

## NALAZ VIRUSA NEKROZE DUHANA U HELJDI

With Summary in English

DEVLETA BUTUROVIĆ i JULIJANA GRBELJA

(Zavod za ratarstvo u Butmiru i  
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu)

Primljeno 20. 01. 1978.

### Uvod

Prve podatke o nalazu virusa nekroze duhana (VND = tobacco necrosis virus) u Jugoslaviji saopćio je Kozumplik (1969). Zatim su Buturović, Klindić i Petrović (1971) izolirali VND iz listova oboljelog jaglaca (*Primula obconica* Hance) koji je potjecao iz proizvodnog staklenika poduzeća »Park« u Sarajevu. Miličić, Stefanac i Ljubešić (1975) istražili su VND izoliran direktno iz tla u okolici Zagreba.

U ovom radu iznosimo podatke o nalazu VND u heljdi (*Fagopyrum esculentum* Moench), koji se po nekim svojstvima razlikuje od prethodnih nalaza VND u Jugoslaviji, posebno sistemičnom reakcijom na grahu (*Phaseolus vulgaris* L.).

### Materijal i metode

VND je izoliran iz gornjih listova prirodno inficirane heljde, skupljene na oglednoj parceli u Novoj Topoli (Lijeve polje, sjeverna Bosna). Primjerci heljde imali su izražene simptome blagog mozaika i crvenila na listovima te mjestimičnih nekroza duž stabljike. Virusni izolat, označen kraticom TH-S, izdvojen je mehanički uz dodatak 0,02 M fosfatnog pufera pH 7,2.

U svrhu koncentriranja virusa za dalja istraživanja virus je purificiran prema metodi Kassanisa (1971). Za elektronsko-mikroskopski pregled purificirana virusna suspenzija fiksirana je 10 postotnim formaldehidom i kontrastirana 2 postotnim uranilacetatom. Serološki pokusi izvedeni su u agar-gelu metodom dvostruke difuzije sa serumima

protiv VND serotipa A i D i s prečišćenim virusom. Serume smo dobile na raspolaganje ljubaznošću prof. dr. Zlate Štefanac (Botanički zavod, Zagreb).

## Rezultati

### Reakcija pokusnih biljaka

Ispitano je ponašanje oko 20 vrsta zeljastih domaćina na infekciju s izolatom TH-S. Njihova reakcija je bila uglavnom lokalna, najčešće s periodom inkubacije od 3 do 5 dana. Karakterističnu reakciju za VND pokazale su vrste *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *C. quinoa* Willd., *Nicotiana tabacum* L. Samsun i White Burley, *Ocimum basilicum* L. i dr.

Sistemičnu zarazu s izolatom iz heljde pokazale su vrste *Fagopyrum esculentum* i *Phaseolus vulgaris*. Sorte vrste *Fagopyrum esculentum* Moench, cv. tetraploidna i ajda črna razvile su osam do deset dana nakon infekcije na primarnim listovima sijanaca okrugle sive nekrotične lezije obrubljene smeđim prstenom. Ponekad su nekroze zahvaćale veći dio plojke. Međutim, na mladim listovima heljde nekroze osim lisne plojke, napadaju i nerve i peteljku. Takvi listovi brzo ugibaju (sl. 1 A), dok vršni listovi pokazuju mozaik i šarenilo slično prirodno inficiranoj heljdi. Na stabljici heljde mogu se vidjeti nekroze poput pruga ili ovećih nekrotičnih područja. Ponekad se na vršnim listovima i stabljici javljaju crvenkasto obojena područja. Cijela biljka zaostaje u razvoju.

*Phaseolus vulgaris* L. var. top crop, starozagorski, zlatna olovka, bonita, a posebno bountiful reagirali su osim lokalnim i karakterističnim sistemničnim simptomima. Dva do tri dana nakon infekcije na inokuliranim listovima javljaju se mjestimično smeđe nekroze nerava koje ponekad zahvaćaju kompletnu nervaturu lista (sl. 1 B). Sistemni simptomi zaraze ispoljavaju se u vidu smeđih nekroza bočnih nerava I i II reda. Nekroze se također zapažaju na peteljci, stabljici i plodu. Na mahuni se formiraju smeđe obojeni oveći prstenovi, pjege i nekroze duž ventralnog šava karpelnog lista. Nakon pojave nekroze mahuna se brzo suši i otpada (sl. 1 C).

