

PRILOG POZNAVANJU
RASPROSTRANJENOSTI VIRUSA KRSTAŠICA
U JUŽNOJ EVROPI

With Summary in English

ĐORĐE MAMULA i DAVOR MILIČIĆ

(Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 2. 2. 1971.

Uvod

Na području Jugoslavije već smo više puta proučavali krstašice inficirane virusima koji pretežno napadaju vrste iz te biljne porodice. Nakon identifikacije utvrdili smo ove viruse: virus mozaika postrne repe (VMPR, turnip mosaic virus) (Štefanac-Uđbinac i dr. 1963), virus mozaika cvjetače (VMC, cauliflower mosaic virus) (Mamula i Miličić 1968; usp. Panjan i Prpić 1954), virus žutog mozaika postrne repe (VŽMPR, turnip yellow mosaic virus) (Mamula i dr. 1966) i virus mozaika rotkvice (VMR, radish mosaic virus) (Štefanac i Mamula 1971).

Spomenuti virusi nađeni su i u većem broju drugih zemalja (Klinkowski 1968). Tako je npr. VMPR poznat u oko 8 evropskih zemalja (Belgija, Njemačka, Poljska, Austrija, Mađarska i dr.), a raširen je i u SAD, Japanu, Kini i nekim drugim područjima (Yoshii 1963). Nedavno je nađen u Britanskoj Kolumbiji (Stace-Smith i Jacoli 1967). VMC je također dosta raširen u Evropi, kao na primjer u Engleskoj, Francuskoj, Španjolskoj, Austriji i u još oko 7 zemalja, a u posljednje vrijeme je zabilježen u Bugarskoj i Italiji (Kovačevski 1968, Giunchedi 1968). Nađen je i izvan Evrope, i to u SAD, Japanu, Novom Zelandu i Australiji (usp. Randles i Crowley 1967). VŽMPR je najprije pronađen u Velikoj Britaniji (Markham i Smith 1946), nakon čega su ga našli u Portugalu, Francuskoj, Danskoj, Njemačkoj i Ju-

goslaviji, tj. samo u evropskim zemljama. VMR je donedavna bio poznat samo iz SAD i Japana (Campbell i Tochiara 1969). Kao što je naprijed spomenuto, u posljednje vrijeme našli su ga Štefanac i Mamula i u Evropi. Dalja dva poznatija virusa krstašica jesu virus kovrčavosti postrne repe (turnip crinkle virus) i virus rozete postrne repe (turnip rosette virus). Nalaz prvog do sada je višekratno potvrđen u Velikoj Britaniji, a ustanovilo se da dolazi i u Indiji (usp. Hollings i Stone 1969). Virus rozete postrne repe do sada je nađen samo na ograničenom prostoru u Škotskoj (Broadbent i Heathcote 1958).

Što se značaja za poljoprivredu tiče, valja istaći da virusi krstašica čine velike štete jer od njih u znatnoj mjeri obolijevaju i stradavaju naročito postrna repa (*Brassica rapa* L. var. *rapifera* Metzg.), cvjetača (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.), kupus (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.), stočni kelj (*B. oleracea* L. var. *acephala* DC) uljna repica (*B. napus* L. var. *oleifera* DC.) i druge kulture krstašica.

U prirodi na krstašicama se može naći i veći broj drugih virusa, na primjer virus mozaika duhana, virus mozaika krstavca i neki drugi koji ipak češće napadaju biljke iz drugih porodica. Takvi virusi neće biti predmet ovog rada (usp. Štefanac 1967, Horváth 1969, Broadbent 1957).

U radu će biti izneseni novi podaci o nalazištima virusa krstašica u našoj zemlji, posebno u njenom zapadnijem dijelu. Radi dobivanja cjelovitije slike o rasprostranjenosti tih virusa u nas, bit će predloženi podaci i o nekoliko prijašnjih nalazišta (Miličić i dr. 1963, Mamula i dr. 1966).

Materijal i metode

Da bismo prikupili podatke o rasprostranjenosti virusa krstašica, pregledali smo velik broj nasada postrne repe, a u manjoj mjeri kulture raznih varijeteta *Brassica oleracea*. te neke samonikle krstašice (*Sinapis arvensis*, *Alliaria officinalis* i dr.). Kod identifikacije smo primijenili četiri metode, i to:

1. pregled i analiza simptoma na nalazištu,
2. analiza staničnih promjena,
3. ispitivanje izolata serološkom metodom,
4. proučavanje izolata na pokusnim biljkama.

Postupak identifikacije je vršen redoslijedom kojim su metode navedene.

Terenski dio rada obavljali smo većim dijelom u toku jesenske sezone, obično od sredine mjeseca rujna do kraja listopada. Zbog povoljnih vanjskih uvjeta, u to vrijeme su dobro izraženi simptomi bolesti na biljkama. Pored toga, tada je u punom vegetacijskom razvoju postrna repa koja je naročito prijemljiva za viruse krstašica i reagira dobro izraženim vanjskim i unutrašnjim simptomima bolesti.

