

VIRUS MOZAIKA POSTRNE REPE (TURNIP
MOSAIC VIRUS) U JUGOSLAVIJI

Sa dvije table

ZLATA ŠTEFANAC-UĐBINAC, DAVOR MILIČIĆ I MARKO ZELJKO

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta i Veterinarskog instituta u Zagrebu)

Uvod

Do sada su se u Jugoslaviji razmjerno malo proučavali virusi krucifera, tako da sve do nedavno nije bio sigurno determiniran nijedan virus ove skupine. Najprije su Panjan i Prpić (1954) istraživali virusnu bolest na stočnom kelju, ali su na kraju rada mogli samo naslutiti da se radi o mješovitoj zarazi s virusom mozaika postrne repe (sinonimi: turnip mosaic virus, cabbage black ring spot virus) i virusom mozaika cvjetače (cauliflower mosaic virus). Poslije toga su Miličić (1956) te Miličić, Panjan, Bilanović i Katić (1958) istraživali jedan izolat iz češnjače (*Alliaria officinalis*), ali su se pri tom uglavnom ograničili na studij virusnih inkluzija. Budući da je nakon ovih posljednjih istraživanja izolat iz češnjače ostao nedeterminiran, nastojali smo tokom 1961. godine u okviru zadatka financiranog od Saveznog fonda za naučni rad odrediti taj virus.

Ekperimentalni dio rada

Već su prijašnja istraživanja pokazala (Miličić i dr. 1958) da se izolat iz češnjače daje prenijeti na druge biljke na mehanički način. Istom metodom inficirali smo i u toku ovih pokusa više biljaka važnih za determiniranje virusa krucifera, kao što su mnogi pripadnici porodice krucifera (*Brassica rapa*, *Sinapis alba* i dr.), porodice solanaceja (vrste roda *Nicotiana*) te kenopodijaceja (vrste roda *Chenopodium*). Te su vrste na infekciju često reagirale na karakterističan način. Tako su npr. na listovima vrste *Nicotiana tabacum* (White Burley i Samsun) nastajale vrlo osebujne lokalne lezije, a isto su tako i lezije na vrsti *Chenopodium amaranticolor* imale dijagnostičku vrijednost. Lezije ove posljednje vr-

ste sastojale su se od nekrotičnog središta koje je bilo okruženo najprije jednim crvenim prstenom, a zatim blijedozelenim klorotičnim ovojem (tabla I). Crvena boja prvog prstena potjecala je od antocijana, a blijedozelena drugog prstena od promjena u kloroplastima koji su u tom području bili slabije razvijeni, nego u susjednim normalnim dijelovima lista. Za razliku od navedenih biljaka, *Nicotiana glutinosa* zarazila se je sistemčno, pri čemu su se na listovima pojavile okrugle pjege koje su imale na rubu svjetliji, ponekad nekrotični, prsten. Ove vrste s karakterističnim simptomima znatno su nam pomogle prilikom utvrđivanja novih domaćara izolata iz češnjače. Redovno smo naime — da bi se izbjegle pogreške zbog eventualne kontaminacije — izvršili reinfekciju, tj. svaku novu inficiranu vrstu preispitali smo pomoću navedenih test-biljaka. Na taj način istražili smo preko 50 različitih biljaka. Ustanovili smo da izolat iz češnjače prelazi na slijedeće vrste:

Amaranthaceae: *Gomphrena globosa* L.; **Caryophyllaceae:** *Agrostemma githago* L., *Lychnis flos cuculi* L.; **Chenopodiaceae:** *Atriplex litoralis* L., *A. nitens* Schk., *Chenopodium album* L., *Ch. amaranticolor* Coste & Reyn., *Ch. quinoa* Willd., *Ch. foliosum* Aschers., *Spinacia oleracea* L.; **Compositae:** *Zinnia elegans* Lacq.; **Cruciferae:** *Alliaria officinalis* Andrž., *Arabis hirsuta* (L.) Scop., *Brassica chinensis* L., *B. rapa* var. *rapifera*, *B. napus* var. *oleifera*, *Capsella bursa pastoris* Medicus, *Cheiranthus cheiri* L., *Eruca sativa* Mill., *Hesperis candida* Kit., *H. dinarica* Beck, *H. matronalis* L., *Malcolmia maritima* R. Br., *Matthiola incana* R. Br., *Peltaria alliacea* Jacq., *Sinapis alba* L., *S. arvensis* L., *Sisymbrium officinale* Scop., *Thlaspi arvense* L.; **Papaveraceae:** *Papaver rhoeas* L.; **Resedaceae:** *Reseda luteola* L., *R. odorata* L.; **Solanaceae:** *Hyoscyamus niger* L., *Nicotiana glutinosa* L., *N. longiflora* Cav., *N. rustica* L., *N. sanderae* hort., *N. tabacum* (Samsun und White Burley), *Petunia hybrida* Vilm.

