

ČETIRI NOVA PRIRODNA DOMADARA
VIRUSA MOZAIKA KRASTAVCA U
HRVATSKOJ

With Summary in English

NIKOLA JURETIĆ

(Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 20. 1. 1974.

Uvod

Prije nekoliko godina zapazili smo na primjercima vrsta *Aristolochia clematitis* L., *Hesperis dinarica* Beck i *Nicandra physaloides* Gaertn., koji se kultiviraju u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, simptome virusnog oboljenja. Nedugo zatim primijetili smo da i primjerci vrste *Sonchus oleraceus* (L.) Gou. pokazuju lako uočljivo virusno šarenilo. Primjerci te biljke rasli su autohtono među biljkama biljno-geografske skupine mediteranskog bilja.

Višegodišnje pojavljivanje virusne zaraze na vrstama *A. clematitis* i *H. dinarica* ponukalo nas je da pokušamo identificirati virus. Osim toga, i izrazitost simptoma na primjercima svih četiriju vrsta, a posebno na primjercima vrste *A. clematitis*, bila je razlogom zbog kojeg smo poklonili pažnju tim bolestima. Posebno nas je potaklo i to što vrste *A. clematitis* i *H. dinarica* kao višegodišnje biljke mogu biti žarišta novih virusnih zaraza, pa je i zbog toga bilo zanimljivo znati kojim su virusima te biljke bile inficirane.

U ovom saopćenju prikazani su rezultati identifikacije i neke osnovne značajke virusnih izolata nađenih na četiri navedene biljne vrste.

Materijal i metode

Simptomi na izvornim biljkama prikazani su na tab. 1. Sve četiri vrste rastle su u južnom dijelu Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, i to primjerci vrsta *A. clematitis* i *N. physaloides* uzgajani su na nastavnom polju, a primjerci vrsta *H. dinarica* i *S. oleraceus* među biljkama dviju odvojenih biljno-geografskih skupina.

Tabela 1. Biljke s virusnim simptomima na kojima su nađeni istraživani izolati A, H, N i S

Table 1. Plants with natural occurring symptoms caused by investigated isolates A, H, N and S

<i>Aristolochia clematidis</i>	Šarenilo sa žutozelenim i zelenim područjima; deformacije listova; mjehurasta izbočenja; enacije (Sl. 1 a) Variegation with yellow green and green zones; enations (Fig. 1 a).
<i>Hesperis dinarica</i>	Šarenilo, rjeđe mozaik; blage deformacije listova. Variegation, sporadic mosaic; mild leaf deformations.
<i>Nicandra physaloides</i>	Šarenilo s pjegavim mozaikom; blage deformacije listova. Variegation and mottling; mild leaf deformations.
<i>Sonchus oleraceus</i>	Blago šarenilo; nema deformacija. Mild variegation; no deformations.

