Zaraženost domaćih ekotipova češnjaka virusima

Ćurić, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:146649

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

ZARAŽENOST DOMAĆIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA VIRUSIMA

DIPLOMSKI RAD

Klara Ćurić

Mentor: doc. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Klara Ćurić**, JMBAG 0178089054, rođena 7.9.1993. u Požegi, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ZARAŽENOST DOMAĆIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA VIRUSIMA

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Klare Ćurić**, JMBAG 0178089054, naslova

ZARAŽENOST DOMAĆIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA VIRUSIMA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Doc. dr. sc. Darko Vončina	mentor	_____
2.	Doc. dr. sc. Sanja Fabek Uher	član	_____
3.	Izv. prof. dr. sc. Edyta Đermić	član	_____

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Darku Vončini na ukazanoj prilici i povjerenju pri odabiru mene kao suradnika na projektu. Isto tako, veliko hvala doc. dr. sc. Sanji Fabek Uher na svoj beskompromisnoj, praktičnoj pomoći, trudu i spremnosti uvijek odgovoriti na sva pitanja. Hvala svima na odvajanju vremena, ostavljanju svojih obaveza po strani kako bi mi pomogli riješiti nedoumice oko diplomskog rada.

Zahvaljujem se i djelatnicima zavoda za fitopatologiju gospođi Draženki Ivić i gospodinu Mladenu Poletti Kopešić na svakodnevnoj pomoći pri obradi uzoraka te inih drugih zadataka.

Od srca hvala mojoj braći, ostatku obitelji te prijateljima na snažnoj podršci tijekom studiranja i inače u životu.

Nadasve, najveću zaslugu svemu što sam postigla pripisujem svojim roditeljima. Hvala vam što ste vjerovali u mene, što ste mi dali potpunu slobodu i omogućili da sama biram svoj put znajući da ste na tom putu i vi uvijek uz mene.

Konačno, zahvaljujem se mojem ujaku Darku Aračiću dipl. ing. agr zbog kojega sam zavoljela agronomiju te koji mi je od malih nogu pokazivao širinu i ljepotu koju ona nudi.

Hvala od srca! ☺

SADRŽAJ

Sažetak

Summary

1 UVOD 1

1.1 HIPOTEZA I CILJ 2

2 PREGLED LITERATURE 3

2.1 Porijeklo i upotreba češnjaka 3

2.2 Proizvodnja češnjaka u Republici Hrvatskoj i svijetu 4

2.3 Sortiment češnjaka 6

2.4 Virusne bolesti češnjaka 7

2.4.1 Virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) 10

2.4.2 Obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV) 11

2.4.3 Virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV) 12

2.5 Serološke metode u detekciji virusa 13

2.5.1 ELISA 14

2.6 Molekularne metode u detekciji virusa 15

2.6.1 PCR 15

2.6.2 RT-PCR 15

2.6.3 Sekvencioniranje DNA Sangerovom metodom 16

2.7 Pouzdanost laboratorijskih testiranja 17

3 MATERIJAL I METODE 19

3.1 Ispitivanje uzoraka metodom ELISA 19

3.2 Djelomična molekularna karakterizacija 23

3.2.1 Detekcija virusa žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV).. 23

3.2.2 Detekcija obično latentni virusa češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV)... 24

3.2.3 Detekcija virusa žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV).... 25

4 REZULTATI 27
4.1 Metoda ELISA 27
4.1.1 Benkovac 27
4.1.2 Zagreb 29
4.1.3 Cerić 31
4.2 Molekularni testovi 32
5 RASPRAVA 34
6 ZAKLJUČAK 38
7 POPIS LITERATURE 39
7.1 Web izvori 43
8 PRILOG 1 45
ŽIVOTOPIS

Sažetak

Diplomskog rada studentice Klare Ćurić, naslova

ZARAŽENOST DOMAĆIH EKOTIPOVA ČEŠNJAKA VIRUSIMA

Biljke češnjaka (*Allium sativum* L.) mogu biti inficirane na polju virusima rodova *Potyvirus*, *Carlavirus* i *Allexivirus*. Ovi virusi prenose se vegetativnim razmnožavanjem i vektorima. Cilj rada bio je ustvrditi učestalost pojave virusa češnjaka na proizvodnim površinama u Republici Hrvatskoj. Laboratorijska detekcija i identifikacija virusa žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), virusa žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV) te obično latentnog virusa češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV) provedena je 2015. godine pomoću metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Ispitano je ukupno 407 uzoraka češnjaka s tri lokacije: Benkovac, Zagreb i Cerić. Ukupno 380 (94%) ispitanih biljaka je bilo zaraženo s barem jednim virusom dok kod 27 (6%) biljaka nije utvrđena prisutnost virusa uključenih u istraživanje. Svih 118 ispitanih uzoraka češnjaka s područja Cerića (Vukovarsko-srijemska županija) pokazali su mješovitu zarazu sa sva tri virusa. Uzorci iz Zagreba (232 uzorka) i Benkovca (57 uzoraka) pokazali su 87,9%-tnu odnosno 96,5% zarazu s OYDV, 12,9% uzoraka iz Zagreba te 3,5% iz Benkovca bilo je inficirano s GCLV dok se LYSV očitovao samo u Zagrebu kod 3,9% uzoraka. Rezultati ovoga istraživanja ukazuju na visok stupanj zaraze autohtonih sorti češnjaka virusima na više lokacija u Hrvatskoj.

Ključne riječi: Hrvatska, *Allium sativum* L., ELISA, ekonomski značajni virusi

Summary

Of the master's thesis – student **Klara Ćurić,** entitled

VIRUS INFECTIONS OF DOMESTIC GARLIC ECOTYPES

Garlic plants (*Allium sativum* L.) can be infected in the field by viruses from genus *Potyvirus*, *Carlavirus* and *Allexivirus*. Those viruses are disseminated by vegetative propagation and insect vectors. The aim of the thesis was to determine the presence frequency of three viruses of garlic on production areas in the Republic of Croatia. Laboratory detection and identification of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), L*eek yellow stripe virus* (LYSV) and *Garlic common latent virus* (GCLV), was carried out in 2015 using ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). In total 407 samples of garlic from three locations (Benkovac, Zagreb and Cerić) were tested: 380 (94%) plants were infected by at least one virus, while 27 (6%) plants were free of viruses included in investigation. All 118 samples from Cerić area (Vukovar-Srijem County) showed mixed infection with three investigated viruses. Samples from Zagreb (232) and Benkovac (57) showed infection rate of 87,9%, and 96,5% with OYDV, 12,9% of samples from Zagreb and 3,5% of plants from Benkovac were infected with GCLV while LYSV was found only in Zagreb at the rate of 3,9%.The results showed high infection rate of native garlic varieties with viruses on several locations in Croatia.

Key words: Croatia, *Allium sativum* L., ELISA, economically important viruses

1 UVOD

Češnjak je jedna od najznačajnijih kulinarskih biljaka široko rasprostranjena i kultivirana u svijetu, a koristi se i kao ljekovita biljka te začin. Prema FAO (2015), u razdoblju od 2000.-2013. godine češnjak se nalazi među top pet namirnica s obzirom na prosječno godišnje povećanje proizvedenih količina s porastom od 7,7% u navedenom razdoblju, što ukazuje na njegovoj važnost češnjaka u svijetu.

Zbog vegetativnog načina razmnožavanja, virusi se prenose iz generacije u generaciju preko zaraženih češnjeva te unutar i između parcela pomoću vektora. Virusi koji najčešće uzrokuju zarazu na češnjaku su virusi iz roda *Potyvirus, Carlavirus, Allexivirus* (King i sur., 2012). Ti virusi imaju slična morfološka svojstva i često sličnu biologija pa ih je teško razdvojiti prema tim svojstvima.

Uzgajivači u Hrvatskoj, ali i u svijetu, tradicionalno koriste vlastiti sadni materijal češnjaka te dio prinosa koriste za sadnju slijedeće godine. Takve biljke imaju tendenciju akumuliranja više vrsta virusa, koji se prenose na sljedeće generacije te dovode do kronične infekcije. Prema tome, virusi i dalje perzistiraju na „novo zasađenim“ površinama. No, iako virusi ne uzrokuju propadanje biljke, dolazi do smanjenja prinosa i kvalitete proizvoda što također ovisi i o kultivaru češnjaka (Lot i sur., 1998; Conci i sur., 2002).

U Republici Hrvatskoj se ne proizvodi dovoljna količinu češnjaka niti za vlastite potrebe tako da o značajnijem izvozu istoga nema podataka. Većina uvoznog češnjaka dolazi iz Kine. Prema Toth i sur. (2015) nedostatna proizvodnja češnjaka u Hrvatskoj je posljedica dvaju glavnih problema: nedostatka kvalitetnog sadnog materijala i neodgovarajućeg skladištenja češnjaka. Također, nepouzdanje poljoprivrednika u nerazriješeno pitanje otkupa češnjaka te značajno niži prinosi u Republici Hrvatskoj u odnosu na inozemstvo su dodatni razlozi zbog kojih se proizvođači ne usude uhvatiti u koštac s proizvodnjom češnjaka. Do 2012. godine, nije postojalo kontinuirano praćenje proizvodnje češnjaka kroz više segmenata. Projektom Zadarske županije u suradnji s Agronomski fakultetom u Zagrebu došlo je do pomaka prema rješavanju i revitalizaciji proizvodnje kako u Zadarskoj županiji, tako i šire. Rezultati ovoga projekta ukazuju na konkretne probleme

s kojima se proizvođači susreću, nudi se rješenje za iste prema napucima struke, daje uvid u trenutno stanje proizvodnih površina na području Zadarske i Vukovarsko-srijemske županije te sadni materijal koji se tamo koristi.

1.1 HIPOTEZA I CILJ

Hipoteza: autohtone sorte češnjaka koje se uzgajaju na području Zadarske (Benkovac) i Vukovarsko-srijemske (Cerić) županije zbog vegetativnog načina razmnožavanja u velikoj mjeri su zaražene virusima.

Cilj rada: utvrditi učestalost pojave virusa žute patuljavosti poriluka, virusa žućenja i kržljavosti luka te obično latentni virus češnjaka ekotipova češnjaka iz Zadarske (Benkovac) i Vukovarsko-srijemske (Cerić) županije. U slučaju pronalaska pojedinih virusa bit će napravljena njihova djelomična molekularna karakterizacija.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Porijeklo i upotreba češnjaka

Češnjak je cijenjen diljem svijeta kao začinski sastojak, hrana i lijek. Pripada porodici *Alliaceae*, koja sadrži 750 vrsta i uključuje lukove, lukove vlasce, poriluke i ukrasno bilje. Latinski naziv mu je *Allium sativum* L. Etimologija njegovog botaničkog naziva, *Allium sativum* L., nije sasvim jasna. Pretpostavlja se kako prvi dio imena dolazi od latinske riječi „*olere*“, što znači „mirisati“ i grčkog pojma „*hallesthai*“ što znači „iskočiti“. Riječ *sativum* povezuje se sa pojmom sjetve. Engleski naziv „*garlic*“ potječe od staroengleskih riječi za „koplje“ (*gar*) i „poriluk“ (*leac*). U engleskom jeziku ima i brojna druga imena: „kraljević ljekovitih trava“, „hrana ljubavi“, „nektar bogova“, „kamfor za siromašne“, „sirup za siromašne“ (tracle, od latinske riječi *theriaca*, koja znači „protuotrov“ ili „lijek“), „smrdljivi luk“, „smrdljiva Jenny“ ili „smrdljivi ljiljan/ruža“ (Stanway, 2013).

Češnjak služi kao sirovina za pripravak lijekova i konzervansa. Lukovica češnjaka sadrži 35-40% suhe tvari, 6-8% sirovih proteina, 20-27% polisaharida i oko 1,5% mineralnih tvari među kojima je jod. Osim toga lukovica sadrži askorbinske kiseline i eterična ulja te zbog toga ima visoku vrijednost u ishrani ljudi (Parađiković, 2002).

Današnji češnjak nastao je kao divlja biljka u središnjoj Aziji prije više od 10 000 godina. Tijekom stoljeća su ga počeli uzgajati i njime trgovati na putevima začina i svile koji su spajali Kinu, Bliski istok i Sredozemlje. S vremenom je stigao do Afrike, Europe, Australije i Amerika. Danas se u Kini proizvodi više od 12 milijuna tona češnjaka godišnje, što je tri četvrtine svjetske proizvodnje. Drugi veliki proizvođači, redom po veličini berbe su Indija, Južna Koreja, Egipat, Rusija, Sjedinjene Američke Države (posebice Kalifornija), Španjolska, Argentina, Burma (Mijanmar) i Ukrajina (Stanway, 2013).

Okus češnjaka opisuje se kao rezak, pikantan, pun, sočan, sladak ili mošusan. Bitan je sastojak mnogih jela diljem svijeta. U Koreji i Kini prosječna tradicionalna prehrana sadrži između osam i dvanaest češanja dnevno dok je prosječna potrošnja u Sjedinjenim Američkim Državama između pola i jednoga češnja. Neki ljudi, pak, ne vole njegov okus, kao ni miris (Stanway, 2013).

Od doba drevnog Egipta, oko 4 000 godina pr. n. e., do kraja 19. stoljeća češnjak je bio najčešće upotrebljavana ljekovita biljka na svijetu. I danas je popularan tradicionalni lijek za mnoge bolesti. Dodaci prehrani na bazi češnjaka među najprodavanijim su biljnim dodacima prehrani u zapadnome svijetu, a brojna znanstvena istraživanja ukazuju da češnjak pozitivno utječe na zdravlje. Sastojci češnjaka koji najviše doprinose zdravlju ljudi su sumporni spojevi (Stanway, 2013).

Kroz povijest, češnjak se koristio i u primijenjenoj umjetnosti: od 13. do 17. stoljeća pozlatari su koristili njegove ljepljive sokove za pričvršćivanje pozlate na okvire slika i na pokućstvo. Danas se koristi i u industriji. Češnjakovo ulje (koje se izolira destiliranjem češnjaka u vodi) iznimno je traženo jer sadrži kemijske spojeve potrebne za proizvodnju industrijskih kemikalija koje se nazivaju alkeni. Oni se koriste za proizvodnju vrhunskih lubrikanata, sredstava za brtvljenje u staklarskoj industriji, vezivnih sredstava za čvrsta goriva za rakete, kao i za vulkanizaciju gume (Stanway, 2013).

Iako su u središnjoj Aziji pronađene neke plodne biljke češnjaka, sorte su sterilne i razmnožavaju se vegetativno (pomoću klonova). Kako nema spolne reprodukcije, postoji mala varijabilnost između kultivara. Ipak, na tržištu su dostupni kultivari koji se razlikuju po veličini i boji češnjeva i lukovica, prisutnosti cvjetne stabljike te sposobnosti prilagodbe klimatskim uvjetima. Otpornost na virus žućenja i kržljavosti luka (OYDV) i virus žute prugavosti poriluka (LYSV) otkriveni su u plodnom klonu češnjaka (Lot i sur., 2001).

2.2 Proizvodnja češnjaka u Republici Hrvatskoj i svijetu

Češnjak se u svijetu uzgaja na površini većoj od 1,5 milijuna hektara. Polovica svjetskih površina nalazi se u Kini (791 407 ha), (grafikon 2.2.1). U Europi češnjak se najviše uzgaja u Ukrajini, Španjolskoj i Rumunjskoj. Prema FAOSTAT (2014), najveći europski proizvođač je Ukrajina sa 21 900 ha i prosječnim prinosom od 8,73 t/ha dok je prosječan prinos u Republici Hrvatskoj 3 t/ha (www.savjetodavna.hr).

Zahvaljujući velikoj adaptabilnosti češnjak se proizvodi u cijeloj zemlji, ali pretežno na malim površinama za lokalna tržišta i osobne potrebe. Uvođenjem bezvirusnih kultivara proizvodnja bi se mogla povećati i predstavljati značajan izvor prihoda (Radat, 2014).

Glavni proizvođač češnjaka u svijetu je Kina, koja proizvodi preko 82% češnjaka (Tablica 2.2.1.). Europski udio u odnosu na svjetsku proizvodnju češnjaka je 3,31%.

