

NOVI PRILOZI POZNAVANJU DOMADARA
I SVOJSTAVA VIRUSA KAKTEJA

Mit deutscher Zusammenfassung

NADA PLEŠE

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Uvod

Molisch (1885) je prvi, vršeći anatomske pretrage nekih vrsta roda *Epiphyllum*, otkrio u epidermskim stanicama kladodija »čudnovate« vretenaste, prstenaste i nitaste tvorbe. Molisch se dublje zainteresirao za prirodu ovih citoplazmatskih uklopina, te je na temelju izvršenih ispitivanja utvrdio da su ta tijela proteinskog karaktera. No Molisch je, kao i neki drugi istraživači (Gicklhorn 1913), ostao u zabludi vjerujući da te proteinske uklopine predstavljaju rezervnu tvar u biljnom organizmu. Klebahn (1928) je prvi posumnjao u normalni karakter proteinskih vretena i ukazao na sličnost, koju te tvorevine pokazuju sa bjelančevinastim inkluzijama u biljkama, za koje se zna da boluju od viroze. Rosenzopf (1951) je konačno dokazala, da su proteinske uklopine kakteja virusne prirode, tj. predstavljaju virusne stanične uklopine. Do ove ispravne konstatacije došla je na temelju niza eksperimenata, kojima je dokazala infektivnu moć staničnog soka bolesnih primjeraka kakteja. Rosenzopf je cijepila primjerak roda *Epiphyllum*, koji nije sadržavao proteinske stanične uklopine, na podlogu (*Pereskia*), koja je sadržavala proteinska vretena, pa je prilikom toga, u dotada zdravoj biljci, uspjela izazvati pojavu protenskih tijela. U drugom eksperimentu ona je injekcijom unijela istisnuti biljni sok virozne vrste *Pereskia* »subkultano« u zdravi primjerak roda *Epiphyllum*, i opet su se u dotada zdravoj biljci pojavile proteinske stanične uklopine. Ovi eksperimenti i činjenica da kod jednih primjeraka neke kakteje nalazimo proteinska vretena, a kod drugih ne, svakako su uvjerljiv dokaz virusne prirode proteinskih staničnih uklopina kakteja.

Osim kristaličnih uklopina (vretena, niti, prstenovi), otkrivena su kod viroznih kakteja i amorfna, granulirana i vakuolizirana x-tijela (Weber, Kenda i Thaler 1952, Miličić 1954, Miličić i

Plavšić 1956, Amelunxen 1956a). Najčešće su x-tijela zapažena u mladim kladodijima, što ide u prilog tvrdnji nekih autora, da se proteinska vretena često razvijaju iz x-tijela. Virusne čestice se u tom slučaju pravilno rasporede i agregiraju u parakristaličnu tvorevinu — proteinsko vreteno (Weber, Kenda i Thaler 1952, Amelunxen 1956b). Prema mišljenju Miličića (1960, 1961) proteinska se vretena mogu razvijati također direktno, bez posredovanja x-tijela. Ovu tvrdnju Miličić bazira na svojim zapažanjima prilikom izvođenja mehaničkog prijenosa virusa kakteja na zdrave primjerke kakteja i neke vrste roda *Chenopodium*. Infekcija je izvedena trljanjem kladodija, odnosno listova pokusnih egzemplara infektivnim sokom uz dodatak karborunduma. Međutim, u inficiranim kladodijima i listovima spomenutih rodova, Miličić nije nikada zapazio x-tijela, te na osnovi toga zaključuje da se proteinska vretena izgrađuju direktno.

Veliki doprinos u istraživanju i poznavanju virusa kakteja dao je Amelunxen (1958), koji je na temelju svojih elektronskomikroskopskih istraživanja odredio veličinu i oblik virusnih čestica, kao i njihov kemijski sastav i strukturu. Prema Amelunxenu čestice virusa kakteja su produžene, prilično fleksibilne tvorevine, čija dužina iznosi 500—520 m μ , a debljina 22 m μ . Što se tiče kemijskog sastava i submikroskopske strukture virusnih čestica (makromolekula), svaka se čestica sastoji od centralne niti, koja je izgrađena iz ribonukleinske kiseline (RNK) i proteinskog omotača, koji je zapravo sastavljen od velikog broja pločastih djelića nanizanih na centralnu nit RNK, tako da kod virusnih makromolekula možemo uočiti poprečne pruge koje se periodično ponavljaju.

Poznato je da se virus kakteja u svojim domadarima iz porodice *Cactaceae* nalazi u latentnom stanju i uglavnom ne prouzrokuje vidljive patološke promjene ili simptome oboljenja. No to nije apsolutna pojava, jer prema navedenim autorima (Blattný i Vukolov 1932, Weber 1953, Miličić 1954, Kenda 1955, Chessin, Solberg i Fisher 1963) ipak neke virozne kakteje pokazuju ponekad i vanjske simptome oboljenja — pjegavost, panaširu, žutilo, nabiranje i nekrozu kladodija. Ako razmotrimo gore navedene činjenice, onda je svakako bilo od neobične važnosti otkriće Miličića i Uđbinac (1961) te Miličića (1962), koji su uspjeli prenijeti virus kakteja na nove domadare (*Chenopodium amaranticolor*, *Ch. album*, *Beta vulgaris*, *Agrostemma githago*), koji ne pripadaju porodici *Cactaceae*. Dapače, neki od tih domadara burno su reagirali, pa su na listovima nastale patološke promjene u vidu brojnih nekrotičnih i klorotičnih lezija. Otkriće je veoma važno za bolje upoznavanje virusa kakteja. Znatno su olakšana naučna istraživanja ovoga virusa, budući da novi domadari pokazuju vanjske simptome oboljenja, a uz to su po svojoj anatomskoj građi mnogo prikladniji za razne postupke istraživanja, nego li sukulentni i sluzavi kladodiji kakteja.

Prema izjavama istraživača Sammons i Chessin (1961) i istraživanjima Brandesa i Bercksa (1962/63) dolazi kod kakteja

više različitih vrsta virusa. Brandes i Bercks su ispitivali različite kakteje i pri tom su u svojim istraživanjima ustanovili dva različita virusa: cactus virus 1 (*cactus virus X*), koji ima dužinu čestica 515 m μ , i cactus virus 2, čija dužina čestica iznosi 650 m μ . Kraći virus je, čini se, indentičan s onim što ga je izmjerio Amelunxen (1958) i više je rasprostranjen, jer su našli spomenute virusne čestice u 25 različitih vrsta kakteja iz botaničkih vrtova, a među njima i kod vrste *Opuntia monacantha*. Sammons i Chessin (1961) su također izmjerili dva virusa kakteja sa dužinom čestica od 515 m μ i sa dužinom čestica 300 m μ . Detaljnija istraživanja ovog drugog, mnogo kraćeg virusa još nisu završena.

Budući da materijal iz Zagreba nije bio istražen elektronskomikroskopski ni serološki ispitan, a isto tako detaljnije ni krug domadara, naročito što se tiče biljaka koje nisu kakteje, usmjerili smo svoja istraživanja virusa kakteja u tom pravcu.

VLASTITA ISTRAŽIVANJA

Pročišćivanje izolata metodom jedne lezije

Prvi zadatak u našem istraživanju virusa kakteja sastojao se u tome da pokušamo iz neke kakteje izolirati određenu vrstu, odnosno soj virusa kakteja, jer smo smatrali da kod kakteja može dolaziti smjesa dviju (možda i više) različitih vrsta ili sojeva virusa. U tu je svrhu odabrana virozna kakteja *Zygocactus (Epiphyllum) bridgesii*, koja nam je među ostalima stajala na raspolaganju u Botaničkom vrtu Sveučilišta u Zagrebu. Taj je primjerak imao vrlo mnogo proteinskih vretena u epidermi kladodija.

Iz plošnih presjeka kladodija istisnuto je nešto sluzavog biljnog soka, pomiješano s par kapi dest. H₂O i inokulirano na listove test-biljke *Chenopodium amaranticolor*. Nakon 15 dana pojavile su se na plojci listova brojne lokalne lezije, raspoređene dosta gusto, tako da su se mnoge međusobno stapale. Koliko se moglo zapaziti, lezije su bile uglavnom klorotičkog karaktera, tu i tamo zapažena je poneka nekroza. Jako uočljive bile su lezije sa crvenim antocijanskim obojenjem, koje je često i neujednačeno prekrivalo gotovo cijelu leziju i davalo joj izgled više manje nepravilne pjege; ponegdje se opet intenzivnije obojenje javljalo na rubu lezije, što je davalo utisak da leziju okružuje širi ili uži antocijanski prsten. U lumenu lezije nerijetko je zapažena jedna ili više sitnih, žuto-smeđih nekroza, koje su se često, uslijed crveno obojenih susjednih tkiva, jedva zapažale.

Jedna od ovih lezija izolirana je prema metodi McWorthera (1951) i prenesena na dva lista zdrave test-biljke *Chenopodium amaranticolor*. Često puta se pokazalo, da nije dovoljno samo jednom provesti postupak izolacije, jer u leziji može biti smjesa dviju različitih čestica. Da bismo isključili mogućnost da se u izoliranoj leziji nađe smjesa dviju

različitih virusnih čestica, izolirana je po jedna lezija nekoliko puta uzastopce. Prilikom druge izolacije nastao je na listovima test-biljke veći broj klorotičnih lezija i nekoliko nekrotičnih lezija. Nekrotične su se lezije veoma dobro zapažale, i to zahvaljujući svojoj naročitoj morfoloiji. Na upadnom svjetlu vidi se žutozelen, okrugao ili više manje nepravilan nekrotični centar, a uokolo njega je žućkastozeleni klorotični rub koji, promatrano na upadnom svjetlu, postepeno prelazi u normalno zelenilo. Ako leziju promatramo u prolaznom svjetlu, vidimo smeđi nekrotični centralni dio, a okolo je prozirni klorotični prsten sa oštrom granicom prema normalnom zelenom dijelu plojke.