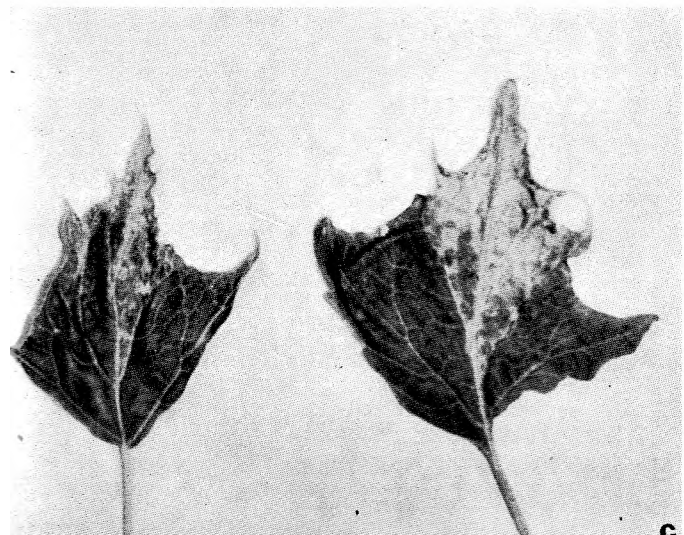
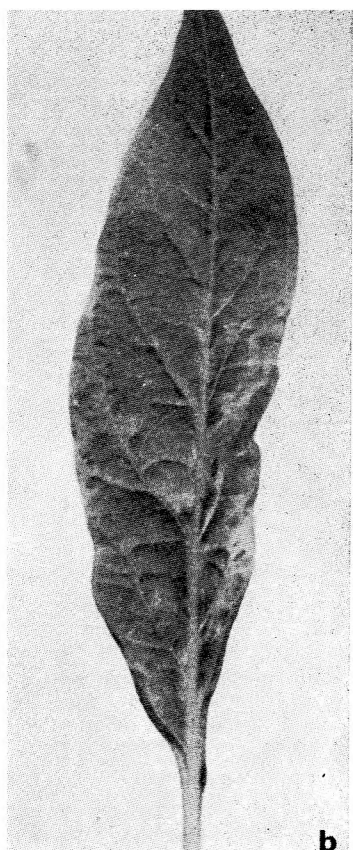
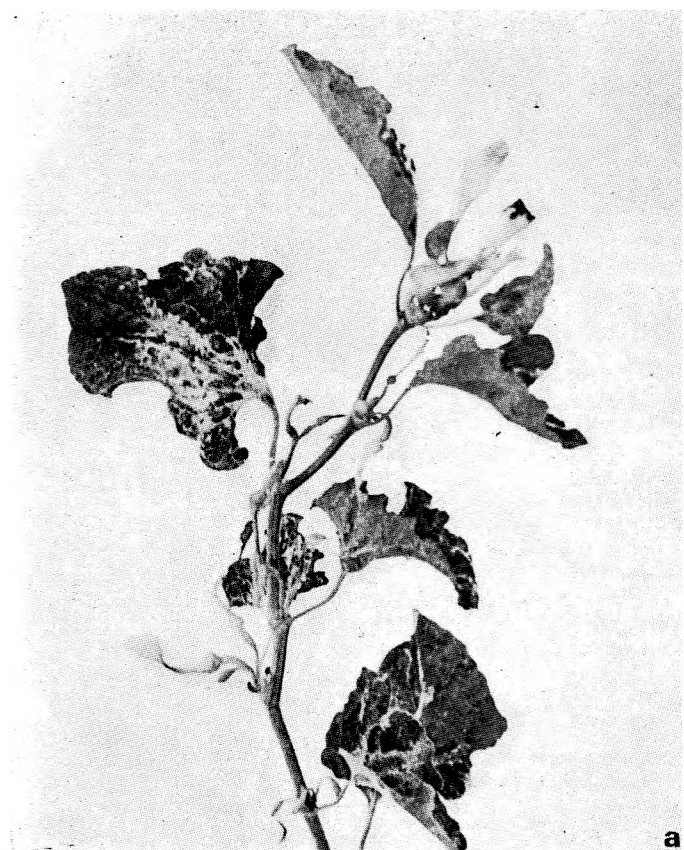
Inficirani primjerci vrste *S. oleraceus* rasli su samoniklo kao korov među drugim kultiviranim biljkama, a primjerci *H. dinarica* bili su uzgajani. Sve inficirane biljke sabrali smo u lipnju 1972.

Mehaničkom inokulacijom soka iz zaraženih primjeraka uspjeli smo prenijeti uzročnika zaraze na vrste *Nicotiana tabacum* tip Hicks resistant, *N. glutinosa* i *Solanum lycopersicum*. Na osnovi njihove reakcije zaključili smo da su oboljenja na sve četiri vrste uzrokovana virusom. Četiri virusna izolata označili smo kraticama, i to izolat iz *A. clematidis* sa **A**, izolat iz *H. dinarica* sa **H**, izolat iz *N. physaloides* sa **N** i izolat iz vrste *S. oleraceus* sa **S**. Izolati su održavani u stakleniku na vrstama *N. glutinosa* i *S. lycopersicum*.

Sok smo najčešće bez ikakva razrjeđivanja upotrijebili za inokulaciju. Rjeđe smo istisnuti sok razrjeđivali destiliranom vodom ili 0,01 M fosfatnim puferom pH 7 u omjeru 1 : 2. Često je, zbog oksidacijskih procesa, sok iz duhana posmeđio. To smo sprječavali dodavanjem soku male količine tioglikolne kiseline (oko 0,01%).

