

VIRUS ŽUTOG MOZAIKA POSTRNE REPE (TURNIP YELLOW MOSAIC VIRUS) U JUGOSLAVIJI

With Summary in English

ĐORĐE MAMULA

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno za štampu 15. III 1967.

Uvod

Nazočnost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji već je prije dokazana. Pri tom mislimo na virus mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) (v. Miličić, Štefanac-Uđbinac i Mamula 1963; Štefanac 1964) i virus mozaika cvjetače (cauliflower mosaic virus) (Mamula 1966; usp. i Panjan i Prpić 1954). Ovim radom dokazali smo da je u Jugoslaviji raširen još i virus žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) koji je također vezan uglavnom za biljke iz porodice *Cruciferae* (v. Mamula 1966; Sladetić 1966). Za sada u Jugoslaviji nisu još pronađeni virus kovrčavosti postrne repe (turnip crinkle virus) i virus rozete postrne repe (turnip rosette virus).

Osobito je značajan virus žutog mozaika postrne repe (VŽMPR). To je virus sa »sferičnom«, tj. poliedričnom elementarnom česticom promjera oko 28 nm,\* koja sadrži oko 37% ribonukleinske kiseline (Markham 1959). Ovaj virus danas predstavlja važan objekt viroloških i općebioloških istraživanja. U tom pogledu dobiva sličan značaj kakav već ima virus mozaika duhana koji je predstavnik virusa s produženim elementarnim česticama. VŽMPR u zaraženim biljkama nalazi se u razmjerno velikoj koncentraciji tako da se iz litre soka zaraženih primjeraka *Brassica chinensis* može izolirati 0,17 grama virusa, a u izuzetnim okolnostima čak i do 4 grama virusa (Markham 1959). Razmjerno lako ga je moguće prirediti u čistom, kristaličnom stanju.

---

\* 1 nm (nanometar) =  $\frac{1}{1,000,000}$  mm

U prirodi VŽMPR prenose neki insekti, kao na primjer naročito pojedine vrste roda *Phyllotreta* (buhachi) i *Psillyodes*, a u izvjesnim slučajevima vrsta *Forficula auricularia*, te neki skakavci (Smith 1957; Martini 1958). Ovi autori dozvoljavaju mogućnost širenja virusa u nasadima i dodirrom između bolesnih i zdravih biljaka, čemu pogoduje vjetrovito vrijeme. Prema Broadbentu (1957), lisne uši ne prenose VŽMPR, međutim, Martini (1958) je ustanovio da *Myzus persicae* (Sulzer) i *Aulacorthum circumflexum* (Bckt.) mogu katkada prenositi ovaj virus. Ipak, koliko je poznato, lisne uši praktično nemaju značaja kao vektori VŽMPR-a u prirodi. U vezi s iznijetim Broadbent (1957) navodi da se širenje VŽMPR-a u nasadima može uspješnije ograničiti i spriječiti nego širenje virusa čiji su glavni vektori lisne uši, jer je spomenute najvažnije prenosiocce VŽMPR-a moguće relativno lako uništavati pomoću insekticida. Virus se najvjerojatnije ne prenosi putem sjemena.

VŽMPR nađen je i opisan prvi puta razmjerno kasno (Markham i Smith 1946), i to u Škotskoj. Kasnije je nađen i u nekim drugim evropskim zemljama.

Nedavno smo u Sloveniji sabrali primjerke vrste *Brassica rapa* var. *silvestris* koji su imali nejednolično obojene listove. Na njima su se izmjenjivale žute i zelene površine dajući tako sliku šarenila. Sokom ovih biljaka inokulirali smo izvjestan broj vrsta, većinom iz porodice krstašica, nakon čega je na nekima od njih došlo do razvitka infekcije. Osim proučavanja reakcije test-biljaka i kruga domadara, izvršili smo serološku i elektronsko mikroskopsku analizu, upoznali se s promjenama koje nastaju u stanicama inficiranih biljaka i purificirali virus.

## Materijal i metode

Naš izolat Y65, koji je pronađen kod mjesta Žalec u Sloveniji na vrsti *B. rapa* var. *silvestris*, bio je glavni predmet ovih istraživanja. Osim toga izvršili smo komparativna istraživanja još i sa dva tačno identificirana izolata VŽMPR. Jedan od njih (YS) potječe iz Škotske, a nabavili smo ga susretljivošću dra C. H. Cadmana (Scottish Horticultural Research Institute, Invergowrie, Dundee). Drugi izolat (YD) dobili smo ljubaznošću dra O. Bode (Braunschweig) koji ga je izolirao iz danskih postrnih repa.

Prilikom istraživanja fizičkih svojstava upotrebljavali smo kao izvor infektivnog soka vrste *Brassica perviridis* i *B. rapa* var. *rapifera*, a kao test-biljke, osim ovih dviju, još i vrstu *Eruca sativa*. U serološkim pokusima koristili smo antiserum protiv VŽMPR koji smo dobili iz Škotske. Za ovaj antiserum također dugujemo zahvalnost dru C. H. Cadmanu. Serološke pokuse vršili smo na dva načina, i to difuzijom u agar-gelu i tzv. kapljičnom reakcijom na predmetnom stakalcu za mikroskopiranje. Prilikom pokusa u agar-gelu primijenili smo Mansijevu (1957) metodu koju smo modificirali tako, da smo umjesto 1,6% agara priredili 1,1–1,2% agarsku podlogu. Osim toga uzeli smo za polovinu manju kon-

centraciju fenola i nismo podlozi dodavali metiloranža. Prilikom izvođenja seroloških reakcija upotrebljavali smo takav infektivan sok koji je prethodno bio pročišćen jednokratnim niskoturažnim centrifugiranjem.

Preparati za elektronskomikroskopsku analizu bili su pripremljeni metodom uranjanja (B r a n d e s 1957). Virusne suspenzije na elektronskomikroskopskim predmetnicama sušene su na zraku kod sobne temperature.

Za purifikaciju našeg izolata koristili smo kao izvor infektivnog soka primjerke vrste *B. rapa* var. *rapifera*. Centrifugiranja smo izvršili u centrifugi »Janetzki« tip T23.

## Rezultati istraživanja

### *Reakcija test-biljaka i krug domadara*

Izolat iz Slovenije (Y65) pokušali smo prenijeti na 30-tak vrsta od kojih većina pripada porodici *Cruciferae*. Kod toga su se na većem broju biljaka, i to posebno krucifera, razvili jasni simptomi infekcije. Na tablici 1. pregledno su označene sve istražene vrste koje naš izolat inficira. Uz naziv svake vrste kraticama su označeni simptomi koji se na njoj razvijaju.