Sabrane listove inficiranih biljaka istražili smo svjetlosnim mikroskopom da bismo utvrdili karakter staničnih promjena. Kao što je poznato, djelovanjem virusa krstašica u stanicama nastaju specifične promjene koje se očituju u pojavi karakterističnih staničnih uklopina amorfnog ili rjeđe kristaličnog tipa, te u promjenama na plastidima (Miličić i dr. 1969) (sl. 3a, b). Konačnu identifikaciju izvršili smo primjenom

preostalih dviju metoda, tj. serološke i metode pokusnih biljaka. Za serološke pokuse koristili smo se antiserumima koji su priređeni u našem laboratoriju. Od pokusnih biljaka pretežno smo upotrebljavali ove vrste: *Brassica rapa var. rapifera*, *B. chinensis* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *Ch. murale* L., *Ch. quinoa* Willd., *Nicotiana megalosiphon* Heurch et Muell. Arg. i *N. tabacum* L. »Hicks resistant«.

Rezultati

Podaci koje ovdje iznosimo predstavljaju rezultate opažanja i proučavanja koje smo provodili u toku nekoliko godina. Najveći broj ih potječe iz 1969. i 1970. godine. Velik dio lokaliteta koje smo pregledali nalazi se na teritoriju Hrvatske, dok se manji broj nalazi u Sloveniji, Bosni i Hercegovini i Srbiji (sl. 1). Najviše podataka prikupili smo iz bliže i dalje okolice Zagreba. Na sl. 1. prikazana su važnija nalazišta virusa krstašica, dok su na tabl. 1. poimenično navedena ta ista nalazišta kao i neka druga koja nisu mogla biti označena na sl. 1.

Naš dosadašnji rad na ovoj problematici pokazao je da su u istraženim područjima prilično česti ovi virusi krucifera: VŽMPR, VMR, VMPR i VMC. Korisno je istaći da smo ih katkad, naročito VMR i VŽMPR, nalazili po nekoliko godina uzastopno na istom lokalitetu, kao npr. u Tuhlju u toku 1968., 1969. i 1970. godine. Ta činjenica upućuje na to da na tim lokalitetima postoje korovne biljke u kojima se virusi mogu održati u toku zime.

Iz tabl. 1. može se vidjeti iz kojih smo biljaka izolirali pojedine viruse. Najviše smo ih našli na postrnoj repi, naročito VMR i VŽMPR, a osim toga i na još 5 drugih vrsta. Pri identifikaciji većeg broja izolata primijenjene su sve četiri metode (tabl. 1), pa su podaci vrlo pouzdani.

Poznato je da virusi krstašica na nekom užem području mogu u većem postotku inficirati kultivirane ili divlje krstašice (usp. Broadbent 1957). Opažanjima i istraživanjem došli smo do zanimljivih rezultata. Već je otprije utvrđeno da je na pojedinim lokalitetima u okolici Zagreba velik broj, čak preko 20% primjeraka, vrste *Alliaria officinalis* bio inficiran s VMPR, dok smo u nasadima cvjetače u okolini Splita nalazili mnogo primjeraka koji su bili napadnuti s VMC (usp. Miličić i dr. 1958, 1963). U toku 1970. godine ustanovili smo da na nekim mjestima u bližoj okolici Siska bilo više primjeraka *Sinapis arvensis* inficiranih s VMPR nego zdravih biljaka. Na tabl. 2. iznijeli smo podatke o zastupljenosti različitih virusa krstašica na površinama pod kulturom. U prvom dijelu tablice izneseni su rezultati ispitivanja koje smo izvršili u Tuhlju na tri odvojene površine zasađene postrnom repom. Budući da su u ta tri nasada virusi bili zastupljeni u podjednakim odnosima, podatke smo ujediniili i zajedno prikazali. Iz tablice se vidi da je broj bolesnih biljaka bio prilično velik, tako da je iznosio oko 9% od ukupnog broja pregledanih biljaka. Zanimljivo je, međutim, bilo ustanoviti u kojem su odnosu bili zastupljeni pojedini virusi. Pokazalo se da je u najvećoj mjeri bio raširen VMR, pri čemu je na njega otpadala oko polovina od ukupnog broja bolesnih biljaka, tj. 4,1%. Dosta je čest bio i VŽMPR. Za razliku od njih, u manjoj mjeri (oko 1%) nasade su zahvatili VMC i VMPR. Još manji je bio postotak tzv. smjesnih infekcija, kod kojih je pojedina biljka bila istovremeno napadnuta od dva ili više vi-

Table 1 — Podaci o geografskom rasprostranjenju i identifikaciji virusa krstašica u Jugoslaviji
 Table 1 — Geographical distribution and identification of crucifer viruses in Yugoslavia