Sl. 1. Simptomi koje uzrokuje izolat **A**: a *A. clematidis* prirodno inficirana, b list vrste *N. tabacum*, tip Hicks resistant sa sistemičnom pjegavosti i deformacijama, c listovi vrste *D. stramonium* s deformacijama i šarenilom, d list vrste *Ch. amaranticolor* s lokalnim nekrotičnim lezijama.

Fig. 1. The symptoms caused by **A** isolate: a *A. clematidis* naturally infected, b leaf of *N. tabacum* type Hicks resistant with systemic spotting and deformations, c leaves of *D. stramonium* with deformations and variegation, d leaf of *Ch. amaranticolor* with local necrotic lesions.



Sl. 1. — Fig. 1.

Izolati A smo prije daljeg prenošenja na pokusne biljke pročistili metodom jedne lezije, služeći se pri tom vrstom *Chenopodium quinoa* koja je reagirala lokalnim lezijama. Antiserum virusa mozaika krastavca, kojim smo se služili prilikom identifikacije, dobili smo ljubaznošću dra J. Richtera iz Institut für Phytopathologie (Aschersleben, DDR).

Rezultati

Budući da su sva četiri izolata već pri prvim prijenosima na pokusne biljke pokazala simptome koji su bili prilično karakteristični za virus mozaika krastavca (VMK), dalja istraživanja su u prvom redu bila usmjerena na to da se vidi pripadaju li ti izolati zaista VMK. Zbog toga smo u daljem radu pokušali prenijeti izolate na pokusne biljke koje karakteristično reagiraju na VMK i s pomoću kojih se VMK može razlikovati od drugih virusa.

1. Istraživanja na pokusnim biljkama

Na tab. 2 prikazani su simptomi koje A, H, N i S izolati uzrokuju na nekim pokusnim biljkama. Kako se po simptomima prikazanim na tab. 2 vidi, četiri virusna izolata uzrokovala su jednake ili vrlo slične simptome. Svi oni izazivaju na vrsti *N. tabacum* blago šarenilo s manjim ili većim sužavanjem lisne plojke. Na vrsti *D. stramonium* izolati su, uz šarenilo, uzrokovali deformacije lista (usp. Kovačevski 1965; Jurčić 1968). Kad su temperature u stakleniku bile između 20 i 25°C, rajčice su obično pod utjecajem svih četiriju izolata, uz blago šarenilo, pokazivale i nitavost lista. Nitavost lista rajčice prilično je karakterističan simptom za VMK (Mogendorff 1930; Lovisolo i Benetti 1961). Ta je nitavost osobito pouzdan simptom VMK, ako se i s pomoću drugih pokusnih biljaka utvrdi da tu nitavost ne uzrokuje virus mozaika duhana.

Po simptomima prikazanim na tab. 2 vidi se da naša četiri izolata ne predstavljaju virus mozaika duhana (VMD), jer na vrsti *N. glutinosa* nisu uzrokovali nekrotične lokalne lezije karakteristične za VMD, već sistemične simptome s deformacijama listova koji su karakteristični za VMK. Da četiri izolata nisu predstavljala VMD, vidjelo se i po tome što na vrsti *D. stramonium* nisu uzrokovali nekrotične lokalne lezije već promjene koje su karakteristične za VMK, tj. lagano šarenilo s istaknutim deformacijama vegetativnih organa. Na osnovi simptoma na diferencijalnim domadarima zaključili smo da naši izolati pripadaju VMK, a ne VMD. To se vidjelo i po tome što su istraživani izolati na vrsti *Ch. quinoa*, koja se smatra osobito vrijednom pokusnom biljkom za VMK, uzrokovali žučkaste lokalne lezije karakteristične za VMK (usp. Uchdrawnit 1955).