Izolatom Y65 inokulirali smo i slijedeće vrste na kojima nije došlo do razvitka infekcije, barem ne do pojave vidljivih vanjskih simptoma infekcije: *Gomphrena globosa* L. (*Amaranthaceae*), *Chenopodium amaranticolor* Coste i Reyn. (*Chenopodiaceae*), *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC., *Cheiranthus cheiri* L., *Lepidium draba* (L.) Desv., *Matthiola incana* R. Br. (*Cruciferae*), *Chelidonium majus* L., *Papaver rhoeas* L. (*Papaveraceae*), *Reseda lutea* L. (*Resedaceae*), *Nicotiana tabacum* sorta »Hicks resistant«, *Petunia hybrida* Vilm. i *Physalis floridana* Rydb. (*Solanaceae*). Prema tome, kako se vidi iz tablice 1, izolatom Y65 uspješno smo do sada inficirali 15 krucifera, a izvan ove porodice samo dvije vrste, i to *Cleome spinosa* (*Capparidaceae*) i *Reseda odorata* (*Resedaceae*). Ove dvije posljednje vrste spominju se u literaturi kao jedine vrste izvan porodice krstašica koje VŽMPR može inficirati (S m i t h 1957; B r o a d b e n t i H e a t h c o t e 1958).

Vrsta *Cleome spinosa* čini se da je važan domadar VŽMPR. U našim pokusima s tom vrstom zapazili smo da se na pojedinim inokuliranim listovima razvijaju dosta jasne klorotične lezije koje su velike oko 1 mm. Na nekim primjercima ove vrste razvila se i sistemična infekcija. Pri tom su se na pojedinim mlađim listovima iznad mjesta inokulacije pojavili prosvjetljivanje nerava i brojne sitne klorotične pjege, a kasnije djelomično i mozaik. Ovi simptomi su nakon nekog vremena iščezli. Na pojedinim listovima, naročito na rubovima, razvila se kasnije i lagana kloroza. Da se radilo o sistemičnoj infekciji, ustanovili smo i u reinfekcijskom

Tablica 1. Popis vrsta koje inficira izolat Y65, s pripadnim simptomima  
 Table 1. List of species which isolate Y65 infects, with related symptoms

Test-biljka Test plant	Simptomi Symptoms
<i>Capparidaceae</i>	
<i>Cleome spinosa</i> L.	L, K; S, (Pn)M
<i>Cruciferae</i>	
<i>Brassica chinensis</i> L.	L, K; S, PnOVŠMMvBŽŠc(Mj)(Z)
<i>B. juncea</i> (L.) Czern.	L, (K); S, PnŠ(Z)(Z)
<i>B. napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> (L.)	L, (K); S, PnPVŠMŽ(Z)
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L. (cvjetača »snježna glava«)	S, PnP(M)
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. (zelje varaždinsko)	S, PnP(M)
<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L. f. <i>violacea</i> (»korabica rana plava«)	L, K; S, PnPVM(Ž)(Z)
<i>B. perviridis</i> Bailey	L, K; S, PnOŠMMvVBŽ(N)(Mj)(Z)
<i>B. rapa</i> (L.) Hartm. var. <i>rapifera</i>	L, K; S, PnOŠMMvBVŽ(N)(Mj)(Z)
<i>Camelina sativa</i> (L.) Cr.	S, Š(Z)
<i>Eruca sativa</i> (Jusl.) R. Br.	L, K; S, OŠ(M)(Mv)(Ž)B(Mj)(Z)
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	L, K; S, PnVŠMŽ(Z)
<i>R. sativus</i> L.	L, K; S, PnVŠM(Mv)B(Mj)(Z)
<i>Sinapis alba</i> L.	S, PnPVŠM(Ž)(Z)
<i>S. arvensis</i> L.	S, PnŠMŽ(Z)
<i>Sisymbrium officinale</i> Scop.	L, K;
<i>Resedaceae</i>	
<i>Reseda odorata</i> L.	S, PnM

Objašnjenje skraćenica (List of Abbreviations). B — žućkastobijela ili gotovo bijela polja na listovima (yellowish-white or nearly white areas on leaves); K — klorotične lokalne lezije na inokuliranim listovima (chlorotic local lesions on inoculated leaves); L — lokalno (local); M — mozaik na listovima (mosaic on leaves); Mj — mjehurasta ispupčenja i udubljenja na listovima (blister-like zones on leaves); Mv — vrpčasti mozaik (line pattern); N — nekrotične pjege na listovima (necrotic spots on leaves); O — zeleni otočići na žutoj plojci lista (green islands on yellow leaf blade); P — sistemične klorotične pjege (systemic chlorotic spots); Pn — prosvjetljivanje nerava (vein-clearing); S — sistemično (systemic); Š — šarenilo listova (variegation on leaves); Šc — šarenilo cvijeta (variegation — »breaking« — of flowers); V — pojava vrpčastih nerava (vein-banding); Z — zaostajanje biljaka rastom (plant stunting); Ž — jednolično žutilo listova (uniformly yellow leaves).

Skraćenice u zagradama označuju simptome koji su razmjerno slabije izraženi (Abbreviations in brackets denote the symptoms which are less conspicuous).

pokusu, prilikom čega smo sokom listova *C. spinosa* inokulirali primjerke vrste *Brassica perviridis*. Na ovoj posljednjoj vrsti razvili su se jasni simptomi infekcije.

Smith (1957) navodi vrstu *C. spinosa* kao diferencijalnog domadara za VŽMPR. Prema ovom autoru razvijaju se na inokuliranim listovima *C. spinosa* crvenkaste lokalne lezije. Poslije toga pojavljuje se na biljci djelomično sistemični mozaik.

Na drugoj vrsti koja ne pripada kruciferama, tj. na vrsti *Reseda odorata*, nastaje također sistemična infekcija. Ona se redovito ispoljava u vidu prosvjetljivanja nerava, a kasnije se na nekim listovima pojavljuju i klorotična polja u vidu mozaika. Infekciju ove vrste također smo potvrdili reinokulacijom na vrstu *B. perviridis*.

Vrstu *R. odorata* spominju i Broadbent i Heathcote (1958) kao važnu test-biljku za VŽMPR. Spomenuti autori ocjenjuju ovu vrstu kao vrlo osjetljivu na VŽMPR. Oni su na njoj ispitali dva soja ovog virusa, te su našli da i jedan i drugi soj dovode do pojave žućenja žila ili do pojave vrpčastih nerava, kao i do razvitka klorotičnih pjega. Jedan od spomenuta dva izolata djelovao je čak tako jako da su nastajale nekrotične pjege.

Na raznim vrstama krstašica koje su navedene u tablici 1. inkubacija traje od 6 do 15 dana. Infekcija je redovito sistemična, ali se simptomi bolesti razvijaju dosta često i na inokuliranim listovima jednog dijela istraženih biljaka. Na njima se pri tom pojavljuju klorotične lokalne lezije. Na pojedinim, osobito na većim listovima, može se nabrojati do 100 pa i više lezija. Naročito su relativno jasne lezije na listovima vrsta *Raphanus raphanistrum*, *R. sativus* (Tab. 1, c, d), *Sisymbrium officinale*, *Eruca sativa* i *Brassica oleracea* var. *gongylodes* f. *violacea*, kod kojih se lezije odlikuju dosta jasnim rubom. Kod tih biljaka nalazili smo relativno malene lezije čiji je promjer iznosio oko 0,5 do 1,5 mm, a na vrsti *B. oleracea* var. *gongylodes* f. *violacea* češće i do 2 mm. Samo nešto slabije izražene lezije nego kod spomenutih pet domadara razvijaju se na vrstama *Brassica chinensis*, *B. perviridis* i *B. rapa* var. *rapifera*. Kod njih su lezije velike do 2 ili 3 mm, a rub im je često ponešto difuzan. Kod svake od gore spomenutih vrsta lezije mogu izostati na ponekom listu ili čak i biljci. Dosta je vjerojatno da bi se neka od vrsta na kojima se razvijaju jasnije lezije mogla iskoristiti za relativna kvantitativna mjerenja VŽMPR. Za tu svrhu mogle bi, na primjer, poslužiti vrste *R. raphanistrum*, *R. sativus*, *S. officinale* i dr. Markham i Smith (1949) su katkad zapažali lokalne lezije na nekim kruciferama pod utjecajem VŽMPR, a najčešće na vrsti *B. chinensis*.

