

RASPROSTRANJENOST VIRUSA UVIJENOSTI LISTA TREŠNJE NA CRNOJ I GROZDASTOJ BAZGI U JUGOSLAVIJI

With Summary in English

JULIJANA GRBELJA

(Biološki institut Univerziteta u Sarajevu i Institut za botaniku
Sveučilišta u Zagrebu)

Primitljeno 15. 12. 1971.

Uvod

Virus uvijenosti lista trešnje (VULT) prvi je opisao Cropley (1961). Kasnije su isti virus, također iz trešnje, izdvojili Mischke i Schuch (1963) te Kegler i sur. (1966), iz višnje Kegler i sur. (1966), a iz rabarbare Tomlinson i Walkey (1967). Osim navedenih biljaka kao domaćini VULT-a poznati su na osnovi istraživanja Schmelzera (1966) crna bazga (*Sambucus nigra* L.) i grozdasta bazga (*Sambucus racemosa* L.). U Jugoslaviji VULT je prvi put pronašla Stefanac (1969) na oboljelim bazgama koje su prije toga opisali Plavšić-Banjac i Miličić (1968). Stefanac (1969) je utvrdila da se bazgin soj VULT-a serološki razlikuje od sojeva VULT-a iz trešnje i rabarbare.

Poznato je da su crna bazga i ostale vrste roda *Sambucus* domaćini raznih virusa koji uglavnom pripadaju grupi nepo-virusa (Cadmán 1960, Harrison i Winslow 1961, Lister 1964, Lovisoló cit. prema Smith-u 1952/54, Uyemoto 1970). Neki nepo-virusi stvaraju amorfne inkluzije u stanicama svojih domaćina. Bujas (1969) je otkrila amorfne inkluzije bazginog soja VULT-a.

Svrha ovog rada bila je da ispitam više virusnih izolata iz crnih bazga i grozdaste bazge te da na osnovi simptoma na pokusnim biljkama, fizičkih svojstava i serološke metode identificiram virus.

Materijal i metode

Virusni izolati, koje sam ispitala, potječu iz zaraženih grmova crne i grozdaste bazge. U radu sam se koristila ovim izolatima:

1. Izolati iz crne bazge: izolati iz Ljubljane (BLJ), izolati iz Zagrebačke gore (BA i BA2), iz Sarajeva (BS i BS2), iz Slunja (BSL) i iz Labina (BAL). Dva posljednja izolata dobila sam ljubaznošću dr. Z. Štefanac i mr. Đ. Mamule (Zagreb), pa im se i ovom prilikom srdačno zahvaljujem.

2. Izolat iz grozdaste bazge sabran na Zagrebačkoj gori (R).

3. Izolat BzS i njegov antiserum koji su mi služili za poredbeni istraživanje (usp. Štefanac 1969).

Izoliranje virusa iz bazga izvršeno je mehaničkom inokulacijom uz dodatak 0,01 M otopine Na-dietilditiokarbamata (DIEKA) ili 0,015 M fosfatnog pufera pH 7. Virus iz bazge uspješno smo mogli izdvojiti od mjeseca prosinca do srpnja. U zimskim mjesecima izolirali smo ih iz prolistalih reznica zaraženih bazga. Za prolistavanje smo se koristili metodom tople kupelji prema Molischu (cit. Vauk, 1922).

Kao izvor virusa za identifikaciju na pokusnim biljkama, purifikaciju virusa i određivanje fizičkih svojstava služile su nam *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, *N. tabacum* L. var. White Burley i *Chenopodium quinoa*. Navedene biljke upotrebljavali smo 8—10 dana nakon inokulacije kad je koncentracija virusa u listu bila maksimalna (Tomlinson i Walkey 1967). Povratni pokusi obavljeni su s pomoću vrsta *C. quinoa*, *C. murale*, *N. tabacum* Samsun i White Burley. Djelomično prečišćavanje virusa izvršila sam metodom koju je opisala Štefanac (1969). Za serološke pokuse pripremila sam serum protiv izolata BzS iz crne bazge (Štefanac 1969).

Virus smo konzervirali sušenjem listova *C. quinoa* i *C. murale* ili duhana po metodi koju su opisali Waterworth i Fulton (1964).