Ako su povoljni vremenski uvjeti (pogodna temperatura i sunčano vrijeme), centralni dio nekroze postaje redovno srebrnastobijele boje, a nekroza se širi i zahvaća cijelu leziju. Veličina tih lezija kreće se od 1—2 mm u promjeru. U daljnjem postupku izolacije i pročišćavanja virusa bila je izabrana jedna od tih »oštrih nekrotičnih lezija«. Postupak je ponovljen, i treći izolat je dao veći broj klorotičnih lezija i dvije gore opisane nekrotične lezije, koje su na plojci lista bile prilično udaljene od susjednih lezija. Pošto je proveden posljednji stepen izolacije ovih lezija, na listovima inokulirane test-biljke javile su se brojne okrugle nekrotične lezije, identične sa gore opisanim nekrotičnim lezijama koje su bile određene za izolaciju (tab. IV, sl. 17, 18. i 19).

Virusne uklopine ovih lezija morfološki su se međusobno razlikovale. Često smo nalazili prava vretena, ali nisu bile rijetke nitaste tvorvine, petlje, kolutovi i prstenaste tvorbe.

Identifikacija virusa

A m e l u n x e n (1958) je u svojim elektronskomikroskopskim istraživanjima ustanovio da virus kakteja ima dužinu čestica od 500—520 m μ . I S a m m o n s i C h e s s i n su u Americi pronašli jedan virus kakteja koji je također imao dužinu čestica od 515 m μ . Isti ili sličan virus proučavali su B r a n d e s i B e r c k s, izmjerili su njegovu dužinu od 515 m μ i nazvali ga *cactus virus X*. Pored ovog virusa ili skupine virusa, koji imaju dužinu čestica od 515 m μ , pronašli su B r a n d e s i W e t t e r jedan drugi virus, *cactus virus 2*, koji ima dužinu 650 m μ , a S a m m o n s i C h e s s i n treći virus kakteja sa dužinom čestica od 300 m μ .

Budući da naš izolat iz Zagreba nije bio detaljnije elektronskomikroskopski istražen, izvršeno je to u Braunschweigu ljubaznošću dra J. B r a n d e s a. Mjerenjem velikog broja čestica ustanovilo se da izolat iz Zagreba sadrži čestice jednolične veličine od 512 m μ dužine (tab. VI), pa se praktički ne razlikuje po veličini od *cactus virus 1*, odnosno *cactus virus X*.

Isto je tako prilikom boravka u Braunschweigu prof. D. Miličić imao priliku mikroskopski istraživati tri izolata virusa kakteja, koji su svi imali dužinu čestica oko 515 m μ . Promatrane i uspoređivane su bile uklopine izolata J. B r a n d e s a u Braunschweigu, našeg izolata iz Za-

greba te jednog izolata koji je u Braunschweig poslao prof. Chessin iz SAD. Prilikom mikroskopiranja listova vrste *Chenopodium quinoa* utvrđeno je da i izolat iz Braunschweiga i izolat iz SAD također izazivlju u inficiranom tkivu pojavu proteinskih vretena. Proteinska vretena pojedinih izolata međusobno su se ponešto razlikovala. Tako su npr. vretena materijala iz Amerike imala oblik kratkih rafida, inkluzije virusa iz Braunschweiga imale su vrlo često oblik dugih savijenih niti, dok je izolat iz Zagreba, koji se kultivirao u istim uvjetima, sadržavao dosta tipična vretena, većinom opružena i na vrhu zašiljena.

Prema tome, svi do sada poznati izolati virusa kakteja, koji su dugi oko 515 m μ , izazivlju u stanicama svojih domadara proteinska vretena. Na osnovi toga može se smatrati da su proteinska vretena kakteja barem vrlo često izgrađena od virusa dužine 515 m μ . S obzirom na to što oblik inkluzija pojedinog izolata dosta varira, pitanje je da li bi se ove razlike mogle uzeti kao kriterij za razlučivanje izolata.

Da bi se utvrdila srodstvena veza između virusa iz Braunschweiga i našeg izolata, prišli smo serološkim istraživanjima. Priredili smo antiserum protiv našeg izolata virusa kakteja koji je imao homologni titar 1:2048. Ovaj isti antiserum reagirao je sa izolatom iz Braunschweiga samo do razređenja seruma 1:64. Budući da je serološka razlika između izolata iz Zagreba i Braunschweiga velika, tj. veća od normalnih seroloških razlika između sojeva istoga virusa, smatramo da to nisu sojevi istoga virusa nego udaljene varijante jedne virusne vrste ili da se čak radi o posebnim virusima.

Izvršena su i preliminarna istraživanja na izolatu iz Zagreba, da se utvrdi termalna tačka inaktivacije i krajnja tačka razređenja virusa. Iz izvedenih pokusa mogli smo utvrditi da termalna tačka inaktivacije leži između 81—82° C. Sličan rezultat dobili su Brandes i Bercks (1962/63) radeći na spomenutom izolatu iz Braunschweiga, koji ima jednaku dužinu kao i naš virus i stvara inkluzije u obliku proteinskih vretena. Pokusi su izvedeni na vrsti *Chenopodium amaranticolor*.

Krajnja tačka razređenja infektivnog soka, prema našim rezultatima, leži između razređenja 10⁵ i 10⁶, što ukazuje na veliku infektivnu snagu virusa. Ova smo istraživanja vršili pomoću vrste *Chenopodium quinoa* upotrebljavajući pri tom inokulirane listove, koji sadrže najviše virusa. Ista je vrsta služila ne samo za dobivanje infektivnog soka nego i kao test-biljka za ustanovljenje krajnje tačke razređenja.

Novi domadari virusa kakteja

Nakon postupka izolacije virusa prešli smo na istraživanja koja su imala svrhu da se pronađu novi domadari virusa kakteja što ne pripadaju porodici *Cactaceae*. Već smo ranije istakli važnost takvih istraživanja za poznavanje virusa kakteja.

Potruga za novim domadarima virusa kakteja bila je opet usmjerena na porodice koje su u filogenetskoj srodnosti s porodicom *Cactaceae*, a to su *Chenopodiaceae*, *Amarantaceae* i *Caryophyllaceae*. Virus smo us-

TABLICA 1 - TABELLE 1

Popis domadara virusa kakteja, koji ne pripadaju porodici kakteja, i način njihove reakcije nakon infekcije

Verzeichnis der den Cactaceen nicht angehörenden Kakteenvirus-Wirtspflanzen mit der Angabe ihrer Reaktionen nach der Infektion

Domadari (Wirtspflanzen)	Inkubacija (dani - Tage)	Karakter infekcije	Vanjski simptomi (Äußere Symptome)
<i>Chenopodiaceae</i>			
<i>Chenopodium amaranticolor</i> L.	7— 8	lok.	Nl.
<i>Beta vulgaris</i> L.	—	lok.	L.
<i>Chenopodium album</i> L.	8—10	lok.	Nl.
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	5— 6	sist.	Nl.
<i>Chenopodium urbicum</i> L.	10—15	lok.	Kl.
<i>Chenopodium anthelminticum</i> L.	8—10	lok.	Kl.
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	8—10	lok.	Kl.
<i>Chenopodium foliosum</i> Aschers.	—	lok.	Kl.
<i>Chenopodium rubrum</i> L.	10—12	lok.	Kl.
<i>Chenopodium foetidum</i> Schrad.	10—15	lok.	Kl.
<i>Chenopodium murale</i> L.	5— 8	lok.	Nl.
<i>Amarantaceae</i>			
<i>Amarantus retroflexus</i> L.	10—15	lok.	Kl.
<i>Amarantus silvester</i> Desf.	10—12	lok.	Kl. i N.
<i>Amarantus hybridus</i> L.	10	lok.	Kl. i N.
<i>Amarantus lividus</i> L.	—	lok.	L.
<i>Amarantus caudatus</i> L.	8	sist.	Nl. i N.
<i>Celosia cristata</i> L.	10	sist.	Nl.
<i>Celosia argentea</i> L.	10	lok.	Nl.
<i>Caryophyllaceae</i>			
<i>Melandrium rubrum</i> Garcke	—	lok.	L.
<i>Silene vulgaris</i> (Mnch.) Garcke	—	lok.	L.
<i>Agrostemma githago</i> L.	—	lok.	L.
<i>Labiatae</i>			
<i>Ocimum basilicum</i> L.	10	lok.	N.

N. — nekroze (Nekrosen)

L. — latentan (latent)

Nl. — nekrotične lezije (nekrotische Läsionen)

Kl. — klorotične lezije (chlorotische Läsionen)

sist. — sistemična infekcija (systemische Infektion)

lok. — lokalna infekcija (lokale Infektion)

pjeli prenijeti na veći broj novih biljnih vrsta koje pripadaju spomenutim porodicama, i tako smo unutar reda *Centrospermae* znatno proširili krug domadara virusa kakteja (tablica 1).

No isto smo tako pokušali inficirati i neke predstavnike mnogih drugih porodica koje nemaju filogenetsko srodstvo s porodicom *Cactaceae*. Kod tih biljaka imali smo uspjeha samo kod vrste *Ocimum basili-*

cum iz porodice *Labiatae*. Nismo uspjeli inficirati ove biljne vrste: *Begonia semperflorens* Lk., *Centaurea jacea* L., *Crepis biennis* L., *Calendula officinalis* L., *Galinsoga parviflora* Cav., *Zinnia elegans* Jacq., *Calistephus chinensis* (L.) Nees., *Brassica oleracea* L., *Capsella bursa pastoris* (L.) Med., *Hesperis dinarica* Beck., *Matthiola incana* (L.) R. Br., *Malva silvestris* L., *Hibiscus abelmoschus* L., *Convolvulus arvensis* L., *Impatiens balsamina* L., *Plantago major* L., *Trifolium pratense* L., *Vigna sinensis* (Torn.) Endl., *Nicotiana tabacum* L., *Salvia pratensis* L., *Antirrhinum majus* L., *Parietaria officinalis* L., *Solanum nigrum* L., *Datura stramonium* L., *Rhoeum undulatum* L., *Fagopyrum sagittatum* Gilib., *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.