Virus	Nalazište Finding- place	Biljka Plant	Vrijeme nalaza Time of finding	Metode za identifikaciju Methods for identification			
				S	I	Sl	T
VMR turnip mosaic virus	Zagreb	<i>Alliaria officinalis</i> Andrž.	1958	+	+	+	+
	Split	<i>Matthiola incana</i> R. Br.	1961/62	+	+	+	+
	Split	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	1961/62	+	+	+	+
	Novi Sad	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1964	+	+	+	+
	Tuhelj	"	1969	±	+	0	+
	Delnice	"	1970	±	+	0	+
VMC cauliflower mosaic virus	Sisak	<i>Sinapis arvensis</i> L.	1970	+	+	0	+
	Split	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.	1961/62	+	+	0	+
	Tuhelj	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1968	±	+	0	+
	Zagreb	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> DC.	1969	+	+	0	+
	Rijeka	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	1970	+	+	0	+
	Zelina	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1970	±	+	0	+
VŽMPR turnip yellow mosaic virus	Celje	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>silvestris</i> (Lam.) Briggs	1965	+	+	+	+
	Kranj	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1966	+	+	+	0
	Zagreb	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.	1966	±	+	+	+
	Tuhelj	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1968	+	+	+	+
	Zelina	"	1970	+	+	+	+
	Popovec	"	1970	+	+	+	+
VMR radish mosaic virus	Sarajevo	"	1970	+	+	+	+
	Delnice	"	1970	+	+	+	0
	Zagreb	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapifera</i> Metzg.	1967	+	+	+	+
	Tuhelj	"	1968	+	+	+	+
	Sarajevo	"	1970	+	+	+	+
	Samobor	"	1970	+	+	+	+
VMR turnip mosaic virus	Zelina	"	1970	+	+	0	+
	Popovec	"	1970	+	+	+	0
	Ivanec	"	1970	+	+	+	0
	Ivanec	"	1970	+	+	+	0

Tumač znakova: VMR = virus mozaika postrne repe, VMC = virus mozaika cvjetače, VŽMPR = virus žutoj mozaiki postrne repe, VMR = virus mozaika rotkvice; (j) = jesen, (p) = proljeće, (z) = zima; S = simptomi, I = stanišne ukllopine, Sl = serološka reakcija, T = test biljke; + = pozitivan nalaz, ± = nesiguran nalaz, 0 = nije ispitano

Explanation of signs: VMR = turnip mosaic virus, VMC = cauliflower mosaic virus, VŽMPR = turnip yellow mosaic virus, VMR = radish mosaic virus; (j) = autumn, (p) = spring, (z) = winter; S = symptoms, I = cell-inclusions, Sl = serological reaction, T = test plants reaction, + positive, ± = uncertain, 0 = not tested

rusa (usp. tabl. 2). Prilikom pregleda nasada postrne repe u Ivancu i okolici dobiveni su rezultati koji se donekle razlikuju od onih iz Tuhlja. Iz tabl. 2. vidi se da smo na toj površini našli samo VMR. Pored toga, u Ivancu VMR je bio raširen čak u dvostruko većem postotku nego u Tuhlju. U nekim drugim nasadima postrne repe u Ivancu, čija je udaljenost od spomenutog iznosila do nekoliko kilometara, bio je VMR raširen u manjoj mjeri. Ta istraživanja upućuju na to da su u našoj zemlji, barem na postrnoj repi, a možda i na drugim krstašicama, u najvećoj mjeri rasprostranjeni VMR i VŽMPR (usp. K u s 1969).

Tablica 2. — Prikaz rasprostranjenosti virusa krstašica na nasadima postrne repe

Table 2. — Outline of crucifer viruses distribution in turnip fields

Bolesne biljke napadnute s označenim virusima ili zdrave biljke Plants infected with the named viruses or healthy plants	Tuhelj 1969		Ivanec 1970	
	Istraženi primjerci Broj	Postotak	Istraženi primjerci Broj	Postotak
	Investigated specimen Number	Percentage	Investigated specimen Number	Percentage
VMR	127	4,1	88	8,7
VŽMPR	50	1,7	—	—
VMC	35	1,2	—	—
VMPR	23	0,8	—	—
VMR + VMC	15	0,5	—	—
VMR + VŽMPR	8	0,3	—	—
VŽMPR + VMC	8	0,3	—	—
VMR + VŽMPR + VMC	4	0,1	—	—
Bolesne biljke (Ukupno) Infected plants (Total)	270	9,0	88	8,7
Zdrave biljke Healthy plants	2730	91,0	927	91,3
Bolesne + zdrave biljke (Ukupno) Infected + healthy plants (Total)	3000	100	1015	100

Tumač znakova: VMR = virus mozaika rotkvice; VŽMPR = virus žutog mozaika postrne repe; VMC = virus mozaika cvjetače; VMPR = virus mozaika postrne repe

Explanation of signs: VMR = radish mosaic virus; VŽMPR = turnip yellow mosaic virus; VMC = cauliflower mosaic virus; VMPR = turnip mosaic virus

U toku godine 1969. pregledali smo nasade postrne repe i u susjednoj Austriji, naročito na području između Celovca i Beljaka uz južnu obalu Drave (sl. 1). Utvrdili smo više oboljelih biljaka koje su napali VŽMPR i VMR. To su ujedno prvi podaci o raširenosti tih dvaju virusa u toj zemlji.

Diskusija

Izvjесnu zanimljivost predstavljaju naši podaci o dosta velikoj raširenosti VMR u Jugoslaviji kao i o nalazu istog virusa u Austriji. Koliko je nama poznato, taj virus sve donedavna nije bio nađen ni u jednoj evropskoj zemlji. Nedavno su ga pronašli prvi put u Evropi Štefanac i Mamula (1971). Mi smo tokom ovih istraživanja ustanovili zanimljivu činjenicu da je taj virus gotovo najčešći virus krstašica u Jugoslaviji. Osim toga smo ga pronašli i u susjednoj Austriji za koju je zemlju prvi put zabilježen. Drugi, u svijetu relativno rijedak virus krstašica je VŽMPR. Prema podacima Matthews a i Ralphi a (1966) ovaj virus do sada nije nađen izvan Evrope, a Klinkowski (1968) navodi podatke o njegovoj nazočnosti u 6 evropskih zemalja, uključujući i našu zemlju. Taj virus smo našli u našoj zemlji na mnogo lokaliteta i na različitim vrstama. Prilikom naših istraživanja pronašli smo ga i u Austriji u kojoj do tada nije bio poznat. Interesantno je da je to prvi susjed Jugoslavije u kojemu je taj virus pronađen. Bilo bi interesantno utvrditi je li on raširen i u drugim zemljama srednje Evrope.

