission and pathogenicity-the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology*, 8: 139-150.

Gara, I. W., Kondo, H., Maeda, T., Inouye, N., Tamada, T. (1997): Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of *Watermelon mosaic virus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 63: 113-117.

Garcia-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2001): Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 157-186.

Garcia-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008): *Cucumber mosaic virus*. *Encyclopedia of Virology*, 1: 614-619.

Gholamalizadeh, R., Vahdat, A., Keshavarz, T., Elahinia, A., Bananej, K. (2008): Occurrence and distribution of ten viruses infecting cucurbit plants in Gulan province, Iran. *Acta Virologica*, 52: 113-118.

Gibbs, A. J., Grower, J. C. (1960): The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies-some statistical points arising in the analysis of results. *Annals of Applied Biology*, 48: 75-83.

Glasa, M., Bananej, K., Predajňa, L., Vahdat, A. (2011): Genetic diversity of *Watermelon mosaic virus* in Slovakia and Iran shows distinct pattern. *Plant Disease*, 95: 38-42.

Glasa, M., Pittnerova, S. (2006). Complete genome sequence of a Slovak isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among Central European ZYMV isolates. *Journal of Phytopathology*, 154: 436-440.

Glasa, M., Svoboda, J., Nováková, S. (2007): Analysis of the molecular and biological variability of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes*, 35: 415-421.

Gleason, M. L., Provvidenti, R. (1990): Absence of seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* from seed of pumpkin. *Plant Disease*, 74: 828.

Goldbach, R. and Kuo, G. (1996): Biodiversity and taxonomy of *Tospoviruses*. *Proceedings of the International Symposium on Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops, Taiwan, 1995*. *Acta Horticulturae*, 431: 21-26.

Grafton-Cardwell, E. E., Perring, T. M., Smith, R. F., Valencia, J., Farrar, C. A. (1996): Occurrence of mosaic viruses in melons in the Central Valley of California. *Plant Disease*, 80:1092-1097.

Greber, R. S., Perley, D. M., Herrington, M. E. (1988): Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39: 1085-1094.

Gumus, M., Erkan, S., Tok, S. (2004): Studies on determination of virus diseases in the seeds of some cucurbitaceous species. *The Journal of Agricultural Faculty of Ege University*, 41: 49-56.

Ha, C., Revill, P., Harding, R. M., Vu, M., Dale, J. L. (2008). Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of Virology*, 153: 45-60.

Hareesh, P. S., Madhubala, R., Bhat, A. I. (2006): Characterization of *Cucumber mosaic virus* infecting Indian long pepper (*Piper longum* L.) and betel vine (*Piper betle* L.) in India. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 89-93.

Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Rymelska, N., Pospieszny, H. (2010): First report of *Papaya ringspot virus* infecting zucchini plants in Poland. *Plant Disease*, 94: 633.

Hattab, M. M. (2005): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Tunisia causing yellows on five cucurbitaceous species. *Plant Disease*, 89: 776.

Hein, A. (1977): Über ein Auftreten des Wassermelonenmosaik-Virus 1 an Zucchini (*Cucurbita pepo* L. var. *giromontiina* Alef.) in Süddeutschland. *Journal of Phytopathology*, 89: 221-228.