U pokusu smo imali 5—6 primjeraka od svake ispitivane biljne vrste. Inokulacija je izvedena mehaničkim putem — trljanjem lisnih plojki infektivnim sokom uz dodatak karborunduma. Eksperimenti su vršeni u stakleniku, i to u maju i junu, te u oktobru na nekim predstavnicima iz porodice *Amarantaceae* (*Amarantus caudatus*, *A. lividus*, *A. hybridus*, *Celosia cristata*), na vrsti *Ocimum basilicum* i na svim onim vrstama koje su dale negativnu reakciju.

Prilikom eksperimenata koje smo vršili u jesen koristili smo proizvedeni homologni antiserum da bismo kod inficiranih vrsta sa sigurnošću utvrdili o kakvoj se vrsti infekcije radi. U tu smo svrhu biljni sok inokuliranih i gornjih neinokuliranih listova i sok iz zdravih kontrolnih primjeraka, ispitivali proizvedenim antiserumom uz primjenu kapljičnog testa. Rezultati ovih ispitivanja potvrdili su, s obzirom na vrstu infekcije, naše prethodne konstatacije, koje su usvojene na temelju promatranja vanjskih simptoma.

Spomenut ćemo nove domadare virusa kakteja i ukratko opisati vanjske simptome oboljenja, odnosno reakciju tih biljaka na prisustvo virusa. Kao izvor infektivnog soka služile su nam biljke *Chenopodium amaranticolor* i *Ch. quinoa*.

Por. *Chenopodiaceae*

Chenopodium urbicum L. Vrijeme inkubacije iznosi oko 10 dana, a infekcija je lokalna. Na listovima se javljaju veoma izrazite klorotične lezije promjera 2—4 mm (tab. IV, sl. 20), u čijem se staničju nalaze proteinska vretena i drugačije oblikovane proteinske virusne uklopine.

Chenopodium ambrosioides L. Inkubacija traje 8—10 dana, a infekcija je lokalna. Na inokuliranim listovima nalazimo malobrojne klorotične lezije, dobro vidljive samo u prolaznom svjetlu kao prozirnije i svijetlozelene pjege. Lezije su više-manje okrugle, ili su to veće klorotične mrlje, ponekad nepravilna oblika. Promjer lezija kreće se od 2—4 mm. U području lezija nalaze se vretenaste virusne uklopine.

Chenopodium anthelminticum L. Vanjski simptomi su poveće, češće okrugle klorotične lezije, veličine 3—5 mm, vidljive u prolaznom svjetlu kao prozirnije i svjetlije zelene mrlje nejasnih kontura. Na upadnom svjetlu lezije se naziru u slučaju ako je plojka lista prethodno zasjenjena.

Ponegdje se susjedne lezije međusobno stapaju u veće klorotične pjege. Pojedine lisne plojke sadrže 2—10 lezija. Uklopine su vretenaste.

Chenopodium foliosum Aschers. Pošto je očekivani period inkubacije (oko 10 dana) prošao, a vanjskih simptoma infekcije nije bilo, odlučili smo da ipak mikroskopski istražimo plošne presjeke lisne plojke, ali uklopine nismo našli. Tek nakon 20 dana iza inokulacije, pojavile su se na već požutjeloj plojci jednog inokuliranog primjerka 2—3 zelene pjege, a mikroskopskim pregledom utvrđena su vretena. Infekcija je lokalna.

Chenopodium rubrum L. Inkubacija traje 10—12 dana. Infekcija je lokalna. Na inokuliranim listovima obrazuju se povećane pjege, no one se mogu uočiti samo pažljivim promatranjem, i to na prolaznom svjetlu. Tada izgledaju kao nešto svjetlije zelena i prozirnija područja plojke. Pjege se mogu postepeno stapati u velike nepravilne klorotične regije, koje se bojom tek neznatno razlikuju od normalno zelenog dijela plojke. Virusne uklopine su vretenaste.

Chenopodium foetidum Schrad. Vrijeme inkubacije iznosi 10—15 dana. Infekcija je lokalna. Inokulirani listovi zapravo su bez vanjskih simptoma, plojke su jednolično zelene, ali kada su napravljeni plošni presjeci svuda su nađene vretenaste i nitaste virusne uklopine. Kada su inficirani listovi ostarjeli, javile su se na požutjeloj plojci blago zeleno nahukane, ponekad nepravilne pjege s proteinskim vretenima u staničju.

Chenopodium murale L. Vrijeme inkubacije iznosi oko 8 dana, a infekcija je lokalna. Inokulirani listovi pokazuju u prolaznom svjetlu dobro vidljive, okrugle, sitne (promjer 0,5—1 mm) i veoma gusto raspoređene lezije s intenzivnije zelenim obrubom i klorotičnim centralnim dijelom, koji ubrzo nekrotizira. U živom staničju lezija utvrđene su proteinske virusne uklopine.

Por. *Amarantaceae*

Amarantus retroflexus L. Vrijeme inkubacije iznosi 10—15 dana. Infekcija je lokalna. Inficirana biljka dosta slabo reagira na prisutnost virusa. Kad smo izvršili prvi pokus infekcije, inokulirani listovi nisu pokazivali nikakve simptome, ali prilikom mikroskopskog pregleda plošnih presjeka epiderme, nađena su tu i tamo proteinska vretena (tab. I, sl. 4—7). Prilikom drugog pokusa infekcije na inokuliranim listovima opazili smo nekoliko okruglih klorotičnih pjega promjera 3—5 mm. Na upadnom svjetlu lezije se naziru kao klorotične mrlje, no dobro su vidljive, ako lisnu plojku promatramo na prolaznom svjetlu. Tada lezije izgledaju kao područja koja su prozirnija od zdravog dijela lisne plojke.

Amarantus silvester Desf. Inkubacija iznosi 10—12 dana. Prilikom pojave vanjskih simptoma zapažaju se na inokuliranim listovima brojne klorotične pjege, veličine 3—4 mm. Lezije se dobro vide samo na prolaznom svjetlu kao slabije zelena i prozirnija područja. Zbog velike međusobne blizine lezije se često stapaju. Kasnije se na tim inficiranim li-

stovima javlja drugi tip simptoma. Lisne plojke ospu se tamnosmeđim pjegama, koje zapravo predstavljaju nekroze. Veličina tih smeđih nekroza iznosi 1—2 mm u promjeru. Nekroze su često nepravilna oblika, a prema normalno zelenom dijelu plojke ograničene su intenzivnije zelenim područjem i uskim klorotičnim pojasom (tab. V, sl. 24). U epidermskim stanicama inficiranih listova utvrđene su brojne vretenaste virusne inkluzije.

Amarantus hybridus L. Vrijeme inkubacije iznosi 10 dana. Infekcija je lokalna. Na inokuliranim listovima javile su se brojne lezije, kod kojih se, naročito na prolaznom svjetlu, ističe smeđi prsten koji uokviruje tek primjetljivo klorotičan središnji dio. Ponegdje se na lisnoj plojci javljaju i smeđe nekrotične pjegice. Virusne uklopine su česte (tab. III, sl. 12. i 13).

Amarantus lividus L. Inkubacija iznosi 8—10 dana. Infekcija je lokalna. Na inficiranim biljakama nismo zapazili nikakve simptome. Možda je teškoća zapažanja u tome što je cijela biljka, zbog antocijana u epidermskim i subepidermskim stanicama tamnocrveno obojena. Prilikom mikroskopskog pregleda plošnih presjeka utvrđeno je da su na više mjesta u epidermi inokuliranih listova lokalizirana vretena.

Amarantus caudatus L. Osam dana nakon inokulacije zapažene su na inficiranim listovima sitne, tamnosmeđe, tačkaste nekroze, veličine oko 0,5 mm koje se postepeno povećavaju (tab. V, sl. 21.). U staničju oko tih nekrotičnih pjegica nađena su brojna velika i lijepa vretena (tab. II, sl. 8—11). Otprilike mjesec i pol dana kasnije pojavile su se na gornjim neinokuliranim mladim listovima smeđe nekroze, koje su prvenstveno zapažene na donjoj epidermi lista, a zahvatile su epidermske stanice glavnih nerava, te nešto kasnije i finiju nervaturu lista. Istovremeno se plojka lista osula brojnim smeđim nekrozama vrlo različita oblika i veličine, te na plojci susrećemo sitne smeđe nekrotične tačkice, veće nekroze nepravilna oblika i oštro oivičene ili smeđe prstenaste nekroze (tab. V, sl. 22). U vrlo produženim epidermskim stanicama lisne nervature nađena su tanka i jako produžena proteinska vretena (tab. III, sl. 14—16). Na nekim listovima javljaju se patološke promjene u vidu deformacije lista, koje se očituju u zdjelicačastom obliku ili djelomičnoj naboranosti lisne plojke. Očito je da je infekcija sistemična.

Celosia cristata L. Nakon 8—10 dana inkubacije ispoljuju se na inokuliranim listovima vidljivi simptomi. To su crvenosmeđe često nepravilne pjege (promjera 1—3 mm), u čijem se centralnom dijelu javlja jedna ili više sivkastosmeđih nepravilnih nekroza. Ove nekroze dolaze manje do izražaja zbog crvenog autocijanskog obojenja same lezije. U prvom pokusu, koji je izveden u mjesecu maju i junu utvrdili smo lokalnu infekciju. No pri ponovljenoj inokulaciji ove vrste u jesen, primijećeni su 10 dana iza pojave primarnih simptoma virozni simptomi na neinokuliranim listovima, koji su smješteni tik iznad inokuliranih, što znači da je infekcija prešla na gornje listove. Virusne uklopine su vretenaste (tab. I, sl. 1. i 2).