### Ispitivanje infektivnog soka in vitro

Istraživanja ponašanja virusa u sirovom soku obuhvatila su utvrđivanje tačke termalne inaktivacije, tačke krajnjeg razrjeđenja i postojanosti virusa pri sobnoj temperaturi. Svojstva su ispitivana s pomoću sorte bountiful. Utvrđeno je da se izolat TH-S inaktivira na temperaturi između 86 i 88 °C. Sok ostaje infektivan u razrjeđenju  $10^{-3}$ , a na sobnoj temperaturi sok zadržava infektivnost i preko 60 dana.

### Elektronsko-mikroskopska i serološka istraživanja

Elektronsko-mikroskopskom analizom prečišćene virusne suspenzije našli smo sferične virusne čestice promjera oko 26 nm (sl. 1 D).

U serološkom difuzijskom pokusu u agar-gelu prečišćena virusna suspenzija reagirala je pozitivno sa serumom protiv VND serotipa A, dok je reakcija izostala sa serumom protiv serotipa D.

## Diskusija

Na osnovi reakcije diferencijalnih domaćina, posebno vrste *Phaseolus vulgaris*, smatra se da izolat TH-S iz heljde pripada VND, i to soju strippl streak (Smith 1972). Sistemična reakcija graha bila je vidljiva na listovima, plodu i stabljici. Simptomi su bili gotovo identični simptomima na grahu koje je opisao Quantz (1956, 1968). Na infekciju je naročito bila osjetljiva sorta bountiful. Pojava i oštrina sistemičnih simptoma pa i brzina njihova razvoja bila je ovisna o temperaturi. Jače izraženi sistemični simptomi javljali su se na temperaturi oko 20°C, što je u suglasnosti sa zapažanjima McCarthyja i sur. (1976).

Međutim, ni u jednom od niza ponovljenih pokusa s pomoću stotina korištenih biljaka sorte bountiful nisu sve biljke čak pod istim, pa i optimalnim, uvjetima ispoljile simptome sistemične infekcije. Isto tako, ni u jednom slučaju nije došlo do ugibanja biljaka. Ponekad su sistemično oboljele biljke relativno dugo vegetirale i donosile plodove na kojima su se javljale tipične nekrotične šare. Takvi plodovi su sadržavali manji broj sjemenki normalnog izgleda ili kržljavih. Ponekad su plodovi bili sterilni. Malobrojne sjemenke normalnog izgleda nisu imale virusa. Prilikom promatranja prečišćenog soka inficiranog graha elektronskim mikroskopom nađene su sferične čestice promjera oko 26 nm, koje odgovaraju promjeru čestica VND prema podacima Kassanisa (1970).

Identifikacija soja »stipple streak« VND na grahu potvrđena je i pozitivnom serološkom reakcijom sa serumom VND protiv serotipa A VND, kojem pripada soj »stipple streak« (Kassanis 1970).

Prema podacima Schmelzera i Wolfa (1971), kao i drugim nama dostupnim podacima, čini se da je heljda ovim istraživanjem za-bilježena prvi put kao prirodni domaćin VND.

## Zaključak

Iz listova prirodno inficiranih heljda (*Fagopyrum esculentum*) izoliran je virus nekroze duhana, vjerojatno soj »stipple streak«. Virus je identificiran na osnovi reakcije diferencijalni domaćina, posebno karakteristične sistemične reakcije vrste *Phaseolus vulgaris*. Točka termalne inaktivacije virusa leži između 86 i 88°C. Oblik čestica je izometričan s promjerom oko 26 nm. Serumom protiv virusa nekroze duhana serotipa A dobivena je pozitivna serološka reakcija.