- Hosseini, S., Mosahebi, G. H., Koochi 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.
- Iwaki, M., Honda, Y., Hanada, K., Tochiara, H., Yonaha, T., Hokama, K., Yokoyama, T. (1984): Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease*, 68: 1006-1008.
- Jacky, F., Bouchery, Y. (1988): Atlas des formes ailees des especes courantes de pucerons. INRA, pp. 48.
- Joannon, B., Lavigne, C., Lecoq, H., Desbiez, C. (2010): Barriers to gene flow between emerging populations of *Watermelon mosaic virus* in southeastern France. *Phytopathology*, 100: 1373-1379.
- Jossey, S., Babadoost, M. (2008): Occurrence and distribution of pumpkin and squash viruses in Illinois. *Plant Disease*, 92: 61-68.
- Juarez, M., Truniger, V., Aranda, M. A. (2004): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. *Plant Disease*, 88: 907.
- Karlović, Đ., Berenji, J., Recseg, K., Kővári, K. (2001): Savremeni pristup uljanoj tikvi (*Cucurbita pepo* L.) sa posebnim osvrtom na tikvino ulje (*Oleaum cucurbitae*). *Zbornik radova Savetovanja industrije ulja, Proizvodnja i prerada uljarica Herceg Novi*, 42: 177-182.
- Katis, N. I., Tsitsipis, J. A., Lykouressis, D. P., Papapanayotou, A., Kokinis, G. M., Perdakis, D. C., Manoussopoulos, I. N. (2006): Transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* by colonizing and non-colonizing aphids in Greece and new aphid vectors of the virus. *Journal of Phytopathology*, 154: 293-302.
- Kaye, A. C., Moyer, J. W., Parks, E. J., Carbone, I., Cubeta, M. A. (2011): Population genetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology*, 101: 147-153.
- Kerbs, C. (1989): *Ecological Methodology*. Harper Collins, New York, pp. 624.
- Kereši, T., Sekulić, R. (2011): Štetočine uljane tikve. U: Berenji, J. (eds.) *Uljana tikva Cucurbita pepo L.* Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, pp. 199-228.
- Kneirim, D., Deng, T. C., Tsai, W. S., Green, S. K., Kenyon, L. (2010): Molecular identification of three distinct *Polyomavirus* species and a recombinant *Cucurbit aphid borne yellows virus* strain infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Pathology*, 59: 991-1002.
- Koundal, V., Haq, Q.M., Praveen, S. (2011): Characterization, genetic diversity, and evolutionary link of Cucumber mosaic virus strain New Delhi from India. *Biochemical Genetics*, 49: 25-38.
- Krstić, B., Bulajić, A. (2007): Karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru. Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Beograd, pp. 202.
- Krstić, B., Tošić, M. (1994): Biljni virusi–neke osobine i dijagnoza. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, pp. 142.
- Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N. I., Papavassiliou, C. (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad*, 103: 57-65.
- Krstić, B., Bulajić, A. (2011): Bolesti uljane tikve. U: Berenji, J. (eds.), *Uljana tikva Cucurbita pepo L.* Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, pp. 115-198.

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.

Kucharek, T. A., Purcifull, D. E., Christie, R. G., Perkins, K. D. (1998): The association of severe epidemics of cucumber mosaic in commercial fields of pepper and tobacco in North Florida with inoculum in *Commelina benghalensis* and *C. communis*. *Plant Disease*, 82: 1172.

Kucharek, T. A., Purcifull, D. E., Hiebert, E. (1996): Viruses That Have Occurred Naturally in Agronomic and Vegetable Crops in Florida. University of Florida Plant Protection Pointers. Extension Plant Pathology Report No. 7. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Dostupno na adresi: <http://edis.ifas.ufl.edu/pg101>.

Kwon, S. W., Kim, M. S., Choi, H. S., Kim, K. H. (2005): Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 80-85.

Lastra, R. (1968): Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. *Plant Disease Reporter*, 52: 171-174.

Latin, X. R. (1996): Bacterial wilt. In: Zitter TA, Hopkins DL and Thomas CE. (eds.) *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 36.

Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Staub, J. E., Ezura, H., Zalapa, J., Kristkova, E. (2006): Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.). In: Singh, R. J. (eds.) *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series, Volume 3-Vegetable Crops*. Chapter 8, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 273-377.

Lecoq H. (1992): Les virus des cultures de melon et de courgette de plein champ (I). *PHM Revue Horticole*, 324: 15-25.

Lecoq, H. (1999): Epidemiology of cucurbit aphid-borne yellows virus. In: Smith, H. G., Baker, H. (eds.), *The Luteoviridae*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 243-248.

Lecoq, H. (2004): *Cucurbit aphid-borne yellows virus*. In: Loebenstein, G., Thottappilly, G. (eds.), *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Springer Science & Business, pp. 675.

Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., Herrbach, E. (1992): A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, *Cucurbit aphid-borne yellows virus*. *Plant Pathology*, 41: 749-761.

Lecoq, H., Desbiez, C., Delecolle, B., Cohen, S., Mansour, A. (2000): Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted *Cucumber vein yellowing virus* is a tentative member of the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, 81: 2289-2293.

Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C., Girard, M. (2003): Potential involvement of melon fruit in long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Disease*, 87: 955-959.

Lecoq, H., Fabre, F., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., Schoeny, A., Desbiez, C. (2011). Search for factors involved in the rapid shift in *Watermelon mosaic virus* (WMV) populations in south-eastern France. *Virus Research*, 159: 115-123.

Lecoq, H., Lisa, V., Dallavalle, G. (1983): Serological identity of *Muskmelon yellow stunt* and *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Disease*, 67: 824-825.