Španjolska je glavni izvoznik među Mediteranskim zemljama (Maramorosch i sur., 2012).

Tablica 2.2.1. Lista najznačajnijih proizvođača češnjaka u 2014. godini

Redni broj	Država	Površina (ha)	Prinos t/ha	Ukupna proizvodnja (tone)
1.	Kina	791 407	25,35	**20 058 388**
2.	Indija	231 000	5,42	**1 252 000**
3.	Oman	135 240	0,01	**1 554**
4.	Bangladeš	53 000	5,89	**312 000**
5.	Rusija	28 400	9,03	**256 406**
6.	Burma (Mjanmar)	28 000	7,46	**208 900**
7.	Južna Korea	25 062	14,12	**353 761**
8.	Ukrajina	21 900	8,73	**191 140**
9.	Španjolska	20 963	8,46	**177 420**
10.	Argentina	15 958	9,33	**148 953**
75.	Hrvatska	161	8,58	**1 381**
Ukupno	**Svijet**	**1 547 381**	**16,12**	**24 939 965**

Izvor: http://www.factfish.com/statistic/garlic%2C%20area%20harvested

Prosječni prinosi češnjaka su oko 10 t/ha. Dvostruko veće prinose od svjetskog prosjeka od većih proizvođača imaju Egipat i SAD dok je u Hrvatskoj prosječan prinos 8,58 t/ha (Matotan, 2004).

Nažalost, prema podacima dostupnima na mrežnim stranicama Državnog zavoda za statistiku (DZS, www.dzs.hr) nema egzaktnih podataka o proizvodnim površinama niti o godišnjem prinosu češnjaka u Republici Hrvatskoj. Naime, statistički su sve vrste luka svrstane u jednu kategoriju te pokazuju ukupni zajednički prinos od 32 323 tona u 2014. godini (Šimanović i sur., 2015). Stoga je nemoguće točno odrediti koliki je udio samoga češnjaka u ukupnom hrvatskom prinosu lukovičastog povrća.

Isti izvor navodi da je u 2015. godini posađen luk (crveni i bijeli – češnjak) na 1 174 ha u Republici Hrvatskoj. Navedene vrijednosti su veoma male te nisu dovoljne za hrvatske potrebe. Međutim, u zadnjih nekoliko godina postupno se povećavaju proizvodne površine pod lukom i češnjakom. Najznačajniji porast zabilježen je u 2013. godini kada

je 1 380 ha bilo pod lukom i češnjakom, u odnosu na 2012. kada su površine pod lukom i češnjakom zauzimale svega 844 ha (www.dzs.hr).

Tablica 2.2.2. Proizvodnja češnjaka u Republici Hrvatskoj od 2004.-2014.

GODINA	POVRŠINA (HA)	T/HA	UKUPNA PROIZVODNJA (T)
2004	1000	3	3000
2005	1200	3,25	3900
2006	900	4	3600
2007	880	5,97	5250
2008	930	5,48	5100
2009	570	9	5130
2010	440	9,68	4260
2011	540	7,65	4130
2012	410	11,22	4601
2013	389	14,51	5645
2014	161	8,58	1381

Izvor: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor

U 2013. godini prema DZS proizvodne površine pod lukom obuhvaćaju 1 380 ha, a podaci FAOSTAT-a za istu godinu navode da je češnjak u Republici Hrvatskoj zastupljen na 389 ha dok je u 2014. godini zabilježena proizvodnja na 161 ha s prosječnim prinosom od 8,58 t/ha (Tablica 2.2.2.).

2.3 Sortiment češnjaka

Većina kultivara u nas i u svijetu dobivena je klonskom selekcijom lokalnih ekotipova. Prema našim iskustvima ekotipovi imaju relativno slabu adaptivnost. Prenošenjem ekotipa poželjnih svojstava u novom proizvodnom području ta svojstva slabije dolaze do izražaja. Izborom lukovica za reprodukciju proizvođači sami provode klonsku selekciju, međutim stručno vođena selekcija daje bolje rezultate (Lešić i sur., 2004).

Prosječna masa lukovica domaćih ekotipova obično je 30 - 40 grama dok francuski bezvirusni kultivari imaju prosječnu masu lukovica 70 - 100 g (Lešić i sur., 2004).

Većina kultivara češnjaka dobivena je klonskom selekcijom lokalnih ekotipova.
Kultivari se mogu podijeliti u 3 osnovne grupe:
Jesenski - (ozimi), sade se u jesen, prezimljuju i u sljedećoj godini odmah na proljeće

počinju razvijati vegetativnu masu i lukovicu, a dozrijevaju početkom ljeta. Imaju kraće razdoblje mirovanja te u ambijentalnim uvjetima njihov repromaterijal ne može čuvati do proljeća. Listovi i lažna stabljika su im većinom širi i krupniji, i sama lukovica je krupnija, s manjim brojem krupnijih češnjeva (Andračić, 2012).

Proljetni - sade se u proljeće, a dozrijevaju sredinom ljeta. U uvjetima ambijenta se mogu dobro očuvati do proljeća, jer imaju duže razdoblje mirovanja. Ovi ekotipovi su osjetljiviji na niske temperature te se iz tog razloga sade u proljeće. Listovi i lažna stabljika su im tanji i uži, a lukovice sitnije s većim brojem sitnijih češnjeva (Andračić, 2012).

Alternativni - po svojstvima su bliži proljetnim ekotipovima, ali se mogu saditi u jesen jer su otporniji na niske temperature od proljetnih. Sadnjom u jesen im se produžuje vegetacija, što rezultira nešto krupnijom lukovicom i time većim prinosom u odnosu na proljetnu sadnju (Andračić, 2012). Većina domaćih proljetnih ekotipova su zapravo alternativni. Češnjevi unutar lukovice obavijeni su čvrstom zaštitnom ljuskom, koja može biti bijela, ružičasta ili svjetlo ljubičasta. Većina domaćih ekotipova imaju ružičastu ljusku. Za preradu sušenjem prednost ima bijela ljuska (Radat, 2014).

Biljka češnjaka otporna je na niske temperature, stoga može dobro prezimiti i u kontinentalnom području. Ipak, postoje kultivari koji su osjetljivi na niske temperature. Tijekom vegetacije rast lukovice pospješuju više temperature i duži dan (Lešić i sur., 2004).

2.4 Virusne bolesti češnjaka

O gubitcima koje virusne zaraze biljaka uzrokuju u poljoprivredi Hrvatske malo je podataka (Juretić, 2002).

Vrste iz roda *Allium* gospodarski su važne kulture na području Mediteranskog bazena, a virusi su među najvažnijim patogenima koji utječu na njihov prinos (Maramorosch i sur., 2012).

Mnogo godina su na listovima češnjaka, luka i vlasca zabilježeni simptomi koji su se pripisivali nekim bolestima nepoznate etiologije pod nazivom "mozaik češnjaka",

"mozaik luka" i "mozaik vlasca" (Van Dijk, 1993; Walkey, 1990). Osim toga, u različitim zemljama zabilježena je i bolest žutih pruga na poljima pod porilukom (Bos i sur., 1978). Identifikacija uzročnika tih bolesti bila je teška i kroz duže razdoblje nepotpuna. Problemi vezani uz izolaciju i pročišćavanje virusa uglavnom su posljedica njihovog ograničenog raspona domaćina (nekoliko divljih *Allium* vrsta), odsutnosti specifičnih indikatorskih biljaka za njihovu diferencijaciju i simultanih infekcija s drugim virusima (posebice u češnjaku). To je rezultiralo poteškoćama u identifikaciji i zbunjenosti u bibliografiji (Maramorosch i sur., 2012).

Utvrđeno je da biljke češnjaka (*Allium sativum* L.) mogu biti zaražene virusima iz roda *Potyvirus, Carlavirus* i *Allexivirus*. Ovi virusi prenose se vegetativnim razmnožavanjem i vektorima (Chodorska i sur., 2014). Pojedini virusi, a posebno *Potyvirus* virus žućenja i kržljavosti luka *(Onion yellow dwarf virus*, OYDV) i virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), uzrokuju mozaične simptome u zaraženome lišću te mogu uzrokovati redukciju prinosa iznad 25% (Messianen i sur., 1981; Vunsh i sur., 1991). Drugi virusi, većinom *Carlavirus* i *Rymovirus*, uzrokuju latentnu zarazu u listovima i češnjevima te ne utječu značajnije na prinos (Van Dijk i sur., 1991).

Međutim, simultana infekcija *Carlavirusa* i *Alexivirusa* s *Potyvirusima* može imati sinergističke učinke. Posebno u češnjaku, procjenjuje se da virusi mogu smanjiti prinos tijekom uzastopnog uzgoja do 50% (Conci i sur., 2003; Lot i sur., 1998) i kod bolesti mozaika češnjaka je zabilježeno gubljenje mase lukovica do 88% (Canavelli i sur., 1998; Lot i sur., 1998; Walkey i Antill, 1989). Osim toga, pokazalo se da je masa lukovica bezvirusnih biljaka češnjaka za 32-216% veća od mase zaraženih biljaka za većinu ispitivanih kultivara (Conci, 1997; Conci i sur., 2003; Melo Filho i sur., 2006. Walkey i Antill, 1989).

OYDV i LYSV detektirani su diljem svijeta (Conci i sur., 1992; Van Dijk, 1993; Barg i sur., 1997; Tsuneyoshi i sur., 1998; Chen i Adams, 2001), a to su najvažniji virusi prema stupnju oštećenja. Utvrđena je smanjena masa lukovice češnjaka između 24 i 60% u prisutnosti OYDV te između 17 i 54% kod zaraze s LYSV (Canavelli i sur., 1998; Lot i sur., 1998).

Kukci imaju važnu ulogu u epidemiologiji virusa češnjaka, budući da *Potyviruse* i *Carlaviruse* prenose lisne uši na neperzistentan način dok *Allexiviruse* prenose grinje.

Utvrđeno je da se bezvirusni češnjak vrlo brzo reinficira nakon što je posađen na polju (Conci i sur., 2003; Lot i sur., 1998; Lunello i sur., 2007; Melo Filho i sur., 2006), što ukazuje da se virusi učinkovito prenose kukcima vektorima iz susjednih zaraženih parcela. Osim toga, vegetativno razmnožavanje vrsta iz porodice *Allium* također je glavni način prijenosa i održavanja zaraze. Virusi se mogu akumulirati u lukovicama i produžiti infekciju iz jedne sezone uzgoja u drugu. Stoga, vrste kao što je češnjak koji se isključivo razmnožava vegetativno, inficirani su kompleksom virusa (Walkey, 1990). Ovaj način prijenosa virusa rezultirao je njihovom distribucijom širom svijeta. Svi tradicionalni komercijalni klonovi češnjaka zaraženi su s više od jednog virusa (Walkey, 1990), dok su u većini slučajeva parcele pod češnjakom visoko ili gotovo potpuno zaražene (Dovas i sur., 2001; Klukakova i sur., 2007). Većina virusa čiji domaćini su biljke iz roda *Allium* ne prenosi se sjemenom (Bos i sur., 1978). Niti jedan od 3 virusa obuhvaćena ovim istraživanjem ne prenosi se sjemenom (Winiarczyk i sur., 2014).

Opažanja i istraživanja pokazuju da je češnjak u svijetu gotovo u potpunosti zaražen mješavinom virusa u kojoj prevladavaju *Potyvirusi* (uglavnom virus žućenja i kržljavosti luka - OYDV, nakon čega slijedi virus žute prugavosti poriluka - LYSV). *Carlavirusi* (uglavnom obično latentni virus češnjaka - GCLV) i *Allexivirusi* također su vrlo česti, ovisno o regiji i kultivaru (Maramorosch i sur., 2012).

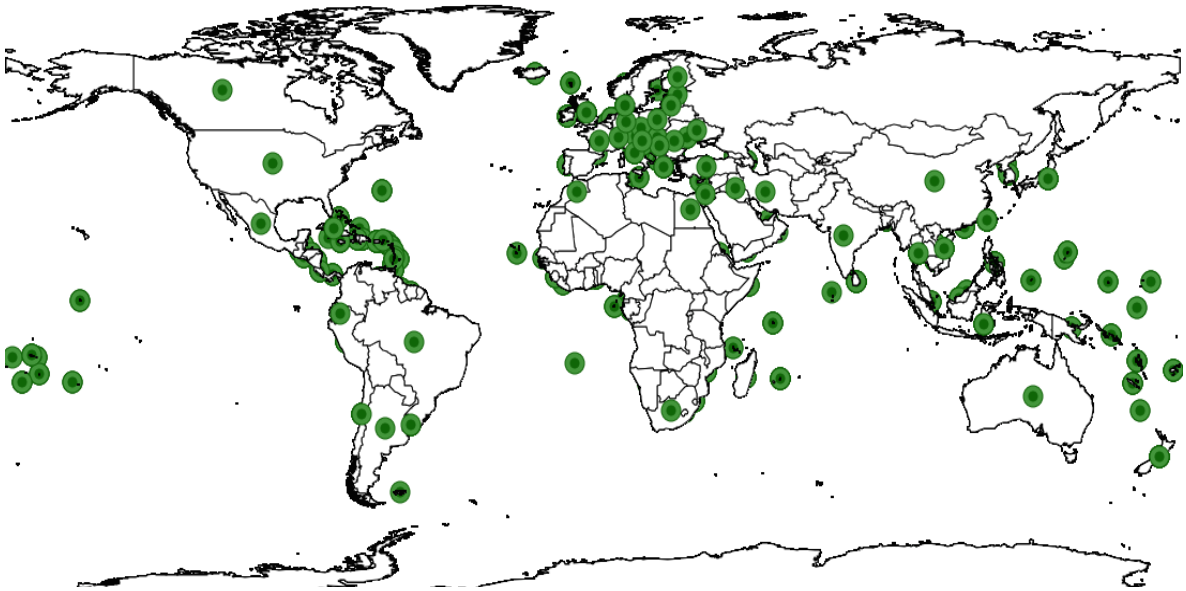
Budući da kod virusnih oboljenja jednom zaražena biljka ostaje zaražena tijekom čitavog svog života (proizvodnog ciklusa) glavni način njihove kontrole za sada predstavljaju preventivne metode. Navedene metode se sastoje od korištenja sadnog materijala koji je slobodan od virusa („*bezvirusni*“) te redovitom praćenju i kontroli njihovih vektora, prvenstveno lisnih uši i grinja (Toth i sur., 2015).

Kako su u pitanju virusne bolesti, točnu dijagnozu nije moguće odrediti na osnovi simptoma, već samo korištenjem adekvatnih seroloških ili molekularnih laboratorijskih tehnika (Far, 2009).

Tehnike koje je moguće koristiti u dokazivanju biljnih virusa su imunodifuzija, ELISA, hibridizacija nukleinskih kiselina i lančana reakcija polimeraze. Najpraktičnija i najčešće korištena metoda dokazivanja biljnih virusa je ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* (Far, 2009).

2.4.1 Virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV)

Virusna bolest žućenja i kržljavost luka poznata je već dugo u svijetu. Zapažena je još 1927. g. na crvenom luku u državi Iowa, SAD (Smith, 1972) dok ga je 1929. Melhus detaljnije opisao te je dosad prepoznata u većem broju zemalja (Slika 2.4.1.1).