Da bi se uklonio eventualni prigovor da nismo radili sa čistim virusom nego sa smjesom virusa, bio je izolat na početku istraživanja prečišćen pomoću metode jedne lezije. Da se poslije prečišćavanja u biljkama nalazio samo jedan virus, moglo se zaključiti i na osnovi jednodličnih simptoma inficiranih biljaka.

Usporedo s navedenim pokusima pokušali smo biokemijskim metodom purificirati izolat iz češnjače. Za purifikaciju smo upotrebili metodu koju je razradio Amelunxen (1958) prilikom izolacije virusa kakteja (višeputno obaranje sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ uz centrifugiranje sa 3500 okretaja u min.). Na kraju purifikacije dobio je dosta infektivan materijal koji je fotografiran elektronskim mikroskopom (tabla II). Iako materijal nije bio čist, mogle su se u njemu zapaziti brojne nitaste čestice koje vjerojatno predstavljaju virusni izolat iz češnjače. Čestice su bile između 725 m μ i 825 m μ duge (srednja vrijednost oko 780 m μ).

Važan dio istraživanja sastojao se od tačnog određivanja termalne tačke inaktivacije izolata. Taj je postupak bio neophodno potreban za sigurnije determiniranje izolata. Istraživanja smo vršili na dvjema test-biljkama *Chenopodium amaranticolor* i *Nicotiana tabacum*. Prva biljka pokazivala je tačku inaktivacije kod 52°, a druga kod 59°.

Budući da su virusi krucifera dosta zamršena i složena skupina, bilo je potrebno usporediti naš izolat sa srodnim sojevima ili vrstama virusa. Za uspoređivanje su nam naročito služili izolati iz kupusa koji smo pronašli u Splitu i izolati iz ljubičine (*Matthiola incana*) koji je pronađen u okolici Splita. Prvi virus prenijeli smo mehanički iz splitskog kupusa na kupus sorte »varaždinsko zelje«, zatim na vrste *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Brassica rapa* var. *rapifera* (postrna repa) i *Sinapis alba*. Kako na kupusu, tako i na drugim test-biljkama nastali su pod utjecajem ovog izolata simptomi karakteristični za tipični soj virusa mozaika postrne repe (dalje VMPR). Na taj smo način dobili mogućnost da izolati iz češnjače usporedimo s ovim važnim virusom krucifera.

Drugi virus, izolati iz ljubičine, prenijeli smo na isti način također na veći broj test-biljaka. To su bile vrste: *Hesperis matronalis*, *Sinapis alba*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Chenopodium amaranticolor*, *Atriplex nitens* i dr. (Miličić 1961/1962). Taj virus mnogo se popudara s izolatom iz češnjače, pa je njegovo upoznavanje koristilo za istraživanje izolata iz češnjače.

Na kraju ovih istraživanja izvršili smo i serološke pokuse s našim izolatima iz češnjače i kupusa. Budući da su druga istraživanja govorela u prilog mišljenju da se radi o sojevima VMPR, nabavili smo ljubaznošću dr. Chr. Schade, člana Fitopatološkog zavoda Univerziteta u Halleu (Saale), antiserum od VMPR. U precipitacijskoj probi antiserum je pozitivno reagirao s djelomično pročišćenim sokom iz biljaka koje su bile inficirane izolatima iz češnjače i kupusa.

Tokom seroloških istraživanja odredili smo i titar spomenutog antiseruma s infektivnim sokom iz biljaka koje su bile zaražene izolatom iz češnjače. Titar antiseruma iznosio je 1/256. Treba spomenuti da smo za vrijeme tih istraživanja priredili i vlastiti antiserum od izolata iz češnjače. Budući da je na naš antiserum pozitivno reagirao i izolati iz kupusa, dokazali smo tim da su ovi izolati međusobno srodni.

Rezultati istraživanja

Navedeni pokusi i zapažanja, naročito simptomi na test-biljkama, omogućili su nam da odredimo virus koji smo izolirali iz češnjače. Za njega je naročito karakteristično da pozitivno reagira na sasvim obične test-biljke, kao što su *Nicotiana tabacum* i *N. glutinosa*, i da se prema tim biljkama vlada upravo suprotno od virusa mozaičke bolesti duhana. Dok virus mozaika duhana prouzrokuje na duhanu sistemsku, a na vrsti *Nicotiana glutinosa* lokalnu infekciju, naš virus izaziva na duhanu lokalno, a na biljci *N. glutinosa* sistemsko oboljenje. Prema Smithu (1957) karakteristično je upravo za VMPR da se ponaša na posljednji način. Zbog toga smatramo da naš izolati iz češnjače pripada VMPR.

Da naš izolati pripada VMPR, ne pokazuje samo vladanje navedenih dviju vrsta *Nicotiana*, nego i krug domadara ovoga izolata. Kako se može vidjeti iz već iznesenog popisa, izolati iz češnjače ne napada samo kruci-

fere, nego i mnoge solanaceje i kenopodijaceje, te pripadnike drugih porodica, a to je također svojstvo VMPR.