Lecoq, H., Pitrat, M. (1984): Strains of *Zucchini yellow mosaic virus* in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Phytopathologische Zeitschrift*, 111: 165-173.

Lecoq, H., Pitrat, M., Clement, M. (1981): Identification et caracterisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougnissement jaune du melon. *Agronomie*, 1: 827-834.

Lecoq, H., Wipf-Schibel, C., Chandeysson, C., Le Van, A., Fabre, F., Desbiez, C. (2009): Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: An historical overview. *Virus Research*, 141: 190-200.

Lelley, T., Hengmuller, S. (2000): Breeding for ZYMV tolerance of seed-oil pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) in Austria using molecular markers. *Cucurbit Genetic Cooperative Report*, 23: 117-119.

Lemaire, O., Gubler, W. D., Valencia, J., Lecoq, H., Falk, B. W. (1993): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* in the Unites States. *Plant Disease*, 77: 1169.

Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A. B., Falk, B. W. (2004): Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology*, 78: 6666-6675.

Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A., Jiminez, M., Falk, B. W. (2003): Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 84: 249-258.

Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G., d'Aquilo, M. (1981): Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology*, 71: 667-672.

Lisa, V., Lecoq, H. (1984): *Zucchini yellow mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 282. Kew, Surrey (GB).

Liu, Y. Y., Yu, S. L., Lan, Y. F., Zhang, C. L., Hou, S. S., Li, X. D., Chen, X. Z. Zhu, X. P. (2009): Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China. *Acta virologica*, 53: 89-97.

Lovisolo, O. (1980): Virus and viroid diseases of cucurbits. *Acta Horticulture*, 88: 33-71.

Luis-Arteaga, M. (1994): Enfermedades producidas por virus. In: Díaz-Ruiz, J. R., García-Jiménez, J. (eds.), *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº 1, Agropubli (Phytoma-España), Valencia, pp. 73-91.

Luis-Arteaga, M., Alvarez, J. M., Alonso-Prados, J. L., Bernal, J. J., García-Arenal, F., Laviña, A., Batlle, A., Moriones, E. (1998): Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease*, 82: 979-982.

Mahgoub, H. A., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Dafalla, G., Lecoq, H. (1997): Characterization and occurrence of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* in Sudan. *Plant Pathology*, 46: 800-805.

Mallick, M. F. R., Masui, M. (1986): Origin, distribution and taxonomy of melons. *Scientia Horticulturae*, 28: 252-261.

Mansour, A., Al-Musa, A. (1982): Incidence, economic importance and prevention of *Watermelon mosaic virus-2* in squash (*Cucurbita pepo*) fields in Jordan. *Phytopathologische Zeitschrift*, 103: 35-40.

Marchoux, G., Hostachy, B., Gebre-Selassie, K., Gognalons P. (2000): Tomato spotted wilt virus: hôtes et méthodes de lutte. *PHM-Revue Horticole*, 418: 46-52.

- Margaritopoulos, J. T., Dovas, C. I., Gounaris, J., Skouras, P. J., Kanavaki, O. M., Katis, N. I., Tsitsipis, J. A. (2009): Molecular analysis of the coat protein of *Potato virus Y* isolates in Greece suggests multiple introduction from different genetic pools. *Journal of Phytopathology*, 158: 73-80.
- Martinez-Ochoa, N., Mullis, S. W., Csinos, A. S., Webster, T. M., Bertrand, P. (2007): Natural infections of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) found in weeds around tobacco fields in Georgia. *Journal of Insect Science*, 7: 19-20.
- Massumi, H., Samei, A., Hosseini Pour, A., Shaabani, M., Rahimian, H. (2007): Occurrence, distribution and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant Disease*, 91: 159-163.
- Matthews, R. E. F. (1979): Classification and nomenclature of viruses. 3rd report of the International Committee on Taxonomy on Viruses. *Intervirology*, 12: 131-296.
- McCreight, J. D. (1996): Botany and culture. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. (eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp: 2-6.
- McCreight, J. D., Staub, J. (1999): Report of the Cucurbit Working Group. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. Paper 483: 79-87. Dostupno na adresi: <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/483>
- McDonald, G. (2003): *Biogeography: Space, Time and Life*. John Wiley and Sons, New York, pp. 518.
- Mcleod, P. J., Scott, H. A., Morelock, T. E. (1986): *Zucchini yellow mosaic virus*: a new severe cucurbit disease. *Arkansas Farm Research* 35. Agricultural Experiment Station, Division of Agriculture, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas, USA.
- Milne, K.S., Grogan, R. G., Kimble, K. A. (1969): Identification of viruses infecting cucurbits in California. *Phytopathology*, 59: 819-828.
- Mnari-Hattab, M., Gauthier, N., Zouba, A. (2009): Biological and molecular characterization of the *Cucurbit aphid-borne yellows virus* affecting cucurbits in Tunisia. *Plant Disease*, 93: 1065-1072.
- Moreno, I. M., Malpica, J. M., Diaz-Pendon, J. A., Moriones, E., Fraile, A. and Garcia-Arenal, F. (2004): Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. *Virology*, 318: 451-460.
- Moury, B. (2004): Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1602–1611.
- Müller, C., Bröther, H., von Barga, S., Büttner, C. (2006): *Zucchini yellow mosaic virus*-incidence and sources of virus infection in field-grown cucumbers in the Spreewald, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 252-258.
- Mullis, S., Martinez-Ochoa, N. (2009): Non-Crop Hosts of TSWV. In: Mullis, S. W. (eds.), *Bulletin 1354, Tospoviruses in Solanaceae and Other Crops in the Coastal Plain of Georgia*. The University of Georgia, pp. 20-21.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabral, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. (1995): *Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Wien, Austria: Springer–Verlag. *Archives of Virology*, 10: 350-354.
- Nagata, T., de Ávila, A. C., Tavares, P. C. M., Barbosa, C. J., Juliatti, F. C., Kitajima, E. W. (1995): Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 90-95.