Slika 2.4.1.1. Rasprostranjenost virusa žućenja i kržljavosti luka (*Onion Yellow Dwarf Virus*, OYDV)
(http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=30286&dsID=37485&loc=glob)

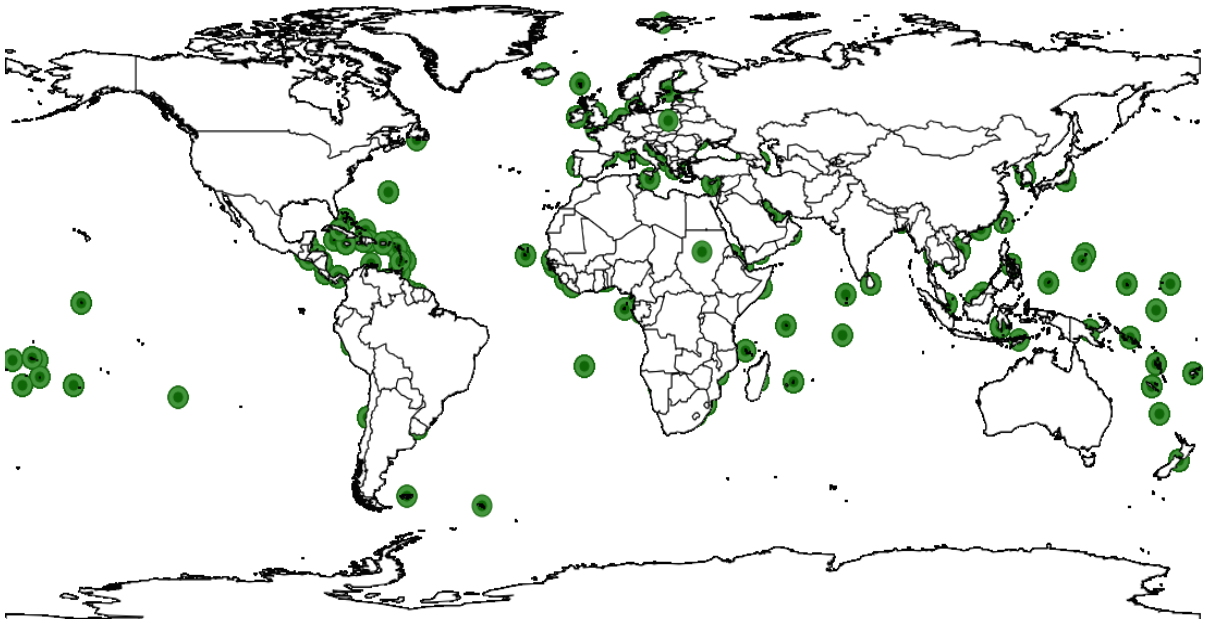
OYDV pripada virusu iz roda ***Potyvirus*** (Šutić i sur., 1999), prenosi ga nekoliko vrsta lisnih uši na neperzistentan način i pomoću inokulacije soka, uglavnom na određene *Allium* vrste dok je prema Štefanac (1977) i vegetativno razmnožavanje *Allium* vrsta razlog je tako široke rasprostranjenosti zaraze u svijetu. Sastoji se od fleksibilnih vlaknastih čestica duljine 775 nm (www.dpvweb.net). Virus uzrokuje žućenje i patuljasti rast luka (usporavanje rasta u prvoj godini razvoja biljke dok su na listovima vidljive nepravilne žute pruge ili gotovo potpuno žutilo), uvijanje listova prema dolje, ravnanje, gužvanje te nedostatak vigora. Također, uzrokuje propadanje tijekom skladištenja i dovodi do preranog klijanja lukovice. U biljaka uzgojenim iz sjemena, virus uzrokuje reduktivni rast, deformaciju listova, narušavanje cvjetne stapke, smanjenje broja cvjetova i sjemenki te smanjenu kvalitetu sjemena (www.bioreba.com).

Napadnute biljke imaju značajno manji prinos od zdravih u proizvodnji sjemena, lučica i lukovica luka. Budući da zaraze često dostižu velike razmjere (50% pa i više), gubici su

veliki. Prema podacima koje navodi Härdtl (1972) gubici u sjemenu na pojedinim zaraženim površinama u Njemačkoj iznosili su do 70% (Štefanac, 1977). Kako navode Toth i sur. (2015) kontrola je moguća prvenstveno korištenjem zdravog sadnog materijala te redovitim praćenjem i suzbijanjem lisnih uši prema potrebi.

2.4.2 Obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV)

GCLV (*Garlic common latent virus*) pripada rodu ***Carlavirus*** te je ujedno i najčešći carlavirus češnjaka (uz latentni virus kozjaka - *Shallot latent virus*, SLV). GCLV je prvi put opisan u Francuskoj kao latentni virus češnjaka. Kasnije je predloženo korištenje imena GCLV kako bi se izbjegla zbrka s japanskim češnjakom latentnog virusa (GLV). GCLV je uočen na češnjaku iz Azije, Europe, Južne Amerike te iz Sjeverne Amerike (Slika 2.4.1.2). Osim češnjaka, GCLV također inficira poriluk, luk i vlasac (www.bioreba.com).



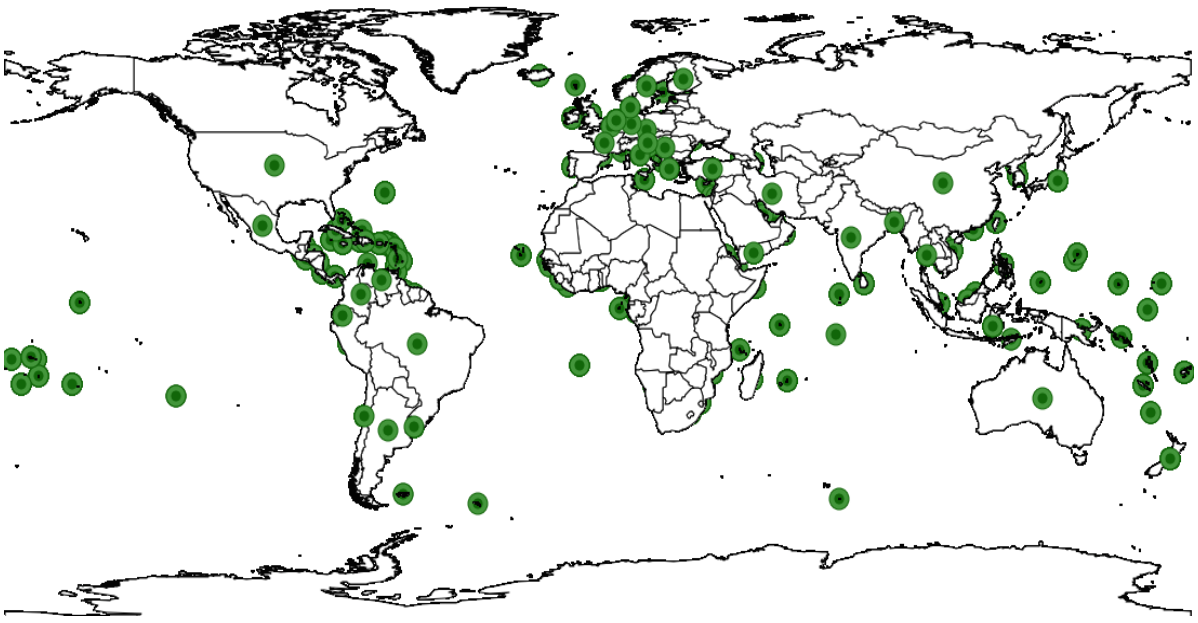
Slika 2.4.1.2. Rasprostranjenost obično latentni virusa češnjaka (*Garlic Common Latent Virus*, GCLV) (http://www.plantwise.org/knowledgebank/pwmap.aspx?speciesid=18247&loc=global)

Kao zaseban patogen na češnjaku, GCLV nije od velikoga značenja, ali u kombinaciji s drugim virusima može uzrokovati značajnije gubitke na proizvodnim površinama. Česta je njegova pojavnost u Europskim zemljama te širom svijeta. Simptomi zaraze su veoma slabi u pojedinačnoj zarazi češnjaka i poriluka. Kod češnjaka, poriluka i luka obično se pojavljuje u latentnom stanju (bez vidljivih simptoma), ali s drugim virusima koji se prenose lisnim ušima iskazuje sinergistički odnos (pojačava njihovo štetno djelovanje)

(Toth i sur., 2015). Biljke domaćini GLCV-a su sve biljke porodice *Alliaceae* premda je najveća zastupljenost na češnjaku. Obično latentni virus češnjaka je kozmopolit te je zabilježen u svim zemljama koje se bave proizvodnjom češnjaka. Prijenos zaraze odvija se mehaničkim putem te se sumnja na lisne uši (o čemu nema podataka) kao vektora. Ipak, najznačajnije širenje zaraze odvija se zbog vegetativnog razmnožavanja odnosno sadnim materijalom češnjaka. Najjednostavnija detekcija moguća je pomoću ELISA (Diekmann, 1997). Virus je mehanički prenosiv u laboratoriju dok prijenos putem sjemena nije dokazan (Maramorosch i sur., 2012).

2.4.3 Virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV)

Virus iz roda ***Potyvirus***. Bolest je najprije opisao Bremer (1937), zatim Kupke (1957), a virus je identificiran i imenovan od strane Bos i sur. (1978). Široko rasprostranjen u nekoliko europskih zemalja, a vjerojatno i širom svijeta (Slika 2.4.1.3). Radi se o jednom od najranije poznatih virusa koji je zabilježen na vrstama roda *Allium*.



Slika 2.4.1.3. Rasprostranjenost virusa žute prugavosti poriluka (*Leek Yellow Stripe Virus*, LYSV) (http://www.plantwise.org/knowledgebank/pwmap.aspx?speciesid=23673&loc=global)

Virusi su građeni od fleksibilnih vlaknastih čestica duljine 820 nm, a prenosi se lisnim ušima na neperzistentan način i pomoću inokulacije sokom. Oštećuje poriluk (*Allium porrum* L.), luk (*Allium cepa* L.), češnjak (*Allium sativum* L.) i morski luk (*Drimia maritima* L.), (www.plantwise.org). U prirodi je virus u velikoj mjeri ograničen na poriluk

u kojem uzrokuje nepravilne žute linije duž cijele lisne površine, posebno na bazi. Cijeli listovi također mogu požutjeti. Zaražene biljke su manje sočne i teže manje nego uobičajene. Lišće je blago oslabljeno, bijele stabljike su beživotne i mogućnost očuvanja kvalitete dobivenih proizvoda je oslabljena. Zaražene biljke u jesenskim i zimskim uvjetima teže podnose smrzavanje od zdravih biljaka te mogu odumrijeti (Maramorosch i sur., 2012).

Simptome zaraze poput bijelih crtica na listovima pospješuje istovremena zaraženost i sa latentnim virusom kozjaka (*Shallot latent virus,* SLV), (www.bioreba.com).

Zbog široke rasprostranjenosti i velikih smanjenja prinosa smatra se jednim od ekonomski najznačajnijih virusa vrsta roda *Allium*. Utvrđen je kao najučestaliji virus češnjaka u Izraelu, Grčkoj, Italiji, Siriji, Turskoj, a njegova pojava je potvrđena i u Francuskoj, Egiptu, Sloveniji i Maroku. Posebno veliku štetnost uzrokuje u slučaju istovremene zaraze s drugim virusima gdje zbog sinergističkog djelovanja smanjenje porasta biljaka i prinosa može biti od 30 do 50% (Toth i sur., 2015).

Kod virusnih bolesti, točnu dijagnozu nije moguće odrediti na osnovi simptoma, već samo korištenjem adekvatnih seroloških ili molekularnih tehnika u laboratoriju. Tehnike koje je moguće koristiti u dokazivanju biljnih virusa su imunodifuzija, ELISA, hibridizacija nukleinskih kiselina i lančana reakcija polimeraze (*Polymerase Chain Reaction,* PCR) (Far, 2009).

2.5 Serološke metode u detekciji virusa

Razvijene su brojne serološke tehnike kojima se rješavaju ne samo teorijski problemi nego i mnoga praktična pitanja u biologiji i medicini. Virusnim imunim serumom (antiserumom) ponajprije se identificira pojedini virus ili virusni soj (Juretić, 2002). Serološke metode se koriste reakcijama antitijela sa agensima bolesti, obično virusima ili bakterijama. Antiserum se proizvodi tako što se najprije pročišćeni pripravak biljnog patogena virusa, ili bakterije ubrizga u životinju (obično zeca). Životinja reagira na taj strani materijal tako što stvara antitijela. Ta antitijela reagiraju samo na patogen koji se koristio za stvaranje antitijela. Antitijela se onda pročišćavaju iz krvi i dobiva se antiserum koji se dalje koristi u dijagnostičkim testiranjima (Far, 2009).

2.5.1 ELISA

U analitici namirnica razlikuju se “screening” metode te potvrdne službeno verificirane i propisane metode. “Screening” metode su takozvane grube metode koje ne omogućavaju definitivan rezultat nego samo osiguravaju indikaciju da je analit ili više njih prisutno u uzorku iznad određene razine (Runje i Cvrtila, 2006). Najpraktičnija i najčešće korištena metoda dokazivanja biljnih virusa je ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Far, 2009).

ELISA je serološka tehnika ispitivanja temeljena na enzimatsko-serološkoj reakciji na čvrstoj fazi dizajnirana za otkrivanje i kvantificiranje tvari kao što su peptidi, proteini, protutijela i hormoni. U ELISA-metodi, antigen mora biti imobiliziran na čvrstu površinu, a zatim upotpunjen antitijelom koji je povezan s enzimom. Detekcija se postiže procjenom konjugirane enzimske aktivnosti inkubacijom sa supstratom kako bi se proizveo mjerljivi produkt. Najvažniji element strategije detekcije je vrlo specifična interakcija protutijelo-antigen. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske pločice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica (Runje i Cvrtila, 2006).

Nakon što su reaktanti ELISA-testa imobilizirani na površinu mikropločice, olakšava se razdvajanje od neželjenog materijala tijekom testiranja. Ova sposobnost da se ispere ne-specifično vezane materijale čini navedenu metodu moćnim sredstvom za mjerenje specifičnih analita unutar nepročišćenog pripravka. Enzimska veza ili označavanje omogućuje da se slijedi ciljani protein ako je prisutan (identifikacija) i u kojoj količini (kvantifikacija), (www.faculty.ksu.edu.sa). ELISA se može izvesti s brojnim izmjenama osnovnog postupka (www.thermofisher.com).

Dvostruka protutijelna sendvič ELISA (*double antibody sandwich ELISA,* DAS-ELISA) je najčešće korišten oblik ELISA-testa za otkrivanje virusa biljaka od njezinog opisa (Clark i Adams, 1977). Ova vrsta testa hvatanja naziva se "sendvič" test jer je analit koji se mjeri vezan između dva primarna antitijela - hvatanje protutijela i detekcijskog protutijela. Ova izvedba je najzastupljenija jer je osjetljiva i robusna (www.fao.org).

Metoda ELISA je prilično jednostavna za provođenje i može omogućiti rezultate u samo dva dana. Da bi ELISA bila uspješna u laboratoriju moraju biti dostupni antiserumi za sve bolesti, a uzorci za testiranje moraju biti uzeti sa prikladnog tkiva, i u određeno doba

godine. Uz to moraju biti i u dobrom fizičkom stanju. Drugi problem serološkihtestiranja je čistoća antiseruma. Kod nekih slučajeva antiserum može reagirati na više od jednog virusa, ili na neku drugu komponentu biljke. U tome slučaju, može doći do zbunjujućih rezultata ili lažno pozitivnih rezultata ako antiserum reagira na drugu komponentu, a ne na virus. Dobar laboratorij bi trebao provoditi kontrolu u svakom testu i savjetovati klijente o tome koji ELISA pribor za određene patogene je sklon tom problemu (Far, 2009).

2.6 Molekularne metode u detekciji virusa

2.6.1 PCR

Lančana reakcija polimerazom, za koju je udomaćena kratica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), razmjerno je nova i danas glavna tehnika u tehnologiji rekombinirajuće DNA. U tehnikama kloniranja DNA koriste se restrikcijske endonukleaze koje „izrezuju“ neku određenu sekvenciju (npr. gen) iz dvolančane DNA. Tu sekvenciju teško je detektirati jer se zbog male količine izvorne DNA (uzorka) ona dobiva u izuzetno malim količinama. Ta se poteškoća prevladava upravo tehnikom PCR: jer se tom tehnikom izrezana sekvencija DNA, koja se želi istražiti, može umnožiti nekoliko milijuna puta tako da se može opažati u gelu (Juretić, 2002).