Rezultati

1. Simptomi i nalazišta

Zaraženi grmovi bazga pokazuju veoma slične simptome na listovima. Listovi crne bazge u području nerava bili su tamnozeleni, dok su interkostalna područja bila svjetlija. Ponekad su interkostalna područja bila bogato išarana klorotičnim pjegama, prstenovima i poluprstenovima, dok je bazga iz Labina pokazivala simptome mozaika i po koji klorotični prsten. Listovi grozdaste bazge pokazivali su klorotične pjege i prstenove. U toku vegetacijske periode simptomi se mijenjaju i na kraju vegetacijske sezone na listovima se pojavljuju nekrotični prstenovi ili nekroze u interkostalnom području.

Oboljele bazge našli smo u gradskom parku u Sarajevu, na Zagrebačkoj gori, u Slunju, Labinu (Istra) i na padinama brežuljka ispod Ljubljanskog grada. Osim zaraženih crnih bazga našli smo na Zagrebačkoj gori i zaražene grmove grozdaste bazge. Rasprostranjenost zaraženih grmova ili stabala crne i grozdaste bazge prikazana je na slici 1.

2. Identifikacija virusa

Virusni izolati BS, BS2, BA, BA2, BLJ, BSL, BAL i R izazivaju identične simptome na pokusnim biljkama (sl. 2). Iz tog razloga nisu izneseni podaci o reakciji svakog pojedinog virusnog izolata na pokusnim biljkama.

a) Reakcija na pokusnim biljkama

Caprifoliaceae

Sambucus nigra L. Nakon infekcije pojavljuje se prolazno prosvjetljavanje nerava na mladim listovima (sl. 4A). Sistemičnu infekciju dalje prati pojava klorotičnih pjega, prstenova i klorotičnih šara. Uz nerve nastaju tamnozelenе vrpce. Pred kraj sezone pojavljuju se smeđe nekroze interkostalno.

Sambucus racemosa L. Nakon 10—15 dana prolazno prosvjetljavanje nerava, kasnije klorotični prstenovi i nekroze.

Chenopodiaceae

Chenopodium amaranticolor Coste et Reyn. Nakon 4—5 dana na inokuliranim listovima sitne nekrotične lezije s klorotičnim rubom. U toku iduća tri do četiri dana na najmlađim listovima mozaik, nekroze i uginuće vrška. Nakon uginuća vrška obično slijedi oporavak aktiviranjem aksilarnih pupova (sl. 3 A).

Chenopodium murale L. Najprije se na inokuliranim listovima pojave nekrotične lezije, poslije uginе vršak i konačno cijela biljka (sl. 3 B).

Chenopodium quinoa Willd. Na inokuliranim listovima klorotične pjege i prstenovi. U toku iduća tri do četiri dana uginе vršak i konačno cijela biljka.

Compositae

Galinsoga quadriradiata Ruiz-Pav. Prolazno prosvjetljavanje nerava, zatim klorotične pjege, prstenovi i poluprstenovi, rjeđe nekrotični prstenovi.

Cucurbitaceae

Cucumis sativus L. Na inokuliranim kotiledonima klorotične pjege koje ubrzo nekrotiziraju. Na gornjim listovima klorotične pjege i prstenovi.

Dipsacaceae

Scabiosa leucophylla Borh. Sistemična infekcija nakon 20—30 dana, sitne bijele pjege i prstenovi na listovima.

Leguminosae

Phaseolus vulgaris L. Nakon 3—5 dana klorotične pjege i prstenovi na inokuliranim listovima. Na gornjim listovima nekrotične pjege i prstenovi.

Scrophulariaceae

Digitalis purpurea L. Biljke bez simptoma. Povratni pokusi na vrstama *Chenopodium* ili *Nicotiana tabacum* var. Samsun bili su pozitivni.

Solanaceae

Nicandra physaloides Gärt. Infekcija latentna. Pokusi povratne infekcije pozitivni.

Nicotiana clevelandii Gray. Na inokuliranim listovima bijele nekrotične pjege i prstenovi. Na gornjim listovima nekrotične pjege i prstenovi (sl. 2 D).

Nicotiana maritima Wheeler. Na inokuliranim listovima klorotične pjege i prstenovi. Na gornjim listovima nekrotični prstenovi ili bijele do žute interkostalne šare.

Nicotiana rustica L. Nakon 3—5 dana isprekidani nekrotični prstenovi. Često veći broj koncentričnih prstenova oko istog središta. Sistemična infekcija sa nekrotičnim prstenovima i šarama. Ponekad nekrotični prstenovi, poluprstenovi i šare.