Primjerke četiriju vrsta iz kojih smo izolirali istraživane izolate pregledali smo svjetlosnim mikroskopom ne sadržavaju li inficirane stanice virusne inkluzije. Naime, virusne inkluzije često mogu biti od znatne dijagnostičke vrijednosti. U tu svrhu smo promatrali gornju epidermu lista i stanice donje epiderme lista u području glavnog nerva. U pregledanim stanicama nije bilo inkluzija. Izostanak inkluzija govori u prilog rezultata dobivenih s pomoću pokusnih biljaka da izolati pripadaju VMK.

Tabela 2. Reakcije pokusnih biljaka na infekciju izolatima A, H, N i S
 Table 2. The reactions of test plants to infection by isolates A, H, N and S

Pokusne biljke Test plants	Izolati — Isolates			
	A	H	N	S
CHENOPODIACEAE				
<i>Ch. amaranticolor</i> Coste and Ryn.	L: NI (Sl. 1 d)	L: NI	L: NI	L: NI
<i>Ch. quinoa</i> Willd.	L: KI	L: KI	L: KI	L: KI
CRUCIFERAE				
<i>Hesperis dimarica</i> Beck	S: Š		S: Š	
CUCURBITACEAE				
<i>Cucumis sativus</i> L. sorta »Delikates«	L: Sp, S: MŠ	L: Sp, S: MŠ	L: Sp, S: MŠ	L: Sp, S: M
SOLANACEAE				
<i>Datura stramonium</i> L.	L: Sp, S: KUIRDŠ (Sl. 1 c)	L: Sp, S: KUIRDŠ	L Sp, S: KUIRDŠ	L: SP, S: KUIRDŠ
<i>Nicandra physaloides</i> (L.) Gärtn.	S: ŠDIU	S: ŠDIU	S: ŠDIU	
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	S: ŠDIR	S: ŠDIR	S: ŠDIR	S: ŠDI
<i>N. megalosiphon</i> Heurck et Muell.	S: ŠRN	S: ŠRN		S: ŠRN
<i>N. silvestris</i> Speg. et Comes	S: MŠ	S: MŠ		
<i>N. tabacum</i> L. tip Hicks resistant	L: Sp, S: ŠI UDI (Sl. 1b)	L: Sp, S: ŠIUDI	L: Sp, S: ŠIUDI	L: SP, S: ŠIUDI
<i>N. tabacum</i> L. tip White Burley	S: VŠ	S: VŠ	S: VŠ	
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	S: VŠI	S: VŠI		S: VŠI
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	S: ŠUNiI	S: ŠUNiI	S: ŠUNi	S: ŠU

Kratice (Kay): Deformacije lista i cvijeta (leaf and flower deformation); DI Deformacije lista (leaf deformation); I mjehurasta izbočenja plojke (blister zones on leaf); K kloroza (chlorosis); KI klorotične lokalne lezije (chlorotic local lesions); L lokalno (local); M mozaik (mosaic); N nekroza (necrosis); Ni nitavost lista (shoestring leaf); NI nekrotične lokalne lezije (necrotic local lesions); R redukcija površine lista (reduction of leaf size); S sistemično (systemic); Sp klorotične pjege na inokuliranim listovima (chlorotic lesions on inoculated leaves); Š šarenilo (variagation); U uvijanje ruba lista (curving of leaf margin); V prosvjetljivanje nerava (vein clearing).

2. Termalna točka inaktivacije izolata A

Termalnu točku inaktivacije određivali smo samo izolatu A. Ostalim izolatima nismo određivali to fizičko svojstvo, jer su po drugim svojstvima bili vrlo slični izolatu A. Rezultati istraživanja termalne točke inkativacije izolata A prikazani su na tab. 3. Kako se na toj tablici vidi, termalna točka inaktivacije bila je između 65 i 67°C, tj. u granicama u kojima leži termalna točka inaktivacije VMK (Tomlinson i sur. 1959; Klinowski 1968).