Celosia argentea L. Iz jednog izvedenog pokusa čini se da je infekcija lokalna. Vrijeme inkubacije kao i vanjski simptomi podudaraju se s onima kod vrste *C. cristata*.

Por. *Caryophyllaceae*

Melandrium rubrum Garcke. Vrijeme inkubacije iznosilo je 10—15 dana. Infekcija je lokalna. Vanjski simptomi oboljenja nisu zapaženi, a prilikom pravljenja plošnih presjeka nađene su u stanicama vretenaste i nitaste virusne uklopine. Budući da su epidermske stanice ove biljke velike, to su se u njima razvile isto tako lijepe i velike uklopine.

Silene vulgaris (Mch.) Garcke. Inkubacija traje 10—15 dana. Infekcija je lokalna. Biljka ne pokazuje vanjske simptome oboljenja. Mikroskopskim pregledom listova nađena su u pojedinim stanicama vretena, no općenito su virusne inkluzije bile vrlo rijetko zastupljene.

Por. *Labiatae*

Ocimum basilicum L. poznata je u virologiji kao dobra test-biljka, (Lovisolo 1961). Vrijeme inkubacije iznosi 10—12 dana. Na plojci inokuliranih listova javlja se tu i tamo poneka veća klorotična lezija djelomično ili potpuno okružena nepravilnom, tamnosmeđom nekrozom. U klorotičnom dijelu lezije lokalizirane su vretenaste virusne uklopine. No isto tako te nepravilne, smeđe nekroze mogu zahvatiti i veće dijelove plojke između nerava. U tom slučaju nalazi se na granici nekrotičnog i zdravog dijela plojke svjetlije zeleni pojas u kome su lokalizirane virusne uklopine. Nekroze pokazuju stalnu tendenciju širenja i povećavanja (tab. V, sl. 23).

Priređivanje antiseruma i titar

U modernoj nauci serologija zauzima vrlo važno mjesto. Rezultati virusne serologije koriste se danas u praksi naročito u suzbijanju viroze krumpira.

Bjelančevina je tvar s najjačim antigenim svojstvima, i kada se nađe u stranom organizmu izaziva u njemu stvaranje odgovarajućih antitijela. Čestice biljnih virusa posjeduju antigena svojstva, i unesene u životinjski organizam izazivlju produkciju specifičnih antitijela.

Radi potreba istraživanja pristupili smo imunizaciji kunića, da bismo proizveli antiserum za naš izolat virusa kakteja. Kao izvor infektivnog soka služila nam je biljka *Chenopodium quinoa*, koju smo inficirali našim pročišćenim izolatom, a koja inače na virus kakteja reagira sistemski, s time da najveću koncentraciju postiže virus u inkuliranim listovima. Prije imunizacije, odnosno injiciranja antigena u organizam kunića, djelomično smo purificirali virus — izvršeno je samo jedno obaranje sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ prema postupku Amelunxena (1958). Prilikom procesa purifikacije koncentriran je virusni sok na 1/10 od ishodnog volumena. Imunizacija kunića izvedena je na taj način da je 4 dana uzastopno unesen u životinjski organizam po 1 cm³ purificiranog virusnog soka, zatim

je nakon 4 dana pauze navedeni postupak ponovljen. Nakon provedene imunizacije, svakih 7 dana ispitivan je titar antiseruma.

Određivanje titra vršeno je makroskopskom metodom u malim epru-
vetama i metodom kapljičnog testa. Čini se da je druga metoda nešto
osjetljivija i zato preciznija. Serološke probe kapljičnim testom izvede
se na predmetnom stakalcu. Upotrebom pipeta pomiješa se 0,93 cm³
(kapljica) antiseruma sa istom količinom antigena. Nakon boravka od
45 min. u termostatu u vlažnoj sredini i pri temperaturi 25° C predmetna
stakalca s kapljicom stavljaju se pod mikroskop te se u tamnom vidnom
polju utvrđuje pojava ili odsutnost precipitacije.

Prvi tjedan nakon imunizacije titar antiseruma iznosio je 1 : 512,
a kod daljnja dva mjerenja utvrđen je pad titra na 256. Mjesec i pol dana
kasnije titar antiseruma pao je na 1 : 64. Da bismo ponovno povisili
titar antiseruma, odnosno koncentraciju antitijela u krvi životinje, dane
su kunićima dvije booster-injekcije, tj. smjesa parafinskog ulja (2,95 ml),
arlacela (0,2 ml), antigena (1,85 ml). Sedam dana nakon injekcije s adju-
vansom kontrolirali smo ponovo titar antiseruma i konstatairali da je
porastao na 1 : 1024. Već smo spomenuli da smo titar antiseruma odre-
đivali makroskopski i metodom kapljičnog testa (Tropfentest). Čini se
da je i u ovom slučaju kapljični test bio osjetljiviji od prvo spomenute
metode, jer je titar mjeren prema ovoj metodi iznosio i 1 : 2048.

Priređeni antiserum koristili smo, kako smo već spomenuli, da bi-
smo kod nekih novih domadara sa sigurnošću utvrdili vrstu infekcije,
tj. radi li se o lokalnoj ili sistemičnoj infekciji.

Virus kakteja u Jugoslaviji

Prema dosadašnjim istraživanjima čini se da proteinska vretena iz-
građuje virus kakteja s veličinom čestica od 515 m μ , dok za viruse od
650 m μ i 300 m μ nisu još istražena eventualna virusna tijela. Prvi virus
kakteja nalazi se u mnogim domadarima iz porodice kakteja u latentnom
stanju i u njima redovito obrazuje dobro izražena proteinska vretena.
Nazočnost vretena sigurniji je dokaz da su biljke inficirane ovim virusom
nego eventualni vanjski simptomi, budući da simptomi još nisu naj-
bolje poznati.

Zbog toga je Miličić (1956 a) rasprostranjenost ove viroze u Ju-
goslaviji utvrđivao na osnovi nazočnosti proteinskih vretena. Miličić je
istraživao kakteje iz roda *Opuntia*, koje rastu u primorskim područjima
i otocima Jugoslavije, te se kultiviraju u alejama, parkovima, vrtovima
i rasadnicima, ili su se razvile spontano i rastu kao podivljale vrste. Tom
prilikom vršene su mikroskopske pretrage velikog broja primjeraka po-
divljalih i uzgajanih opuncija (*Opuntia compressa*, *O. ficus-indica*, *O.*
inermis, *O. monacantha*, *O. microdasys* i dr.) u svrhu utvrđivanja vi-
rusnih uklopina.

U toku ovih istraživanja duž obale Jadrana, spomenuti autor nije
mogao utvrditi niti jedan primjerak podivljale opuncije, koji bi sadrža-
vao virusne inkluzije. Izgleda, prema tome, da opuncije koje spontano

rastu uz našu obalu nisu virusno oboljele. Nasuprot tome, kod opuncija koje su uzgajane kao ukrasne biljke u vrtovima, parkovima i rasadnicima, sretani su češće inficirani primjerci.

Rezultati ovih ispitivanja navode na zaključak, da su se podivljale kolonije opuncija, koje rastu spontano u našem primorju, razvile iz sjemenki te zbog toga ne sadrže proteinska vretena, budući da se virus kakteja ne prenosi sjemenkama (Miličić (1959/1960). Naprotiv, kakteje koje uzgaja čovjek kao ukrasne, obično se razmnožavaju vegetativno pomoću sadnica, te se zbog toga ne prekida kontinuitet virusnog oboljenja.

DISKUSIJA

Trebalo je proći oko 70 godina (Molisch 1885), da bi se konačno utvrdilo (Rosenzopf 1951, Melunxen 1956) da su proteinske vretenaste uklopine mnogih kakteja virusne prirode i da predstavljaju jedan oblik agregacije virusnih čestica u stanicama domadara. Dakle, proteinska vretena jesu virusne stanične uklopine.

Virus je raširen kod brojnih rodova iz porodice *Cactaceae*; popis vrsta nalazi se kod Miličić i Uđbinac 1961. Dosada je njegova nazočnost kod kakteja bila redovno konstatirana na osnovi prisutnosti proteinskih vretena, a ne na osnovi vanjskih simptoma, koji kod kakteja još nisu dovoljno poznati.

Prema dosadašnjim istraživanjima čini se da je virus kakteja s veličinom čestica 515 m μ uzrok proteinskih vretena. Da li virusi od 650 m μ i 300 m μ mogu također stvarati slične stanične uklopine, nije do sada poznato. Naš virus se po dosad poznatim svojstvima, osim po serološkoj aktivnosti, podudara sa *cactus virus X*.

Važan je onaj momenat u istraživanju virusa kakteja, kada je virus uspješno prenesen na neke filogenetski srodne zeljaste vrste izvan porodice *Cactaceae*, budući da je u ovim domadarima i inkubacija dosta kratka, a kod sistemično inficiranih vrsta virus se mnogo brže širi nego u kaktejama. Kod većine zeljastih biljaka pojavljuju se i dosta jasni i karakteristični vanjski simptomi oboljenja, a što je možda najbitnije, ti su novi domadari, nasuprot sukulentnim i sluzavim kladodijima kakteja, postali za eksperimente veoma pogodan i bogat izvor virusnog materijala.

Našim smo istraživanjima proširili krug domadara ovoga virusa, prenijevši virus na veći broj vrsta iz porodice *Chenopodiaceae* (7 vrsta), *Amarantaceae* (7 vrsta), *Caryophyllaceae* (2 vrste) i jednu vrstu iz porodice *Labiatae* (*Ocimum basilicum*).

Prema dosadašnjim zapažanjima svi ti novi domadari reagiraju na virus kakteja lokalno, osim vrsta *Amarantus caudatus* i *Celosia cristata*, koje pokazuju sistemičnu infekciju. Vrsta *Amarantus caudatus* inače je otporna biljka, simptomima su izraziti, a koncentracija virusa velika.