Nicotiana sylvestris Speg. et Comes. Nekrotične pjege i prstenovi na inokuliranim listovima; iznimno se pojavljuju i na mlađim listovima, biljka postupno ozdravljuje.

Nicotiana sp. (Wisconsin 38). Nakon 5—8 dana na inokuliranim listovima nekrotični prstenovi.

Nicotiana tabacum L. var. Hicks resistant. Nakon 3—4 dana nekrotične pjege s isprekidanim koncentričnim prstenovima, ponekad nepravilnim te isprekidanim linijama duž nerava. Infekcija sistemična.

Nicotiana tabacum L. var. White Burley. Simptomi se pojavljuju nakon 2—4 dana. Nekrotične pjege i prstenovi, pojedinačni ili koncentrični. Linije koje obrazuju prstenove mjestimično isprekidane (sl. 2 C).

Nicotiana tabacum L. var. Samsun. Simptomi jednaki kao i kod duhana White Burley (sl. 2 A i B).

Nicotiana langsdorffii Weinm. Na inokuliranim listovima klorotične pjege i prstenovi koji ubrzo nekrotiziraju.

Nicotiana megalosiphon Heureck et Muell. Na listovima nastaju gusto raspoređeni bijeli nekrotični prstenovi i lezije.

Sl. 1. Nalazišta virusa uvijenosti lista trešnje u Jugoslaviji.

Fig. 1. Localities of cherry leaf roll virus in Yugoslavia.

Sl. 2. Simptomi na listovima. *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, A — izolat BLJ, B — izolat R; *Nicotiana tabacum* L. var. White Burley, C — izolat BA; *Nicotiana clevelandii* Gray, D — izolat BS 2.

Fig. 2. Symptoms on leaves: *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, A — isolate BLJ, B — isolate R; *Nicotiana tabacum* L. var. White Burley, C — isolate BA; *Nicotiana clevelandii* Gray, D — isolate BS 2.

Sl. 3. A *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. Infekcija izazvana VULT-om. Nakon uginuća vrška nastupio je oporavak aktiviranjem aksilarnih pupova.

B *Chenopodium murale* L. Nekrotične lezije na inokuliranim listovima, uginuće vrška.

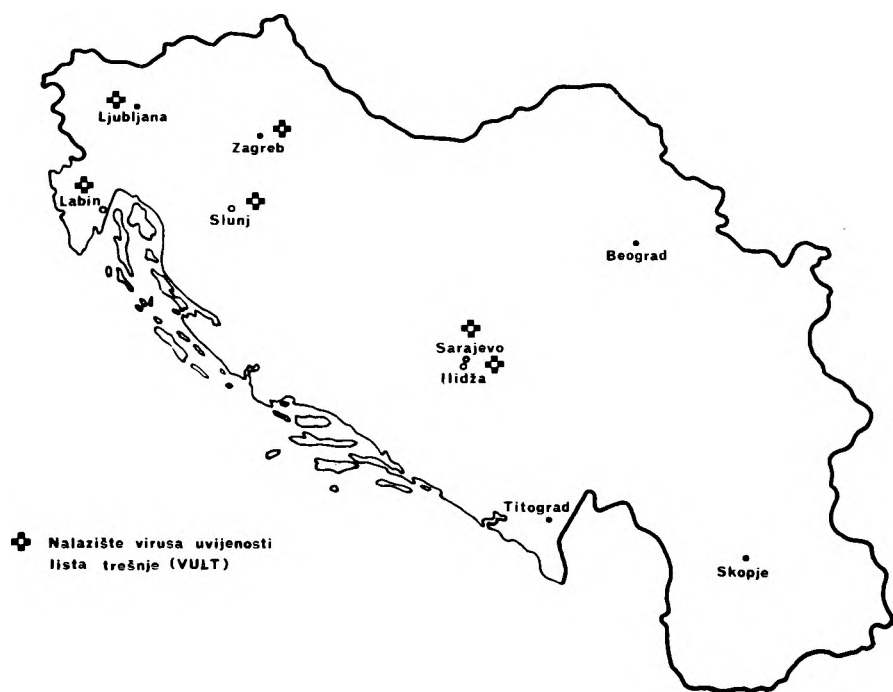
Fig. 3. A *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. Infection caused by cherry leaf roll virus. After withering of tip, the plant recovered due to activation of the axillary buds.

B *Chenopodium murale* L. Necrotic lesions on the inoculated leaves, withering of the terminal bud.