Tabela 3. Istraživanje termalne točke inaktivacije izolata A

Table 3. Investigation of the thermal inactivation point of isolate A

Temperatura Temperature °C	Pokusne biljke Test plants	
	<i>Ch. quinoa</i>	<i>Ch. amaranticolor</i>
55	240/10*	172/10
60	78/10	26/10
65	12/10	4/10
67	0/10	0/10
70	0/10	
Kontrola	720/10	501/10

* Ukupan broj lezija/broj inokuliranih listova

* Total number of lesions/number of inoculated leaves

3. Serološka identifikacija

U serološkim pokusima koristili smo se agar-gel difuzijskom metodom. Agar (Difco Noble Agar) priređivali smo prema Dudmanu (1965). U pokusima je upotrijebljen sirovi biljni sok. Sva četiri izolata reagirala su s antiserumom protiv VMK. Precipitacijske linije koje su stvarali izolati A, H, N i S povezivale su se kad su izolati bili stavljeni u susjedne bazene.

Budući da se i po simptomima na pokusnim biljkama izolati nisu u bitnome razlikovali, vrlo je vjerovatno da oni predstavljaju usko srodne sojeve VMK ili možda čak isti soj.

Diskusija

Već je dugo poznato da VMK predstavlja jedan od najraširenijih virusa u prirodi. Tome je vjerovatno razlog i to što je on prilagodljiv na veliki broj biljnih vrsta od kojih su mnoge višegodišnji korovi koji služe prezimljavanju i širenju virusa (Faan i Johnson 1951; Herold i Bremer (1958). Osim toga VMK se na nepersistentan način prenosi lisnim ušima, što također pogoduje njegovu širenju. Kovačevski

(1965) je osobito podrobno istraživao raširenost VMK u prirodi, te je utvrdio da je 91 vrsta u Bugarskoj zaražena VMK.

Tri vrste iz kojih smo mi izolirali VMK poznate su već kao prirodni domadari toga virusa. Prema Schmelzeru i Schmidtu (1968) primjerci vrste *Aristolochia clematitidis* s virusnim simptomima koje je zapazio dr O. Bode potjecali su od zelenog soja VMK. Iz vrste *Nicandra physaloides* Kovačevski (1965) je izolirao VMK. Čini se da je VMK nađen na toj vrsti mnogo prije. Naime, Rižkov i sur. (1936) opisali su na toj vrsti virozu koju su nazvali »nitavost No. 2«. Uzrok te viroze je, po svemu sudeći, VMK, tj. virus koji i autori sami navode kao vjerovatnog uzročnika. I vrsta *Sonchus oleraceus* poznata je kao prirodni domadar VMK. Iz te je biljke VMK izolirala Hein (1957). U literaturi nismo našli podatak da na vrsti *Hesperis dinarica* dolazi u prirodi VMK. Prema Schmelzeru i Wolfu (1971) ova biljka nije poznata ni kao pokusni domadar VMK. Međutim, spomenutim autorima je izbjeglo da je Juretiću (1968) pošlo za rukom prenijeti jedan soj VMK na tu vrstu. Vrste roda *Hesperis* poznate su kao domadari virusa mozaika postrne repe (VMPR) (Miličić i sur. 1958; Štefanac-Uđbinac i sur. 1963). Naš izolat iz vrste *H. dinarica* razlikovao se, međutim, od VMPR u prvom redu po tome što je na primjerke *D. stramonium* i *N. tabacum* prelazio sistemski, a ne samo lokalno kako je to slučaj s VMPR. Osim toga naš izolat iz vrste *H. dinarica* nije stvarao u inficiranim biljkama virusne stanične uklopine dok se u biljkama inficiranim s VMPR inkluzije redovito susreću.

Sva četiri naša izolata su pokazala mnoge zajedničke osobine s B12 sojem virusa mozaika krastavca koji je opisao Juretić (1968). I B12 soj je kao i četiri naša izolata potjecao iz biljaka koje su rasle u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Moguće je da svi ti izolati predstavljaju vrlo usko srodne sojeve VMK.

Zaključak

Virusni izolati nađeni na vrstama *Aristolochia clematitidis*, *Hesperis dinarica*, *Nicandra physaloides* i *Sonchus oleraceus* identificirani su na osnovi istraživanja s pomoću pokusnih biljaka, mikroskopske analize tkiva inficiranih biljaka, seroloških pokusa i djelomično s pomoću analize termalne točke inaktivacije kao izolati virusa mozaika krastavca (VMK). Sva četiri izolata predstavljaju usko srodne ako ne i identične zelene sojeve VMK. Čini se da su istraživani izolati vrlo slični soju B12 koji je prije više godina nađen na istom lokalitetu gdje i naša četiri opisana izolata (usp. Juretić 1968).