Da bi se tehnika PCR primijenila, mora se znati nukleotidna sekvencija „izrezane“ DNA. Bit te tehnike je u sljedećem: „izrezana“ dvolančana DNA (npr. gen) rastavlja se na svoja 2 lanca. Svaki lanac se višestruko umnožava. Za umnožavanje su nužne oligonukleotidne početnice (*primers*). Početnice se sintetiziraju (konstruiraju) i one moraju biti komplementarne s poznatim sekvencijama na suprotnim lancima „izrezane“ DNA. Sintetiziranje početnica vrlo je važan korak u cijelom postupku. Tehnika PCR ima, među ostalim, važnu primjenu u identifikaciji virusa (Juretić, 2002).

2.6.2 RT-PCR

Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) metoda je koja se vrlo često koristi u analizi ekspresije gena. Sastoji se od obrnutog prepisivanja RNA u komplementarnu DNA

(cDNA) i umnažanja dobivene cDNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Zbog svoje velike osjetljivosti, ova metoda omogućuje analizu ekspresije gena neovisno o količini početnog materijala, pa je pogodna i za slabije eksprimirane gene. RT-PCR može se koristiti u više svrha: za određivanje prisutnosti ili odsutnosti određenog transkripta, za procjenu razine ekspresije gena ili kloniranje cDNA (Ambriović Ristovi sur., 2007).

Budući da RNA ne može poslužiti kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom, ključni korak je njezino obrnuto prepisivanje u komplementarnu DNA, koja se potom umnaža metodom PCR. Ovu reakciju omogućuje enzim transkriptaza (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Reakcija obrnutog prepisivanja odvije se u nekoliko koraka. Prvi korak je denaturacija sekundarnih struktura RNA. Denaturacija se provodi zagrijavanjem RNA tijekom 5 min pri 65° C uz dodatak inhibitora RNaze. Nakon toga uzorci se naglo ohlade na ledu , te se dodaje ostatak reakcijske smjese, koji sadrži i enzim. Slijedi sparivanje početnica pri 25° C i inkubacija na odgovarajućoj temperaturi (37 odnosno 42° C), za vrijeme koje se odvija sinteza prvog lanca cDNA. Po završetku sinteze cDNA reakcijska smjesa zagrijava se pri 95° C, čime se inaktivira reverzna transkriptaza. Osim toga, ovim se korakom denaturira nastala hibridna molekula (Ambriović Ristov i sur., 2007).

2.6.3 Sekvencioniranje DNA Sangerovom metodom

Metodu za određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) u molekuli DNA koja je danas u upotrebi razvio je sredinom sedamdesetih godina 20. stoljeća Frederick Sanger sa suradnicima na Cambridgeu. Za svoje je otkriće 1980. godine dobio Nobelovu nagradu. Metoda sekvencioniranja molekule DNA zasniva se na zaustavljanju enzimatske sinteze lanca DNA ugradnjom dideosiribonukleozid-trifosfata pa se ova metoda osim Sangerovom, naziva još i enzimatskom dideoksi-metodom (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Prirodni supstrati za sintezu DNA su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) dATP, dCTP, dGTP i dTTP. Sinteza DNA ide u 5' → 3' smjeru, a preduvjet za sintezu je postojanje početnice koja pronalazi sebi homologan slijed i čijim produžavanjem nastaje novi DNA lanac. DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu ugraditi u rastući

lanac i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji nemaju hidroksilnu skupinu na 3' - položaju deoksiriboze, pa nakon njihove ugradnje, zbog nemogućnosti uspostavljanja nove fosfodiesterske veze, dolazi do zaustavljanja daljnje sinteze DNA (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Za enzimatsku sintezu DNA danas se koristi modificirana DNA polimeraza iz virusa T7 (sekvenaza). Kao kalup služi jednolančana DNA dobivena denaturacijom dvolančane plazmidne DNA ili denaturacijom dvolančane DNA, koja je produkt PCR reakcije. Enzimatska sinteza DNA ide u četiri odvojene reakcije. U svakoj reakcijskoj smjesi nalaze se sva četiri dNTP-a, te samo jedan ddNTP. Omjer dNTP-a i ddNTP-a podešen je tako da se ddNTP ugrađuje u DNA s mnogo manjom učestalošću (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Svaki analog nukleotida obilježen je drugom fluorescencijskom bojom. Na kraju reakcije nastaje smjesa fragmenata DNA koji se razlikuju dužinom samo za jedan nukleotid. Tijekom elektroforeze fluorescentno obilježeni fragmenti putuju u okomito postavljenom gelu. Detekcija se provodi sustavom koji uključuje laserski čitač. Signali se automatski pohranjuju i kompjuterski obrađuju. "DNA-sekvenator" je uređaj kojim se određuje slijed nukleotida u molekuli DNA. Najnoviju generaciju "DNA-sekvenatora" predstavlja kapilarni tip instrumenta velikog kapaciteta. Ovakvi instrumenti u sve su većoj mjeri automatizirani i koriste "četverobojnu" biokemiju (Ambriović Ristov i sur., 2007).

2.7 Pouzdanost laboratorijskih testiranja

Niti jedna dijagnostička metoda nije savršena. Sve opisane metode mogu proizvesti lažni pozitivni ili lažni negativni rezultat. Lažni pozitivni se događa kada biljka nije bolovala od određene bolesti, ali rezultati pokazuju da je bolest bila prisutna. To se obično događa zbog kontaminacije ili pogrešnog obilježavanja uzoraka. Pogreške se mogu dogoditi i na terenu kada se sakupljaju uzorci ili u laboratoriju kad uzorci budu dostavljeni. Kontaminacija se posebice odnosi na PCR zbog osjetljivosti testiranja. Samo nekoliko bakterija ili virusnih čestica prenesenih iz jednog uzorka na drugi može dovesti do lažnih pozitivnih ili negativnih rezultata. Kod ELISA testova lažni pozitivni rezultati se

događaju ako antiserum reagira na biljne komponente u aditivu. Lažni negativni rezultati su uobičajeniji nego lažni pozitivni. Lažni negativni se mogu dogoditi i zbog toga što u uzorku koji je dan na analizu nema agenasa bolesti ili se uzorkom pogrešno rukovalo, pa uzorak nije bio u dobrom stanju kada je stigao u laboratorij. Lažno negativni rezultati mogu se dogoditi uslijed raznih problema u laboratoriju koji obavljaju procedure testiranja. Dobar laboratorij uključuje kontrolu njihovih testova (Far, 2009).

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Ispitivanje uzoraka metodom ELISA

Istraživanjem zdravstvenog stanja, odnosno, zaraženosti ekotipova češnjaka porijeklom iz Zadarske županije (područje Benkovca), sa pokušališta Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu te s područja Vukovarsko-srijemske županije (Cerić) bila su obuhvaćena tri virusa: virus žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) i obično latentni virus češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV). Ukupno je analizirano 407 biljaka čije podrijetlo je prikazano u Tablici 3.1.1. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 5 ekotipova češnjaka (E1, E2, E3, E4 i Cerićki ozimi) kroz 3 varijante sadnje (iz češnjeva, lučica i presadnica). Sve biljke uključene u istraživanje testirane su enzimatsko serološkom metodom ELISA (od eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Navedena metoda izabrana je zbog njezine praktičnosti te mogućnosti istovremenog testiranja uzoraka na prisutnost više različitih virusa. U testiranju su korišteni komercijalni ELISA pribori tvrtke Bioreba (Švicarska), (www.bioreba.ch).

Kao potencijalni izvor virusa (antigena) korišteno je tkivo lista (sa vidljivim simptomima ili bez simptoma), a uzorci su prikupljeni neposredno prije laboratorijskih analiza. Svaki od uzoraka je posebno označen kako bi se kasnije rezultate analiza moglo povezati s konkretnim zdravstvenim stanjem pojedinih biljaka. U komercijalnom ELISA priboru (kitu) dostavljaju se koncentrirani puferi koji su pripremljeni za analizu i korišteni su sukladno preporukama proizvođača. Nakon oblaganja mikrotitarskih pločica protutijelima, uzorci (0,1 g) su homogenizirani u puferu za ekstrakciju uz pomoć tekućeg dušika te naneseni na mikrotitarske pločice. Očitavanje rezultata odrađeno je na spektrofotometru EL800 (Biotek, SAD) dva sata nakon dodavanja supstrata. Pozitivnim su smatrani oni uzorci čija je vrijednost spektrofotometrijskog očitanja bila barem dvostruko veća od prosječne vrijednosti negativnih kontrola (Slike 3.1.1. – 3.1.13).

Tablica 3.1.1. Lokacija uzorkovanja i broj uzoraka češnjaka testiranih na tri virusa (LYSV, OYDV, GCLV) metodom ELISA

Lokacija	*Broj analiziranih uzoraka*	*Broj ekotipova*
Benkovac		
Lisičić, poljski pokus, češnjevi i lučice (E1, E2, E3 i E4), uzgoj na otvorenom	57	4
Zagreb, pokušalište Zavoda za povrćarstvo		
*Poljski pokus, **presadnice**, uzgoj u zaštićenom prostoru (tunelu)*	60	4
*Poljski pokus, **lučice**, uzgoj u zaštićenom prostoru (tunelu)*	53	4
*Poljski pokus, **češnjevi**, uzgoj na otvorenom*	119	4
Cerić		
Cerićki ozimi, uzgoj na otvorenom	118	1
Ukupno	**407**	**5**

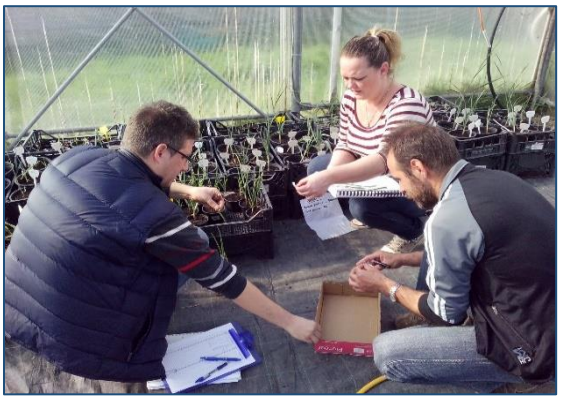
Oznake: E1-E4, Cerićki ozimi = ekotipovi češnjaka, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus*



Slika 3.1.1. Pokusno polje Zavoda za povrćarstvo, Agronomski fakultet, Zagreb (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.2. Češnjak u pokusnom tunelu - Zavod za povrćarstvo, Agronomski fakultet, Zagreb (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.3. Uzimanje i označavanje uzoraka češnjaka (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.4. Pozitivne kontrole OYDV, LYSV i GCLV (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.5. Pripremljeni puferi za postupak ELISA (foto: Klara Ćurić)



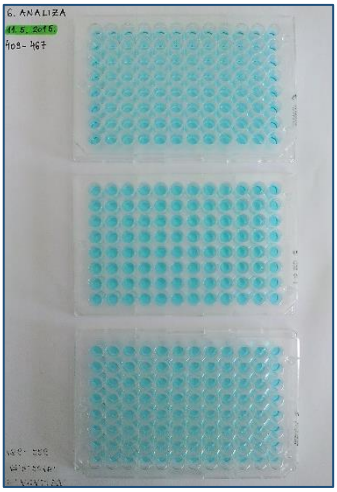
Slika 3.1.6. Numerirani uzorci češnjaka (foto: Klara Ćurić)



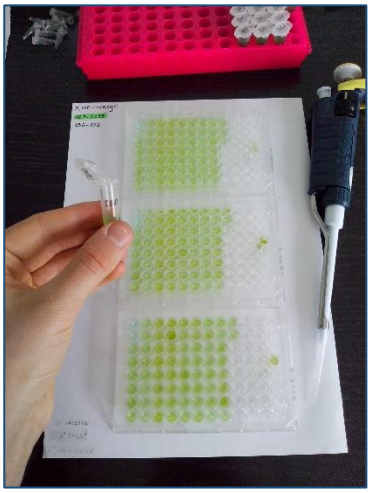
Slika 3.1.7. Priprema uzorka (foto: Klara Ćurić)



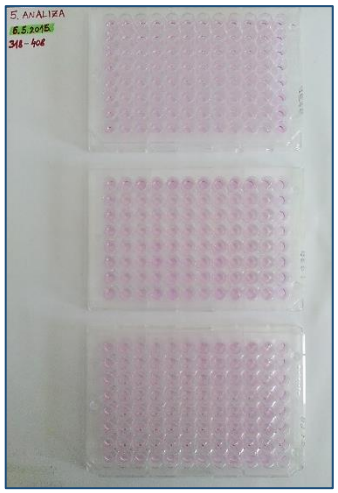
Slika 3.1.8. Uzorak nakon centrifuge (foto: Klara Ćurić)



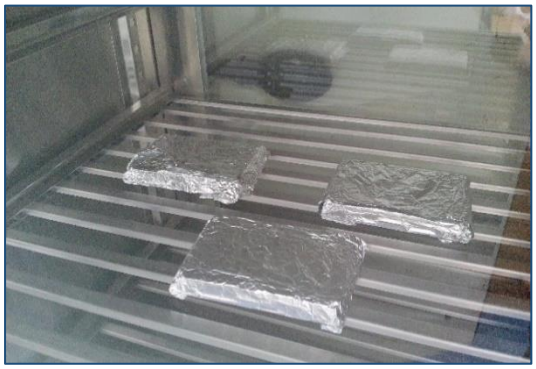
Slika 3.1.9. Prvi sloj protutijela (foto: Klara Ćurić)



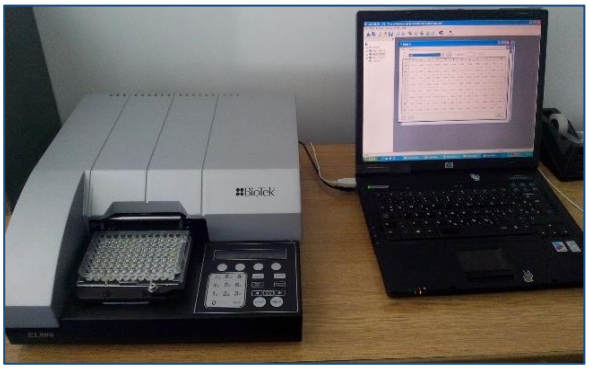
Slika 3.1.10. Stavljanje biljnog ekstrakta iz uzoraka u jažice (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.11. Drugi sloj protutijela (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.12. Odležavanje mikropločica u termostatu (foto: Klara Ćurić)



Slika 3.1.13. Spektrofotometar EL800 (foto: Klara Ćurić)

3.2 Djelomična molekularna karakterizacija

Po jedna ELISA-pozitivna biljka je odabrana za svaki virus kako bi se provele daljnje potvrde. U tu svrhu, odrađena je ekstrakciju ukupnih ribonukleinskih kiselina (total RNA) pomoću QIAGEN Rneasy Plant mini kompleta (Valencia, SAD) prema uputama proizvođača.

Nakon ekstrakcije ukupnih RNA, prisutnost virusa potvrđena je lančanom reakcijom polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). U tu svrhu korišten je One-step RT-PCR pribor (Qiagen, SAD).

Početnice potrebne za RT-PCR naručene su od tvrtke Macrogen (Sjeverna Koreja). S obzirom da dolaze kao koncentrat bilo ih je potrebno razrijediti. Za razrjeđivanje je korištena mikrobiološki čista voda slobodna od ribonukleaza. U RT-PCR reakciji korištene su početnice koncentracije 10 µM.

3.2.1 Detekcija virusa žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV)

U dokazivanju OYDV korišten je par početnica koji veže za dio virusnog genoma veličine 283 parova baza. Nukleotidni sljedovi početnica bili su (Dovas i sur., 2001):

komplementarna: 5' – GAA GCA CAY ATG CAA ATG AAG G – 3'
homologna: 5' – GCC ACA ACT AGT GGT ACA CCA C – 3'

Komponente mastermiksa korištene u detekciji OYDV opisane su u Tablici 3.2.1., dok su uvjeti RT-PCR reakcije navedeni u Tablici 3.2.2.