I elektronskomikroskopske snimke našeg izolata podupiru također naše mišljenje. Prema Bodeu i Brandesu (1958) čestice VMPR imaju nitasti oblik, duge su 754 m μ , a široke oko 12 m μ . Kako je vidljivo iz već iznesenih podataka, oblik se našeg izolata podudara sa VMPR, a isto tako i njegove dimenzije.

Naše mišljenje da se radi o VMPR, temelji se i na rezultatima istraživanja termalne tačke inaktivacije prema kojima se naš izolat inaktivira nešto iznad 58° C. To je baš područje u kojemu i VMPR gubi infektivna svojstva.

Osim toga, i serološki pokusi izvršeni s antiserumom od VMPR sigurno dokazuju da naši izolati iz češnjače i kupusa pripadaju tom virusu. Što se tiče izolata iz ljubičine (*Matthiola incana*), taj virus nismo još serološki detaljnije istražili.

Diskusija

U stručnoj literaturi nalaze se brojni podaci o virusima krucifera. U posljednje se vrijeme na osnovi modernih metoda, naročito pomoću serološke dijagnoze (Larson, Matthews i Walker 1950), ustanovilo da mnogi virusi krucifera, koji su se prije držali za posebne vrste, predstavljaju samo sojeve jednog te istoga virusa. Sojevima je osobito bogat VMPR koji je — kako se vidi iz ovoga saopćenja — i kod nas prilično raširen.

Prema Broadbentu (1957), autoru jedne monografije o virozama na vrstama roda *Brassica*, rasprostranjeno je u Velikoj Britaniji pet virusnih bolesti na ovim biljkama, ali su naročito česte dvije, i to viroza mozaika postrne repe i viroza mozaika cvjetače.

Uzročnici ovih bolesti mogu se lako razlikovati po termalnoj tački inaktivacije i po krugu domadara. Termalna tačka inaktivacije VMPR leži između 56 i 65° C, a virusa mozaika cvjetače između 70 i 80° C. Što se tiče domadara, prvi virus prelazi na biljke iz raznih familija, dok drugi može inficirati samo krucifere. Usporedimo li svojstva ovih virusa sa svojstvima naših izolata, naši se izolati podudaraju s prvim virusom. Ostale tri rjeđe viroze također se — ili po krugu domadara ili po karakterističnim simptomima na test-biljkama — znatnije razlikuju od naše viroze. To ukazuje također na to da naši izolati moraju pripadati VMPR.

Dok se izolat iz kupusa posvema podudara s tipičnim sojem VMPR, naš izolat iz češnjače udaljuje se od njega s obzirom na neka svojstva. Najznatnija se razlika između tipičnoga soja i izolata očituje u vladanju prema vrsti *Brassica oleracea*. Dok tipični soj prelazi na ovu vrstu, s izolatom iz češnjače nismo uspjeli inficirati ni jedan njen varijetet. Moramo ipak navesti da su u literaturi zabilježeni slučajevi da VMPR ponekad ne prelazi na vrstu *Brassica oleracea*. Tako npr. Smith (1947: 44) spominje da se neki sojevi VMPR ne mogu prenijeti na varijetete navedene

biljke. Isto tako ni P o u n d i W a l k e r nisu uspjeli dva soja, izolirana iz vrste *Matthiola incana*, prenijeti na neke vrste roda *Brassica*.

Navedena istraživanja upotpunili smo najzad i serološkim pokusima. Pomoću antiseruma od VMPR sa sigurnošću je utvrđeno da izolati iz češnjače i kupusa pripadaju VMPR. Antiserum za identifikaciju virusa dobili smo iz Njemačke gdje je S c h a d e (1960, 1962) pomoću njega istraživala razne sojeve VMPR.

Na kraju želimo napomenuti da je u posljednje vrijeme na području istraživanja VMPR postignut značajan uspjeh tim što je S h e p h e r d u i P o u n d u (1960) pošlo za rukom ovaj virus posve purificirati.

Z a k l j u č a k

1. Virus izoliran iz biljke *Alliaria officinalis* mehanički je prenesen na oko 40 test-biljaka. Na osnovi karakteristične reakcije test-biljaka, utvrđenog kruga domadara ovoga virusa, njegove termalne tačke inaktivacije, oblika i veličine elementarne čestice, i najzad seroloških pokusa, ustanovili smo da pripada virusu mozaika postrne repe (sinonimi: turnip mosaic virus, cabbage black ring spot virus).

2. Usporedo s tim analiziran je i izolat iz kupusa, pa je ustanovljeno da je to također soj virusa mozaika postrne repe (VMPR).

3. Na osnovi tih istraživanja proizlazi da je VMPR, koji je u Jugoslaviji bio do sada nepoznat, dosta čest u našim krajevima.