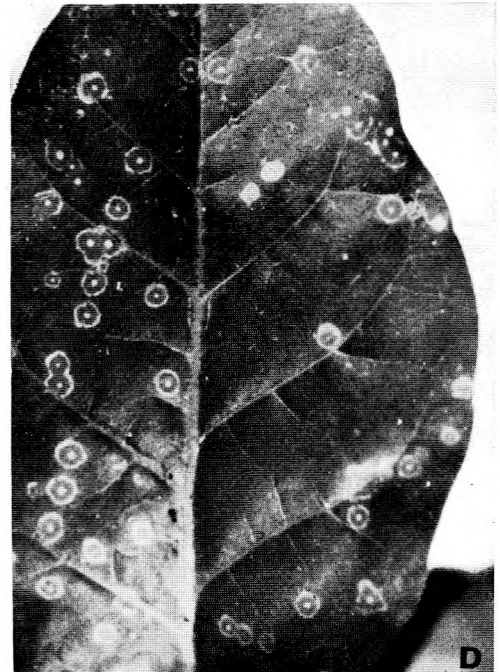
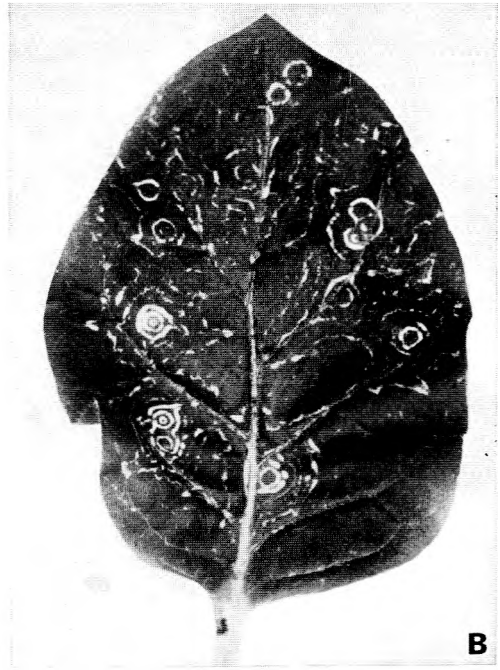
Sl. 4. A Sijanac *Sambucus nigra* L. inficiran izolatom BS iz crne bazge. B Komparativni difuzijski pokus u agar-gelu sa serumom protiv VULT-a iz bazge (ABZ). Izolati VULT-a iz crne bazge: BLJ iz Ljubljane, BS i BZ iz Sarajeva, BA i BA 2 iz Zagrebačke gore. R izolat iz grozdaste bazge.

Fig. 4. A Seedling of *Sambucus nigra* L. infected with the isolate from elderberry.

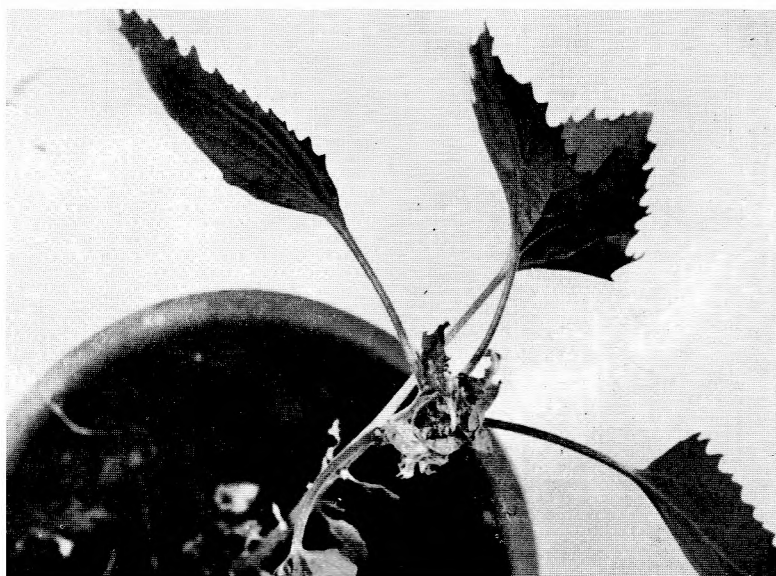
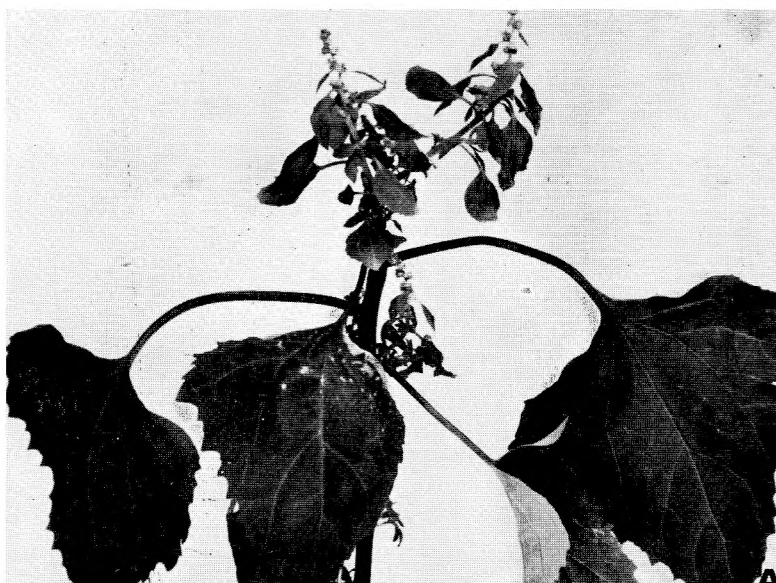
B Comparative diffusion experiment in agar-gel with the serum against cherry leaf roll from elderberry (ABZ). Isolates from elderberry: BLJ from Ljubljana, BS and BZ from Sarajevo, BA and BA 2 from the mountain Zagrebačka gora. R isolate from *Sambucus racemosa* L.