Tablica 3.2.1. Komponente mastermiksa za detekciju OYDV

REAGENSI	VOLUMEN
5x Qiagen „One step" pufer	2 µl
dNTP mix	0,4 µl
5x Q-Solution	2 µl
Početnica A (konc. 10 µM)	0,2 µl
Početnica B (konc. 10 µM)	0,2 µl
Enzim mix	0,4 µl
Voda (RNA-se free)	3,8 µl
tRNA	1 µl
UKUPAN VOLUMEN	**10 µl**

Tablica 3.2.2. Uvjeti programa RT-PCR za detekciju OYDV

FAZE REAKCIJE	TEMPERATURA	VRIJEME
RT	50° C	30 min
Inicijalni PCR aktivacijski korak	95° C	15 min
Denaturacija	**94° C**	**30 sek**
Sparivanje početnica	**58° C**	**30 sek**
Produljivanje lanca	**72° C**	**30 sek**
Elongacija	72° C	10 min
Čuvanje	4° C	∞

35 ponavljanja

3.2.2 Detekcija obično latentni virusa češnjaka (*Garlic common latent virus*, GCLV)

U dokazivanju GCLV korišten je par početnica koji veže za dio virusnog genoma veličine 481 parova baza. Nukleotidni sljedovi početnica bili su (Fidan i Baloglu, 2009):

komplementarna: 5' – GCA CCA GTG GTT TGG AAT GA – 3'

homologna: 5' – AGC ACT CCT AGA ACA ACC ATT A – 3'

Komponente mastermiksa korištene u detekciji GCLV opisane su u Tablici 3.2.3., dok su uvjeti RT-PCR reakcije navedeni u Tablici 3.2.4.

Tablica 3.2.3. Komponente mastermiksa za detekciju GCLV

REAGENSI	VOLUMEN
5x Qiagen „One step" pufer	2 µl
dNTP mix	0,4 µl
5x Q-Solution	2 µl
Početnica A (konc. 10 µM)	0,6 µl
Početnica B (konc. 10 µM)	0,6 µl
Enzim mix	0,4 µl
Voda (RNA-se free)	3 µl
tRNA	1 µl
UKUPAN VOLUMEN	**10 µl**

Tablica 3.2.4. Uvjeti programa RT-PCR za detekciju GCLV

FAZE REAKCIJE	TEMPERATURA	VRIJEME
RT	50° C	30 min
Inicijalni PCR aktivacijski korak	95° C	15 min
Denaturacija	**94° C**	**30 sek**
Sparivanje početnica	**56° C**	**30 sek**
Produljivanje lanca	**72° C**	**30 sek**
Elongacija	72° C	10 min
Čuvanje	4° C	∞

35 ponavljanja

3.2.3 Detekcija virusa žute prugavosti poriluka (*Leek yellow stripe virus*, LYSV)

U dokazivanju LYSV korišten je par početnica koji veže za dio virusnog genoma veličine 304 parova baza. Nukleotidni sljedovi početnica bili su (Dovas i sur., 2001):

komplementarna: 5' – CAC ATC AAG AAC ACC AGT TAG AGC – 3'

homologna: 5' – GTA GAA ACT GCC TTG AAC GAG TG – 3'

Komponente mastermiksa korištene u detekciji LYSV opisane su u Tablici 3.2.5., dok su uvjeti RT-PCR reakcije navedeni u Tablici 3.2.6.

Tablica 3.2.5. Komponente mastermiksa za detekciju LYSV

REAGENSI	VOLUMEN
5x Qiagen „One step" pufer	2 µl
dNTP mix	0,4 µl
5x Q-Solution	2 µl
Početnica A (konc. 10 µM)	0,2 µl
Početnica B (konc. 10 µM)	0,2 µl
Enzim mix	0,4 µl
Voda (RNA-se free)	3,8 µl
tRNA	1 µl
UKUPAN VOLUMEN	**10 µl**

Tablica 3.2.6. Uvjeti programa RT-PCR za detekciju LYSV

FAZE REAKCIJE	TEMPERATURA	VRIJEME
RT	50° C	30 min
Inicijalni PCR aktivacijski korak	95° C	15 min
Denaturacija	**94° C**	**30 sek**
Sparivanje početnica	**58° C**	**30 sek**
Produljivanje lanca	**72° C**	**30 sek**
Elongacija	72° C	10 min
Čuvanje	4° C	∞

35 ponavljanja

Vizualizacija RT-PCR produkata odrađena je gel elektroforezom na 2% TBE (tris borate EDTA) gelu pri 70V u trajanju od 30 minuta.

Dobiveni produkti poslani su na određivanje nukleotidnih sljedova (sekvenciranje) u tvrtku Macrogen (Južna Koreja). U obradi dobivenih rezultata i sklapanju sekvenci korišten je programski paket MEGA ver. 6 (Tamura i sur., 2013). Sekvence odgovarajućih virusa, nazvane GCLV-Cro, LYSV-Cro i OYDV-Cro, predane su u GenBank bazu podataka. Navedena baza korištena je i za usporedbu hrvatskih izolata istraživanih virusa sa izolatima istih virusa iz drugih zemalja. U tu svrhu korištena je opcija usporedbe po nukleotidima – Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

4 REZULTATI

4.1 Metoda ELISA

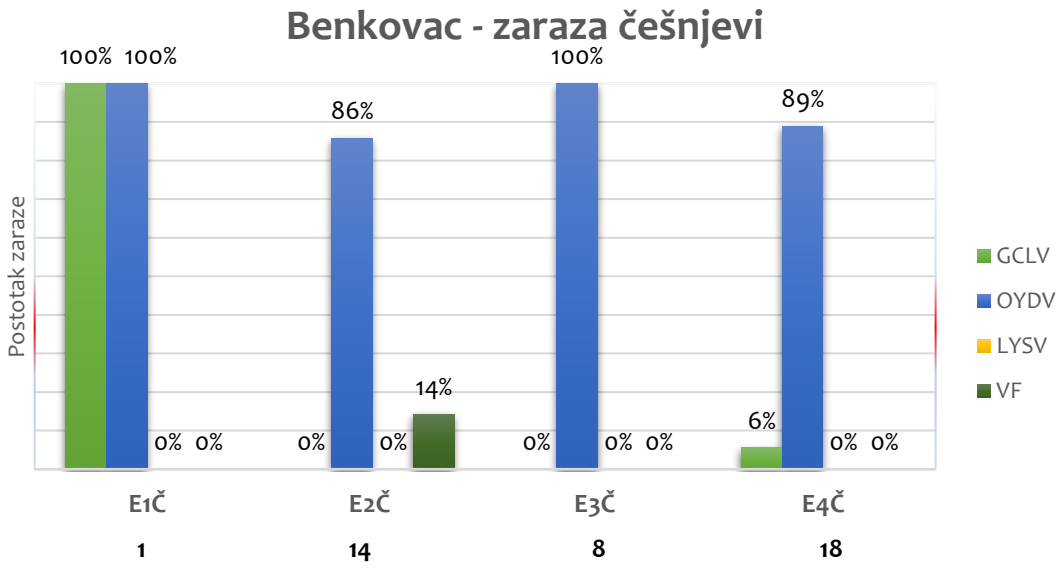
Rezultati dobiveni ispitivanjem 407 biljaka češnjaka detaljno su prikazani u grafikonima 4.1.1.1. do 4.1.2.3. Rezultati češnjaka iz Zadarske županije (područje Benkovca) i sa pokušališta Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu kategorizirani su prema lokaciji uzgoja češnjaka, prema načinu sadnje (iz češnjeva, lučica te presadnica) te podijeljeni prema četiri ispitivana ekotipa (E1, E2, E3, E4) dok uzorci sa područja Vukovarsko-srijemske županije (Cerić) pripadaju samo jednom ekotipu (Cerićki ozimi).

Ukupni broj analiziranih uzoraka po pojedinoj lokaciji označen je brojevima na dnu grafikona.

Rezultati analize češnjaka prikazani su u obliku postotka zaraze na tri ispitivana virusa te broja biljaka za svaki pojedini ekotip i lokaciju. Nadalje, svaki grafikon se sastoji i od stupca sa podacima o bezvirusnim (*virus free,* VF) biljkama gdje se evidentira broj VF biljaka ovisno o ekotipu, lokaciji te podrijetlu sadnoga materijala (češnjevi, lučice ili presadnice).

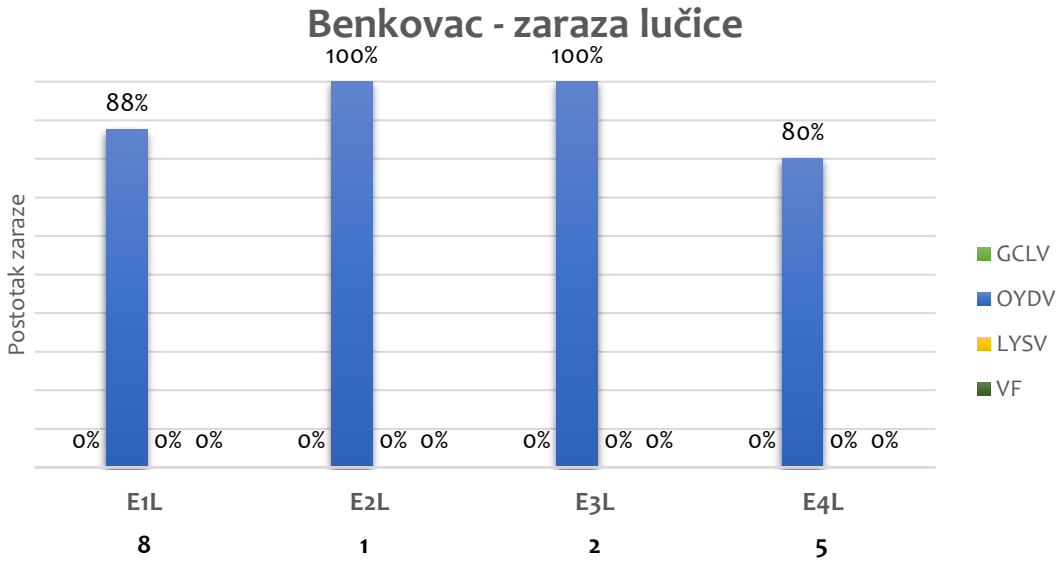
4.1.1 Benkovac

U ovoj skupini ispitana je 41 biljka dobivena sadnjom iz češnjeva (grafikon 4.1.1.1.). Dvije biljke bile su pozitivne na GCLV, 37 na OYDV, nije utvrđena zaraza sa LYSV, a kod samo 2 uzorka nije utvrđena prisutnost ispitivanih virusa (bezvirusne biljke, VF).



Grafikon 4.1.1.1. Postotak zaraženih biljaka češnjaka, uzgoj iz češnjeva – Benkovac (Oznake: E1-E4 = ekotipovi češnjaka, Č = sadnja iz češnjeva, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free.* Ukupni broj analiziranih biljaka označen je brojevima na dnu grafikona.)

U grafikonu 4.1.1.2. prikazano je 16 uzoraka češnjaka uzgajanih iz lučica. Očitovala se samo zaraza s OYDV u vrlo visokom postotku.

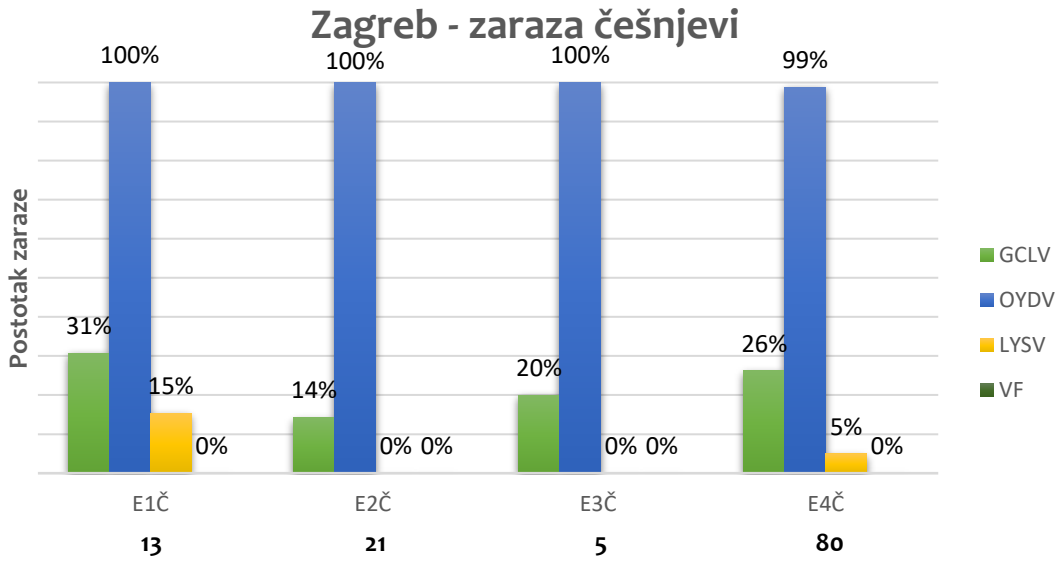


Grafikon 4.1.1.2. Postotak zaraženih biljaka češnjaka, uzgoj iz lučica – Benkovac (Oznake: E1-E4 = ekotipovi češnjaka, L = sadnja iz lučica, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free.* Ukupni broj analiziranih biljaka označen je brojevima na dnu grafikona.)

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 57 uzoraka češnjaka podrijetlom iz Benkovca kroz 2 varijante sadnje (češnjevi i lučice). Od toga, 2 biljke su zaražene s GCLV, 51 biljka sadrži virus OYDV, nema evidencije o pojavnosti LYSV dok su pronađene samo 2 VF (bezvirusne) biljke.

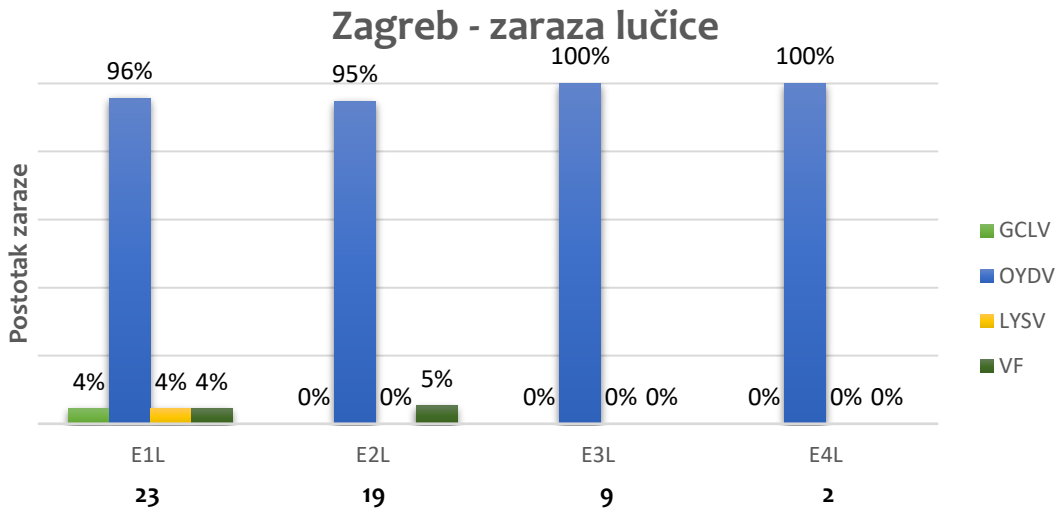
4.1.2 Zagreb

S lokacije Zagreb ukupno je ispitano 119 biljaka uzgajanih iz češnjeva. Od toga, 29 biljaka je zaraženo sa GCLV, 118 biljaka pokazuje prisutnost OYDV, a LYSV se očitovao na 6 biljaka dok bezvirusnih biljaka nije bilo (grafikon 4.1.2.1.).