*

Za izradu priložene elektronskomikroskopske snimke zahvaljujemo i na ovom mjestu Prof. dr Z. D e v i d é u, šefu Laboratorija za elektronsku mikroskopiju Instituta »Ruder Bošković«, te dr M. W r i s c h e r, asistentici istog laboratorija. Naročitu hvalu dugujemo i dr Chr. S c h a d e, članici Fitopatološkog instituta Univerziteta u Halleu (Saale), za poslani antiserum virusa mozaika postrne repe. Najzad izražavamo zahvalnost i Saveznom fondu za naučni rad koji je materijalnom pomoći omogućio ova istraživanja.

*

Opaska prilikom korekture: Dok je ova radnja bila u tisku, objelodanjena je rasprava: J. B r č á k i Z. P o l á k, 1963: Identification of the Viruses Responsible for the Mosaic Disease of *Alliaria officinalis* Andr. in Central Bohemia. Preslia 35, 110—117. U radnji su opisana svojstva jednog izolata iz češnjače koji također pripada VMPR i koji se s obzirom na osobine podudara potpuno s izolatom iz Jugoslavije.

LITERATURA — SCHRIFTTUM

- Amelunxen, F.**, 1958: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* 49, 140—178.
- Bode, O.**, und **J. Brandes**, 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kohlrübenmosaikvirus (turnip mosaic virus). *Phytopath. Z.* 34, 103—106.
- Broadbent, L.**, 1957: Investigations of virus diseases of *Brassica* crops. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Larson, R. H.**, **R. E. F. Matthews** and **J. C. Walker**, 1950: Relationships between certain viruses affecting the genus *Brassica*. *Phytopathology* 40, 955—962.
- Miličić, D.**, 1956: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. *Protoplasma* 47, 341—346.
- Miličić, D.**, 1961/1962: Viruskörper in den Zellen von *Matthiola incana*. *Acta Bot. Croatica* 20/21, 21—34.
- Miličić, D.**, **M. Panjan**, **Đ. Bilanović** i **B. Katić**, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. *Acta Bot. Croatica* 17, 159—176.
- Miličić, D.**, **Z. Stefanac-Uđbinac** i **Đ. Mamula**, 1963: Rasprostranjenost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji. *Agronomski glasnik* 13, 92—100.
- Panjan, M.** i **Z. Prpić**, 1954: Prilog poznavanju virusne bolesti na stočnom kelju. *Biljna proizvodnja* 1954, 169—184.
- Pound, G. S.**, and **J. C. Walker**, 1945: Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reactions. *J. Agric. Res.* 71, 255—278 (citirano prema Weil, 1957, *Phytopath. Z.* 31, 52).
- Schade, Ch.**, 1960: Zur Löslichkeit des Kohlrübenmosaikvirus bei verschiedener H-Ionenkonzentration. *Phytopath. Z.* 40, 147—150.
- Schade, Ch.**, 1962: Viruskrankheiten des Rhabarbers. *Archiv für Gartenbau* 2, 113—118.
- Shepherd, R. J.**, and **G. S. Pound**, 1960: Purification of turnip mosaic virus. *Phytopathology* 50, 797—803.
- Smith, K. M.**, 1947: Virus diseases of farm and garden crops. Worcester Press, Worcester.
- Smith, K. M.**, 1957: A textbook of plant virus diseases. London.
- Weil, B.**, 1957: Thermale Inaktivierung von zwei Pflanzenviren. Ein Beitrag zur Wärmetherapie pflanzlicher Viruskrankheiten. *Phytopath. Z.* 31, 45—78.

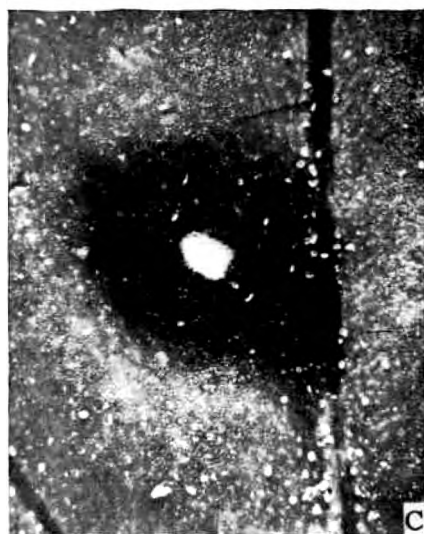
Tabla I. Lokalne lezije na listovima vrste *Chenopodium amaranticolor* A = početni stadij lezija; B = razvijene lezije čija su bijela središta okružena sa dva prstenasta ovoja: prvi je crven (na sl. tamnosiv), drugi blijedozelen (na sl. svijetlosiv); C = jedna razvijena lezija znatno povećana; D = lezija koja se razvila pri slabom osvjetljenju.