Što se tiče vanjskih simptoma, oni su slabije ili jače izraženi kod velike većine inficiranih vrsta iz porodice *Chenopodiaceae* i *Amarantaceae*, dok je kod inficiranih primjeraka iz porodice *Caryophyllaceae* infekcija bila latentna.

ZAKLJUČAK

Iz vrste *Epiphyllum (Zygocactus) bridgesii*, koja je u epidermi kladodija imala velik broj proteinskih vretena, izoliran je virus i razmnožen na vrstama *Chenopodium amaranticolor* i *Ch. quinoa*. I na vrstama *Chenopodium* izaziva virus vretenaste uklopine. Izolirani virus dug je oko 512 m μ , pa se prema tome po dužini ne razlikuje od vrste *cactus virus X*. Priređeni antiserum protiv ovog virusa imao je visok homologni titar 1 : 2048. Taj antiserum pozitivno je reagirao s izolatom kaktus-X-virusa iz Braunschweiga, ali samo do razređenja seruma 1 : 64. Ovaj niski titar ukazuje na velike serološke razlike između izolata iz Zagreba i Braunschweiga. Budući da su razlike mnogo veće nego što su normalno serološke razlike između sojeva istog virusa, smatramo da to nisu sojevi, nego udaljene varijante jedne virusne vrste ili se tu možda radi o posebnim virusnim vrstama.

U svrhu ispitivanja i proširenja kruga domadara izvan porodice *Cactaceae*, virus je uspješno prenesen na veći broj zeljastih biljaka, tj. na 17 novih domadara. To su slijedeće vrste: *Chenopodium urbicum*, *Ch. ambrosioides*, *Ch. anthelminticum*, *Ch. foliosum*, *Ch. murale*, *Ch. foetidum* i *Ch. rubrum* iz porodice *Chenopodiaceae*; *Amarantus retroflexus*, *A. silvester*, *A. hybridus*, *A. lividus*, *A. caudatus*, *Celosia cristata* i *C. argentea* iz porodice *Amarantaceae*; *Melandrium rubrum* i *Silene vulgaris* iz porodice *Caryophyllaceae*, te vrsta *Ocimum basilicum* iz porodice *Labiatae*. Kod svih inficiranih primjeraka gore navedenih vrsta, utvrđene su vretenaste virusne uklopine (table I—III).

Zahvaljujem se prof. D. Miličiću za pomoć i interes koji je pokazao za moj rad. Isto tako dugujem zahvalnost prof. dru Z. Devideu i dru M. Wrischer (Institut »Ruđer Bošković, Zagreb) za elektronskomikroskopske pretrage moga virusa, te dru J. Brandesu (Biologische Bundesanstalt, Braunschweig), koji je izradio priložene elektronskomikroskopske snimke.

PREGLED LITERATURE — LITERATURVERZEICHNIS

- Amelunxen, F.*, 1956a: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen. *Protoplasma* 45, 164—171.
- Amelunxen, F.*, 1956b: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Cactaceen. *Protoplasma* 45, 228—240.
- Amelunxen, F.*, 1958: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* 49, 140—178.
- Blattny, C.*, und *V. Vukolov*, 1932: Mosaik bei *Epiphyllum truncatum*. *Gartenbauwiss.* 6, 425.
- Brandes, J.*, und *R. Bercks*, 1962/63: Untersuchungen zur Identifizierung und Klassifizierung des Kakteen-X-Virus (*cactus virus X*). *Phytopath. Z.* 46, 291—300.

- Brandes, J., and C. Wetter, 1959: Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8, 99—115.
- Chessin, M., S. A. Solberg, and P. C. Fisher, 1963: External Symptoms and Giemsa-Stainable Cell Inclusions Associated with Virus Infection in Cacti. *Phytopathology* 53, 988—989.
- Gicklhorn, J., 1913: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. *Österr. bot. Z.* 63, 8—13.
- Kenda, G., 1955: Eiweißspindeln in *Opuntia monacantha f. variegata*. *Protoplasma* 44, 192—193.
- Klebahn, H., 1928: Experimentelle und cytologische Untersuchungen im Anschluß an Alloiophyllie und Virus-Krankheiten. *Planta Arch. für wissenschaftl. Bot.* 6, 40—95.
- Lovisol, O., 1961: *Ocimum basilicum*, new test plant for Lucerna mosaic virus. *Proceed. fourth conf. potato virus dis.* Braunschweig.
- McWorther, F. P., 1951: Suggestions for transferring virus from local lesions to test plants. *Phytopathology* 41, 185.
- Milicić, D., 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* 43, 228—236.
- Milicić, D., 1956a: Rasprostranjenje kakteja s virusnim tijelima u primorskim krajevima Jugoslavije (= Die Verbreitung der Viruskörper-führenden Kakteen an der jugoslawischen Meeresküste). *Biol. glasnik* 9, 21—25.
- Milicić, D., 1956b: Eiweißkristalloide in *Opuntia inermis*. *Österr. bot. Z.* 103, 365—375.
- Milicić, D., 1959/60: Sind verschiedene Eiweißkristalle der Kakteen Viruskörper? *Acta Bot. Croat.* 18/19, 37—63.
- Milicić, D., 1962: Neue Wirtspflanzen des Kakteenvirus. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 75, 172—178.
- Milicić, D., and B. Plavšić, 1956: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virusträgern. *Protoplasma* 46, 547—555.
- Milicić, D., and Z. Udbinac, 1961: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalläsionen von *Chenopodium*. *Protoplasma* 53, 584—596.
- Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 3, 195—202.
- Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper? *Phyton* 3, 95—101.
- Sammons, J. M., and M. Chessin, 1961: Cactus virus in the United States. *Nature* 191, 517—518.
- Suhov, K. S., i G. S. Nikiforova, 1955: Virusopodobnye casticy v soke rastenij *Epiphyllum*, nesuscih v kletkah belkovye kristally (= Virusähnliche Partikel im Saft der Eiweißspindeln-führenden *Epiphyllum*-Pflanzen). *Dokl. AN SSSR* 103, 721.
- Weber, F., 1953a: Eiweißpolyeder in *Pereskiaopsis*-Virusträgern. *Protoplasma* 42, 283—286.
- Weber, F., 1953b: Viruskrankes *Epiphyllum*. *Österr. bot. Z.* 100 548.
- Weber, F., and G. Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. *Protoplasma* 41, 111—120.
- Weber, F., G. Kenda, and J. Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. *Protoplasma* 41, 277—286.

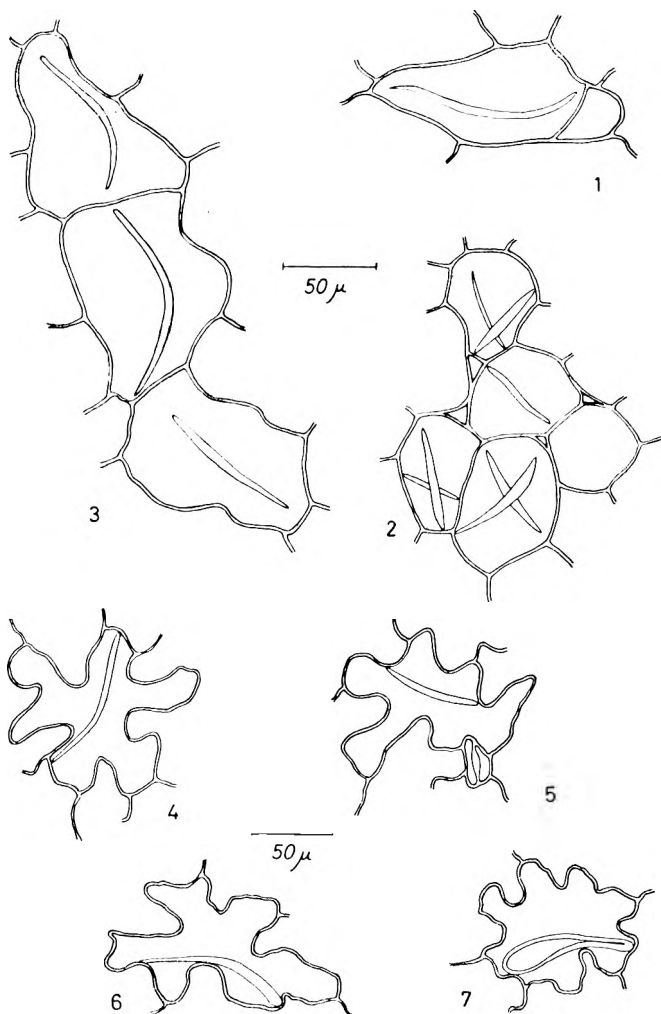


TABLA I — TAFEL I

- Sl. 1. i 2. *Celosia cristata*. Virusna proteinska vretena kakteja u epidermskoj stanici (1) i u većom broju subepidermskih stanica listova (2).
- Abb. 1. u. 2. *Celosia cristata*. Kakteen-Virus-Eiweißspindeln in einer Epidermiszelle und in mehreren Subepidermiszellen (2) der Laubblätter
- Sl. 3. *Celosia argentea*. Virusna proteinska vretena u epidermskim stanicama lista.
- Abb. 3. *Celosia argentea*. Virus-Eiweißspindeln in Blattepidermiszellen
- Sl. 4. — 7. *Amarantus retroflexus*. Proteinska vretena kakteja u epidermskim stanicama.
- Abb. 4. — 7. *A. retroflexus*. Kakteen-Eiweißspindel in Epidermiszellen.