Literatura

- Dudman, W. F., 1965: Differentiation of strains of tobacco mosaic virus by immune diffusion in agar plates. *Phytopathology* 55, 635—639.
- Faan, H. C. and J. Johnson, 1951: The overwintering of the cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 41, 1001—1110.
- Hein, A., 1957: Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräuterung. *Phytopath.* Z. 29, 204—229.
- Herold, F. und H. Bremer, 1958: Untersuchungen zur Epidemiologie, Ökologie und Bekämpfung des Gurkenmosaikvirus. *Gartenbauwissenschaft* 23, 254—274.

- Juretić, N., 1968: Deformacije na listu i cvijetu kužnjaka (*Datura stramonium* L.) inficiranog virusom mozaika krastavca. *Acta Bot. Croat.* 29, 117—144.
- Klinkowski, M., 1968: Pflanzliche Virologie. Bd. II, Akademie-Verlag, Berlin.
- Kovačevski, M., 1965: Krastavično mozaičnata viroza v Belgaria. Izdatelstvo na Blgarskata akademija na naukite, Sofija.
- Lovisolò, O. e M. P. Benetti, 1961: Su di un ceppo del virus del mosaico del cetriolo di tipo alloiofillia da pomodoro. *Boll. Staz. Pat. Veget.* 19, 35—50.
- Miličić, D., M. Panjan, Đ. Bilanović und B. Katić, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. *Acta Bot. Croat.* 17, 159—176.
- Mogendorff, N., 1930: Fern-leaf of tomato. *Phytopathology* 20, 25—46.
- Rižkov, V. A., P. V. Mihajlova i R. M. Pivovarova, 1936: Virusnie bolezni paslenovih. Virusnie bolezni rastenij. Trudi vsesozuznoj akademii s.-h. nauk im. V. I. Lenina, 5.
- Schmelzer, K. und H. E. Schmidt, 1968: Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 6. Mitteilung: Ergänzende Befunde an *Caryopteris* sowie Virosen an *Philadelphus*, *Aristolochia*, *Buddleja*, *Lycium* und *Aesculus*. *Phitopath. Z.* 62, 105—126.
- Schmelzer, K. und P. Wolf, 1971: Wirtspflanzen der Viren und Virosen Europas. *Nova acta leopoldina*, Bd. 36. Johann Ambrosius Barth Leipzig.
- Stefanac-Uđbinac, Z., D. Miličić i M. Zeljko, 1963: Virus mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) u Jugoslaviji. *Acta Bot. Croat.* 22, 107—117.
- Tomlinson, J. A., R. J. Shepherd and J. C. Walker, 1959: Purification, properties and serology of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 49, 293—299.
- Uschdraweit, H. A., 1955: *Chenopodium quinoa* als Testpflanze für das Gurkenmosaik. *Nachr.-Bl. dtsh. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig)* 7, 151—152.

SUMMARY

FOUR NEW NATURAL HOSTS OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS IN CROATIA

Nikola Juretić

(Botanical Institute of the University of Zagreb)

Cucumber mosaic virus (CMV) was isolated from the following plants which grew in Botanical Garden of Zagreb University: *Aristolochia clematitidis*, *Hesperis dinarica*, *Nicandra physaloides* and *Sonchus oleraceus*. On the basis of investigations by test plants, serological experiments, light microscopic investigations and partially by analysis of thermal inactivation point, the four virus isolates represented green strains of CMV. All four isolates are very similar mutually both serologically and according to symptoms on test plants. It is not impossible that they represent one strain of CMV only. The investigated isolates are very similar to B12 strain of CMV described by Juretić (1968). The latter strain was isolated on the same locality as the four investigated isolates.

Dr Nikola Juretić
 Institut za botaniku Sveučilišta
 Marulićev trg 20/II
 41000 Zagreb (Jugoslavija)