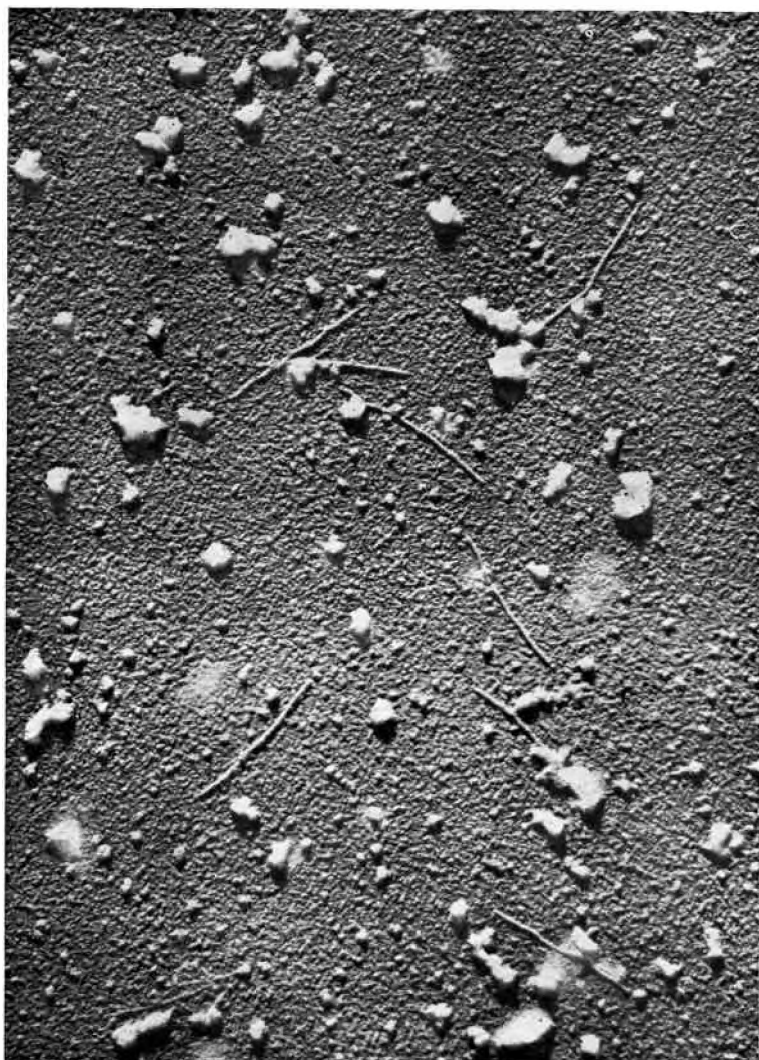
Tafel I. Lokalläsionen auf den Blättern von *Chenopodium amaranticolor*. A = Anfangsstadien; B = entwickelte Läsionen, die um die hellere Mitte zwei ringförmige und verschiedengefärbte Teile enthalten: der erste ist rot (an der Abbildung dunkelgrau), der andere blaßgrün (in der Abbildung hellgrau); C = normale, stark vergrößerte Läsion; D = Läsion, die sich bei schwacher Belichtung entwickelt hat.

Tabla II. Na slici se jasno razabira veći broj nitastih elementarnih čestica virusa mozaika postrne repe. Povećano 26.500 X.

Tafel II. Mehrere fadenförmige Elementarpartikeln des Wasserrüben- und Kohlrübenmosaikvirus sind gut sichtbar. Vergrößert 26.500 X.

TABLA I





ZUSAMMENFASSUNG

WASSERRÜBEN- UND KOHLRÜBENMOSAIKVIRUS (TURNIP MOSAIC VIRUS)
IN JUGOSLAWIEN

Zlata Stefanac-Uđbinac, Davor Miličić und Marko Zeljko

(Aus dem Botanischen Institut der Universität und dem Tierärztlichen Institut Zagreb)

Bisher wurde den Kruziferenviren-Untersuchungen in Jugoslawien nur eine geringe Aufmerksamkeit gewidmet, so daß bis unlängst in diesem Gebiete kein Virus dieser Gruppe mit Sicherheit bestimmt werden konnte. Zuerst untersuchten Panjan und Prpić (1954) eine Viruskrankheit des Markstammkohls, kamen aber dabei nur zur Vermutung, daß es sich um eine Mischinfektion mit Wasserrüben- und Kohlrübenmosaikvirus (WKMV) und Blumenkohlmosaikvirus (syn. cauliflower mosaic virus) handle. Später studierten Miličić (1956) und Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) ein Virusisolat, das aus *Alliaria officinalis* gewonnen wurde; während der Untersuchung haben besonders die intrazellularen Einschlüsse das Interesse dieser Autoren auf sich gezogen. Da selbst nach diesen Untersuchungen das Virusisolat unbestimmt blieb, bemühten wir uns während des Jahres 1961 darum, es zu determinieren.