Za identifikaciju virusa krstašica vrlo je podesna biljka postrna repa. Često smo samo na osnovi simptoma na ovoj vrsti prilikom pregleda nasada mogli vrlo sigurno ocijeniti vrstu virusa, naročito kada se radilo o VŽMPR i VMR. Prvi virus uzrokuje nastajanje izrazitog šarenila i mozaika na listovima s karakterističnim žutim, katkad gotovo bijelim područjima. Deformacije listova nisu izrazite kao kod drugih virusa krstašica (usp. Markham i Smith 1949, Mamula 1967/68). Biljke inficirane s VMR većinom ispoljavaju nekrotične promjene po cijelom listu, uključujući glavnu žilu i peteljku lista. Zbog toga su listovi često deformirani, a biljke kržljave. Na njima se uz to mnogo puta vidi šarenilo (sl. 2a), a dosta često klorotični ili nekrotični prstenovi (Campbell 1964, Štefanac i Mamula 1971). Preostala dva virusa, tj. VMR i VMC, uzrokuju na postrnoj repi nešto manje markantne simptome nego VŽMPR i VMR. Prilikom infekcije s pomoću VMR često se na ovoj vrsti pojavljuje šarenilo, ali je žuti ton obojenja svjetlijih područja znatno slabiji nego pri VŽMPR. Deformacije listova i kržljivost biljaka česte su kod infekcije ovim virusom, pa on u tom pogledu ima sličnosti s VMR i VMC. Na postrnoj repi, koja je inficirana s VMC, karakteristični su simptomi prosvjetljivanje nerava, vrpčasto obojenje uz nerve, bočno savijanje glavne žile lista i cijelih listova praćeno često nekrotičnim promjenama, kao i jako naglašeni zastoj u rastu biljaka koje mnogo puta poprimaju izgled kržljave rozete (Tompkins 1937, Mamula i Miličić 1968). Treba spomenuti da je prosvjetljivanje nerava kao simptom bolesti često prisutno i pri infekcijama s

Opis slika — Description of figures

Sl. 1. Nalazišta virusa krstašica u Jugoslaviji i Austriji.

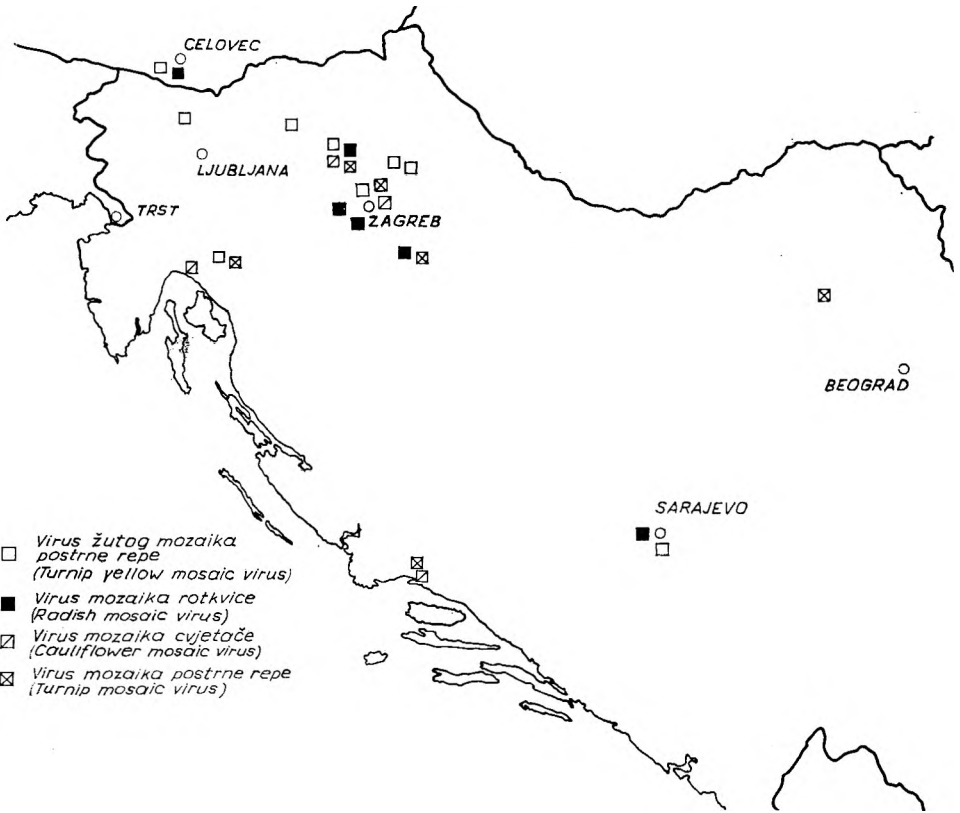
Fig. 1. Finding places of crucifer viruses in Yugoslavia and Austria.