Kako smo već spomenuli, za VŽMPR karakteristična je sistemična infekcija. Na listovima koji se razvijaju iznad mjesta inokulacije pojave se obično vrlo jasni simptomi. Prvi simptom sistemične infekcije najčešće je prosvjetljivanje nerava (vein-clearing). U ovoj fazi infekcije na listovima se dobro ističe nervatura, i to naročito sitniji nervi (tab. 1, a). Paralelno s prosvjetljivanjem nerava ili ponekad poslije njega pojavljuju se na listovima pojedinih biljaka manje ili više brojne klorotične pjege.

Velike su od 1 do 3 mm, a nalazili smo ih naročito na vrstama *B. oleracea* var. *gongylodes* f. *violacea*, *B. oleracea* var. *capitata* i na nekim drugim (usp. tabl. 1). U ovim prvim simptomima sistemične infekcije izolat Y65 dosta je sličan virusu mozaika cvjetače (usp. M a m u l a 1966).

Poslije tih najranijih simptoma često se na listovima vrsta *B. chinensis*, *B. perviridis* i *B. rapa* var. *rapifera* proširi jednolično žutilo. Na listovima drugih vrsta žutilo je znatno slabije potencirano nego kod ovih vrsta, tako da je boja više svijetlozelena ili žućkastozelena. Na takvim listovima koji su izgubili normalnu boju zadrže se ponekad u manjem broju zeleno obojene površine poput malenih otočića velikih do 0,5 cm, koji se jasno ističu na listovima vrsta *B. perviridis*, *B. rapa* var. *rapifera* i *B. chinensis*. Od simptoma najčešći su na ispitanim vrstama, pored prosvjetljivanja nerava, šarenilo i mozaik. Vrlo upadljivo izraženi su na tri prethodno spomenute vrste, a nerijetko i na vrsti *Eruca sativa*. Na njihovim listovima izmjenjuju se jasno ograničena zelena, žuta, a više puta čak gotovo posve bijela polja i šare (tab. 2, a, b). Naročito upada u oči žuta boja, po čemu je virus i dobio naziv »žuti« mozaik. Bijela polja obično su nešto manja nego žuta (tab. 2, b). Katkad se na listovima spomenutih vrsta protežu i krivudave žute ili žućkastobijele linije u obliku tzv. vrpčastog mozaika (line pattern). Ovaj simptom prikazan je na tab. 2, d (usp. i tabl. 1).

Na drugim istraženim domadarima, kako smo već naprijed istakli, ne dolazi do pojave izrazito žutih šara kao na vrstama *B. perviridis*, *B. rapa* var. *rapifera* i *B. chinensis*.

Na nekim vrstama nastaje pojava vrpčastih nerava (vein-banding). Ovaj simptom zapaža se u vrijeme razvitka šarenila ili još ranije, nakon što iščezne prosvjetljivanje nerava. Naročito jasne vrpce nalazili smo na vrsti *R. sativus* (tab. 1, b), ali smo ih zapažali i na drugim vrstama (vidi tabl. 1).

Izolat Y65 neredovito uzrokuje na vrstama *B. perviridis* i *B. rapa* var. *rapifera* razvitak nekrotičnih pjega koje su obično malobrojne, nepravilnog oblika i velike nekoliko milimetara. Na listovima dviju posljednjih kao i još nekih vrsta (vidi tabl. 1) zapažaju se ponekad nekoliko milimetara velika zdjelčasta udubljenja i mjehurasta ispupčenja.

Na laticama cvjetova vrste *B. chinensis*, koje su normalno žute boje, dolazi više puta do pojave bijelih pruga, a ponekad su i cijele latice bijele. Ovaj simptom, koji ima i dijagnostičku vrijednost, spominje na istoj vrsti i S m i t h (1957).

Za razliku od nekih drugih virusa krstašica, kao na primjer virusa mozaika postrne repe i naročito virusa mozaika cvjetače, koji izazivaju jake deformacije listova, izolat Y65 ne prouzrokuje uočljivije promjene ovog karaktera. U tom pogledu naš se izolat podudara s VŽMPR. Primjerci biljaka inficirani našim izolatom zaostaju rastom u odnosu na zdrave egzemplare, ali ovo zaostajanje rastom redovito nije jako izraženo, naročito u usporedbi s gore spomenutim virusima krstašica. To smo, naime, mogli zapaziti u uvjetima uzgoja biljaka u stakleniku.

Prema tome, izolat Y65 izaziva na svojim domadarima, a naročito na vrstama *B. perviridis*, *B. chinensis* i *B. rapa* var. *rapifera* pojavu izrazito

žutih pjega, šara, mozaičnih područja ili linija. Spomenute tri vrste sa takvim karakterističnim simptomima mogu zbog toga dobro poslužiti za prepoznavanje virusa.

Možemo napomenuti da jedino na vrsti *Sisymbrium officinale* nismo zamijetili simptome sistemične infekcije. Međutim, da je i ova vrsta bila sistemično inficirana dokazali smo u reinfekcijskom pokusu sa vrstom *B. perviridis*.

U pogledu simptoma izolat Y65 dosta je sličan izolatu YS, jer oba uzrokuju intenzivno žute šare na listovima, koje su nešto slabije izražene kod izolata Y65. Izolat YD dovodi do razvitka slabijih žutih simptoma nego izolati Y65 i YS.

Moguće je da se, u slučaju pojave gotovo posve bijelih šara na listovima, radi o mutantima virusa, koji na mjestima gdje su lokalizirani proizvode tako jake promjene boje.

Pojava žućenja, do čijeg razvitka dovodi infekcija izolatom Y65, posljedica je promjena koje se zbivaju u kloroplastima. O tome će biti iznijeto više u poglavlju o promjenama plastida.

### Fizička svojstva

U cilju potpunije identifikacije izolata Y65, pristupili smo određivanju njegovih fizičkih svojstava. Pri tom smo istražili krajnju tačku razrjeđenja (k. t. r.) i postojanost in vitro (p. i. v.) (vidi i poglavlje »Materijal i metode«).

K. t. r. nalazi se iznad razrjeđenja od  $1:10^6$ , što predstavlja dosta visoku vrijednost. Smith (1957), međutim, također navodi da nisu tako rijetke pozitivne infekcije iznad ovog razrjeđenja.