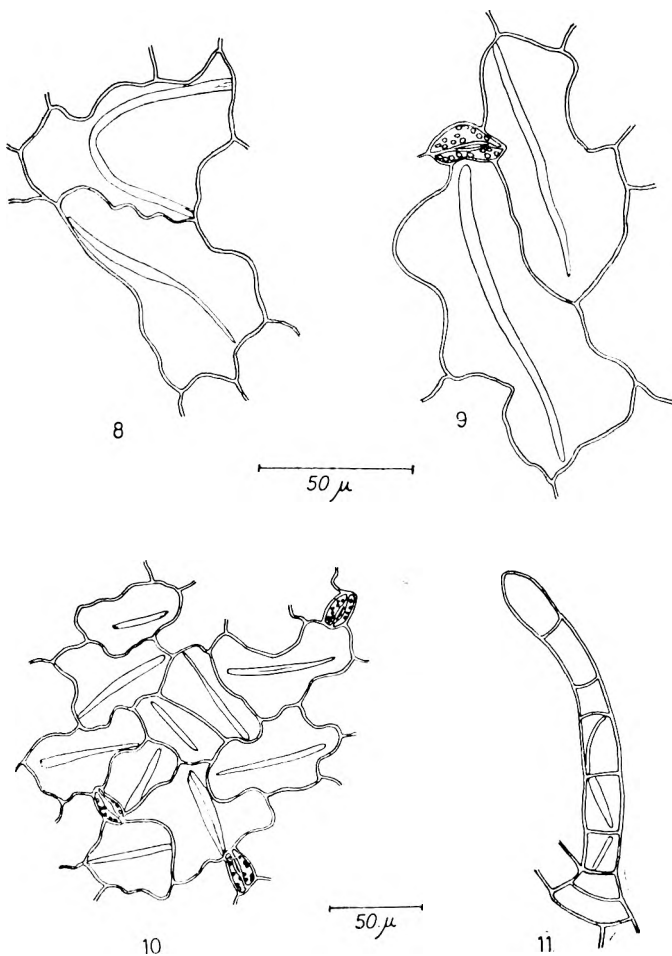


TABLA II — TAFEL II

S. 8. — 11. *Amarantus caudatus*. Virusna proteinska vretena u epidermskim stanicama (8—10) i u stanicama dlake (11).

Abb 8. — 11. *Amarantus caudatus*. Virus-Eiweißspindeln in Epidermiszellen (8—10) und in einem Trichom (11)

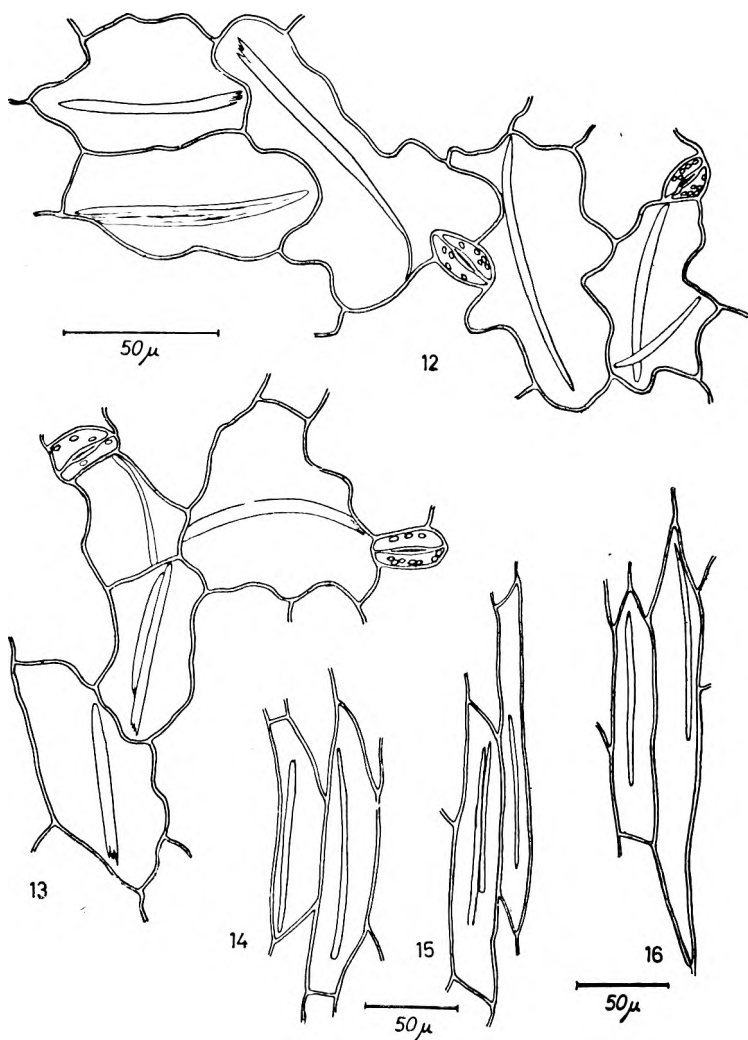


TABLA III — TAFEL III

- Sl. 12. i 13. *Amarantus hybridus*. Proteinska vretena kakteja u epidermskim stanicama lista.
- Abb. 12. und 13. *Amarantus hybridus*. Kakteen-Eiweißspindeln in Blattepidermiszellen
- Sl. 14. — 16. *Amarantus caudatus*. Proteinska vretena u epidermskim stanicama, koje se nalaze iznad nerava lista.
- Abb. 14. — 16. *Amarantus caudatus*. Eiweißspindeln in den unter einem Nerven befindlichen Blattepidermiszellen

TABLA IV — TAFEL IV

- Sl. 17. *Chenopodium quinoa*. Nekrotične lokalne lezije na inokuliranom listu.
 Abb. 17. *Chenopodium quinoa*. Nekrotische Lokalläsionen auf einem inokulierten Blatte
- Sl. 18. *Chenopodium quinoa*. Okrugle pjege na jednom gornjem neinokuliranom listu.
 Abb. 18. *Chenopodium quinoa*. Rundliche Flecke auf einem oberen nicht inokulierten Blatte
- Sl. 19. *Chenopodium amaranticolor*. Nekrotične lokalne lezije.
 Abb. 19. *Chenopodium amaranticolor*. Nekrotische Lokalläsionen
- Sl. 20. *Chenopodium urbicum*. Klorotične lezije.
 Abb. 20. *Chenopodium urbicum*. Chlorotische Läsionen

TABLA V — TAFEL V

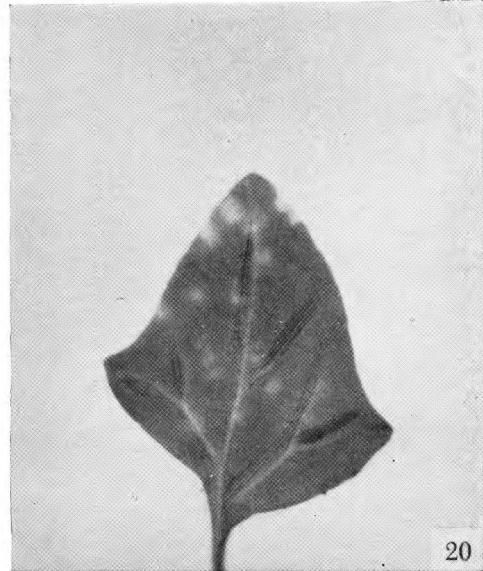
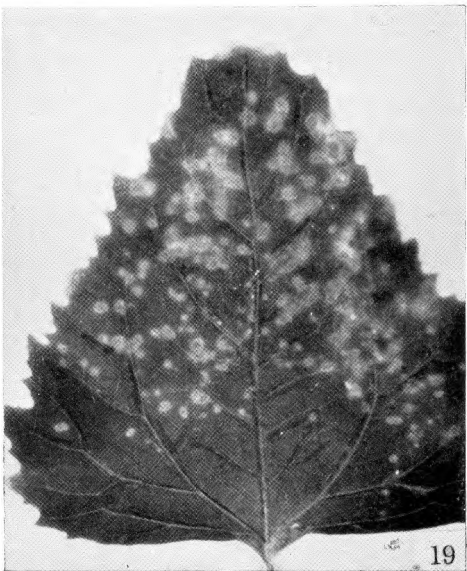
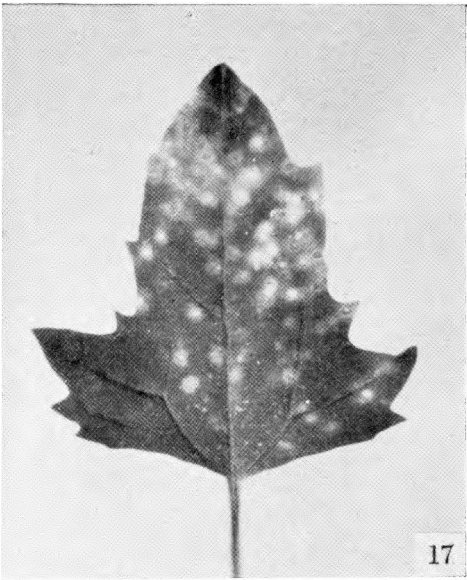
- Sl. 21. *Amarantus caudatus*. Nekrotične lokalne lezije na inokuliranom listu.
 Abb. 21. *Amarantus caudatus*. Nekrotische Lokalläsionen auf einem inokulierten Blatte
- Sl. 22. *Amarantus caudatus*. Donja strana lista. Raznovrsne, većinom okruglaste nekroze između nerava i produžene nekroze nerava.
 Abb. 22. *Amarantus caudatus*. Untere Seite der Blattspreite. Verschiedenartige, meistens rundliche Nekrosen zwischen den Nerven und längliche Adernnekrosen.
- Sl. 23. *Ocimum basilicum*. Slabo primjetljive nekroze u vršnom dijelu lisne plojke.
 Abb. 23. *Ocimum basilicum*. Schwach ausgeprägte Nekrosen auf der Blattspitze
- Sl. 24. *Amarantus silvester*. Okrugle nekrotične lokalne lezije.
 Abb. 24. *Amarantus silvester*. Rundliche nekrotische Lokalläsionen