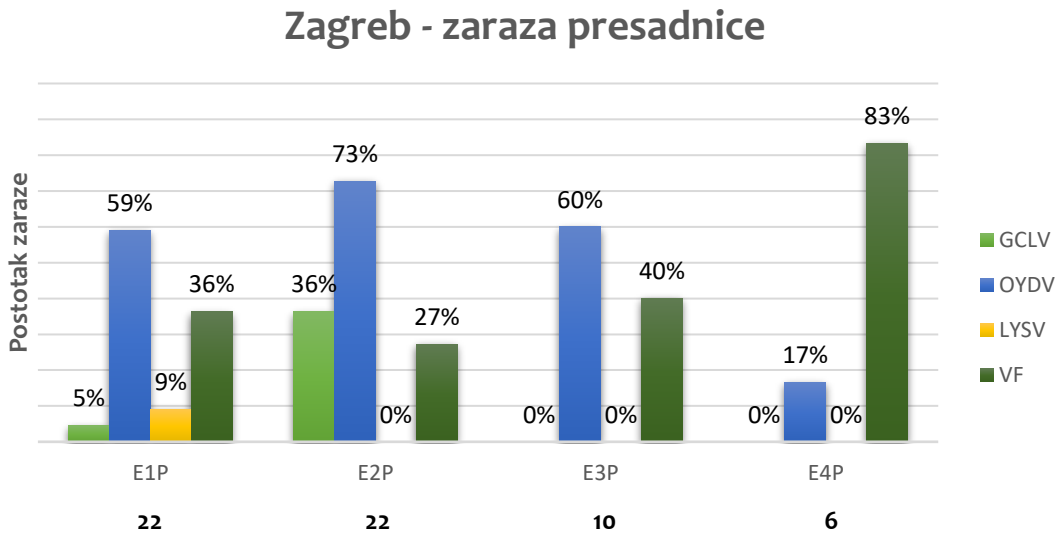
Grafikon 4.1.2.1. Postotak zaraženih biljaka češnjaka, uzgoj iz češnjeva – Zagreb (Oznake: E1-E4 = ekotipovi češnjaka, Č = sadnja iz češnjeva, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free.* Ukupni broj analiziranih biljaka označen je brojevima na dnu grafikona.)

Obzirom na uzgoj iz lučica (porijeklom iz presadnica) na lokaciji Zagreb, testirane su 53 biljke. Jedna biljka je pokazala zarazu s virusom GCLV, 51 biljka infektirana je s OYDV, 1 biljka sadrži LYSV virus dok su 2 biljke u ovoj seriji bile bezvirusne (grafikon 4.1.2.2.).



Grafikon 4.1.2.2. Postotak zaraženih biljaka češnjaka, uzgoj iz lučica – Zagreb (Oznake: E1-E4 = ekotipovi češnjaka, L = sadnja iz lučica, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free.* Ukupni broj analiziranih biljaka označen je brojevima na dnu grafikona.)

Ovom skupinom uzgoja češnjaka iz presadnica obuhvaćeno je 60 biljaka. 9 biljaka je pokazalo prisutnost GCLV virusa, 36 biljke su nositelji OYDV virusa, samo na dvije biljke dokazan je LYSV dok je najveća pojavnost bezvirusnih (VF) biljaka zabilježena upravo u ovoj skupini. 23 biljke tj. 38% biljaka u ovoj skupini su VF biljke (grafikon 4.1.2.3.).



Grafikon 4.1.2.3. Postotak zaraženih biljaka češnjaka, uzgoj iz presadnica – Zagreb (Oznake: E1-E4 = ekotipovi češnjaka, P = sadnja iz presadnica, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free.* Ukupni broj analiziranih biljaka označen je brojevima na dnu grafikona.)

Zaključno, s lokacije Zagreba ispitano je ukupno 232 biljke češnjaka iz 3 varijante sadnje (češnjevi, lučice i presadnice). 39 biljaka češnjaka zaraženo je virusom GCLV, 205 biljaka pokazuju zarazu s OYDV, 9 biljaka pokazalo se pozitivnima na LYSV dok je 25 biljaka bez virusa.

4.1.3 Cerić

S područja Vukovarsko-srijemske županije (Cerić) bilo je ukupno ispitano 118 uzoraka i kod svih uzoraka utvrđena je mješovita zaraza sa sva tri testirana virusa. Ovo su najizraženiji rezultati cjelokupnog istraživanja. Kod češnjaka „Cerićki ozimi“ nije pronađen niti jedan bezvirusni uzorak češnjaka.

Pregled ukupne utvrđene zaraze sa pojedinim virusima te mješovitih infekcija prikazan je u Tablici 4.1.3.1.

Tablica 4.1.3.1. Ukupna analiza svih testiranih uzoraka

Svi uzorci (Benkovac, Zagreb, Cerić)	Broj zaraženih uzoraka	Postotak zaraze
Zaraženi s 1 virus	217	53.3%
Zaraženi s 2 virusa	42	10.3%
Zaraženi s 3 virusa	121	29.7%
Bezvirusni uzorci	27	-
Ukupno zaraženi	**380**	
Zaraženi s GCLV	150	36.9%
Zaraženi s OYDV	377	92.6%
Zaraženi s LYSV	127	31.2%

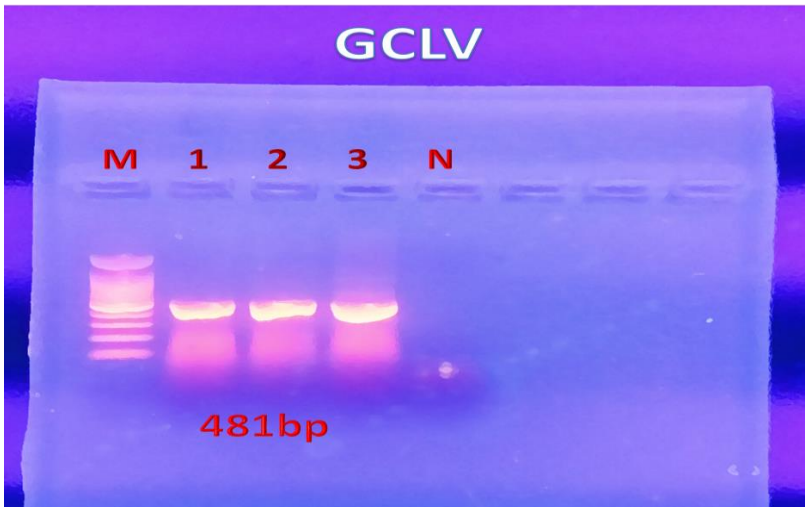
Oznake: GCLV = *Garlic common latent virus,* OYDV = *Onion yellow dwarf virus,* LYSV = *Leek yellow stripe virus,* VF = *virus free*

Od ukupnih 407 uzoraka, 217 uzoraka bilo je zaraženo sa samo jednim virusom, 42 uzorka očitovala su unakrsnu zarazu sa dva virusa dok je 121 ispitanih biljaka bilo pozitivno na sva tri proučavana virusa. Detaljnije, 150 uzoraka pokazalo se pozitivno na obično latentni virus češnjaka (GCLV), 377 uzorkovanih biljaka češnjaka otkrivaju

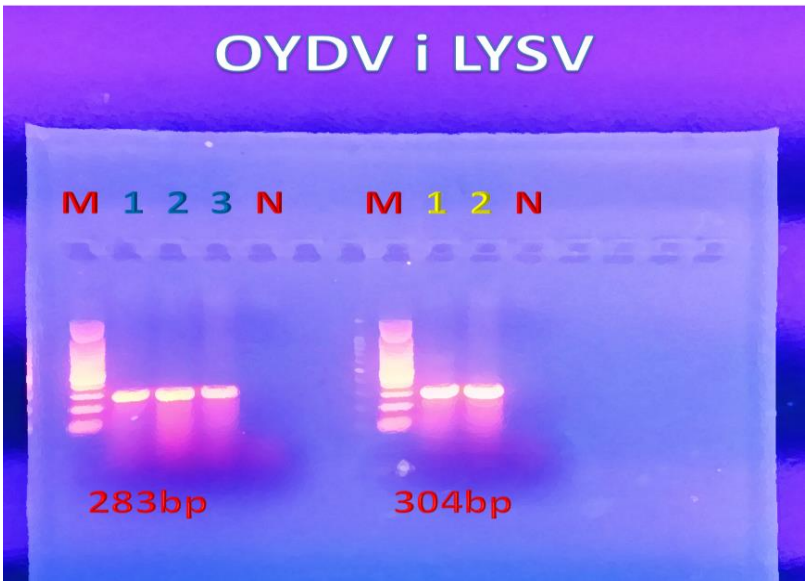
zarazu s virusom žućenja i kržljavosti luka (OYDV), naposljetku s virusom žute prugavosti poriluka (LYSV) inficirano je 127 biljaka češnjaka.

4.2 Molekularni testovi

PCR produkti, nazvani GCLV-Cro, LYSV-Cro i OYDV-Cro, izravno su sekvencirani u oba smjera (GenBank pristupni brojevi KT336495, KT336496 i KT336497). Dobiveni PCR produkti su vizualizirani na transiluminatoru nakon čega su fotografirani (slika 4.2.1. i 4.2.2.).



Slika 4.2.1. Rezultati testiranja prisutnosti GCLV metodom PCR. Oznake: 1-3 = uzorci, N = negativna kontrola, M = standard za određivanje molekularne mase. Očekivana veličina produkata je iznosila 481 parova baza (Foto: Darko Vončina)



Slika 4.2.2. Rezultati testiranja prisutnosti OYDV i LYSV metodom PCR. Oznake: 1-3 = uzorci, N = negativna kontrola, M = standard za određivanje molekularne mase. Očekivana veličina produkata je iznosila 283 parova baza za virus OYDV te 304 parova baza za LYSV
(Foto: Darko Vončina)

Usporedbom lanaca dobivenih sekvenciranjem u oba smjera utvrđeni su slijedeći nukleotidni sljedovi za pojedine viruse:

GCLV:

AATGTTAATCACTAAAAGGCCGCCTGCTGGTTGGCAAACCAAAGGTTACACTGCCAG
TACGAAGTATGCCGCCTTCGATACTTTCGATTATGTGCTAAACTCTGCTTGTGTCCA
GCCACTTGAGGGGATCATACGGGTCCCGACCGACGAAGAGACCATTGCTCACATGA
CCAACAAGCGGATTGCTATTGACAGGAACAGGCGCAATGACCGGTTTTCAAGCACA
AATAGTCTAGTAACGGGTGGCATGTTCGGTAAGGATATCAAGACCAACTTTAATGGA
TCCAACAATGCAGATTAGTATAATTTTGCTCTTAGCCGTTAAGAATAAATTGTGTGA
TAGTGGCGTGCCTACTGACGTCGCGATTGGTATTATAGAACCAATTATCAAAGAGGT
GAGGAAATTGCAGTGCCAAGAAGAGCAAAGGCTGCTACGTTT

OYDV:

GCGCGAGGCTCATGCACAAATGAAAGCAGCGGCATTACGTAATTCAAGGCCAAGGC
TGTTTGGACTAGACGGTAACGTCACAACCACGGATGAGGACACGGAGAGGCACACA
GCACATGACGTGAATGCACGAATGCACCATCTTGATGGTGCGCATATGCAGTGATGT
TTCGGTTAGCAACCGGTTATGGGCTTCCATCTAAAAAGTCCCAAGTGCCAAACTTGT
AATTTTGGCTA

LYSV:

AAGAAGCACATATGCAAATGAAGGCGGCTGCGATTAGAGGGGCAACTAATCGTTTG
TTTGGCCTAGACGGTAACGTAAACACAACGGAAGAGGACACGGAAAGACACACAGC
TGCAGATGTTAATAAGAACCAGCACACGTTGCTTGGTATTAGAATGTAAGA

5 RASPRAVA

U ovom radu ispitan je stupanj zaraze autohtonih sorata češnjaka (ukupno 5 ekotipova) s tri različite lokacije u Hrvatskoj. Cilj je bio utvrditi učestalost pojave tri ekonomski važna virusa češnjaka (GCLV, OYDV i LYSV) kako bi se ustanovilo realno zdravstveno stanje domaćih ekotipova češnjaka te kako bi se, sukladno rezultatima, mogli poduzeti sljedeći koraci u smanjenju zaraze češnjaka virusima.

Dobiveni rezultati su poražavajući, jer je 94% uzoraka zaraženo barem s jednim virusom, dok je samo 6% biljaka pokazalo odsutnost virusa. Detekcija samih virusnih bolesti je otežana uslijed teškog razlikovanja simptoma s onim nedostatka pojedinih biljnih hranjiva, štetama koje prouzrokuju toksini kukaca, visokih temperatura te fitotoksičnog djelovanja pesticida. Jedini način sigurne detekcije prisutnosti virusa u tkivu jest laboratorijski test, no zbog nedovoljne educiranosti te skupoće takvih postupaka većina proizvođača ne ispituje sadni materijal koji koriste. Potrebne su dodatne edukacije hrvatskih proizvođača o štetnosti tj. ekonomskom gubitku do kojega dolazi prilikom korištenja neadekvatnog sadnog materijala.

S obzirom da je ovo prvo istraživanje ovakvog tipa na češnjaku u Hrvatskoj, ne postoje rezultati s drugih područja Hrvatske ili drugih autora za usporedbu. Stoga, su u korelaciju stavljeni rezultati sličnih istraživanja iz regije i šire.

Informacije o učestalosti virusa češnjaka važne su za indeksiranje virusa za propagativni materijal bez virusa. Zaražene biljke, uključujući biljke majke, sadrže izvor patogena za već postojeće i nove plantaže (Chodorska i sur., 2014).

Iako se ELISA često primjenjuje za dijagnozu virusa u češnjaku (Shahraeen i sur., 2008), RT-PCR je učinkovitija i osjetljiva metoda otkrivanja virusa. Stoga bi pri proizvodnji certificiranog sadnog materijala bilo potrebno uzorke testirati pomoću RT-PCR metode kako bi bili sigurni u čistoću sadnoga materijala. Glavni razlog tomu je što (DAS) - ELISA, najčešće korištena varijanta ELISA-testa, nije poželjna za „in vitro“ analizu biljaka (dobivenih meristem-tip kulturom) jer je često virusna koncentracija ispod granice detekcije DAS-ELISA, što dovodi do nejasnih rezultata ili lažno negativnih (Conci, 1997).

S druge strane, ELISA je odlična metoda za utvrđivanje stupnja zaraze na proizvodnim poljima češnjaka za konzumaciju.

Uzorci iz Benkovca, uzgajani iz češnjeva i lučica, pokazuju najizraženiju zarazu upravo s OYDV virusom (96%). Nadalje, slijedi niska zaraza s GCLV (4%), nema zaraze s LYSV dok je postotak bezvirusnih biljaka samo 4%.

Na lokaciji Zagreb testirane su sve 3 varijante sadnje (češnjevi, lučice i presadnice), a uzorkovanje je obuhvatilo 232 biljke češnjaka. Najdominantnije su zaražene s OYDV na čak 205 uzoraka (88%), slijedi GCLV koji se očituje na 39 biljaka (17%), samo 9 biljaka zaraženo je s LYSV (4%) dok je s područja Zagreba otkriveno najviše bezvirusnih biljaka, njih 25 (11%) i to većinom iz uzoraka uzgajanih iz presadnica.

Valja napomenuti da nije rijetka istovremena koinfekcija s više virusa među ispitivanim uzorcima, a posebno je to izraženo na uzorcima češnjaka iz Cerića.

Kako je već navedeno, najkritičnijim se pokazao češnjak iz Cerića gdje su svi uzorci istovremeno bili zaraženi sa sva 3 ispitivana virusa. Dakle 100%-tna simultana zaraza svih 118 ispitanih uzoraka.

U Europi, pojavljivanje virusa koji inficiraju češnjak je prijavljeno u Francuskoj (Lot i sur., 1998), Grčkoj (Dovas i sur., 2001.), Češkoj (Klukácková i sur., 2004; Smékalová i sur., 2010), Poljskoj (Chodorska i sur., 2014) i Španjolskoj (Lunello i sur., 2005).

U različitim mediteranskim zemljama poput Francuske, Egipta, Maroka, Turske, Sirije, Tunisa, Izraela, Španjolske, Slovenije, Italije i Grčke otkriveni su i prijavljeni virusi triju rodova. Iako postoji nekoliko izvješća o prisutnosti različitih virusa, informacije o njihovoj učestalosti u svakoj zemlji su prilično ograničene zbog nedostatka epidemioloških istraživanja velikih razmjera. Najveći dio informacija odnosi se na viruse češnjaka koji su ekonomski važni za proizvodna polja u nekoliko zemalja mediteranskog bazena (Maramorosch i sur., 2012).