P. i. v. našeg izolata na temperaturi od 20 do 22 °C, čini se, da je znatno veća od 10 dana jer smo prilikom ispitivanja infektivnosti soka koji je stajao 10 dana dobivali još dosta visoki postotak infekcija.

### Promjene plastida

Istražujući stanice biljaka inficiranih izolatom Y65, utvrdili smo da dolazi do karakterističnih promjena plastida (Miličić i Štefanac 1967). Kao prva i najizrazitija pojava uočava se vakuolizacija plastida. U pojedinom plastidu nastaju po jedna ili nekoliko vakuola (tab. 3, b) koje su u početku manje, a kasnije se povećavaju. Ako se u plastidu nalazi jedna vakuola, te ako je smještena u njegovom centru, tada se zeleni dio plastida vidi kao uži ili širi prsten. U slučajevima kada vakuola ima ekscentričan položaj, uočava se zeleni dio plastida nerijetko u obliku srpa odnosno polumjeseca (tab. 3, b). Promjene u plastidima naročito se dobro zapažaju na plošnim presjecima lista u subepidermskim stanicama, gdje se u relativno velikim kloroplastima jasno uočavaju bezbojne vakuole, a preostali, zeleno obojeni dijelovi plastida također se dobro vide, često u obliku prstenastih i srpastih tvorevina.

Kada je vakuolizacija plastida već dosta uznapredovala, redovito dolazi do sakupljanja plastida na pojedinim mjestima u stanici, često u blizini jezgre. Na taj način obrazuju se veće nakupine plastida, u kojima se isprva još dobro razabiru granice plastida (tab. 3, b), a ukoliko se radi o kloroplastima dobro se ističe i njihova zelena boja. Ovakvih nakupina plastida može biti i po nekoliko u jednoj stanici.

U daljnjem toku infekcije dolazi do djelomičnog ili potpunog stanjanja plastida u jedinstvena, ali nehomogena tijela koja se obično pojedinačno nalaze u stanicama. Ovakva tijela najčešće su nepravilnih oblika i jako su vakuolizirana (tab. 3, a). U njima se više ne razabiru pojedini plastidi, a ukoliko su nastala od kloroplasta, nazire se još mjestimično zelena boja.

Opisane promjene u plastidima nalazili smo u svim inficiranim biljkama koje smo mikroskopski promatrali. Naročito jasno zapažaju se u stanicama vrsta *Brassica chinensis*, *B. perviridis*, *B. rapa* var. *rapifera*, *Raphanus sativus* i *Sinapis alba* (usp. tab. 3, a, b).

Promjene plastida koje smo ovdje opisali vrlo su karakteristične, tako da mogu poslužiti kao dobro dijagnostičko sredstvo za razlikovanje VŽMPR od drugih virusa krucifera. Identične promjene plastida zbivaju se i u stanicama biljaka inficiranih izolatima YS i YD.

Napominjemo da smo radi kontrole pregledali veći broj zdravih biljaka koje su po starosti odgovarale inficiranim primjercima, ali u njihovim plastidima nismo zapazili promjene (tab. 3, c). Također ističemo da je već i Rubio (1956) opisao promjene u plastidima pod utjecajem VŽMPR koje odgovaraju našim zapažanjima (usp. i Goldin 1963).

Prema tome, sve što smo iznijeli o promjenama plastida pod utjecajem izolata Y65 ukazuje na to da on pripada VŽMPR. Nesumnjivo je da se jaki vanjski simptomi u obliku kloroze i izrazitog žućenja u raznim vidovima (vidi poglavlje »Reakcija test-biljaka i krug domadara«), koje uzrokuje naš izolat, mogu dovesti u vezu s karakterističnim promjenama u plastidima koje smo ovdje opisali.

### Serološka istraživanja

U toku identificiranja izolata Y65 ispitali smo ga i serološki s antiserumom protiv VŽMPR (usp. i poglavlje »Materijal i metode«). Paralelno s tim izvršili smo radi usporedbe i serološke pokuse između izolata YS i istog antiseruma.

Rezultate seroloških pokusa pregledno smo prikazali na tablici 2. Kako se iz tablice 2. vidi, izolat Y65 reagirao je pozitivno još i kod razrjeđenja antiseruma od 1/64. Do istog razrjeđenja pozitivno je reagirao i izolat YS. Pri tom su talozi koje je davao izolat YS općenito bili nešto obilniji, a linije precipitacije ponešto izrazitije, nego talozi, odnosno linije, koji su potjecali od izolata Y65. To se moglo naročito dobro uočiti kod većih razrjeđenja antiseruma. Možemo istaći da nije bilo značajnijih razlika između rezultata dobivenih u kapljičnoj i agar-gel difuzijskoj reakciji.



Tablica 2. Rezultati seroloških istraživanja izolata Y65 i YS  
 Table 2. Results of serological investigations of isolates Y65 and YS

Antiserum	Antigen Izolot Y65 Isolate Y65		Antigen Izolot YS Isolate YS	
	Konc.	1/5	Konc.	1/5
	VŽMPR (Škotska) TYMV from Scotland	64*	64	64

\* recipročna vrijednost titra seruma (reciprocal value of titre of the anti-serum)

Kada smo gel-difuzijski pokus bili postavili tako da su oko centralnog bazena s antiserumom naizmjenično bili smješteni u svojim bazenima izolat Y65 i izolat YS, precipitacijske linije ovih dvaju izolata u nekim su se slučajevima spajale na svojim krajevima. Pri tom su se one spajale na način koji je karakterističan za srodne viruse.

Rezultati navedenih seroloških pokusa pokazuju da se izolat Y65 ondosi prema antiserumu od VŽMPR-a vrlo slično kao izolat YS. Budući da izolat YS predstavlja VŽMPR, preostaje jedino zaključak da i izolat Y65 pripada tom virusu. Pored toga iz iznesenih rezultata može se zaključiti i to, da je izolat Y65 dosta srodan izolatu YS, jer su oba slično reagirala s istim antiserumom. Rezultat seroloških pokusa u skladu je i s reakcijom test-biljaka na infekciju izolatima Y65 i YS.

### Purifikacija virusa

Naš izolat Y65 uspjeli smo purificirati. Pri tom smo koristili metodu koju navode Markham i Smith (1949).

Infektivni sok vrste *Brassica rapa* var. *rapifera* najprije smo pročistili dodatkom 90% (vol.) etilnog alkohola u omjeru 10 dijelova soka : 3 dijela alkohola. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje sa 4 000 okr./min. u trajanju od 15 minuta. Zatim smo iz tekućeg dijela, tj. supernatanta, postepenim dodavanjem zasićene otopine amonijevog sulfata u nekoliko navrata oborili kristale kalcijeva sulfata i druge primjese. Nakon svakog dodavanja amonijeva sulfata istaložili smo primjese centrifugiranjem 20 minuta kod 5 500 okr./min. Tek kada je koncentracija spomenute soli u virusnoj otopini dosegla 1/3 zasićenja kod sobne temperature (23 °C), nastupilo je taloženje virusa, pri čemu je on kristalizirao.