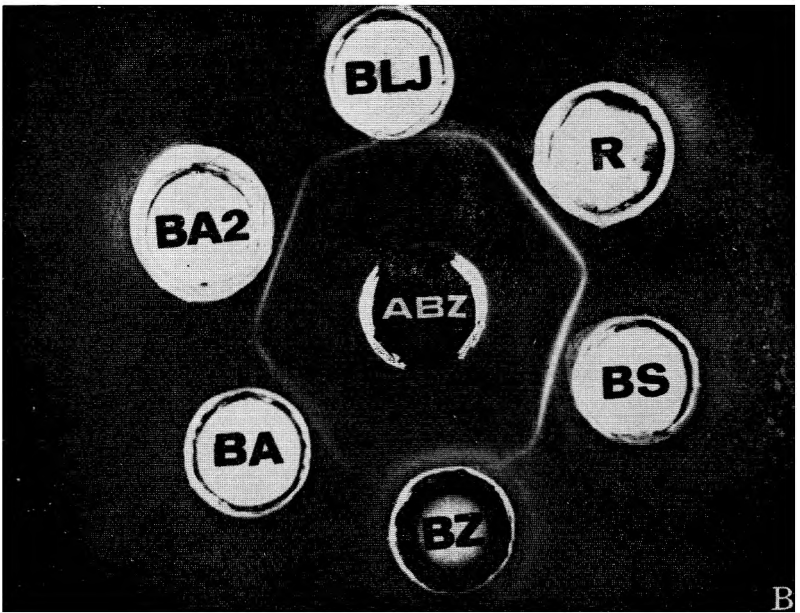
Sl. 1. — Fig. 1.



Sl. 2. — Fig. 2.



Sl. 3. — Fig. 3.



Sl. 4. — Fig. 4.

S virusnim izolatima iz crne i grozdaste bazge nismo uspjeli inficirati ove biljne vrste:

Aizoaceae (*Tetragonia expansa* Mur.), *Amaranthaceae* (*Amaranthus caudatus* L., *Gompherna globosa* L.), *Campanulaceae* (*Symphandra hofmani* Pant.), *Plantaginaceae* (*Plantago reniformis* Beck.), *Solanaceae* (*Capsicum annum* L., *Datura metel* DC., *Nicotiana glutinosa* L., *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Solanum luteum* Mill., *Solanum lycopersicum* L.), *Polemonaceae* (*Phlox drumondii* Hook).

b) Fizička svojstva

Termalna točka inaktivacije virusnih izolata BS, BS2, BA, BA2 BLJ, BSL, BAL iz crne bazge kao i izolata R iz grozdaste bazge istraživana je nekoliko puta u toku rada. Sok je uvijek bio infektivan na 52°C, ali nije bio infektivan i na 55°C.