Experimenteller Teil

Wie Miličić, Panjan, Bilanović und Katić gezeigt haben, läßt sich leicht das *Alliaria*-Isolat auf mehrere Pflanzen mechanisch übertragen. Auf diese Weise wurden von uns mit diesem Isolat manche Testpflanzen infiziert, die für die Determination der Kruziferenviren von Bedeutung sind, wie so manche Kruziferen (*Brassica rapa*, *Sinapis alba* usw.), Solanaceen (*Nicotiana*-Arten), Chenopodiaceen (*Chenopodium*-Arten) u. a. Diese Pflanzen reagierten häufig nach der Infektion charakteristisch: so z. B. entstanden auf den Blättern von *Nicotiana tabacum* (White Burley und Samsun) eigenartige Lokalläsionen, die aus einem braunen nekrotischen Ringe mit hellerer Mitte bestanden; ebenso enthielten auch die auf *Chenopodium amaranticolor* erschienenen Lokalläsionen einen diagnostischen Wert, weil sie aus einem durch Anthozyan rot gefärbten Ringe mit weißer Mitte aufgebaut waren (Tafel I). Diese Arten mit charakteristischen Symptomen waren uns bei der Feststellung neuer Wirtspflanzen des *Alliaria*-Isolates sehr nützlich. Wir haben nämlich, um genaue Angaben über den Wirtspflanzenkreis unseren Isolates zu erhalten, jede neu festgestellte Wirtspflanze mit Hilfe der erwähnten Testpflanzen nachgeprüft. Auf diese Weise wurden über 50 verschiedene Pflanzen untersucht und es wurde dabei festgestellt, daß das *Alliaria*-Isolat auf folgende Arten übertragbar ist:

Amaranthaceae: *Gomphrena globosa*; **Caryophyllaceae:** *Agrostemma githago*, *Lychnis flos cuculi*; **Chenopodiaceae:** *Atriplex litorale*, *A. nitens*, *Chenopodium album*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Ch. foliosum*, *Spi-*

nacia oleracea; **Compositae:** *Zinnia elegans*; **Cruciferae:** *Alliaria officinalis*, *Arabis hirsuta*, *Brassica chinensis*, *B. rapa* var. *rapifera*, *B. napus* var. *oleifera*, *Capsella bursa pastoris*, *Cheiranthus cheiri*, *Eruca sativa*, *Hesperis matronalis*, *H. candida*, *H. dinarica*, *Malcolmia maritima*, *Matthiola incana*, *Peltaria alliacea*, *Sinapis alba*, *S. arvensis*, *Sisymbrium officinale*, *Thlaspi arvense*; **Papaveraceae:** *Papaver rhoeas*; **Resedaceae:** *Reseda luteola*, *R. odorata*; **Solanaceae:** *Hyoscyamus niger*, *Nicotiana glutinosa*, *N. longiflora*, *N. rustica*, *N. sanderae*, *N. tabacum* »Samsun«, *N. tabacum* »White Burley«, *Petunia hybrida*.

Um dem eventuellen Einwand zu entgehen, daß wir nicht mit einem Virus, sondern mit einem Virengemisch gearbeitet haben, wurde unser Isolat am Anfang dieser Untersuchung durch Einzelherdverfahren gereinigt. Daß sich nach der Reinigung in unseren Pflanzen nur ein Virus befand, konnten wir auch auf Grund der auf den kranken Pflanzen erschienenen einförmigen Symptome beschließen.

Parallel mit diesen Experimenten versuchten wir auch mit biochemischen Methoden unser Virus zu purifizieren. Für die Purifikation wurde eine Methode von Amelunxen (1958) verwendet, mit der dieser Autor das Kakteenvirus isoliert hat (mehrmalige Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Zentrifugieren bei 3500 U/min.). Am Ende des Verfahrens zeigte sich ein ziemlich infektiöses Material erhalten, das dann im Elektronenmikroskop photographiert wurde (Tafel II). Die Virussuspension war nicht rein, dennoch konnten wir darin viele fädige Partikeln beobachten, die wahrscheinlich das in den kranken *Alliaria*-Pflanzen befindliche Virus darstellten. Die Partikeln waren zwischen 725 und 825 m μ lang (Mittelwert 780 m μ) und etwas über 10 m μ breit.

Einen wichtigen Teil dieser Untersuchung machte auch die genaue Feststellung der thermalen Inaktivierung unseres Virus aus, die besonders für seine Bestimmung von Bedeutung war. Die Untersuchung wurde mit *Chenopodium amaranticolor* und *Nicotiana tabacum* ausgeführt. Der Preßsaft der ersten Pflanze verliert die Infektionsfähigkeit bei 52°, der aus der anderen Pflanze bei 59° C.