Nameth, S. T., Dodds, J. A., Paulus, A. O. (1986): Cucurbit viruses of California an ever-changing problem. *Plant Disease*, 70: 8-11.

OEPP/EPPO (1999): Data sheets on quarantine pests. *Tomato spotted wilt virus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 29: 465-472.

OEPP/EPPO (2008): EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. EPPO standard PM 5/3 (2). Dostupno na adresi: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>

Oliveira, A. C. B., Maluf, W. R., Pinto, J. E. B. P., Azevedo, S. M. (2003): Resistance to *Papaya ringspot virus* in summer squash *Cucurbita pepo* L., introgressed form an interspecific *C. pepo* x *C. moschata* cross. *Euphytica*, 132: 211-215.

Omar, A. F., Bagdady, N. A. (2012): *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Egypt. *Phytoparasitica*, 40: 177-184.

Owen, J. E., Palukaitis, P. (1988): Characterization of *Cucumber mosaic virus*. 1. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology*, 166: 495-502.

Özdemir, S., Erilmez, S., Kaçan, K. (2009): Detection of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) on Tomato Crops and Some Weeds In Denizli Province of Turkey. *Acta Horticulturae*, 808: 171-174.

Özer, M., Sipahioğlu, H. M., Usta, M., Fidan, H. (2012): Cloning and sequencing of coat protein gene of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from squash and muskmelon in Turkey. *Turkish Journal of Biology*. doi:10.3906/biy-1110-16.

Palukaitis, P., García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62: 242-323.

Palukaitis, P., Zaitlin, M. (1997): Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advance in Virus Research*, 48: 349-377.

Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. (1992): *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research*, 41: 281-348.

Papayiannis, L. C., Ioannou, N., Boubourakas, I. N., Dovas C. I., Katis, N. I., Falk, B. W. (2005): Incidence of viruses infecting cucurbits in Cyprus. *Journal of Phytopathology*, 153: 530-535.

Pappu, H. R., Jones, R. A. C. and Jain, R. K. (2009): Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141: 219-236.

Pappu, H., Pappu, S., Jain, R., Bertrand, P., Culbreath, A., McPherson, R. and Csinos, A. (1998): Sequence characteristics of natural populations of *Tomato spotted wilt tospovirus* infecting flue-cured tobacco in Georgia. *Virus Genes*, 17: 169-177.

Paris, H. S. (2000): History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews*, 25: 71-170.

Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C. and Marchoux, G. (2003): An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, 85: 227-264.

Parrella, G., Sorrentino, D. (2009): Identification of a *Cucumber mosaic virus* isolate from *Passiflora edulis* in southern Italy and validation of subgroup identification by in silico restriction fragment length polymorphism. *Journal of Phytopathology*, 157: 762-767.

Pejčinovski, F. (1978): Virusot na mosaicot na krstavicata koj odgleduvanite rastenija od familijata Cucurbitaceae vo SR Makedonija. Godišen zbornik na Zemljodelskot fakultet, Skopje, XXVII-XXVIII: 97-116.