Sl. 2. Simptomi virusa mozaika rotkvice. a: Inficirana *Brassica rapa* var. *rapifera* iz polja. Zapažaju se nekroze uz glavne nerve, deformacije listova i mozaik. b: Zdrava *Brassica rapa* var. *rapifera* iz istog polja kao a.

Fig. 2. Symptoms of radish mosaic virus. a: *Brassica rapa* var. *rapifera* infected in field. Necrosis along main nerves, leaf deformations and mosaic are visible. b: Healthy *Brassica rapa* var. *rapifera* from the same field as a.

Sl. 3. Stanične promjene koje uzrokuju virusi krstašica (a, b). a: Vakuolizacija i agregacija kloroplasta u stanicama mezofila vrste *Brassica chinensis* pod utjecajem virusa žutog mozaika postrne repe (izolat iz Sarajeva); Povećanje 1000 ×. b: Vakuolizirano X-tijelo virusa mozaika rotkvice (izolat iz Tuhlja) u epidermskoj stanici (područje glavnog nerva) vrste *Brassica rapa* var. *rapifera*; v = vakuole; Povećanje 1000 ×. c: Sero-loška reakcija u agar-gelu između raznih izolata virusa mozaika rotkvice i antiseruma protiv tog virusa. A = izolat iz Austrije, S = izolat iz Sarajeva, T = izolat iz Tuhlja, Z = sok zdrave postrne repe, sT = antiserum od izolata T.

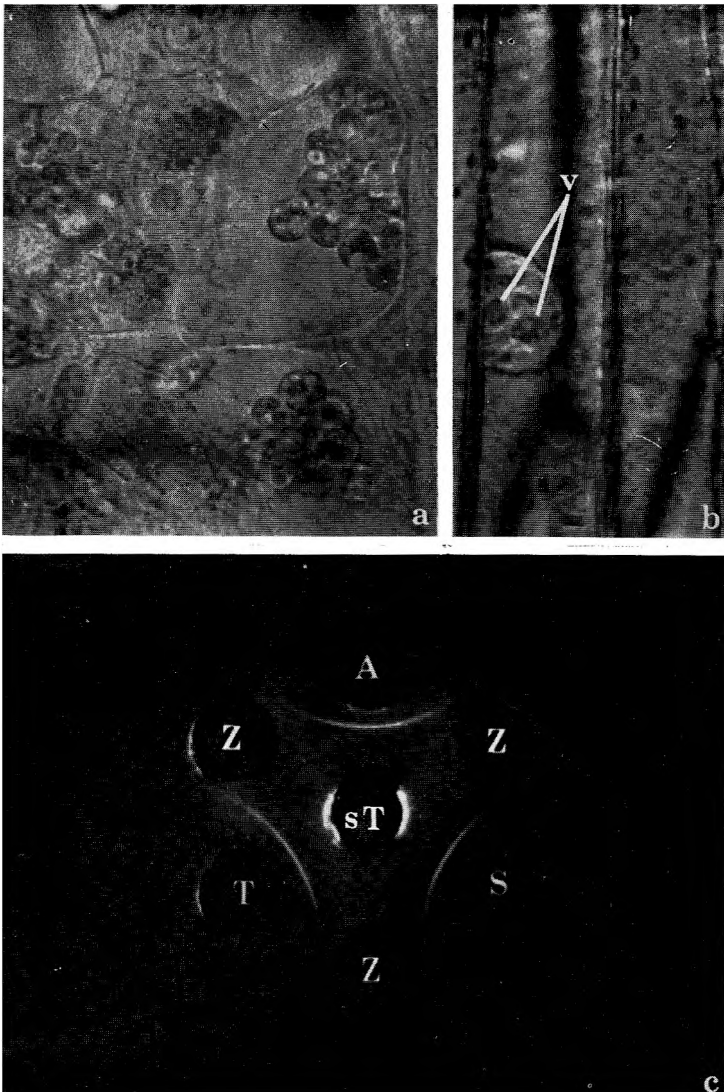
Fig. 3. Cell alterations and inclusions caused by crucifer viruses (a, b). a: Vacuolisation and aggregation of chloroplasts in mesophyll cells of *Brassica chinensis* infected with turnip yellow mosaic virus (isolate from Sarajevo); Magnification 1000 ×. b: Vacuolated X-body of radish mosaic virus (isolate from Tuhelj) in an epidermal cell (main nerve region) of *Brassica rapa* var. *rapifera*; v = vacuoles; Magnification 1000 ×. c: Serological reaction in agar-gel between various isolates of radish mosaic virus and antiserum against this virus. A = isolate from Austria, S = isolate from Sarajevo, T = isolate from Tuhelj, Z = sap of healthy turnip plant, sT = antiserum to isolate T.



Sl. 1. — Fig. 1.



Sl. 2. — Fig. 2.



Sl. 3. — Fig. 3.

VMPR i VŽMPR, pri čemu je naročito izrazito kod posljednjeg virusa. Korisno je istaći da su u stakleniku simptomi VMR na kupusu, cvjetači i nekim drugim varijetetima vrste *Brassica oleracea*, slabije izraženi nego simptomi VMPR, VMC i VŽMPR, pa nije isključeno da takvi odnosi vladaju i na polju kod ovih varijeteta.