Da die Kruziferenviren eine verwirrte und komplizierte Virengruppe sind, war es notwendig, das aus *Alliaria* gewonnene Isolat mit ähnlichen Viren oder Virusstämmen zu vergleichen. Für die Vergleichung hat uns besonders ein Isolat aus Weißkohl gedient, der in Split gesammelt wurde; in derselben Richtung hat uns auch ein aus *Matthiola incana* isoliertes Virus genützt, das ebenfalls in der Umgebung von Split aufgefunden wurde. Das erstere Virus haben wir auf *Brassica oleracea* var. *capitata* (Sorte »varaždinsko zelje«), *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Brassica rapa* var. *rapifera* und *Sinapis alba* übertragen. Wie auf dem Weißkohl, so entstanden auch auf den anderen Testpflanzen unter Einfluß dieses Virus Symptome, die für das WKMV charakteristisch sind. Mittels dieses Isolates, das typische Eigenschaften des WKMV enthielt, konnten wir die Besonderheiten des *Alliaria*-Isolates leichter erkennen.

Das andere Virus, das aus *Matthiola incana* erhalten wurde, haben wir auf dieselbe Weise auf folgende Testpflanzen übertragen: *Hesperis matronalis*, *Sinapis alba*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Chenopodium amaranticolor*, *Atriplex nitens* und andere (Miličić 1961/1962). Dieses Virus stimmte mit dem aus *Alliaria* gewonnenen Isolate gut überein, so daß die gewonnenen Kenntnisse seiner Eigenschaften uns beim Studium des *Alliaria*-Isolates sehr nützlich waren.

Die Untersuchung wurde endlich auch mit serologischen Versuchen ergänzt. Mittels eines Antiserums gegen WKMV, das uns durch die Liebenswürdigkeit von Frau Dr. Christiane Schade zur Verfügung gestellt wurde, konnten wir mit Sicherheit beweisen, daß die aus *Alliaria* und Weißkohl gewonnenen Isolate dem WKMV angehören.

Während mancher Präzipitationsversuche haben wir auch den Titer des erwähnten Antiserum mittels des Preßsaftes bestimmt, der aus mit *Alliaria*-Isolate infizierten Pflanzen erhalten wurde. Der Serumtiter betrug 1/256. Es sei noch erwähnt, daß wir dafür auch ein eigenes Antiserum gegen das *Alliaria*-Isolat bereitet haben. Da mittels dieses Antiserum auch das aus Weißkohl gewonnene Isolat positiv reagierte, wurde damit bewiesen, daß diese zwei Isolate verwandt sind.

Ergebnisse der Untersuchung

Für das *Alliaria*-Isolat ist es besonders charakteristisch, daß es auf die gebräuchlichsten Testpflanzen, wie das *Nicotiana tabacum* und *N. glutinosa* sind, übertragbar ist und daß es sich gerade umgekehrt als das Tabakmosaikvirus verhält. Während das Tabakmosaikvirus auf Tabak eine systemische und auf *N. glutinosa* eine lokale Infektion verursacht, ruft unser Virus auf Tabak eine lokale und auf *N. glutinosa* eine systemische Erkrankung hervor. Nach Smith (1957) ist das letztere Verhalten für das WKMV charakteristisch. Deshalb meinen wir, daß unser *Alliaria*-Isolat dem WKMV zugehört.

Das unser Isolat ein Stamm von WKMV ist, zeigt nicht nur sein Verhalten den erwähnten *Nicotiana*-Arten gegenüber, sondern auch der Wirtspflanzenkreis dieses Isolates. Wie aus den oben angeführten Wirtspflanzen-Verzeichnis sichtbar ist, kann das Isolat nicht nur Kreuziferen befallen, sondern auch Solanaceen, Chenopodiaceen und andere, was eben die Eigenschaft von WKMV ist.

Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Isolates unterstützen diese unsere Meinung. Nach Bode und Brandes (1958) sind die WKMV-Partikeln fadenförmig mit einer Länge von 754 m μ und Breite von 12 m μ . Wie aus den schon angeführten Angaben ersichtlich ist, stimmen die Form und die Dimensionen unseres Isolates mit denjenigen von WKMV ziemlich gut überein.

Unsere Meinung, daß es sich um WKMV handelt, gründet sich auch auf den Ergebnissen der Untersuchung der thermalen Inaktivierung nach der unser Isolat bei etwas über 58⁰ inaktiviert wird. Das ist gerade die Temperatur, bei der auch WKMV seine Infektiosität verliert.

Außerdem haben auch die serologischen Versuche, die mit einem Antiserum gegen WKMV ausgeführt wurden, mit Sicherheit bewiesen, daß unsere Isolate aus Weißkohl und *Alliaria officinalis* dem WKMV angehören. Was das Isolat aus *Matthiola incana* betrifft, wurde dieses bisher serologisch noch nicht näher geprüft.

Diskussion der Ergebnisse

Bisher ist eine große Anzahl von Kruziferenviren beschrieben worden. In neuerer Zeit wurde auf Grund neuerer Arbeitsmethoden, besonders mit Hilfe von serologischen (Larson, Matthews und Walker 1950) und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Bode und Brandes 1958) festgestellt, daß viele Kruziferenviren, die früher für besondere Virusarten gehalten wurden, Stämme ein und desselben Virus darstellen. Das WKMV zeichnet sich besonders durch viele Stämme aus. Dieses Virus ist — wie aus dieser Mitteilung hervorgeht — in Jugoslawien ziemlich verbreitet.