- Perring, T. M., Farrar, C. A. (1993): Simulation of growth and yield of virus-infected cantaloupe with pyrethroids. *Plant Disease*, 77: 1077-1080.
- Perring, T. M., Farrar, C. A., Mayberry, K., Blua, M. J. (1992): Research reveals pattern of cucurbit virus spread. *California Agriculture*, 46: 35-40.
- Pfossor, M. F., Baumann, H. (2002): Phylogeny and geographical differentiation of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates (*Potyviridae*) based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes. *Archives of Virology*, 147: 1599-1609.
- Popović, M. (1991): Povrtarstvo. Nolit, Beograd, pp. 431.
- Popović, M. (1971): Prilog poznavanju kulture tikava (*Cucurbita* sp.) u nas. *Savremena poljoprivreda*, 19: 59-72.
- Prieto, H., Bruna, A., Hinrichsen, P., Muñoz, C. (2001): Isolation and molecular characterization of a Chilean isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Disease*, 85: 644-648.
- Provvidenti, R. (1996a): Diseases caused by viruses. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. (eds), *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 37-45.
- Provvidenti, R. (2000): APSnet Feature story: Zucchini yellow mosaic. (pp. 3) Experiment Station Cornell University Geneva, NY 14456. Dostupno na adresi <http://www.apsnet.org/online/feature/pumpkin/zuccyell.html>
- Provvidenti, R., Gonsalves, D., Humaydan, H. S. (1984): Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California. *Plant Disease*, 68: 443-446.
- Provvidenti, R., Schroeder, W.T. (1970): Epiphytotic of watermelon mosaic among Cucurbitaceae in Central New York in 1969. *Plant Disease Reporter*, 54: 744-748.
- Provvidenti, R. (1996b): Watermelon mosaic. In: Zitter T. A., Hopkins D. L., Thomas, C. E. (eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 43-45.
- Purcifull, D. E., Hiebert, E. (1979): Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathology*, 69: 112-116.
- Purcifull, D. E., Hiebert, E., Edwardson, J. (1984): *Watermelon mosaic virus 2*. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 293. Kew, Surrey (GB).
- Petrović-Obradović O., Vučetić A., Knežević T., Živković LJ., Pantelić M. (2006): Uspostavljanje sistema praćenja leta biljnih vašiju u usevima semenskog krompira. Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 82.
- Ragozzino, A., Stefanis, D. (1977): Neoformazioni cupuliformi su zucchine infette dal virus del mosaico del cocomero (*Watermelon Mosaic Virus 1*). *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università degli Studi di Napoli*, 11: 33-41.
- Rahimian, H., Izadpanah, K. (1978): Identity and prevalence of mosaic-inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran. *Journal of Phytopathology*, 92: 305-312.
- Reinbold, C., Herrbach, E., Brault, V. (2003): Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology*, 84: 3473-3484.
- Remaudière, G., Seco Fernandes, V. (1990): Cles pour aidé à la reconnaissance des ailes de pucerons pieges en region Mediterranee (Hom. Aphoidea). *Universidad de Leon*, I-II, pp. 205.

- Riedle-Bauer, M., Suarez, B., Reinprecht, H. J. (2002): Seed transmission and natural reservoirs of *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. *Journal of Plant Disease and Protection*, 109: 200-206.
- Robinson, R. W., Provvidenti, R., Shail, J. W. (1993): Tests for seed born transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Hort Science*, 28: 694-696.
- Roossinck, M. J., Zhang, L., Hellwald, K. H. (1999): Rearrangements in the 59 nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73: 6752-6758.
- Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H.-X. and Falk, B. W. (2001): Geographically distant isolates of the crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* show very low genetic diversity in the coat protein gene. *Journal of General Virology* 82, 929-933.
- RZS, (2010): Statistički godišnjak biljne proizvodnje. Republika Srbija Republički zavod za statistiku. Dostupno na adresi: http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/Public/Report_View.aspx
- Salama, E. A., Hill, W. H. (1968): Distribution of cucurbit viruses in Kansas. *Plant Disease Reporter*, 52: 11-14.
- Samuel, G., Bald, J. G., Pittman, H. A. (1930): Investigations on „spotted wilt“ of tomatoes. *Australian Council of Science and industrial Research Bulletin*, 44: 64.
- Sax, D.F., Brown, J.H. (2000): The paradox of invasion. *Global Ecology and Biogeography*, 9: 363-371.
- 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, pp. 112-174.
- 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.
- Schubert, T. S., Ritchie, J. J. (1984): *Zucchini Yellow Mosaic Virus*. Plant Pathology Circular No. 259. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, Florida. Dostupno na adresi: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PI/PI04600.pdf>
- Sevik, M. A., Arli-Sokmen, M. (2003): Viruses infecting cucurbits in Samsun, Turkey. *Plant Disease*, 87: 341-344.
- Shang, Q. X., Xiang, H. Y., Han, C. G., Li, D. W., Yu, J. L. (2009): Distribution and molecular diversity of three cucurbit-infecting poleroviruses in China. *Virus Research*, 145, 341-346.
- Sharifi, M., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Shaabani, M., Rahimian, H. (2008): Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus isolates* from Iran. *Virus Genes*, 37: 304-313.
- Shew, H. D., Lucas, G. B. (1991): *Compendium of Tobacco Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 96.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. (1988): Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the Potyvirus group. *Journal of General Virology*, 69: 2703-2710.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H., Ward, C. W. (1988): The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69: 1497-1508.