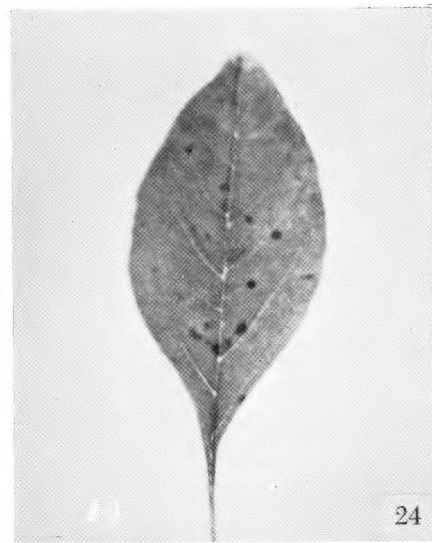
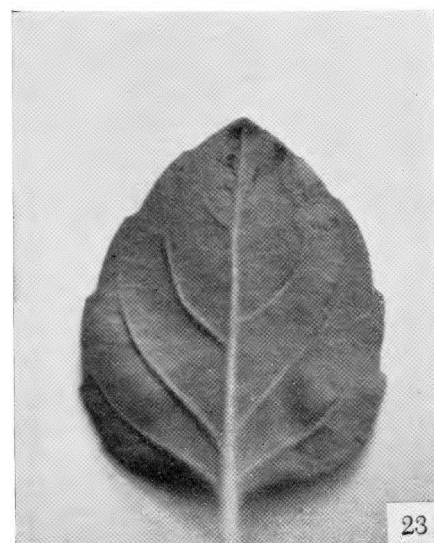
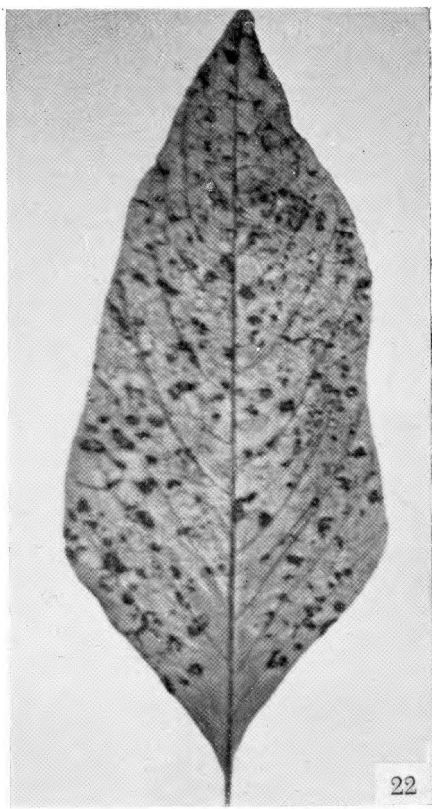
TABLA VI — TAFEL VI

Elektronskomikroskopska snimka virusa kakteja (izolat K₁₁ iz Zagreba). 37100 : 1. Fot. Dr J. Brandes.

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Kakteenvirus (Isolat K₁₁ aus Zagreb). 37100 : 1. Phot. Dr. J. Brandes.

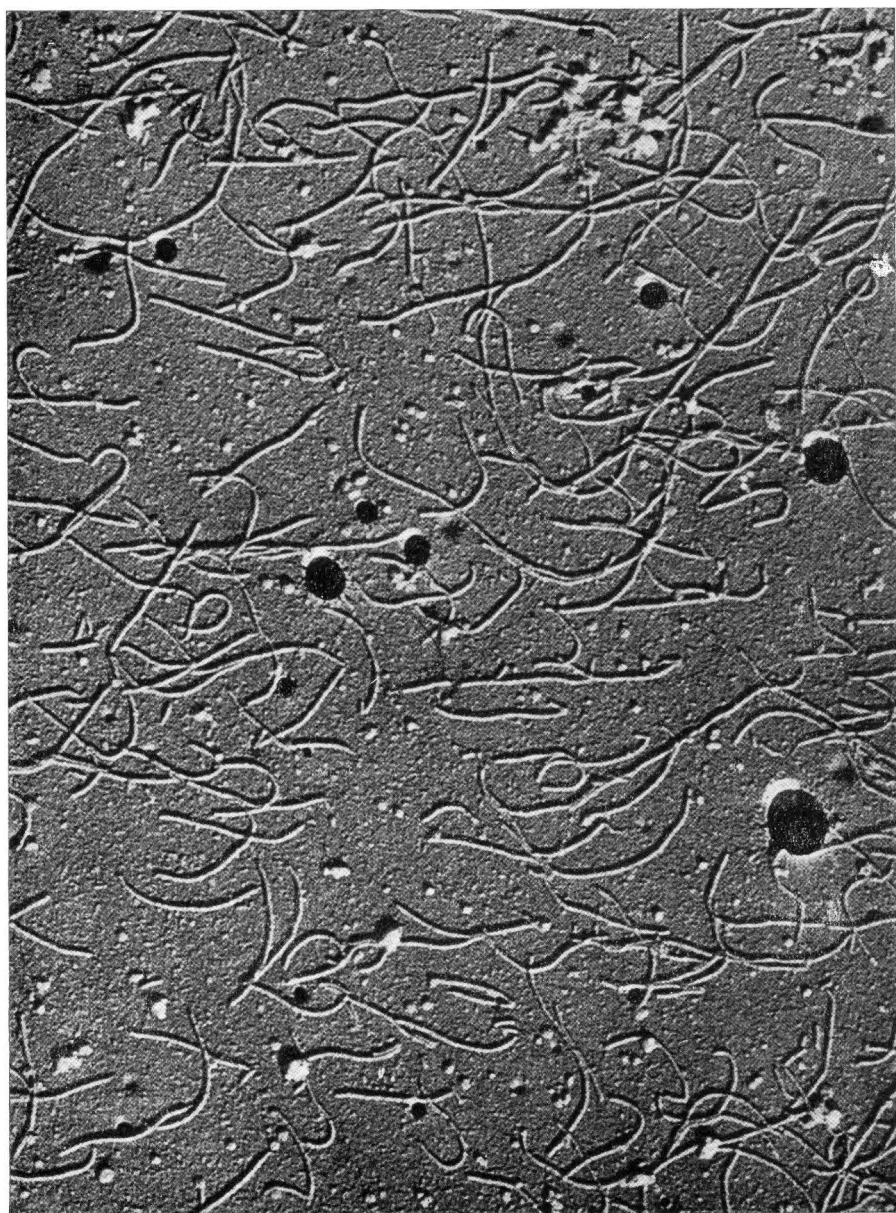
TABLA IV - TAFEL IV





← TABLA V - TAFEL V

TABLA VI - TAFEL VI



ZUSAMMENFASSUNG

NEUE BEITRÄGE ZUR KENNNTNIS DER WIRTS-PFLANZEN UND DER
EIGENSCHAFTEN DES KAKTEENVIRUS

Nada Pleše

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Zagreb)

Molisch (1885), der Entdecker der Kakteen-Eiweißspindeln, war der Meinung, daß diese Körper Reservееiweiße darstellen. Erst Rosenzopf (1951) hat experimentell festgestellt, daß die Eiweißspindeln Viruscharakter besitzen, weil das Agens, das die Entstehung der Eiweißspindeln verursacht, durch den Berkefeldsfilter passiert und durch Pfropfung und Abreibung des Preßsaftes auf gesunde Pflanzen übertragbar ist. Diese Autorin schloß daraus, daß die Eiweißspindeln keine normalen Zellbestandteile, sondern Viruseinschlüsse sind. Später wurden auch die für pflanzliche Viroten charakteristischen x-Körper in den Zellen der infizierten Kakteen gefunden (Weber, Kenda und Thaler 1952, Weber und Kenda 1952, Miličić 1954, Miličić und Plavšić 1956, Amelunxen 1956 a).

In der letzten Zeit wurden mit Hilfe des Elektronenmikroskops auch die gestreckten und etwas flexiblen Partikel des Kakteenvirus entdeckt (Suhov und Nikiforova 1955, Amelunxen 1956 a b).

Was die Kenntnis der Eiweißspindel-Struktur und der Virusteilchen-Eigenschaften betrifft, sind besonders die Untersuchungen von Amelunxen (1956 a b und 1958) wichtig. Dieser Autor hat festgestellt, daß die Eiweißspindeln parakristalline Gebilde mit longitudinal und lateral aggregierten Viruspartikeln sind und daß sich die spindelbildenden Virusteilchen nach ihrer chemischen Zusammensetzung von den Partikeln anderer pflanzlicher Viren nicht unterscheiden.

Neueren Untersuchungen (Brandes und Wetter 1959, Brandes und Bercks 1962/63, Sammons und Chessin 1961) zufolge kommen bei Kakteen drei Arten verlängerter Viren vor. Das sind cactus virus 1 (*cactus virus X*) mit einer Länge von 515 m μ , cactus virus 2 mit einer Länge von 650 m μ und ein drittes Virus mit einer Länge von 300 m μ (Sammons und Chessin 1961). Das erste Virus scheint mit dem von Amelunxen (1958) beschriebenen Virus identisch zu sein.

Nach den bisherigen Untersuchungen verursachen alle bekannten Isolate des Kakteenvirus, die um 515 m μ lang sind (Amelunxen 1958, Sammons und Chessin 1961, Brandes und Bercks 1962/63), in den Zellen ihrer Wirtspflanzen die Entstehung der Eiweißspindeln. Doch ist uns noch immer nicht bekannt, ob das cactus virus 2 und das von Sammons und Chessin entdeckte Kakteenvirus (mit einer Teilchengröße von 300 m μ) Viruszelleinschlüsse verursachen können und ob die eventuellen Einschlüsse ebenfalls spindelförmig sind.

In Zagreb wurde mehrmals ein Kakteenvirus untersucht, das die Entstehung von Eiweißspindeln verursacht (Miličić 1954, Miličić und Udbinac 1961, Miličić 1962). Meine wichtigste Aufgabe war,

die Eigenschaften eines Kakteenvirus-Isolates aus dem Bot. Garten der Universität Zagreb weiter zu analysieren. Unter dem Einfluß dieses Isolates traten in infizierten Testpflanzen regelmäßig Eiweißspindeln auf. Dieses Virus wurde aus spindelführenden *Zygocactus bridgesii*-Pflanzen isoliert und auf *Chenopodium amaranticolor* übertragen. Da dieses Virus auf *Chenopodium amaranticolor* Lokalläsionen hervorrief (Miličić und Uđbinac 1961), konnten wir durch mehrfache Isolierungen der Läsion und durch Abreibung des Läsionssaftes auf gesunde Pflanzen nach der Methode von McWorther (1951) das Virus reinigen.