Istraživanje Klukáčková i sur. (2007) pokazuje da je češki češnjak (srednja vrijednost svih pet ispitivanih kultivara) zaražen u prosjeku 75,4% od strane OYDV, razina zaraze s LYSV je 31,2%, a GCLV je otkriven u čak 99,6% uzoraka češnjaka. Ukupno, 80,9% ispitanih biljaka češnjaka imalo je vidljive simptome viroze na listovima.

Isto kao i u istraživanju provedenom u Hrvatskoj, Klukáčková i sur. (2007) navode kako rezultati istraživanja pokazuju da je OYDV češći *Potyvirus* od LYSV u Češkoj. U dvije sorte otkrili su 100%-tnu zarazu OYDV. U Europi, Dovas i sur. (2001) i Dovas i Vovlas (2003) otkrili su OYDV u gotovo 100% testiranih biljaka češnjaka u Grčkoj i Italiji. Uočena je visoka pojavnost OYDV-a u uvezenim lukovicama iz Kine.

Slično tome, Sutarya i Van Dijk (1994) otkrili su OYDV u 87% uzoraka češnjaka u Javi. S druge strane, Daniels (1999), Fajardo i sur. (2001) te Tajaichi i sur. (1998; 2001) opisuju nisku frekvenciju (do 40%) zaraze s OYDV u Brazilu i Japanu.

U Hrvatskoj, najmanja zaraza pokazala se s LYSV (31%). Slične rezultate prezentira Klukáčková i sur. (2007) gdje je LYSV detektiran u niskim vrijednostima u tri od pet čeških kultivara. Ovo je suprotno izvješćima o uobičajenom pojavljivanju (80-100%) LYSV u češnjaku npr. iz Brazila (Daniels, 1999; Fajardo i sur., 2001), Argentine (Conci i sur., 2002), Grčke (Dovas i sur., 2001), Italije (Dovas i Vovlas, 2003), te Japana (Takaichi i sur., 1998; 2001).

Suprotno rezultatima ovog diplomskog rada, prema Klukáčková i sur. (2007), GCLV je bio najčešći virus u uzorcima češnjaka iz Češke bez obzira na ispitane sorte, a ujedno, najznačajniji je bio i na uzorcima iz Španjolske.

U odnosu na rezultate ovog istraživanja koji su za GCLV bili relativno niži (10% zaraze), ako se izuzme češnjak „Cerićki ozimi“ kod kojeg je svih 118 uzoraka bilo zaraženo s 3 virusa (ako se i njih ubroji zaraženost iznosi 36,4%), u različitim regijama u Grčkoj pojavnost virusa je bila od 0 do 98% (Dovas i sur., 2001). Nadalje, Dovas i Vovlas (2003) otkrivaju 23 do 98% inficiranih biljaka s GCLV u Italiji. S druge strane, u Češkoj (Klukáčková i sur.,2007) i Brazilu (Daniels, 1999) GCLV detektiran je u do 4% uzoraka češnjaka podrijetlom iz Kine i Brazila.

Kako bi se ustvrdila točnost seroloških ispitivanja uzoraka češnjaka u ovom je radu uzeta po jedna ELISA-pozitivna biljka za svaki virus u svrhu potvrde molekularnim metodama. U tu svrhu korištena je metoda lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja. Navedena metoda se uz korištenje objavljenih parova početnica pokazala vrlo učinkovitom u detekciji sva tri virusa uključenih u istraživanje. Dobiveni produkti

poslani su na određivanje nukleotidnih sljedova (sekvenciranje) u tvrtku Macrogen (Južna Koreja).

Sekvenciranjem dobivenih PCR produkata utvrđena je najveća sličnost hrvatskih izolata sa izolatima iz Japana (GCLV i OYDV), odnosno iz Argentine (LYSV). Detaljnija analiza cijelih genoma hrvatskih izolata virusa češnjaka bila bi od koristi u njihovom filogenetskom pozicioniranju, određivanju štetnosti, učinkovitosti prijenosa putem različitih vektora i određivanju najprikladnijih mjera za kontrolu njihovog širenja.

6 ZAKLJUČAK

- Istraživanjem je utvrđena visoka zaraženost virusima (94% ispitanih biljaka) pet ekotipova češnjaka koji se uzgajaju na području Zadarske i Vukovarsko-srijemske županije
- Dominantan virus bio je virus žućenja i kržljavosti luka (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) – 92,6%, a uz njega LYSV (31,2%) te GCLV (36,9%)
- Kod samo 7% ispitanih biljaka češnjaka nije utvrđena prisutnost ispitivanih virusa (bezvirusni uzorci)
- Uz metodu ELISA i molekularna metoda (RT-PCR) se pokazala kao učinkovita u detekciji tri virusa obuhvaćena istraživanjem
- Analizom sekvenci dijelova virusnih genoma utvrđeno je da su hrvatski izolati GCLV i OYDV najsličniji japanskim izolatima, dok je LYSV pokazao najveću sličnost sa argentinskim izolatom SW9

7 POPIS LITERATURE

1. Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Ćetković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007). Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb. 380, 475-476
2. Andračić I. (2012). Antioksidacijska Aktivnost Ozimog Slavonskog Češnjaka (*Allium sativum* L.). Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju
3. Barg E., Lesemann D.E., Vetten H.J., Green S.K. (1997). Viruses of alliums and their distribution in different Allium crops and geographical regions. Acta Horticulturae 433: 607–616
4. Bos L., Huijberts N., Huttinga H., Maat D. Z. (1978). *Leek yellow stripe virus* and its relationships to *Onion Yellow Dwarf Virus*; characterization, ecology and possible control. Neth. J. Plant Pathol. 84: 185–204
5. Bremer H. (1937). Phytopathology Z. 10: 79
6. Canavelli A., Nome S.F., Conci V.C. (1998). Efecto de distintos virus en la produccio´ n de ajo (*Allium sativum* L.) "Rosado Paraguayo". Fitopatologı´a Brasilera 23 (3): 354–358
7. Chen J., Adams M.J. (2001). Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. Archives of Virology 146: 1841–1853
8. Chodorska M., Paduch-Cichal E., Kalinowska E., Szyndel M.S. (2014). Assessment Of *Allexiviruses* Infection In Garlic Plants In Poland. Agricultural University in Warsaw. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 13(2): 179-186
9. Clark M.F., Adams A.N. (1977). Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 475-483
10. Conci V. C. (1997). Virus y Fitoplasmas de ajo. In "50 Temas Sobre Produccion de Ajo" (J. L. Burba, ed.) EEA-INTA La Consulta, Mendoza. 267–293
11. Conci V. C., Canavelli A., Lunello P. (2003). Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. Plant Dis. 87: 1411–1415

12. Conci V.C., Lunello P., Buraschi D., (2002). Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. Plant Disease, 86: 1085-1088
13. Conci V.C., Nome S.F., Milne R.G. (1992). Filamentous viruses of garlic in Argentina. Plant Disease 76: 594–596
14. Daniels J. (1999). Occurrence of viruses in garlic in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. Fitopatol. Brasil. 24, 91
15. Diekmann M. (1997). Allium sp. Food and Agriculture Organization, (FAO), Rome, (Italy); International Plant Genetic Resources Instit., (IPGRI), Rome (Italy). 18-20
16. Dovas C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shiboleth, Y. M., Katis, N. (2001). Incidence of viruses infecting Allium spp. In Greece. Eur. J. Plant Pathol. 149: 1-7
17. Dovas C. I., Vovlas C. (2003). Viruses infecting Allium spp. In Southern Italy. J. Plant Pathol. 85, 135
18. Dovas C.I., Hatziloukass E., Salomon R., Barg E., Shiboleth Y., Katis N.I. (2001). Comparison of methods for virus detection in Allium spp. J Phytopathol. 149: 731–737
19. Fajardo T. V. M., Nishijima M., Buso J.A., Torres A.C., Avila A.C., Resende R. O. (2001). Garlic viral complex: identification of Potyviruses and Carlavirus in Central Brazil. Fitopatol. Brasil. 26: 619-626
20. Far M. (2009). Virusi i viroze vinove loze. Diplomski rad. Veleučilište u Požegi. Poljoprivredni odjel
21. Fidan H., Baloglu S. (2009). First Report Of Garlic Common Latent Virus in Garlic in Turkey. J. Plant Pathol. 91(S4): 99
22. Härdtl H. (1972). Die Übertragung der Zwiebelgelbstreifigkeit durch den Samen. Z. PflKrankh. PflSchutz 79: 694—701
23. Juretić N. (2002). Osnove biljne virologije. Školska knjiga, Zagreb. 48, 103
24. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press: Amsterdam

25. Klukáčková J., Navrátil N., Duchoslav M. (2007). Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. Journal of Plant Diseases and Protection, 114 (3): 97–100
26. Klukáčková J., Navrátil N., Veselá M., Havránek P., Šafářová D. (2004). Occurrence of garlic viruses in the Czech Republic. Acta Fytotech. Zootech. 7: 126–128
27. Kupke. (1957). Rhein. Monatsschr. Gemüse- Obst.- u. Gartenbau. 45: 173
28. Lešić R., Borošić J., Butorac I., Herak-Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004). Povrćarstvo II. dopunjeno izdanje. Zrinski d.d. Čakovec. 134-142
29. Lot H., Chevelon V., Souche S., Dellecolle B. (1998). Effects of *Onion Yellow Dwarf Virus* and *Leek Yellow Stripe Virus* on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease 82: 1381–1385
30. Lot H., Chovelon V., Souche S., Delecolle B., Messiaen C. M., Etoh T. (2001). Resistance to *Onion Yellow Dwarf Virus* and *Leek Yellow Stripe Virus* found in a fertile garlic clone. Acta Hort. 555: 243–246
31. Lunello P., Di Rienzo J., Conci V. (2007). Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. Plant Dis. 91: 153–158
32. Lunello P., Ducasse D., Conci V. (2005). Improved PCR detection of *Potyviruses* in *Allium* species. European Journal of Plant Pathology 112: 371–378
33. Maramorosch K., Shatkin A.J., Murphy F.A. (2012). Advances in virus research; viruses and virus diseases of vegetables in the Mediterranean basin. London, Elsevier Inc. ISSN: 0065-3527
34. Matotan Z. (2004). Suvremena proizvodnja povrća. Nakladni zavod globus, Zagreb. 153-158
35. Melo Filho P., Resende R. O., Torres Cordeiro C. M., Buso J., Torres A. C., Dusi A. N. (2006). Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field condtions. Eur. J. Plant Pathol. 116: 95–101
36. Messianen C., Youcef-Benkada M., Beyries A. (1981.) Rendement potentiel et tolerance aux virus chen l'ail. Agronomie 1: 759-762
37. Parađiković N. (2002). Osnove proizvodnje povrća. Katava, Osijek. 154
38. Radat B. (2014). Poslovni Plan Za Proizvodnju Češnjaka. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

39. Runje M., Cvrtila Ž. (2006). Elisa u analitici hrane. Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica. Meso, 7 (2): 92-95
40. Shahraeen N., Lesemann D.E., Ghtbi T., (2008). Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. OEPP/EPPO Bull. 38: 131–135
41. Smékalová K., Stavlíková H., Dusek K. (2010). Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic. J. Plant Pathol. 92(1): 273–274
42. Smith K. M. (1972). A textbook of plant virus diseases. Longman, London
43. Stanway P. (2013). Češnjak – praktični savjeti za zdravlje i dom. Planetopija, Zagreb. 7-8
44. Sutarya R., Van Dijk P. (1994). Virus diseases of shallot and garlic in Java, and prospects for their control. Acta Hort. 369: 134-143
45. Šimanović M., Bago I., Kanižaj Ž., Valentić M., Grlica A. (2015). Poljoprivredna proizvodnja u 2014. Statistička izvješća ISSN 1332 – 0297. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb
46. Štefanac Z. (1977). Virus Žute Kržljavosti Crvenog Luka u Jugoslaviji. Acta Bot. Croat. 36: 39—45
47. Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M. T. (1999). Handbook of plant virus diseases. CRC Press, Washington DC
48. Takaichi M., Nagakubo T., Oeda K. (2001). Mixed virus infection of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. Plant Dis. 85: 71-75
49. Takaichi M., Yamamoto M., Nagakubo T., Oeda K. (1998). Four garlic viruses identified by reverse transcription – polymerase chain reaction and their regional distribution in Northern Japan. Plant Dise. 82: 694-698
50. Tamura K., Stecher G., Peterson D.,, Filipski A., Kumar S. (2013). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30(12): 2725-2729
51. Toth N., Fabek S., Vončina D. (2015). Završno izvješće: Revitalizacija proizvodnje češnjaka u Zadarskoj županiji. Agronomski fakultet, Zagreb
52. Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaki K.T., Sumi S. (1998). Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in Allium plants. Archives of Virology 143: 97–113

53. Van Dijk P. (1993). Survey and characterization of potyviruses and their strains of Allium species. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 1–48
54. Van Dijk P., Verbeek M., Bos L. (1991). Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species and their classification into two new *rymoviruses* in the family *Potyviridae*. Neth. J. Plant Pathol. 97: 381-399
55. Vunsh R., Rosner A., Stein A. (1991). Detection of bean yellow mosaic virus in *Gladioli* corms by the polymerase chain reaction. Ann. Appl. Biol. 119: 289-294
56. Walkey D. G. A. (1990). Virus diseases. In "Onion and allied crops" (H. D. Rabinowitch and J.-L. Brewster, eds.), Vol II, pp. 191–212. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL
57. Walkey D. G. A., Antill D. N. (1989). Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). J. Hortic. Sci. 64: 53
58. Winiarczyk K., Solarska E., Sienkiewicz W., Curie-Skłodowska M. (2014.) Prevalence Of Infections With *Onion Yellow Dwarf Virus*, *Leek Yellow Stripe Virus* And *Garlic Common Latent Virus* In Plants From The Genus *Allium*. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 13(3): 123-133

7.1 Web izvori

1. BIOREBA - GCLV. <www.bioreba.com>. Pristupljeno 21. travnja 2017.
2. BIOREBA - LYSV. <www.bioreba.com>. Pristupljeno 24. travnja 2017.
3. BIOREBA - OYDV. <www.bioreba.com>. Pristupljeno 6. travnja 2017.
4. DESCRIPTION OF PLANT VIRUSES. <www.dpvweb.net>. Pristupljeno 24. travnja 2017.
5. DRŽAVNI ZAVOD ZA STATISTIKU. <www.dzs.hr>. Pristupljeno 24. ožujka 2017.
6. ELISA. <www.thermofisher.com>. Pristupljeno 21. travnja 2017.
7. FAOSTAT 2014. <www.fao.org>. Pristupljeno 21. travnja 2017.
8. FAOSTAT 2015. < http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>. Pristupljeno 26. travnja 2017.
9. KING SAUD UNIVERSITY. <www.faculty.ksu.edu.sa>. Pristupljeno 21. travnja 2017.
10. PLANTWISE KNOWLEDGE BANK. <www.plantwise.org>. Pristupljeno 24. travnja 2017.