- Shukla, D. D., Ward, C. W. (1989): Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology*, 106: 171-200.
- Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. (1994): *The Potyviridae*. CAB International, Wellingford, UK, pp. 448.
- Silveira, W. G., Jr., Avila, A. C., Muñoz, J. O. (1985): Chayote (*Sechium edule* Sw): a new host of *Tomato spotted wilt virus*. *Fitopatologia Brasileira*, 10: 661-665.
- Simmons, H. E., Holmes, E. C., & Stephenson, A. G. (2008). Rapid evolutionary dynamics of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 89: 1081-1085.
- Simmons, H. E., Holmes, E. C., Gildow, F. E., Bothe-Goralczyk, M. A., & Stephenson, A. G. (2011). Experimental verification of seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Disease*, 95: 751-754.
- Sivparsad, B. J., Gubba, A. (2008): Isolation and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in South Africa. *African Journal of Agricultural Research*, 3: 428-434.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2010): Pravilnik o listama štetnih organizama i listama bilja, biljnih proizvoda i propisanih objekata, broj 7/10.
- Srinivasulu, M., Sarovar, B., Johnson, A. A., Gopal, D. S. (2010): Association of a potyvirus with mosaic disease of gherkin (*Cucumis anguria* L.) in India. *Indian Journal of Microbiology*, 50: 221-224.
- Stakić, D., Nikolić, V. (1966): Virus mozaika lubenice-novo virozno oboljenje u Jugoslaviji. *Savremena poljoprivreda*, 3: 289-302.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Berenji, J., Krstić B. (2011): Status of tobacco viruses in Serbia and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Acta Virologica*, 55: 337-347.
- Svoboda, J., Leisova-Svobodova, L. (2011): First Report of *Squash Mosaic Virus* in Ornamental Pumpkin in the Czech Republic. *Plant Disease*, 95: 1321.
- Svoboda, J., Leisova-Svobodova, L., Lecoq, H. (2011): First Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Squash in the Czech Republic. *Plant Disease*, 95: 220.
- Svoboda, J., Polak, J. (2002): Distribution, variability and overwintering of *Zucchini yellow mosaic virus* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38: 125-130.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Taylor, L. R. (1984): *A Handbook for Aphid Identification*. Rothamsted Experimental Station, Harpenden, UK, 171 pp.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M., Moury, B. (2011): Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology*, 92: 961-973.
- Teppner, R. H. (2000): *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae)-History, seed coat types, thin coated seeds, and their genetics. *Phyton*, 40: 1-42.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

Thomson, K. G., Dietzgen, R. G., Gibbs, A. J., Tang, Y. C., Liesack, W., Teakle, D. S. and Stackebrandt, E. (1995): Identification of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* by RT-PCR and analysis of sequence variability. *Journal of Virological Methods*, 55: 83-96.

Tian, Z., Qiu, J., Yu, J., Han, C., Liu, W. (2009): Competition between *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II isolates in tobacco. *Journal of Phytopathology*, 157: 457-464.

Tóbiás, I., Basky, Zs., Ruskó, J. (1996): *Zucchini yellow mosaic virus*-potyvirus a new pathogen of cucurbit plants occurring in Hungary. *Növényvédelem*, 32: 77-79.

Tóbiás, I., Palkovics, L. (2003): Characterization of Hungarian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var *Styriaca*. *Pest Management Science*, 59: 493-497.