Am Anfang der Reinigung befanden sich auf der erwähnten Pflanzenart nebst chlorotischen auch nekrotische Läsionen. Da ich bei der Läsionsisolierung immer nur nekrotische Läsionen übertragen habe, traten am Ende dieses Verfahrens nur nekrotische Läsionen auf (Taf. IV, Abb. 19.). Das lebende Gewebe im Läsionsbereich enthielt immer zahlreiche spindelförmige Viruseinschlüsse.

Das Isolat habe ich mittels *Chenopodium quinoa* vermehrt, die nach Ušchdraweit (zit. nach Brandes und Bercks 1962/63) systemisch befallen wird. Da diese Pflanze wegen oben erwähnter Eigenschaften für die Untersuchung sehr geeignet ist, hat sie mir als Quelle des virösen Materials gedient. Infolge der Wichtigkeit dieser Testpflanze werde ich das Aussehen der Läsionen genauer beschreiben, die auf ihnen mit dem Isolat aus Zagreb inokulierten Blättern erschienen.

Die Läsionen haben eine am Anfang gelbbraun gefärbte nekrotische Mitte, die später breiter und häufig grauweißlich wird. Um die Nekrose herum ist ein gelbgrüner chlorotischer Rand bemerkbar, der allmählich in den normalen grünen Blatteil übergeht. Wenn wir die Läsionen im durchfallenden Lichte betrachten, erweist sich der chlorotische Ring als durchsichtig und scharf vom normalen grünen Blatteil abgegrenzt (Taf. IV, Abb. 17. und 18). Diesen *Chenopodium quinoa*-Läsionen sind diejenigen ähnlich, die auf inokulierten Blättern von *Chenopodium amaranticolor* entstehen. Nur bei *Chenopodium amaranticolor* entsteht oft der nekrotische Teil nicht zuerst in der Mitte der Läsion, sondern beginnt sich am Rand der Läsionen zu entwickeln.

Unser Isolat ist liebenswürdigerweise von dr. J. Brandes (Braunschweig) elektronenmikroskopisch untersucht worden. Dabei konnte festgestellt werden, daß unser Isolat Virenteilchen mit Längen von 512 m μ enthält und daß es sich nach seiner Größe von cactus virus 1 praktisch nicht unterscheidet (Taf. VI).

Das Serum gegen unser Kakteenvirus-Isolat wurde aus dem infektiösen Preßsaft von *Chenopodium quinoa* hergestellt. Die Immunisierung der Kaninchen wurde mit nach der Methode von Amelunxen (1958) partiell gereinigtem Saft ausgeführt. Das gewonnene Antiserum erreichte einen homologen Titer von 1 : 2048.

Um die Verwandtschaft unseres Isolates mit ähnlichen Viren zu überprüfen, haben wir von dr. R. Bercks (Braunschweig) das *cactus virus X* bekommen, wofür wir ihm herzlichst danken. Mit diesem Virus reagierte unser Antiserum nur bis zur Verdünnung 1 : 64. Dieser

große serologische Unterschied brachte uns auf den Gedanken, daß es sich hier um eine entfernte Variante des *cactus virus X* oder sogar um eine bisher unbekannte, dem *cactus virus X* verwandte Virusart handelt.

Bei der Untersuchung unseres Isolates mittels *Chenopodium amaranticolor* konnten wir feststellen, daß sein thermaler Inaktivierungspunkt zwischen 81°—82° C liegt. Auch das aus Braunschweig geschickte Virus hatte seinen thermalen Inaktivierungspunkt bei etwa 80° C (Brandes und Bercks 1962/63).

Der Verdünnungsendpunkt unseres Isolates lag zwischen 10⁻⁵ und 10⁻⁶, was auf eine große Infektiosität unseres Virus hinweist. Für die Zubereitung der Verdünnungsstufen habe ich Gewebesaft aus den inokulierten Blättern von *Chenopodium quinoa* verwendet, weil diese die größte Viruskonzentration besitzen.

Was die Untersuchung des Wirtspflanzenkreises betrifft, habe ich versucht, diese besonders auf die der Familie *Cactaceae* nicht angehörenden Arten auszudehnen.

In den bisherigen Untersuchungen haben sich die Kakteen wegen des Schleims, infolge langsamen Wachstums und langsamer Virusverbreitung als sehr ungeeignet erwiesen. Außerdem ist die Infektion bei Kakteen oft latent so daß sie nur auf Grund von Eiweißspindeln konstatiert werden kann. Die äußeren Symptome, die nach einigen Autoren an Kakteen erscheinen können (Chessin, Solberg und Fisher 1963), sind noch nicht genügend bekannt. Deshalb war die erfolgreiche Virus-Übertragung auf Pflanzen, die den Kakteen nicht angehören, von besonderer Bedeutung.

Die ersten nicht der Familie *Cactaceae* angehörenden Arten, auf welche dieser Virus übertragen wurde, waren *Chenopodium amaranticolor* und *Chenopodium album* (Miličić und Uđbinac 1961), *Beta vulgaris* und *Agrostemma githago* (Miličić 1962) und *Chenopodium quinoa* (Ušchdraweit, zit. nach Brandes und Bercks 1962/63). Die erwähnten Verfasser haben beobachtet, daß bei einigen von diesen Arten deutliche äußere Krankheitssymptome entstehen. Diese Pflanzenarten haben eine kürzere Inkubation, und bei systemisch infizierten *Chenopodium quinoa*-Pflanzen verbreitet sich das Virus viel schneller als in Kakteen.

Um neue Wirtspflanzen des Kakteenvirus festzustellen, haben wir versucht, es auf Angehörige jener Familien zu übertragen, die ihrer Stellung im Pflanzensystem nach den *Cactaceae* benachbart sind. Außerdem haben wir auch einige Arten anderer, entfernterer Familien inokuliert. Während wir unter den Angehörigen verwandter Familien viele neue Wirtspflanzen des Kakteenvirus gefunden haben, haben wir unter den entfernten Familien nur bei *Ocimum basilicum* ein positives Ergebnis erzielt (Tabelle 1).

Das Virus konnten wir auf 7 neue *Chenopodiaceae*-Arten, 7 *Amarantaceae*-Arten, 2 weitere *Caryophyllaceae*-Arten und dazu auf die schon erwähnte *Labiatae* *Ocimum basilicum* erfolgreich übertragen (Ta-

belle 1; siehe S. 56). In dieser Tabelle sind außer diesen Arten auch noch die schon früher bekannten Wirtspflanzen des Kakteenvirus verzeichnet, die nicht der Familie *Cactaceae* angehören.

Aus der Tabelle ist ebenfalls ersichtlich, daß die Inkubationszeit der lokal infizierten Wirtspflanzen von 8—15 Tagen variieren kann, während bei den systemisch erkrankten Arten die sekundären Symptome noch später erscheinen.

Nach unseren bisherigen Beobachtungen reagieren alle diese neuen Wirtspflanzen auf das Kakteenvirus mit einer lokalen Infektion, ausgenommen *Amarantus caudatus* und *Celosia cristata*, die systemisch infiziert werden. *Amarantus caudatus* ist eine geeignete Wirtspflanze mit starkausgeprägten Symptomen und großer Viruskonzentration (Taf. V, Abb. 21. und 22.).

Was die äußeren Symptome betrifft, sind sie bei den den Familien Chenopodiaceen und Amarantaceen angehörenden lokalinfizierten Wirtspflanzen meistens sichtbar und treten mehr oder weniger hervor, und zwar meistens in der Form von Lokalläsionen. Bei der systemisch infizierten *Amarantus caudatus*-Pflanze treten starke Nekrosen im Bereiche der Blattnerven auf, bei der ebenfalls systemisch erkrankten *Celosia cristata*-Pflanze zuerst chlorotische Flecke, die später nekrotisch werden. Auf den Blättern der lokal infizierten *Ocimum basilicum*-Pflanze entstehen große Nekrosen von unregelmäßiger Form (Taf. V, Abb. 23.). Während die Mehrzahl der oben erwähnten Wirtspflanzen deutliche Symptome zeigt, bleibt die Infektion bei den untersuchten Caryophyllaceen immer latent.

Bei allen diesen mit Kakteenvirus infizierten Arten — ohne Rücksicht darauf, ob die Infektion sichtbar oder latent war — konnte die Erkrankung immer mit Sicherheit auf Grund der Eiweißspindeln in der Blattepidermis konstatiert werden. Die Viruseinschlüsse hatten am häufigsten die Form echter Spindeln (Taf. I, Abb. 2, 3. und 5.), manchmal aber wiesen sie eine fädige, ring- oder schleifenförmige Gestalt auf (Taf. I, Abb. 7.).

Zusammenfassend können wir über unsere Untersuchungen des Kakteenvirus Folgendes sagen: Aus *Zygocactus bridgesii* haben wir ein spindelbildenden Virus isoliert, das eine Länge von etwa 512 μ hat. Nach unserer Vermutung ist dieses Virus eine entfernte Variante des Kakteen-X-Virus. Unser Isolat wurde auf 17 für den Kakteen-X-Virus nicht bekannte Wirtspflanzen übertragen, die den Familien *Chenopodiaceae*, *Amarantaceae*, *Caryophyllaceae* und *Labiatae* angehören. Die Mehrheit der neuen Wirtspflanzen zeigt dabei deutliche äußere Krankheitssymptome. Das Virus verursacht in allen infizierten Arten deutliche spindelförmige Zelleinschlüsse (Tafeln I—III).