Kristali našeg izolata imaju oblik oktaedra, a karakteristično je da su optički izotropni. U svim svojstvima podudaraju se kristali našeg izolata s kristalima VŽMPR-a (usp. Markham i Smith 1946. i 1949; Markham 1959). To je daljnji dokaz da izolat Y65 pripada VŽMPR-u. Zapazili smo da se kristale može fiksirati s 4% formaldehidom, pri čemu im se oblik i veličina dobro sačuvaju.

Kako se iz iznesenoga vidi, može se VŽMPR razmjerno lako purificirati u odnosu na druge viruse. Prema Markhamu (1959) VŽMPR se može potpuno purificirati ako se tri do četiri puta prekrystalizira.

### Elektronskomikroskopska istraživanja

Kako je već spomenuto u poglavlju »Materijal i metode«, za elektronskomikroskopsku analizu upotrebljeni su bili preparati koji su bili priređeni metodom uranjanja. Na snimkama preparata koji potječu od bolesnih biljaka uočili smo nazočnost vrlo velikog broja sferičnih čestica, koje bi prema približnoj ocjeni njihovih dimenzija mogle biti virusne čestice. Na snimkama jednako priređenih preparata od zdravih biljaka ne mogu se naći čestice takvih dimenzija, već samo mnogo manje. Nesumnjivo je, prema tome, da ove veće čestice doista predstavljaju virus.

Poznato je da promjer elementarnih čestica VŽMPR-a u vlažnom stanju iznosi oko 28 nm (Markham 1959). Što se tiče oblika čestica VŽMPR-a, smatra se da one nisu sferične već da su poliedrične, te da imaju oblik dodekaedra (Markham 1959). To je u skladu sa zapažanjima o poliedričnoj građi i nekih drugih »sferičnih« virusa.

Metodom uranjanja, koja je korištena prilikom elektronskomikroskopske analize, općenito se dobivaju dobri rezultati kod istraživanja virusa s produženom elementarnom česticom. Naše iskustvo govori da se ova metoda može dobro koristiti i za istraživanja sferičnih virusa, i to onih koji u domadarima dolaze u relativno visokoj koncentraciji.

### Diskusija

U ovom radu iznijeli smo rezultate istraživanja svojstava virusnog izolata Y65 izoliranog iz vrste *Brassica rapa* var. *silvestris*. Istraživanja su pokazala da naš izolat pripada virusu žutog mozaika postrne repe (VŽMPR) (usp. Sladetić 1966; Mamula i dr. 1966).

U pogledu reakcije test-biljaka značajno je da smo na nekoliko vrsta uočili pojavu dosta jasnih klorotičnih lokalnih lezija na inokuliranim listovima. Među takve vrste spadaju *Raphanus sativus*, *R. raphanistrum*, *Sisymbrium officinale*, *Brassica perviridis* te još neke druge biljke (usp. tabl. 1). Kako je već iznijeto u poglavlju »Reakcija test-biljaka i krug domadara«, razvitak lezija nije sasvim redovit kod nijedne od navedenih vrsta. Ta okolnost otežava primjenu metode lokalnih lezija za kvantitativna mjerenja VŽMPR, o čemu govore već Markham i Smith (1949). Spomenuti autori navode da se lezije najredovitije razvijaju na vrsti *Brassica chinensis*, i to za vrijeme zime. Govoreći o tim lezijama Markham i Smith ističu da one poprimaju tamnogrimiznu boju ako se primjerci ove vrste uzgajaju uz deficit dušika. Diener i Jenifer (1964) na temelju ove posljednje činjenice razradili su metodu za korištenje lokalnih lezija na *B. chinensis* u svrhu kvantitativnih mjerenja VŽMPR. Pri tom su uzgajali biljke na tlu s malo dušika, na konstantnoj temperaturi i pri svjetlosti određenog intenziteta. Grimizno obojene lezije

Metoda Markhama i Smitha (1949) za purifikaciju VŽMPR dala je dobar rezultat prilikom purifikacije našeg izolata. Povoljna je okolnost da virus pri tom kristalizira, pa se na taj način može prirediti preparat relativno velike čistoće. Takvi preparati mogu dati pouzdane rezultate u kemijskim i drugim analizama virusa.

### Zaključak

Istražujući svojstva virusnog izolata Y65, koji smo izolirali iz vrste *Brassica rapa* var. *silvestris*, utvrdili smo da on predstavlja soj virusa žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus). To smo zaključili na temelju ovih činjenica:

1. Simptomi izolata Y65 na istraženim test-biljkama identični su simptomima koje prouzrokuje VŽMPR.

2. Izolat Y65 uz male iznimke inficira samo biljke iz porodice *Cruciferae*. Takvim krugom domadara odlikuje se i VŽMPR. Izvan krucifera izolat Y65 inficira iste one biljke na koje prelazi i VŽMPR, a to su vrste *Cleome spinosa* (*Capparidaceae*) i *Reseda odorata* (*Resedaceae*).

3. U pogledu fizičkih svojstava izolat Y65 podudara se s VŽMPR.

4. Promjene u plastidima kao posljedica infekcije izolatom Y65, tj. njihova vakuolizacija i destrukcija, istovjetne su s promjenama koje nastaju pod utjecajem VŽMPR.

5. Izolat Y65 daje jasnu pozitivnu serološku reakciju s antiserumom protiv VŽMPR.

6. Purifikacija izolata Y65 može se postići metodama za purifikaciju VŽMPR-a. Purificirani preparat našeg izolata pokazuje jednaka svojstva kao purificirani preparat VŽMPR.

7. Elektronskomikroskopska analiza pokazuje da izolat Y65, jednako kao i VŽMPR, ima poliedrične elementarne čestice koje odgovaraju česticama VŽMPR-a.

\*

Zahvaljujem se Prof. dr Davoru Miličiću za upute i savjete, te kolegama Nikoli Juretiću, Zlati Štefanac, Ani Suda, Mariji Bujas i Ankici Sladetić za pomoć prilikom izrade ove publikacije.

## Opis tabla — Explanation of plates

### Tabla 1

*a* *Raphanus sativus* inficiran izolatom Y65. Prosvjetljivanje nerava na listu. *b* *R. sativus* inficiran izolatom Y65. List s pojavom vrpčastih nerava. *c* *R. sativus* inficiran izolatom Y65. Klorotične lokalne lezije na inokuliranom listu. *d* *R. sativus* inficiran izolatom Y65. Klorotične lokalne lezije na inokuliranom listu.

### Plate 1

*a* *Raphanus sativus* infected with isolate Y65. Vein-clearing on leaf. *b* *R. sativus* infected with isolate Y65. Leaf with vein-banding. *c* *R. sativus* infected with isolate Y65. Chlorotic local lesions on an inoculated leaf. *d* *R. sativus* infected with isolate Y65. Chlorotic local lesions on inoculated leaf.

### Tabla 2

*a* *Brassica perviridis*; infekcija izolatom Y65. Mozaik na listu. Prevladava žuta boja. *b* *B. perviridis* inficirana izolatom Y65. Šarenilo i mozaik na listu. Vidljivo je nekoliko gotovo bijelih polja. *c* *Eruca sativa*; infekcija izolatom Y65. Šarenilo na listu. Upadljiva su žuta područja. *d* *Brassica rapa* var. *rapifera* inficirana izolatom Y65. List s vrpčastim mozaikom.