11. SAVJETODAVNA SLUŽBA. <www.savjetodavna.hr>. Pristupljeno 28. travnja 2017.

8 PRILOG 1

Tablica 8.1. Pregled svih testiranih uzoraka češnjaka te pojavnost ispitivana 3 virusa na pojedinačnim uzorcima (E1-E4 = ekotipovi, Č = sadnja iz češnjeva, P =sadnja iz presadnica, L = sadnja iz lučica, GCLV = *Garlic common latent virus*, OYDV = *Onion yellow dwarf virus*, LYSV = *Leek yellow stripe virus*)

Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV	Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV
Benkovac					**41.**	E4L3		+	
1.	E2Č5		+		**42.**	E4L1		+	
2.	E2Č7		+		**43.**	E2Č1		+	
3.	E2Č9		+		**44.**	E3Č5		+	
4.	E2Č6		+		**45.**	E2Č2		+	
5.	E2Č8				**46.**	E3Č4		+	
6.	E2Č10		+		**47.**	E3Č6		+	
7.	E2Č4		+		**48.**	E1Č1	+	+	
8.	E4Č3		+		**49.**	E3Č2		+	
9.	E4Č2		+		**50.**	E4Č15		+	
10.	E2Č3		+		**51.**	E3L1		+	
11.	E4Č2		+		**52.**	E3L3		+	
12.	E4Č7		+		**53.**	E2Č3			
13.	E4Č6		+		**54.**	E2Č4		+	
14.	E4Č3		+		**55.**	E2Č1		+	
15.	E4Č8		+		**56.**	E2L3		+	
16.	E4Č5		+		**57.**	E2Č5		+	
17.	E4Č4		+		**Zagreb**				
18.	E4Č14		+		**58.**	E1L 166		+	
19.	E4Č12		+		**59.**	E1L 167		+	
20.	E4Č9		+		**60.**	E1L 168		+	
21.	E4Č13		+		**61.**	E1L 169		+	
22.	E4Č11		+		**62.**	E1L 170	+	+	
23.	E4Č10		+		**63.**	E1L 171			
24.	E4Č1		+		**64.**	E1L 172		+	
25.	E3Č8		+		**65.**	E1L 173		+	
26.	E3Č9		+		**66.**	E1L 174		+	
27.	E4Č2	+	+		**67.**	E1L 175		+	
28.	E3Č7		+		**68.**	E1L 176		+	
29.	E3Č10		+		**69.**	E1L 177		+	
30.	E1L7		+		**70.**	E1L 178		+	
31.	E1L4		+		**71.**	E1L 179		+	+
32.	E1L2		+		**72.**	E1L 180		+	
33.	E1L5		+		**73.**	E1L 181		+	
34.	E1L3		+		**74.**	E1L 182		+	
35.	E1L1		+		**75.**	E1L 183		+	
36.	E1L6		+		**76.**	E1L 184		+	
37.	E1L8		+		**77.**	E1L 185		+	
38.	E4L4		+		**78.**	E1L 186		+	
39.	E4L2		+		**79.**	E1L 187		+	
40.	E4L5		+		**80.**	E1L 188		+	

Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV	Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV
81.	E2L 189				**121.**	E1P 229		+	
82.	E2L 190		+		**122.**	E3P 230			
83.	E2L 191		+		**123.**	E3P 231		+	
84.	E2L 192		+		**124.**	E3P 232		+	
85.	E2L 193		+		**125.**	E3P 233		+	
86.	E2L 194		+		**126.**	E3P 234		+	
87.	E2L 195		+		**127.**	E3P 235			
88.	E2L 196		+		**128.**	E3P 236			
89.	E2L 197		+		**129.**	E3P 237		+	
90.	E2L 198		+		**130.**	E3P 238			
91.	E2L 199		+		**131.**	E3P 239		+	
92.	E2L 200		+		**132.**	E4P 240			
93.	E2L 201		+		**133.**	E4P 241			
94.	E2L 202		+		**134.**	E4P 242		+	
95.	E2L 203		+		**135.**	E4P 243			
96.	E2L 204		+		**136.**	E4P 244			
97.	E2L 205		+		**137.**	E4P 245			
98.	E2L 206		+		**138.**	E2P 246			
99.	E2L 207		+		**139.**	E2P 247		+	
100.	E1P 208				**140.**	E2P 248	+	+	
101.	E1P 209				**141.**	E2P 249		+	
102.	E1P 210				**142.**	E2P 250	+	+	
103.	E1P 211				**143.**	E2P 251	+	+	
104.	E1P 212				**144.**	E2P 252		+	
105.	E1P 213		+		**145.**	E2P 253	+	+	
106.	E1P 214		+		**146.**	E2P 254		+	
107.	E1P 215				**147.**	E2P 255	+	+	
108.	E1P 216		+		**148.**	E2P 256	+	+	
109.	E1P 217		+		**149.**	E2P 257		+	
110.	E1P 218				**150.**	E2P 258			
111.	E1P 219				**151.**	E2P 259		+	
112.	E1P 220	+	+		**152.**	E2P 260			
113.	E1P 221			+	**153.**	E2P 261			
114.	E1P 222		+	+	**154.**	E2P 262	+	+	
115.	E1P 223		+		**155.**	E2P 263		+	
116.	E1P 224		+		**156.**	E2P 264	+	+	
117.	E1P 225		+		**157.**	E2P 265			
118.	E1P 226		+		**158.**	E2P 266			
119.	E1P 227		+		**159.**	E2P 267		+	
120.	E1P 228		+		**160.**	E3L 268		+	

Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV	Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV
161.	E3L 269		+		**201.**	E2Č 309	+	+	
162.	E3L 270		+		**202.**	E2Č 310		+	
163.	E3L 271		+		**203.**	E2Č 311		+	
164.	E3L 272		+		**204.**	E2Č 312		+	
165.	E3L 273		+		**205.**	E2Č 313		+	
166.	E3L 274		+		**206.**	E2Č 314		+	
167.	E3L 275		+		**207.**	E2Č 315		+	
168.	E3L 276		+		**208.**	E2Č 316		+	
169.	E4L 277		+		**209.**	E2Č 317		+	
170.	E4L 278		+		**210.**	E4Č 329		+	
171.	E1Č 279		+		**211.**	E4Č 330		+	
172.	E1Č 280		+		**212.**	E4Č 331	+	+	
173.	E1Č 281	+	+		**213.**	E4Č 332	+	+	
174.	E1Č 282		+		**214.**	E4Č 333		+	
175.	E1Č 283		+		**215.**	E4Č 334		+	
176.	E1Č 284	+	+	+	**216.**	E4Č 335	+	+	
177.	E1Č 285		+		**217.**	E4Č 336		+	+
178.	E1Č 286	+	+	+	**218.**	E4Č 337		+	
179.	E1Č 287		+		**219.**	E4Č 338	+	+	
180.	E1Č 288		+		**220.**	E4Č 339	+	+	
181.	E1Č 289		+		**221.**	E4Č 340	+	+	
182.	E1Č 290		+		**222.**	E4Č 341		+	
183.	E1Č 291	+	+		**223.**	E4Č 342		+	
184.	E3Č 292		+		**224.**	E4Č 343		+	
185.	E3Č 293		+		**225.**	E4Č 344		+	
186.	E3Č 294		+		**226.**	E4Č 345		+	
187.	E3Č 295		+		**227.**	E4Č 346		+	
188.	E3Č 296	+	+		**228.**	E4Č 347		+	
189.	E2Č 297	+	+		**229.**	E4Č 348	+	+	
190.	E2Č 298		+		**230.**	E4Č 349		+	
191.	E2Č 299		+		**231.**	E4Č 350		+	
192.	E2Č 300		+		**232.**	E4Č 351		+	
193.	E2Č 301		+		**233.**	E4Č 352	+	+	
194.	E2Č 302		+		**234.**	E4Č 353		+	
195.	E2Č 303		+		**235.**	E4Č 354	+	+	
196.	E2Č 304		+		**236.**	E4Č 355		+	
197.	E2Č 305	+	+		**237.**	E4Č 356	+	+	
198.	E2Č 306		+		**238.**	E4Č 357		+	
199.	E2Č 307		+		**239.**	E4Č 358		+	
200.	E2Č 308		+		**240.**	E4Č 359		+	

Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV	Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV
241.	E4Č 360		+		**281.**	E4Č 400		+	
242.	E4Č 361		+		**282.**	E4Č 401		+	
243.	E4Č 362		+		**283.**	E4Č 402		+	
244.	E4Č 363		+		**284.**	E4Č 403	+	+	
245.	E4Č 364		+		**285.**	E4Č 404		+	
246.	E4Č 365		+		**286.**	E4Č 405		+	
247.	E4Č 366		+		**287.**	E4Č 406		+	
248.	E4Č 367		+		**288.**	E4Č 407		+	
249.	E4Č 368		+		**289.**	E4Č 408	+	+	
250.	E4Č 369		+		**Cerić**				
251.	E4Č 370		+		**290.**	Cerić 1	+	+	+
252.	E4Č 371		+		**291.**	Cerić 2	+	+	+
253.	E4Č 372	+	+	+	**292.**	Cerić 3	+	+	+
254.	E4Č 373	+	+		**293.**	Cerić 4	+	+	+
255.	E4Č 374		+		**294.**	Cerić 5	+	+	+
256.	E4Č 375		+		**295.**	Cerić 6	+	+	+
257.	E4Č 376		+	+	**296.**	Cerić 7	+	+	+
258.	E4Č 377		+		**297.**	Cerić 8	+	+	+
259.	E4Č 378	+	+		**298.**	Cerić 9	+	+	+
260.	E4Č 379	+	+		**299.**	Cerić 10	+	+	+
261.	E4Č 380		+		**300.**	Cerić 11	+	+	+
262.	E4Č 381	+	+		**301.**	Cerić 12	+	+	+
263.	E4Č 382	+	+		**302.**	Cerić 13	+	+	+
264.	E4Č 383		+		**303.**	Cerić 14	+	+	+
265.	E4Č 384	+	+		**304.**	Cerić 15	+	+	+
266.	E4Č 385		+		**305.**	Cerić 16	+	+	+
267.	E4Č 386		+		**306.**	Cerić 17	+	+	+
268.	E4Č 387		+		**307.**	Cerić 18	+	+	+
269.	E4Č 388	+			**308.**	Cerić 19	+	+	+
270.	E4Č 389		+		**309.**	Cerić 20	+	+	+
271.	E4Č 390		+		**310.**	Cerić 21	+	+	+
272.	E4Č 391		+		**311.**	Cerić 22	+	+	+
273.	E4Č 392		+		**312.**	Cerić 23	+	+	+
274.	E4Č 393		+	+	**313.**	Cerić 24	+	+	+
275.	E4Č 394		+		**314.**	Cerić 25	+	+	+
276.	E4Č 395	+	+		**315.**	Cerić 26	+	+	+
277.	E4Č 396		+		**316.**	Cerić 27	+	+	+
278.	E4Č 397		+		**317.**	Cerić 28	+	+	+
279.	E4Č 398		+		**318.**	Cerić 29	+	+	+
280.	E4Č 399		+		**319.**	Cerić 30	+	+	+
					320.	Cerić 31	+	+	+

Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV	Redni broj	Oznaka uzorka	GCLV	OYDV	LYSV
321.	Cerić 32	+	+	+	364.	Cerić 75	+	+	+
322.	Cerić 33	+	+	+	365.	Cerić 76	+	+	+
323.	Cerić 34	+	+	+	366.	Cerić 77	+	+	+
324.	Cerić 35	+	+	+	367.	Cerić 78	+	+	+
325.	Cerić 36	+	+	+	368.	Cerić 79	+	+	+
326.	Cerić 37	+	+	+	369.	Cerić 80	+	+	+
327.	Cerić 38	+	+	+	370.	Cerić 81	+	+	+
328.	Cerić 39	+	+	+	371.	Cerić 82	+	+	+
329.	Cerić 40	+	+	+	372.	Cerić 83	+	+	+
330.	Cerić 41	+	+	+	373.	Cerić 84	+	+	+
331.	Cerić 42	+	+	+	374.	Cerić 85	+	+	+
332.	Cerić 43	+	+	+	375.	Cerić 86	+	+	+
333.	Cerić 44	+	+	+	376.	Cerić 87	+	+	+
334.	Cerić 45	+	+	+	377.	Cerić 88	+	+	+
335.	Cerić 46	+	+	+	378.	Cerić 89	+	+	+
336.	Cerić 47	+	+	+	379.	Cerić 90	+	+	+
337.	Cerić 48	+	+	+	380.	Cerić 91	+	+	+
338.	Cerić 49	+	+	+	381.	Cerić 92	+	+	+
339.	Cerić 50	+	+	+	382.	Cerić 93	+	+	+
340.	Cerić 51	+	+	+	383.	Cerić 94	+	+	+
341.	Cerić 52	+	+	+	384.	Cerić 95	+	+	+
342.	Cerić 53	+	+	+	385.	Cerić 96	+	+	+
343.	Cerić 54	+	+	+	386.	Cerić 97	+	+	+
344.	Cerić 55	+	+	+	387.	Cerić 98	+	+	+
345.	Cerić 56	+	+	+	388.	Cerić 99	+	+	+
346.	Cerić 57	+	+	+	389.	Cerić 100	+	+	+
347.	Cerić 58	+	+	+	390.	Cerić 101	+	+	+
348.	Cerić 59	+	+	+	391.	Cerić 102	+	+	+
349.	Cerić 60	+	+	+	392.	Cerić 103	+	+	+
350.	Cerić 61	+	+	+	393.	Cerić 104	+	+	+
351.	Cerić 62	+	+	+	394.	Cerić 105	+	+	+
352.	Cerić 63	+	+	+	395.	Cerić 106	+	+	+
353.	Cerić 64	+	+	+	396.	Cerić 107	+	+	+
354.	Cerić 65	+	+	+	397.	Cerić 108	+	+	+
355.	Cerić 66	+	+	+	398.	Cerić 109	+	+	+
356.	Cerić 67	+	+	+	399.	Cerić 110	+	+	+
357.	Cerić 68	+	+	+	400.	Cerić 111	+	+	+
358.	Cerić 69	+	+	+	401.	Cerić 112	+	+	+
359.	Cerić 70	+	+	+	402.	Cerić 113	+	+	+
360.	Cerić 71	+	+	+	403.	Cerić 114	+	+	+
361.	Cerić 72	+	+	+	404.	Cerić 115	+	+	+
362.	Cerić 73	+	+	+	405.	Cerić 116	+	+	+
363.	Cerić 74	+	+	+	406.	Cerić 117	+	+	+
					407.	Cerić 118	+	+	+

ŽIVOTOPIS

Klara Ćurić rođena je 7.9.1993. godine u Požegi, gdje je završila osnovnu i srednju Katoličku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Požegi. Preddiplomski studij Hortikulture na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, upisala je akademske godine 2011./2012. te je stekla titulu sveučilišnog prvostupnika hortikulture obranom završnog rada iz područja zaštite bilja pod naslovom „Biljna karantena i njena uloga u biljnom zdravstvu“. Nadalje, pokazuje veliki interes za više grana biotehničkih znanosti, glavni interesi su vezani za hortikulturu, zaštitu te ishranu bilja. Akademske godine 2014./2015. upisuje diplomski studij Fitomedicine na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.

Studentica se nalazila među 10% najuspješnijih studenata na preddiplomskom studiju Hortikulture s prosjekom ocjena 4.424 te je ujedno i predstavnica smjera Hortikulture generacije 2011./2012.

2014. godine dobitnica je Dekanove nagrade za rad naslova „Učinak dehidriranih organskih gnojiva na mineralni sastav salate“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Sanje Fabek Uher. Rad je objavljen 2016. godine u časopisu *Acta Horticulturae* (http://www.actahort.org/books/1142/1142_44.htm).

U 2014. godini studentica je sudjelovala na međunarodnom simpoziju „*6th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes*“ u Zagrebu gdje je predstavljala plakat za rad s kojim je osvojila Dekanovu nagradu.

2016. godine, pod mentorstvom doc. dr. sc. Darka Vončine, sudjeluje u istraživanju koje je objavljeno u časopisu *Plant Disease* naslova „*First Report of Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus, and Garlic common latent virus on Garlic in Croatia*“.

U okviru ERASMUS+ programa, 2016. godine, studentica boravi 6 mjeseci na razmjeni studenata u Grčkoj na otoku Kreti kao student na „*Technological Educational Institute of Crete*“. Iste godine, u okviru CEEPUS programa sudjeluje na razmjeni studenata u Austriji (Beč) na „*University of Natural Resources and Life Sciences* - BOKU“.

Kao dodatak, studentica pokazuje veliki interes za dodatne edukacije, konferencije, seminare, ljetne škole, međunarodne razmjene i putovanja. Do sada je posjetila 28 zemalja širom 4 kontinenta. Osim znanstvenih interesa, studentica proučava i istražuje

razne egzotične životinje te je aktivna u humanitarnom radu, radu s mladima te se bavi brojnim sportovima, a posebno biciklizmom i košarkom.