Za obavljanje terenskih istraživanja vrlo je povoljno doba jesen jer virusi tada postignu maksimum svog rasprostranjenja u toku godine (usp. »Materijal i metode«). U to vrijeme se, osim toga, najbolje može uočiti njihov štetni učinak na kulture krstašica. U vezi s tim možemo spomenuti da najveću štetu nanose VMC, VMPR i VMR, dok je štetnost VŽMPR, kako se čini, nešto manja (usp. Lister 1958, Hollings i Stone 1969).

Da bismo dobili što pravilniju sliku o rasprostranjenosti virusa, upotrijebili smo četiri metode za identifikaciju. Ispitivanje s pomoću test-biljaka je pouzdano, ali na rezultat često treba duže čekati. Zbog toga veću vrijednost imaju one metode koje mogu brzo dati rezultate. Od tih spomenut ćemo serološku i metodu istraživanja staničnih promjena s pomoću svjetlosnog mikroskopa. Vrijednost prve već je dobro poznata, pa se njome vrlo često služimo za potrebe identifikacije (sl. 3c).

Metoda istraživanja staničnih promjena do sada se rijetko ili nedovoljno primjenjivala za ove svrhe. Većinom je bila u upotrebi prilikom istraživanja virusa iz grupe mozaika duhana čije su stanične uklopine dobro proučene (usp. Miličić i dr. 1968). Djelovanjem virusa krstašica dolazi također do formiranja specifičnih staničnih uklopina, većinom tipa X-tijela, a ima i drugih promjena, naročito na plastidima. Oblik, struktura i druga svojstva inkluzija karakteristični su za svaki pojedini virus. Već su dobro proučene promjene koje nastaju pod utjecajem nekih virusa krstašica, i to VMPR, VMC i VŽMPR (Rubio 1956, Miličić i Stefanac 1967, Miličić i dr. 1969) (usp. sl. 3a).

Inkluzije VMR tek su u novije vrijeme istražene (usp. Stefanac i Mamula 1971); detaljnija istraživanja ovih inkluzija izvršili su Stefanac i Ljubešić (1971). Inkluzije ovog virusa obično su nešto veće nego inkluzije VMPR, VŽMPR i VMC. Sadrže po jednu, ili još češće više dosta velikih vakuola (sl. 3b). Često su u njima uklopljena jasno vidljiva oveća zrnca.

Primjenom metode svjetlosno-mikroskopskog istraživanja staničnih promjena mogli smo naročito brzo i sigurno identificirati VŽMPR i VMR, jer su intracelularne promjene koje oni uzrokuju najizrazitije. Ova metoda nam je davala sigurne rezultate koji su redovito bili potvrđeni serološkim istraživanjima i analizom s pomoću pokusnih biljaka; zbog toga u kasnijem radu mnogo puta nije bilo potrebno primjenjivati posljednje dvije metode. Zahvaljujući u velikoj mjeri upravo metodi inkluzija bili smo u mogućnosti dati veći broj podataka o rasprostranjenosti virusa krstašica u našoj zemlji.

Potrebno je napomenuti da su kod nekih varijeteta vrste *Brassica oleracea* stanične promjene slabije izražene nego kod postrne repe, gorušice, zatim vrsta *Brassica rapa var. silvestris*, *Sisymbrium officinale* i nekih drugih. Zbog toga metoda inkluzija nije za sada toliko upotrebljiva za varijetete vrste *B. oleracea*, pa će biti potrebno inkluzije kod njih još detaljnije proučiti.

Zaključak

1. U Jugoslaviji su vrlo rašireni slijedeći virusi krstašica: virus mozai-ka rotkvice, virus žutog mozaika postrne repe, virus mozaika postrne repe i virus mozaika cvjetače.
2. Značajno je da smo na više mjesta u Jugoslaviji utvrdili nazočnost virusa mozaika rotkvice. Ovaj virus pronašli su nedavno Štefanac i Mamula (1971) po prvi put u Evropi; prije toga VMR nije bio nađen ni u Jugoslaviji niti u drugim zemljama Evrope nego samo u SAD i Japanu. Ovdje smo iznijeli prve detaljnije podatke o rasprostranjenosti tog virusa u Evropi. Taj virus, kao i virus žutog mozaika postrne repe, našli smo još i u Austriji u kojoj su ova dva virusa prilikom naših istraživanja prvi puta pronađena.
3. Prilikom rada na identifikaciji velikog broja virusnih izolata naročito korisnim pokazala su se svjetlosno-mikroskopska istraživanja staničnih uklopina i drugih promjena u stanicima.