Tóbiás, I., Tulipán, M. (2002): Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Növényvédelem*, 38: 23-27.

Tóbiás, I., Sári, L., Kuhlmann, H. (2003): Seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* on *Cucurbita pepo* conv. *citrullinina* var. *styriaca* (oilseed pumpkin). *Cucurbit Genetics Cooperative Reports*, 26: 42-43.

Tóbiás, I., Szabó, B., Salánki K., Sári, L., Kuhlmann, H., Palkovics, L. (2008): Seedborne transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in styrian hulless group of *Cucurbita pepo*. In: Pitrat M. (eds.), Proc IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, INRA, Avignon, France, pp. 189-197.

Tomassoli, L., Meneghini, M. (2007): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Italy. *Plant Pathology*, 56: 720-720.

Tošić, M., Provvidenti, R., Vujić, S., Krnjaja, V. (1996): Contribution to the study of viral diseases of cucumber in Yugoslavia. *Zaštita bilja*, 47: 343-349.

Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. and Moyer, J. W. (2005): The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14: 53–66.

Ullman, D. E., Cho, J. J., German, T. L. (1991): Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. *Plant Disease*, 75: 367-370.

Ullman, D. E., Meideros, R., Campbell, L. R., Whitfield, A. E., Sherwood, J. L., German, T. L. (2002): Thrips as vectors of tospoviruses. *Advances in Botanical Research*, 36: 113-140.

Van de Wetering, F., Goldbach, R., Peters, D. (1996): *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology*, 86: 900-905.

Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickne, R. B. (2000): *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press, S. Diego, CA, USA, 929-930.

Vance, V. B., Moore, D., Turpen, T. H., Bracker, A., Hollowell, V. C. (1992): The complete nucleotide sequence of pepper mottle virus genomic RNA: comparison of the encoded polyprotein with those of other sequences potyviruses. *Virology*, 191: 19-30.

Vučetić A. (2011): Let i ponašanje biljnih vašiju u usevima semenskog krompira. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 1-217.

Vučetić, A., Petrović-Obradović, O., Knežević, T. (2007): Praćenje leta biljnih vašiju u usevima semenskog krompira. Zbornik rezimea XIII Simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 93.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Virusi-stalni problem u usevu tikava u Srbiji. Zbornik rezimea IX Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 96-97.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krnjajić, S., Krstić, B. (2009b): *Watermelon mosaic virus* - destruktivni patogen tikve u Srbiji. Zbornik rezimea VI Kongresa o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkom suzbijanju invanzivnih organizama, Zlatibor, Srbija, str. 46-57.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009a): Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruzja. Pesticidi i fitomedicina, 24: 85-94.

Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009c): Biološka varijabilnost virusa žutog mozaika kukuruzja u Srbiji. Pesticidi i fitomedicina, 24: 271-280.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2011a): First report of the occurrence of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* on oilseed pumpkin in Serbia. Plant Disease, 95: 1035.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus isolates*. European Journal of Plant Pathology, DOI 10.1007/s10658-012-9964-x.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2010): Učestalost pojave i molekularna karakterizacija virusa mozaika lubenice poreklom iz Srbije. Pesticidi i fitomedicina, 25: 213-230.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2011b): Karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom sa tikava u Srbiji. Pesticidi i fitomedicina, 26: 325-336.

Wagner, F. S. (2000): The Health Value of Styrian Pumpkin Seed Oil-Science and Fiction. Cucurbit genetics Cooperative Report, 23: 122-123.

Walkey, D. G. A. (1992): *Zucchini Yellow Mosaic Virus*: Control by mild strain protection. Phytoparasitica, 20 (Suppl): 99-103.

Wang, Y., Giba, V., Yang, J., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2002): Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. Phytopathology, 92: 51-58.

Wang, H. L., Gonsalves, D., Provvidenti, R., Zitter, T. A. (1992): Comparative biological and serological properties of four strains of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Disease, 76: 530-535.

Webb, R. E., Scott, H. A. (1965): Isolation and identification of *Watermelon mosaic virus* 1 and 2. Phytopathology, 55: 895-900.

Webb, S. E. (2007): IPM case studies: Cucurbits. In: van Emden H. F., Harrington R. (eds.), Aphids as Crop Pests. CABI, Wallingford, pp. 639-649.

Williams, P. H. (1996): Angular Leaf Spot. In: Zitter T. A., Hopkins D. L., Thomas C. E. (eds.), Compendium of Cucurbit Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 33-34.