### Plate 2

*a* *Brassica perviridis*; infection with isolate Y65. Mosaic on leaf. Yellow colour dominant. *b* *B. perviridis* infected with isolate Y65. Variegation and mosaic on leaf. Several almost white areas visible. *c* *Eruca sativa*; infection with isolate Y65. Variegation on leaf. Yellow areas conspicuous. *d* *Brassica rapa* var. *rapifera* infected with isolate Y65. Leaf with line pattern.

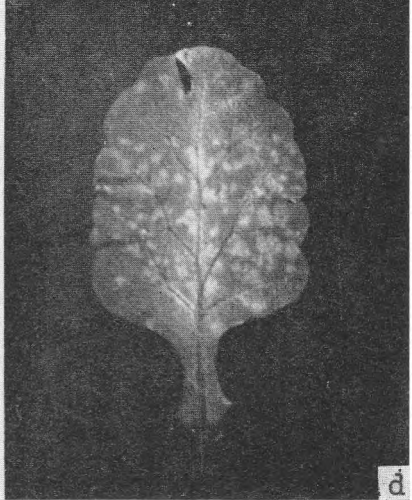
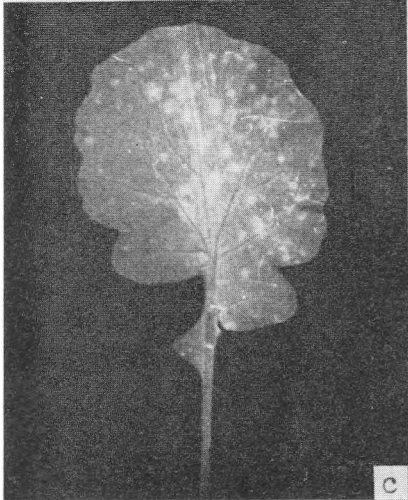
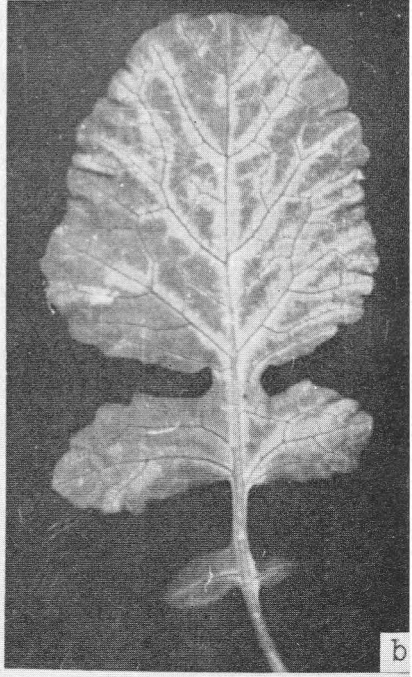
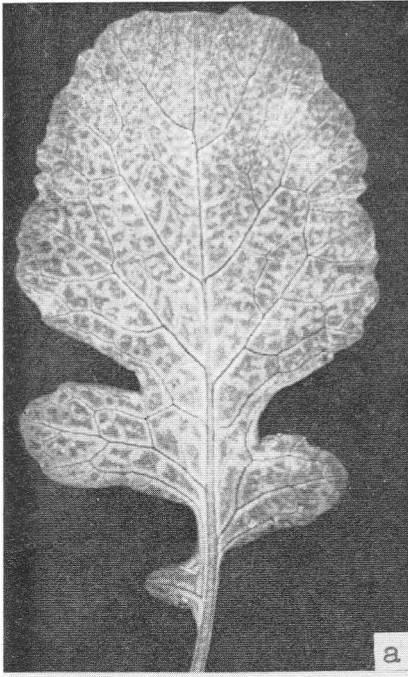
### Tabla 3

*a* *B. perviridis*; izolat Y65. Donja epiderma lista. Vide se velika tijela nepravilnog oblika izgrađena od vakuoliziranih plastida. Nacrtała M. Bujas. *b* *B. rapa* var. *rapifera* inficirana oko 70 dana izolatom Y65. Spužvasti parenhim s vakuoliziranim kloroplastima. Nacrtała Z. Štefanac. *c* *B. rapa* var. *rapifera*; zdrava biljka. Spužvasti parenhim s normalnim kloroplastima. U kloroplastima su označeni granumi. Nacrtała Z. Štefanac.

### Plate 3

*a* *B. perviridis*; isolate Y65. Lower epidermis of leaf. Big bodies of irregular shape built of vacuolate plastids visible. Drawn by M. Bujas. *b* *B. rapa* var. *rapifera* infected for about 70 days with isolate Y65. Spongy parenchyma with vacuolate chloroplasts. Drawn by Z. Štefanac. *c* *B. rapa* var. *rapifera*; healthy plant. Spongy parenchyma with normal chloroplasts. In the chloroplasts grana are marked. Drawn by Z. Štefanac.