Literatura — References

- Błaszczak, W., 1968: Virus mozaiki rzepy (*Marmor brassicae* H.) i jego wpływ na plonowanie rzepy i gorczycy. Roczn. Nauk roln., Ser. A, 94, 629—640.
- 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, 585—592.
- Campbell, R. N., 1964: Radish mosaic virus, a crucifer virus serologically related to strain of bean pod mottle virus and to squash mosaic virus. Phytopathology 54, 1413—1424.
- Campbell, R. N., and H. Tochiwara, 1969: Radish enation mosaic virus is a strain of radish mosaic virus. Phytopathology 59, 1756—1757.
- Giunchedi, L. e J. Lu, 1968: Ricerche sul mosaico del Cavolfiore (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L.). Phytopath. mediterr. 7, 140—144.
- Hollings, M., and Olwen M. Stone, 1969: Purification and serological reactions of four polyhedral viruses from Cruciferae. Zbl. Bakt. II 123, 237—248.
- Horváth, J., 1969: Untersuchungen über eine Virose von *Brassica napus* L. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hungaricae 4, 29—44.
- Klinkowski, M., 1968: Pflanzliche Virologie Bd. II, Akademie Verlag, Berlin.
- Kovačevski, I., 1968: Mozaika na cvetnoto zelev v Belgarija. Grad. i loz. nauka 5, 35—45.
- Kus, M., 1969: Virus rumenega mozaika strniščne repe v Sloveniji. Zaštita bilja 20, 165—167.
- Lister, R. M., 1958: Some turnip viruses in Scotland and their effect on yield. Plant path. 7, 144—146.
- Mamula, Đ., 1967/68: Virus žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) u Jugoslaviji. Acta bot. Croatica 26—27, 85—100.
- Mamula, Đ., und D. Miličić, 1968: Über die Eigenschaften von zwei jugoslawischen Isolaten des Blumenkohlmosaikvirus. Phytopath. Z. 61, 232—252.
- Mamula, Đ., N. Juretić, M. Wrischer, Z. Devidé i D. Miličić, 1966: Novi podaci o virusima krucifera u Jugoslaviji. Agronomski glasnik 16, 845—861.

- Markham, R., and K. M. Smith, 1946: A new crystalline plant virus. Nature (London) 157, 300.*
- Markham, R., and K. M. Smith, 1949: Studies on the virus of turnip yellow mosaic. Parasitology 39, 330—342.*
- Matthews, R. E. F., and R. K. Ralph, 1966: Turnip yellow mosaic virus. Adv. Vir. Res. 12, 273—328.*
- Miličić, D., und Z. Stefanac, 1967: Plastidenveränderungen unter dem Einfluß des Wasserrübelgelbmosaikvirus (turnip yellow mosaic virus). Phytopath. Z. 59, 285—296.*
- Miličić, D., Z. Stefanac-Uđbinac i Đ. Mamula, 1963: Rasprostranjenost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji. Agronomski glasnik 13, 92—100.*
- Miličić, D., Z. Stefanac i Đ. Mamula, 1969: Intracellular changes induced by crucifer viruses. Plant virology, Proc. of the 6th Conf. of the Czechoslovak Plant Virologists, (Olomouc 1967), Academia — Praha.*
- Miličić, D., M. Panjan, Đ. Bilanović i B. Katić, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. Acta bot. Croat. 17, 159—176.*
- Miličić, D., Z. Stefanac, N. Juretić, and M. Wrischer, 1968: Cell inclusions of Holmes' ribgrass virus. Virology 35, 356—362.*
- Panjan, M. i Z. Prpić, 1954: Prilog poznavanju virusne bolesti na stočnom kelju. Biljna proizvodnja 4, 169—184.*
- Randles, J. W., and N. C. Crowley, 1967: Epidemiology of cauliflower mosaic virus in South Australia. Austr. J. agric. Res. 18, 289—298.*
- Rubio-Huertos, M., 1956: Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology 46, 553—556.*
- Stace-Smith, R., and G. G. Jacoli, 1967: A virus disease of Rhubarb in British Columbia. Can. J. Bot. 45, 1059—1061.*
- Stefanac, Z., 1967: Prilozi poznavanju svojstava virusa krucifera. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.*
- Stefanac, Z., and N. Ljubešić, 1971: Inclusion bodies in cells infected with radish mosaic virus. J. gen. Virol. (u štampi).*
- Stefanac, Z., and Đ. Mamula, 1971: A strain of radish mosaic virus occurring in turnip in Europe. Ann. appl. Biol. (u štampi).*
- Stefanac-Uđbinac, Z., D. Miličić i M. Zeljko, 1963: Virus mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) u Jugoslaviji. Acta bot. Croatica 22, 107—117.*
- Tompkins, C. M., 1937: A transmissible mosaic disease of cauliflower. J. Agr. Res. 55, 33—46.*
- Vukovits, G., 1956: Die Schwarzringfleckigkeit, eine Viruskrankheit der Kohlgewächse. Pflanzenarzt 9, 26—27.*
- Yoshii, H., 1963: On the strain distribution of turnip mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 28, 221—227.*

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE DISTRIBUTION OF CRUCIFER VIRUSES IN SOUTHERN EUROPE

Dorđe Mamula and Davor Miličić

(Botanical Institute of the University Zagreb)

The most important viruses which in nature predominantly attack Cruciferae are: turnip mosaic virus (TuMV), cauliflower mosaic virus (CIMV), radish mosaic virus (RaMV), turnip yellow mosaic virus (TYMV), turnip crinkle virus (TCV), and turnip rosette virus (TRosV). Some of them are spread in many countries while the others were found in limited areas. TuMV has been detected in 7 or 8 European countries (Klinkowski 1968, Vukovits 1956, Błaszczak 1968), and also in the USA, Japan and China as well as in some other countries (Yoshii 1963); recently, it has been found in British Columbia (Stace-Smith and Jacoli 1967). CIMV is also widespread in Europe where it was observed in 13 countries (Klinkowski 1968; Kovačevski 1968, Giunchedi 1968); it is also known to exist in the USA (Tompkins 1937), New Zealand and Australia (Randles and Crowley 1967). Finding places of TYMV are apparently limited to Europe (comp. Matthews and Ralph 1966); this virus was first found in Scotland (Markham and Smith 1966); and later in 5 other countries in continental Europe. TCV was reported from Great Britain and India and TRosV only from Scotland (Hollings and Stone 1969; comp. Broadbent and Heathcote 1958). RaMV has been so far detected in the USA and Japan (Campbell and Tochiwara 1969). Recently, Štefanac and Mamula (1971) found RaMV in Europe.