\*

Ovom prilikom posebno zahvaljujemo prof. dru Davoru Miličiću, koji je pregledao ovaj rukopis.

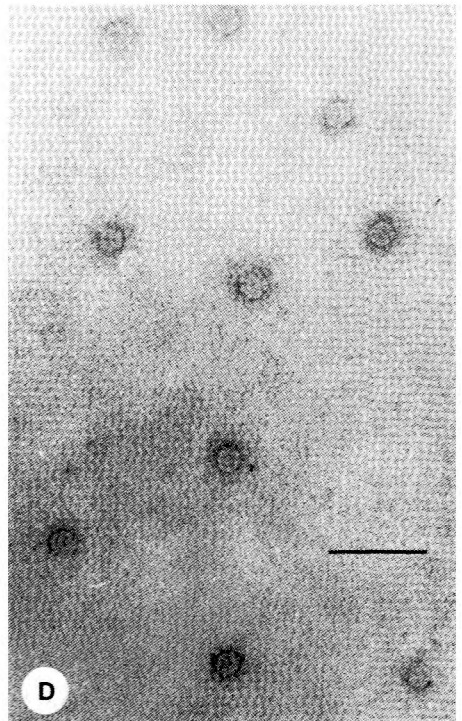
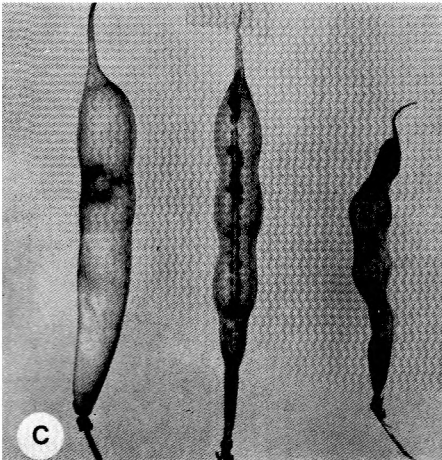
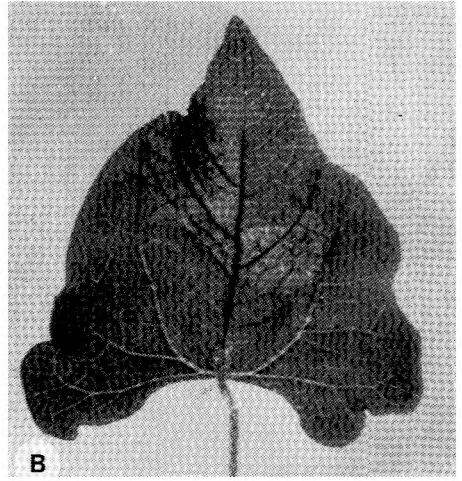
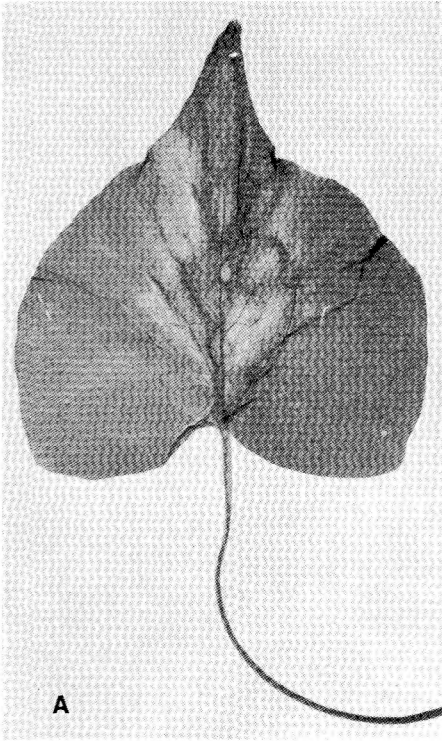
## Literatura