TABLA 1 -- PLATE 1



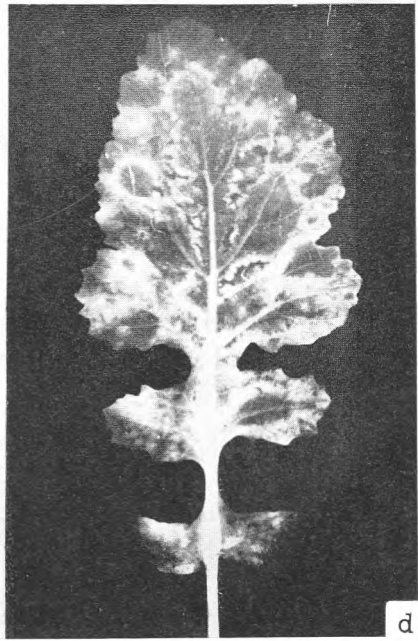
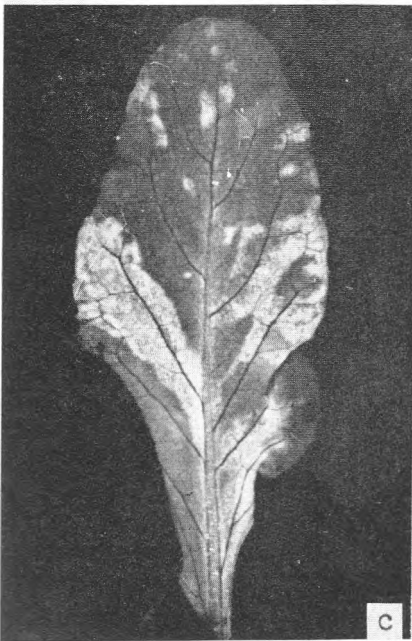
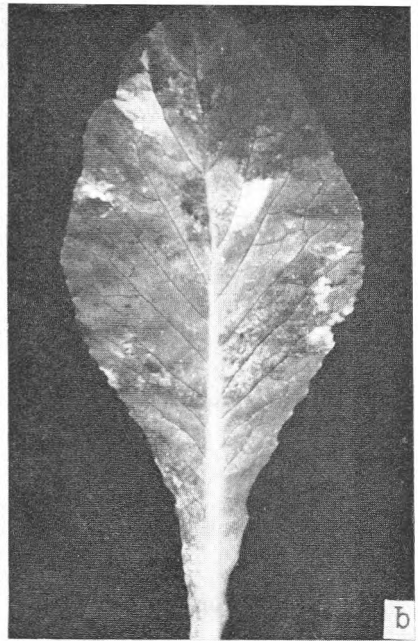
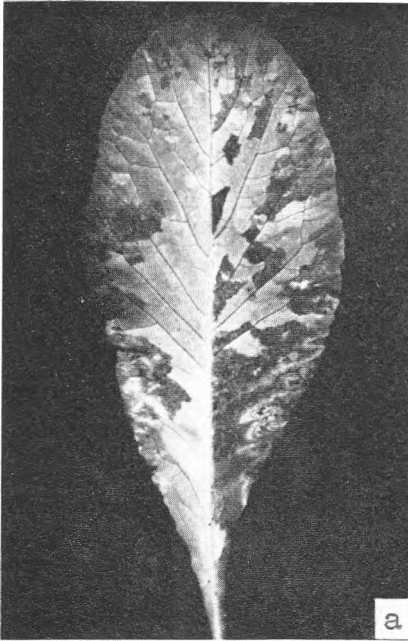
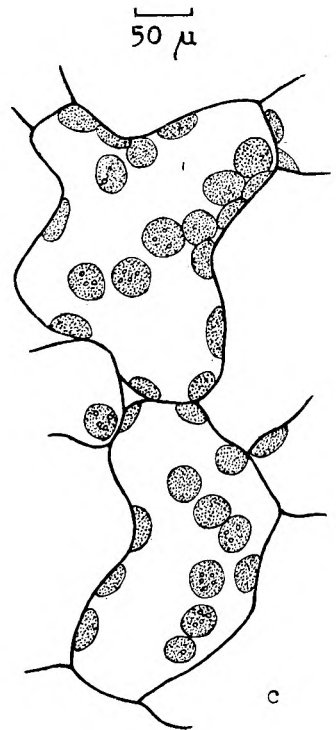
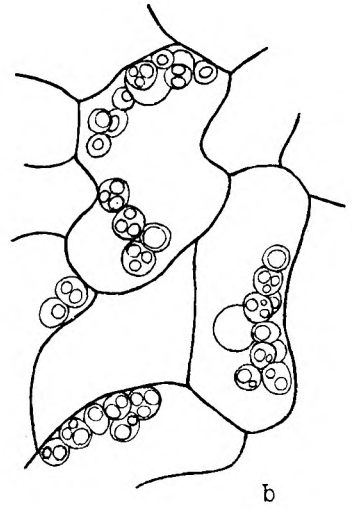
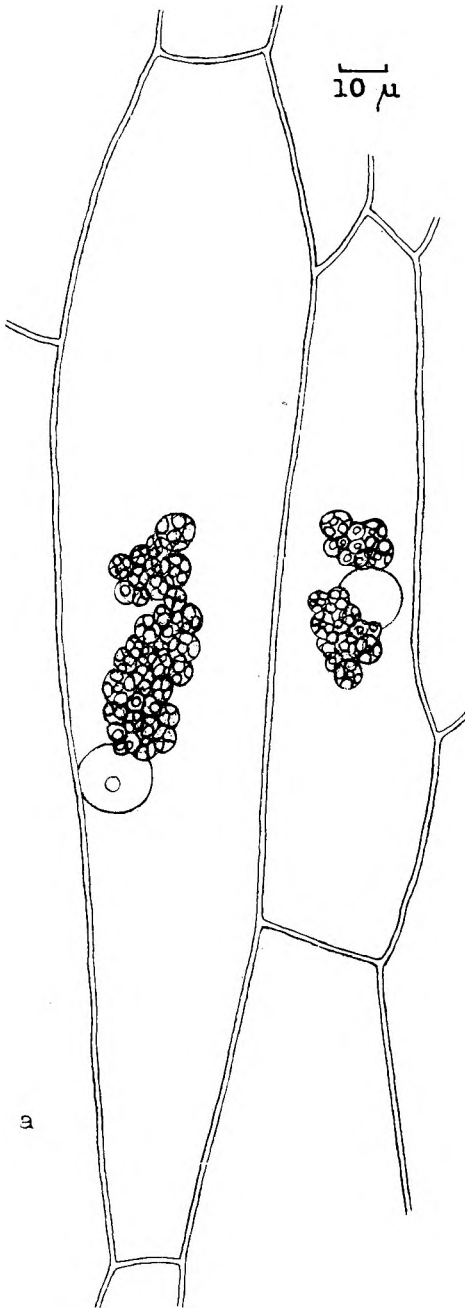


TABLA 3 — PLATE 3



Literatura — Bibliography

- Brandes, J.*, 1957: Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) 9, 151—152.
- Broadbent, L.*, 1957: Investigation of virus diseases of Brassica crops. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Broadbent, L.*, and *G. D. Heathcote*, 1958: Properties and host range of turnip crinkle, rosette and yellow mosaic viruses. Ann. appl. Biol. 46 (4), 585—592.
- Diener, T. O.*, and *F. G. Jenifer*, 1964: A dependable local lesion assay for turnip yellow mosaic virus. Phytopathology 54, 1258.
- Goldin, M. I.*, 1963: Virusnye vključenija v rastitelnoj kletke i priroda virusov. Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR, Moskva.
- Klinkowski, M.*, 1958: Pflanzliche Virologie. Bd. II. Akademie Verlag, Berlin.
- Mamula, Đ.*, 1966: Istraživanje svojstva virusa mozaika cvjetače (Marmor cruciferarum Holmes). Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Mamula, Đ.*, *N. Juretić, M. Wrischer, Z. Devidé i D. Miličić*, 1966: Virus žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) u Jugoslaviji. Agromonski glasnik 16, 843—859.
- Mansi, W.*, 1957: The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitation test. J. Comp. Path. 67, 297—303.
- Markham, R.*, 1959: The biochemistry of plant viruses. U knjizi Burnet, F. M., and W. M. Stanley: The viruses. Vol. 2., 98—128. Academic Press, New York—London.
- Markham, R.*, and *K. M. Smith*, 1964: A new crystalline plant virus. Nature 157, 300.
- Markham, R.*, and *K. M. Smith*, 1949: Studies on the virus of turnip yellow mosaic. Parasitology 39, 330—342.
- Martini, C.*, 1958: The transmission of turnip viruses by biting insects and aphids. Proceedings of the third Conference on potato virus diseases. 106—113. H. Veenman Zonen — Wageningen — 1958.
- Miličić, D.*, and *Z. Štefanac*, 1967: Plastidenveränderungen unter dem Einfluß des Wasserrübenmosaikvirus (turnip yellow mosaic virus). Phytopath. Z. 59, 285—296.
- Miličić, D.*, *Z. Štefanac-Uđbinac i Đ. Mamula*, 1963: Rasprostranjenost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji. Agromonski glasnik 13, 92—100.
- Panjan, M. i Z. Prpić*, 1954: Prilog poznavanju virusne bolesti na stočnom kelju. Biljna proizvodnja 4, 169—184.
- Pirone, T. P.*, *G. S. Pound*, and *R. J. Shepherd*, 1961: Properties and serology of purified cauliflower mosaic virus. Phytopathology 51, 541—546.
- Rubio-Huertos, M.*, 1956: Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology 46, 553—556.
- Sinclair, J. B.*, *P. H. Geil*, and *P. Kaesberg*, 1957: Biophysical studies of wild cucumber mosaic virus. Phytopathology 47, 372—377.
- Sladetić, A.*, 1966: Nalaz virusa žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) u Jugoslaviji. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Smith, K. M.*, 1957: A textbook of plant virus diseases. Churchill. London.
- Štefanac, Z.*, 1964: Prilog poznavanju virusa mozaika postrne repe (Marmor brassicae Holmes). Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.