Williams, P. H., Zitter, T. A. (1996): Bacterial leaf spot. In: Zitter T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. (eds.), Compendium of Cucurbit Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 35.

Wilson, C. R., (1998): Incidence of weed reservoirs and vectors of *Tomato spotted wilt tospovirus* on southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathology*, 47: 171-176.

Wong, S. M., Chang, C. G., Chang, C. Y., Chong, P. L. (1994): Characterization of an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. *Journal of Phytopathology*, 141: 355-368.

Xiang, H. Y., Shang, Q.X., Han, C. G., Li, D. W., Yu, J. L. (2008): First report on the occurrence of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* on nine cucurbitaceous species in China. *Plant Pathology*, 57: 390.

Xu, P., Li, M., Lin, Q., Xie, L. (1999): Comparative studies on properties of five *Cucumber mosaic virus* isolates infecting passiflora in China. *Virologica Sinica*, 14: 73-79.

Yakoubi, S., Desbiez, C., Fakhfakh, H., Wipf-Scheibel, C., Marrakchi, M., Lecoq, H. (2007): Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 89: 417-420.

Yakoubi, S., Desbiez, H., Fakhfakh, C., Wipf-Scheibel, C., Fabre, F., Pitrat, M., Marrakchi, M. and Lecoq, H. (2008): Molecular, biological and serological variability of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Tunisia. *Plant Pathology*, 57: 1146-1154.

Yardımcı, N., Özgönen, H. (2007): First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 2: 59.

Yoshioka, K., Hanada, K., Noda, C., Oosawa, K. (1996): Nucleotide sequence of the coat protein gene and 30-noncoding region of Japanese isolate of WMV2. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 62: 22-424.

Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2005): Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123: 155-161.

Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Kitajima, E. W., Barroso, P. A. V., Kuniyuki, H., Groppo, G. A., Pavan, M. A. (2000): Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. *Plant Disease*, 84: 516-520.

Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Dingjun, L., 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 biochemica et biophysica* since, 39: 431-437.

Zhao, M. F., Chen, J., Zheng, H. Y., Adams, M. J., Chen, J. P. (2003). Molecular analysis of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates from Hangzhou, China. *Journal of Phytopathology*, 151: 307-311.

Zitter, T. A. (1996): Cucurbit Diseases. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. (eds.), Compendium of Cucurbit Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 1-2.

9. BIOGRAFIJA

Ana Vučurović je rođena 08.06.1984. godine u Nikšiću, Crna Gora. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2008. godine, sa prosječnom ocjenom 9,66 (devet i 66/100). Diplomski rad pod naslovom: „Morfološke i odgajivačke odlike izolata *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock and Man in 't Veld“ odbranila je sa ocjenom 10 (deset). Dobitnik je nagrade Zadužbine Nikole Spasića za najboljeg studenta treće godine Poljoprivrednog fakulteta, nagrade Poljoprivrednog fakulteta za studenta generacije 2006/07. i nagrade Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta generacije Poljoprivrednog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 2007/08. godini.

Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Studijski program: Poljoprivredne nauke, Modul: Fitomedicina upisala je 2008/09. godine. Od 2009. godine kao stipendista Ministarstva prosvete i nauke angažovana je na Katedri za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na projektima „Unapređenje sortimenta, tehnologije proizvodnje i primarne dorade uljane tikve–golice i nevena“ i „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“. Učestvovala je na projektu Ministarstva Poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede pod nazivom „Serološke i molekularne metode utvrđivanja nivoa zaraženosti semena lucerke, praćenje intenziteta zaraze useva i genetička struktura populacije virusa mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) u Srbiji“ i na bilateralnom projektu sa Hrvatskom „Raširenost fitopatogenih gljiva na aromatičnom i lekovitom bilju u Hrvatskoj i Srbiji“ koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke.

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

Do sada je objavila i saopštila ukupno 48 naučnih radova.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Ana Vučurović

broj indeksa 08/7

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava
i epidemiologija oboljenja u Srbiji

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.07.2012. godine

Ana Vučurović

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ana Vučurović

Broj indeksa 08/7

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava i epidemiologija oboljenja u Srbiji

Mentor prof. dr Branka Krstić, redovni profesor

Potpisani/a Ana Vučurović

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.07.2012. godine

Ana Vučurović

Izjava o korišćenju

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

Diverzitet, biološka i molekularna karakterizacija virusa tikava

i epidemiologija oboljenja u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.07.2012. godine

Ana Vućurović