Krajnja točka razrjeđenja navedenih izolata iz crne i grozdaste bazge bila je između 1 : 1000 i 1 : 10000.

Virusni izolati in vitro pri sobnoj temperaturi zadržavali su infektivnost 3 do 5 dana. Virusna suspenzija pohranjena u hladioniku na temperaturi od -15°C bila je infektivna i nakon 16 dana. Konzervirani listovi inficiranih primjeraka *Chenopodium quinoa* osušeni u eksikatoru pri niskoj temperaturi zadržali su infektivnost i nakon godinu dana.

c) Serološka istraživanja

Homologni titar seruma priređenog protiv izvornog soja BzS iznosio je 1/256. Titar virusa svakog pojedinog izolata iz crne i grozdaste bazge iznosio je 1/4.

U difuzijskom pokusu u agar-gelu izolati iz crne bazge BS, BS2, BA, BA2, BLJ, BSL i BAL, kao i izolat R iz grozdaste bazge, reagirali su pozitivno sa serumom protiv VULT-a. Precipitacijske linije navedenih izolata bile su povezane jedna s drugom bez ostruga (sl. 4 B). Dobivene precipitacijske linije u difuzijskom pokusu u agar-gelu dokaz su da su svi virusni izolati iz crne i grozdaste bazge serološki identični, a isto tako su identični s izolatom VULT-a BzS iz crne bazge (na sl. 4 B taj izolat označen je oznakom BZ) koji je izolirala Štefanac (1969).

Diskusija

Crne bazge pokazivale su tamnozelenе vrpce duž nerava, klorotične pjege i prstenove, dok su bazge iz kojih je Schmelzer (1966) izolirao VULT pokazivale simptom žute mreže. Dakle, VULT na crnoj bazgi može izazvati različite simptome. Pojava i intenzitet simptoma koje izaziva VULT jako variraju pod utjecajem vanjskih faktora (svjetla i temperature) što je i ranije primijećeno za VULT (Štefanac, 1969). Duhani su u toku mjeseca kolovoza obično bili bez simptoma. Vjerojatno je to nastajalo zbog povišene temperature u stakleniku gdje je za vrijeme ljetnih toplih dana temperatura iznosila od 37—42°C. U zimskim mjesecima, kad su se pokusi izvodili u laboratoriju, simptomi su redovno izostajali ukoliko pokusne biljke nisu bile osvjetljavane. Budući da smo mogli ustanoviti da je intenzitet simptoma obično bio u korelaciji s količinom prisutnog virusa, najpogodniji uvjeti za rad VULT-om bili su u proljeće i jesen kad se virus intenzivno razmnožavao.

Fizička svojstva pojedinih sojeva VULT-a iz rabarbare, trešnje i bazge pokazuju stanovite razlike. Termalna točka inaktivacije naših izolata VULT-a iz oboljelih bazga nalazi se između 52° i 55°C tj. kao i kod C r o p l e y j e v o g (1961) izolata iz trešnje. Izolati VULT-a iz rabarbare imaju termalnu točku inaktivacije 50 °C (T o m l i n s o n i W a l k e y 1967), dok izolati VULT-a iz trešnje, koje su izolirali K e g l e r i sur. (1966), kao i S c h m e l z e r - o v i (1966) izolati iz bazga, imaju termalnu točku inaktivacije između 56° i 58°C. Krajnja točka razrjeđenja za pojedine sojeve VULT-a također je različita. Za VULT izoliran iz trešnje C r o p l e y (1961) iznosi podatak 1/100—1/1000, a 1966. godine K e g l e r i sur. 1/4000—1/8000. Krajnja točka razrjeđenja naših izolata iz bazga leži između 1/1000 i 1/10000.

Iako postoje stanovite razlike što se tiče vrijednosti pojedinih fizičkih svojstava navedenih virusa, ne bismo te razlike mogli smatrati značajnima, jer su uvjeti u kojima su bili izvršeni ti pokusi vjerovatno varirali. Naši rezultati, u svakom slučaju, nalaze se u granicama vrijednosti fizičkih svojstava prije navedenih za VULT.

Serum koji je pripremljen protiv soja iz bazge BzS imao je titar 1/256, dok su vrijednosti titra serum protiv VULT-a, koje su pripremili T o m l i n s o n i W a l k e y (1967) te K e g l e r (1966) iz rabarbare, odnosno trešnje, iznosile 1/128. Ovaj rezultat pokazuje da je soj VULT-a iz bazge dosta stabilan i da se od njega mogu razmjerno lako prirediti upotrebljivi antiserumi.