## SUMMARY

### TURNIP YELLOW MOSAIC VIRUS IN YUGOSLAVIA

*Dorđe Mamula*

(Botanical Institute of the University Zagreb)

In 1965 we have found virus infected specimens of *Brassica rapa* var. *silvestris* with mosaic pattern in Slovenia in the vicinity of the town Celje. Already at the beginning of our investigation of this isolate (Y65) we have noticed the similarity in symptoms with the turnip yellow mosaic virus (TYMV). We have made further researches primarily in order to identify this isolate. In order to be able to make comparisons we have procured by the courtesy of Dr. C. H. Cadman (Invergowrie, Dundee, Scotland) an precisely identified isolate (YS) of the TYMV, and by kindness of Dr. O. Bode (Braunschweig) another strain (YD) of the same virus isolated from Danish turnip plants. Besides that Dr. Cadman has also given us an antiserum against the TYMV.

During the investigation of the isolate Y65 we have studied the reaction of test plants, host range, physical properties, alterations in plastids, and moreover we have carried out serological tests, electron microscope analysis and purification of the virus.

We have tried to transmit isolate Y65 to 20 species from the family *Cruciferae*. Distinct symptoms of infection have developed on 15 species (Table 1). We have also inoculated several species from other families but symptoms of disease have appeared only on two species, that is, on *Cleome spinosa* (*Capparidaceae*) and *Reseda odorata* (*Resedaceae*). On these two species vein-clearing has appeared on the leaves situated above the place of inoculation, and on upper leaves less or more chlorotic areas and mosaic. *C. spinosa* was mentioned by Smith (1957) and *R. odorata* by Broadbent and Heathcote (1958) as species susceptible to TYMV. These plants are up to now the only known species outside the family *Cruciferae* which can be infected by TYMV.

Infected cruciferous plants usually show distinct symptoms of infection. The incubation period lasts from 6 to 15 days. The appearance of chlorotic local lesions on inoculated leaves is fairly common in some hosts and it usually comes before the symptoms of systemic infection. In the course of our investigations the most distinctly developed lesions have

been found in *Raphanus raphanistrum*, *R. sativus* (Pl. 1, c, d), *Brassica oleracea* var. *gongylodes* f. *violacea*, *Eruca sativa* and *Sisymbrium officinale*, and somewhat less expressed lesions in *Brassica chinensis*, *B. perviridis*, *B. rapa* var. *rapifera* and *B. napus* var. *napobrassica*. It is likely that some of the quoted species, particularly *R. raphanistrum* and *R. sativus*, will be suitable for use in quantitative investigations of this virus. Species *B. chinensis* has already been used for that purpose (Diener and Jenifer 1964).

The first symptom of the systemic infection is vein-clearing (Pl. 1, a). Parallel with this symptom, systemic spots develop in some species, as for instance in *R. sativus*, *B. chinensis*, *B. perviridis*, *B. rapa* var. *rapifera* and specially in *B. oleracea* var. *gongylodes* f. *violacea*. In some hosts we have sometimes observed vein-banding (Pl. 1, b). Besides vein-clearing the most common and the most characteristic symptoms of our isolate are variegation and mosaic. These two symptoms are expressed very clearly on the leaves of *B. perviridis* (Pl. 2, a, b), *B. rapa* var. *rapifera*, *B. chinensis* and sometimes *Eruca sativa* (Pl. 2, c). Green, clear yellow and often almost white areas alternate on their leaves (Pl. 2, a, b, c) the yellow areas being most outstanding. Quite frequently the line pattern can be seen on leaves of *B. perviridis* and *B. rapa* var. *rapifera* (Pl. 2, d). The normally yellow petals of *B. chinensis* often show the phenomenon of white lines, and sometimes petals are white on their entire surface (comp. Smith 1957).

In the greenhouse grown infected plants are little stunted in comparison with the healthy ones.

According to the described symptoms in hosts of the isolate Y65, the isolate fully agrees with the descriptions of TYMV by Smith (1957), Klinkowski (1958) and other authors. We have also noticed a great similarity between the symptoms of the isolates Y65 and YS.

In respect to the physical properties our isolate corresponds to TYMV. The infection end-point of our isolate is somewhat higher than  $1:10^6$ , and it withstands in vitro considerably more than 10 days (comp. Smith 1957, Broadbent and Heathcote 1958).

Isolate Y65 causes a development of characteristic alterations in plastids in the cells of infected plants. One or more colourless vacuoles are formed in each plastid so that the green parts of the plastids sometimes can be seen in the form of rings or sickles (Pl. 3, b). The plastid can be seen in the first form when a vacuole arises in the centre of it and in the sickle form when a vacuole arises on the margin. Besides that plastids gather forming bigger masses in which their boundaries later disappear. Such masses often have an irregular shape and are ordinary vacuolised.

Described alterations of plastids are especially clearly visible in sub-epidermal cells of leaves. We have observed them for instance in *B. chinensis*, *B. perviridis*, *Sinapis alba* and in many other species.

The changes of plastids observed by us agree with those investigated by Rubio (1956) in plants also infected with TYMV.

Isolate Y65 has given a distinct positive serological reaction in the slide precipitin test and in the agar-gel diffusion test with the antiserum against the TYMV. In these tests it has reacted very similarly to the isolate YS (Table 2).

We have also purified the isolate Y65 using the method for virus sedimentation by means of ammonium sulphate (Markham and Smith 1949). Clarified infective sap has been freed from various ingredients by applying fractional sedimentation with saturated solution of ammonium sulphate. By such a concentration of this salt, which corresponds to one third of saturation, the virus crystallizes in the solution into the form of small, optical isotropic octahedra which are identical with those of the TYMV (Markham and Smith 1946, 1949; Markham 1959).

Electron microscope analysis revealed the presence of numerous "spherical", i. e. polyhedral particles in preparation of isolate Y65 which, as regards their dimensions, correspond to virus particles. In preparation of healthy plants we did not find "spherical" particles of same or similar size. As it is already known, the particles of TYMV have a diameter of 28 nm (Markham 1959).

According to these results the presence of turnip yellow mosaic virus in Yugoslavia is proved (comp. also Mamula et al. 1966; Sladetić 1966; Miličić and Stefanac (1967).