- Babos, P. and B. Kassanis, 1963: Thermal inactivation of tobacco necrosis virus. *Virology* 20, 490—497.
- Buturović, D., O. Klindić i D. Petrović, 1971: Prilog poznavanju bolesti i štetočina ukrasnog bilja. Zbornik radova Instituta za poljoprivredna istraživanja Sarajevo, 67—82.
- Kassanis, B., 1970: Tobacco necrosis virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 14.
- Kozumplik, V., 1969: Nalaz virusa nekroze duhana u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 104, 137—141.
- McCarthy, D., S. P. Hawkes, J. Thorne, 1976: Some effects of temperature on the early stages of tobacco necrosis virus multiplication. *J. gen. Virol.* 33, 237—248.
- Miličić, D., Z. Štefanac i N. Ljubešić, 1975: Two plant viruses isolated from soil in Croatia. *Rad JAZU* 371, 161—170.
- Quantz, L., 1956: Eine für Deutschland neue Viruskrankheit der Gartenbohne durch ein Tabaknekrose-Virus. *Nachrichtenblatt Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig)* 8, 7—8.
- Quantz, L., 1968: Leguminosen. In: M. Klinkowski, *Pflanzliche Virologie*. Band II, Teil 1, 116—117, Berlin.
- Smith, K. M., 1972: *A Textbook of Plant Virus Diseases*. Longman, London.
- Schmelzer, K. und P. Wolf, 1971: *Wirtspflanzen der Viren und Virosen Europas*. Nova acta Leopoldina, Suppl. Nr. 2. J. A. Barth, Leipzig.

---

Sl. 1. *A. Fagopyrum esculentum* (heljda). Nekroze na plojci i peteljci sistemično inficiranog lista. B i C. *Phaseolus vulgaris* cv. bountiful. Nekroza nerava na primarnom listu (B) i na plodovima (C). D. Čestice virusa nekroze duhana. Skala iznosi 100 nm.

Fig. 1. *A. Fagopyrum esculentum*. Necroses on blade and petiole of a systemic infected leaf. B and C. *Phaseolus vulgaris* cv. Bountiful. Necrosis symptoms on a primary leaf (B) and on pods (C). D. Particles of tobacco necrosis virus. Bar represents 100 nm.



Sl. 1. — Fig. 1.

## SUMMARY

### ISOLATION OF TOBACCO NECROSIS VIRUS FROM BUCKWHEAT PLANTS

*Devleta Buturović and Julijana Grbelja*

(Institute for Agriculture at Butmir and Faculty of Science,  
University of Sarajevo)

From leaves of naturally infected buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench), cultivar Bednaja, an isolate of tobacco necrosis virus (TNV) was obtained. The virus was isolated mechanically, i. e. by means of sap inoculation, from infected buckwheat to healthy bean plants. The infected buckwheat plants were collected in north Bosnia and showed necrotic symptoms. This isolate differed from other TNV strains found in Yugoslavia earlier.

The virus was identified as stipple streak strain of TNV following host plants reactions, stability in sap, serology, and electron microscopy. It provokes local necrotic reaction on many host plants, but systemic symptoms on beans (Fig. 1 B, C) and buckwheat cultivars (Fig. 1 A). The systemic reaction of bean consisted of necroses along the leaf veins, stems and fruits (Fig. 1 C). The buckwheat plants reacted with necroses on inoculated and young leaves, sometimes on the stem too, and with mosaic on top leaves.

The thermal inactivation point was between 86 and 88 °C and longevity in vitro took more than 60 days at room temperature. In purified TNV preparations isometric particles with a diameter of about 26 nm were found (Fig. 1 D). In double diffusion serological reaction in agar-gel the TNV isolate from buckwheat reacted positively with an antiserum of TNV serotype A but not with an antiserum of serotype D.

*Ing. Devleta Buturović*  
Zavod za ratarstvo, Butmir,  
Yu-71000 Sarajevo (Jugoslavija)

*Doc. dr Julijana Grbelja*  
Prirodno-matematički fakultet  
Vojvođe Putnika b.b.  
Yu-71000 Sarajevo (Jugoslavija)