Izolati VULT-a iz Jugoslavije međusobno su serološki identični, a isto tako su identični s izolatom BzS iz crne bazge koji je identificirala Š t e f a n a c (1969). Svoj izolat Š t e f a n a c je usporedila sa izolatima VULT-a iz trešnje i rabarbare i dokazala da se ta tri virusna izolata serološki razlikuju te time ustanovila postojanje triju serološki različitih sojeva VULT-a. Naši izolati VULT-a koje smo dobili iz crne i grozdaste bazge međusobno su serološki identični te je prema tome vjerovatno na bazgi raširen jedan specifičan soj tog virusa.

Napominjemo da se za serološke pokuse nekoliko puta nismo mogli koristiti sokom duhanskih biljaka jer nije dolazilo do reakcije u difuzijskim pokusima u agar-gelu ili su precipitacijske linije kod nekih izolata bile vrlo slabo izražene. Zbog toga sam za serološke pokuse redovno upotrebljavala *Chenopodium quinoa*, jer je u listovima te vrste koncentracija virusa bila mnogo veća. Razne vrste *Chenopodium* veoma su pogodne kao pokusne biljke i pri istraživanju virusa trešnje (K e g l e r 1962).

Kako je poznato, VULT se prenosi mehanički, kalemljenjem, sjemenkama, polenom (L i s t e r i M u r a n t 1967, M u r a n t i L i s t e r 1967) i nematodama (F r i t z s c h e i K e g l e r 1964). Način prenošenja VULT-a može objasniti da su virozne bazge na lokaciji uvijek bile mnogobrojne.

Z a k l j u č a k

1. Utvrdili smo da je virus uvijenosti lista trešnje (VULT) vrlo raširen na crnoj bazgi (*Sambucus nigra* L.) u raznim krajevima Jugoslavije.

2. Isti virus pronašli smo i na grozdastoj bazgi (*Sambucus racemosa* L.) u Hrvatskoj.

3. Izolati VULT-a iz crne i grozdaste bazge pokazuju iste simptome na pokusnim biljkama, imaju ista fizička svojstva i serološki su identični što je ustanovljeno s pomoću difuzijskog pokusa u agar-gelu.

Literatura — References

- Bujas, M.**, 1969: Stanične inkluzije NEPO-virusa. *Zaštita bilja* 20, 104, 159—163.
- Cadman, C. H.**, 1960: Studies on the relationship between soilborne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe. *Virology* 11, 653—664.
- Cropley, J. R.**, 1960: Serological detection of a virus in cherry trees with a leaf roll disease. *Nature* 188, 875—876.
- Cropley, J. R.**, 1961: Cherry leaf-roll virus. *Ann. appl. Biol.* 49, 524—529.
- Fritzsche, R.**, und **Kegler, H.**, 1964: Die Übertragung des Blattrollvirus der Kirsche (cherry leaf-roll virus) durch Nematoden. *Naturwissenschaften* 51, Heft 12, 299.
- Harrison, B. D.**, and **Winslow, R. D.**, 1961: Laboratory and field studies on relation of arabis mosaic virus to its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky). *Ann. appl. Biol.* 49, 621—633.
- Kegler, H.**, 1962: Chenopodium-Arten als Test- und Wirtspflanzen für Kirschenviren. *Phytopathol. Z.* 45, 248—259.
- Kegler, H.**, **Richter, J.**, und **Schmidt, H. B.**, 1966: Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung des Blattrollvirus der Kirsche (cherry leaf roll virus). *Phytopathol. Z.* 56, 313—330.
- Lister, R. M.**, 1964: Strawberry latent ringspot: a new nematodeborne virus. *Ann. appl. Biol.* 54, 167—176.
- Lister, R. M.**, and **Murant, A. F.**, 1967: Seed-transmission of nematodeborne viruses. *Ann. appl. Biol.* 59, 49—62.
- Mischke, W.**, und **Schuch, K.**, 1963: Der Nachweis des cherry leaf roll virus in einer pfeffingerkranken Süßkirsche. *Phytopathol. Z.* 47, 175—181.
- Murant, A. F.**, and **Lister, R. M.**, 1967: Seed-transmission in the ecology of nematode-borne viruses. *Ann. appl. Biol.* 59, 63—76.
- Plavšić-Banjac, B.**, i **Miličić, D.**, 1968: Neke nove viroze drveća u Jugoslaviji. *Mikrobiologija* 5, 65—72.
- Schmelzer, K.**, 1966: Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze 5. Mitteilung: Virosen an *Populus* und *Sambucus*. *Phytopathol. Z.* 55, 317—351.
- Smith, K. M.**, 1952/54: Some recent work on plant viruses. *Sci. Hortic.* 11, 98—103.
- Štefanac, Z.**, 1969: Nalaz virusa uvijenosti lista trešnje (cherry leaf roll virus) u Jugoslaviji. *Acta bot. Croat.* 28, 373—378.
- Tomlinson, J. A.**, and **Walkey, D. G. A.**, 1967: The isolation and identification of rhubarb viruses occurring in Britain. *Ann. appl. Biol.* 59, 415—427.
- Uyemoto, K. J.**, 1970: Symptomatically distinct strains of tomato ringspot virus isolated from grape and elderberry. *Phytopathology* 60, 1838—1841.
- Vouk, V.**, 1922: *Nauka o životu bilja*. Zagreb.
- Waterworth, H. E.**, and **Fulton, R. W.**, 1964: Variation among isolates of necrotic ringspot and prune dwarf viruses isolated from sour cherry. *Phytopathology* 54, 1155—1160.