Nach Broadbent (1957), den Autor einer schönen Monographie über *Brassica*-Virosen, findet man in Großbritannien auf *Brassica*-Arten fünf Viruskrankheiten verbreitet, besonders häufig aber nur zwei, und zwar das Wasserrüben- und Kohlrübenmosaik und das Blumenkohlmosaik.

Diese zwei Viren lassen sich leicht nach dem Grad der thermalen Inaktivierung und dem Wirtspflanzenkreise unterscheiden. Die thermale Inaktivierung des WKMV liegt zwischen 56 und 65° C, die des Blumenkohlmosaikvirus zwischen 70 und 80°. Was die Wirtspflanzen anbelangt, kann das erste Virus verschiedene Familien, das zweite nur Kruziferen befallen. Vergleichen wir die Eigenschaften dieser zwei Viren mit den Eigenschaften unserer Isolate, so stimmen unsere Isolate mit dem ersten Virus überein.

Die übrigen drei *Brassica*-Virosen, die in Großbritannien seltener vorkommen, unterscheiden sich ziemlich scharf von unserer Krankheit, und zwar entweder nach dem Wirtspflanzenkreise oder nach den charakteristischen Testpflanzen-Symptomen.

Während das Isolat aus Weißkohl mit dem typischen Stamm völlig übereinstimmt, sind die Eigenschaften des *Alliaria*-Isolates von jenen des typischen Stammes etwas verschieden. Der wichtigste Unterschied äußert sich im Verhalten *Brassica oleracea* gegenüber. Der typische Stamm kann auf diese Art übertragen werden, demgegenüber ist das *Alliaria*-Isolat nicht imstande die Varietäten von *Brassica oleracea* zu infizieren. Es sei noch betont, daß in der Literatur Angaben zu finden sind, nach denen das WKMV auf *Brassica oleracea* manchmal nicht übertragbar ist. So z. B. schreibt Smith (1947, S. 44), daß einige WKMV-Stämme nicht fähig sind, die Varietäten von *Brassica oleracea* zu befallen. Ebenso konnten Pound und Walker zwei aus *Matthiola incana* isolierte Stämme auf einige *Brassica*-Arten nicht übertragen.

Am Ende dieser Untersuchung wurden auch serologische Versuche mit den aus *Alliaria* und *Brassica* gewonnenen Isolaten durchgeführt. Da die anderen Versuche darauf hinwiesen, daß es sich um WKMV handelt, haben wir ein hochtitriges Antiserum gegen dieses Virus verschafft und mit diesem bewiesen, daß unsere Isolate dem WKMV angehören. Das Antiserum stammte aus Deutschland, wo Schade (1960, 1962) damit verschiedene Herkünfte des WKMV studiert hat.

Es sei hier noch erwähnt, daß es in letzter Zeit den Forschern Shepherd und Pound (1960) gelungen ist, das WKMV mittels der Ultrazentrifuge in ganz reinem Zustande zu bekommen.

* * *

1. Ein von *Alliaria officinalis* gewonnenes Virusisolat wurde mechanisch auf ungefähr 40 Testpflanzen übertragen. Auf Grund der Testpflanzen-Reaktion, des Wirtspflanzenkreises, der thermalen Inaktivierung, der Form und Größe der Viruspartikeln wie auch der serologischen Versuche, konnten wir beweisen, daß dieses Isolat dem Wasserrüben- und Kohlrübenmosaikvirus (syn. turnip mosaic virus, cabbage black ring spot virus) zugehört.

2. Parallel mit diesen Versuchen wurde auch ein Isolat von Weißkohl analysiert. Dabei konnte man konstatieren, daß es auch einen Stamm des WKMV darstellt.

3. Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß das WKMV, das bisher in Jugoslawien unbekannt war, in diesem Gebiete häufig vorkommt.

*

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind wir dem Leiter des Laboratoriums für Elektronenmikroskopie des Institutes »Ruder Bošković« in Zagreb Prof. Dr. Z. Devidé wie auch der Assistentin desselben Laboratoriums Dr. Mercedes Wrischer zum besten Dank verpflichtet. Wir danken herzlichst auch Frau Dr. Ch. Schade, dem Mitglied des Phytopathologischen Institutes der Universität Halle (Saale), für das gesendete Antiserum gegen das WKMV.

*

Anmerkung bei der Korrektur: Vor kurzen ist folgende Abhandlung erschienen: J. Brčák und Z. Polák, 1963: Identification of the Viruses Responsible for the Mosaic Disease of *Alliaria officinalis* Andr. in Central Bohemia. Preslia 35, 110—117. In dieser Arbeit ist ebenfalls ein aus *Alliaria* isoliertes Virus untersucht, das als WKMV identifiziert wurde. Seine Eigenschaften entsprechen vollkommen jenen des von uns hier beschriebenen Virus.