From the six above mentioned crucifer viruses the following four have been repeatedly found in Yugoslavia up to now: TuMV (Štefanac-Uđbinac *et al.* 1963), CIMV (Mamula and Miličić 1968; comp. Panjan and Prpić 1954), TYMV (Mamula *et al.* 1966) and RaMV (Štefanac and Mamula 1971). In order to obtain some evidence of the distribution of these viruses we have investigated them in many places of Yugoslavia, especially in the western part of the country (Fig. 1, Table 1 a. 2).

On the basis of distribution analysis we have established that the mentioned viruses are rather spread in Yugoslavia. The finding places of the viruses are denser in those parts of the country where they were investigated more intensively (Fig. 1). We have particularly closely investigated these viruses on turnip plants (*Brassica rapa var. rapifera*). Observations on the frequency of the viruses inside turnip fields were made during three years in Tuhelj and Ivanec near Zagreb and they are presented in Table 2. The most frequent virus was RaMV, the second in order of frequency being TYMV. CIMV and TuMV were not found so often. Mixed infections with all of these viruses were detected in very

low percentage. In several fields near Ivanec turnip was infected only with RaMV (Table 2). In some localities (Tuhelj) the viruses were found repeatedly for several years.

During the autumn 1969 we visited southern Austria and established that TYMV and RaMV were rather spread in turnip fields (Fig. 1).

Identification of virus isolates was carried out by means of the following methods:

1. Observation of symptoms in field,
2. Analysis of intracellular changes,
3. Testing of isolates by serological method,
4. Investigation by means of test plants.

At least two of these methods were used for the identification of each isolate (Table 1).

On the basis of characteristic symptoms on field plants, especially on turnip, it is sometimes possible to identify crucifer viruses. In this plant TYMV produces outstanding variegation and mosaic with yellow, sometimes nearly white areas on leaves which are rarely deformed (Markham and Smith 1949). Field plants infected with RaMV mostly show necrosis on the whole leaf, specially on the midrib and the pedicle (Fig. 2a). Besides, they often have mosaic and chlorotic as well as necrotic rings and lines on leaf blades (Campbell 1964, Štefanac and Mamula 1971). Turnip plants affected by TuMV often exhibit mosaic and variegation, but the difference between the brighter and the darker areas of the leaf is not so remarkable as in the case of TYMV. Turnips attacked by CIMV show vein-banding, assymetrical leaves with laterally curved midribs and often get appearance of stunted rosette (Tompkins 1937, Mamula and Miličić 1968; comp. Broadbent 1957). CIMV infected plants often have well expressed vein-clearing on leaves as the first sign of infection; this symptom also appears in TuMV and TYMV infections and is particularly conspicuous in the latter. It is, however, absent from plants infected with RaMV. Only in TYMV infections stunting of plants is a symptom which is not often very expressive. Identification on the basis of symptoms in turnip plants can be done with a fairly high degree of certainty in the case of TYMV and RaMV, and somewhat less sure concerning TuMV and CIMV infections.

In the cells of their hosts crucifer viruses induce characteristic intracellular inclusion bodies and also some other changes, especially in plastids (Fig. 3a), which can be very helpful in their identification. Inclusions of TuMV, CIMV and TYMV have already been minutely studied and described (Rubio 1956, Miličić and Štefanac 1967, Miličić et al. 1969). Plants infected with RaMV also contain very specific inclusions (Štefanac and Ljubešić 1971, Štefanac and Mamula 1971). They are usually fairly big, specially in relation to inclusions of TuMV, TYMV and CIMV. In inclusions of RaMV, which sometimes contain distinct granula, one, or often more, fairly large vacuoles are mostly present (Fig. 3b).

Conspicuous intracellular changes have been noticed in turnip, white mustard, charlock, Chinese cabbage, *Sisymbrium officinale* and

some other plants, whereas they are not so distinct in some varieties of *Brassica oleracea*. It would be useful to investigate inclusion bodies in *B. oleracea* varieties in more detail. Nevertheless, despite the difficulty in working with this species, the method of cell inclusions can be very useful for identification of crucifer viruses. The knowledge of intracellular changes has helped us very much in rapid identification of numerous isolates of all investigated viruses. This was especially the case in TYMV and RaMV infections, because intracellular alterations which arise under the influence of these viruses are very conspicuous (Fig. 3a, b).

Đorđe Mamula, mr biol.
i prof. dr Davor Miličić,
Institut za botaniku
Sveučilišta u Zagrebu
Marulićev trg 20/II
41000 Zagreb (Jugoslavija)