SUMMARY

DISTRIBUTION OF ELDERS (*SAMBUCUS NIGRA* L. AND *S. RACEMOSA* L.) INFECTED WITH CHERRY LEAF ROLL VIRUS IN YUGOSLAVIA

Julijana Grbelja

(Biological Institute of the University of Sarajevo and Botanical Institute
of the University of Zagreb)

Virus infected elders were found for the first time in Yugoslavia by Plavšić-Banjac and Miličić (1968). Afterwards Štefanac (1968) established that these plants were infected with cherry leaf roll virus (CLRV). By comparing an elder isolate (Bz S) with CLRV isolates obtained from cherry and rhubarb, Štefanac (1969) found that the elder isolate was serologically different from them because the isolates provoked spurs in agar-gel diffusion tests. During these investigations only two localities of infected elders were found in Yugoslavia.

In this work an attempt was made to establish the distribution of infected elders in this country more precisely. Elders suffering from virus diseases were detected in some new localities in Sarajevo, they abounded on the citadel hillsides in Ljubljana, in many places on Zagrebačka gora, and also at Slunj and Labin (Fig. 1). The disease was also present and widely spread in *Sambucus racemosa* on Zagrebačka gora.

Six virus isolates from *Sambucus nigra*, taken from various localities, and one from *S. racemosa* were examined in detail. Seedlings of both elder species infected with these isolates first developed vein-clearing (Fig. 4A), then chlorotic spots, rings and lines on leaves. *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* and *C. murale* produced chlorotic or necrotic local lesions on inoculated leaves and subsequently the plant apices withered and eventually the whole plants died (Fig. 3). *Nicotiana clevelandii*, *N. langsdorffii*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* (Hicks resistant, Samsun and White Burley) and *N. sp.* (Wisconsin 38) reacted with concentric necrotic rings (Fig. 2). After these investigations it was clear that seven examined isolates produce the same symptoms, i.e. that these isolates belong to the same virus. The symptoms on test plants were characteristic of CLRV.

Thermal inactivation point of *S. nigra* and *S. racemosa* isolates was estimated several times. The squashed sap from virus infected plants was infective at 52°C, but not at 55°C. The dilution end point of the isolates was between 1:1000 and 1:10000, and longevity *in vitro* from three to five days at room temperature. The virus suspension stored in refrigerator at -15°C was infective for more than sixteen days. Leaves of infected *Chenopodium quinoa* dried in desiccator remained infective at +2°C even after a year.

The Bz S isolate of CLRV was purified and an antiserum prepared with homologous titre of 1/256. In agar-gel diffusion tests all isolates showed positive reaction with this serum. Their precipitin lines were connected without spurs (Fig. 4B) and showed that all *S. nigra* and *S. racemosa* isolates were serologically identical. They were identical also with the BzS isolate examined by Štefanac (1969) (Fig. 4B). The results of serological reactions also prove that the investigated isolates belong to the elder strain of CLRV.

Julijana Grbelja, mr biol.
Prirodno-matematički fakultet
Maršala Tita 114
71000 Sarajevo (Jugoslavlja)