

UDC 576.858.8 : 582.739 = 862

KUKUMOVIRUS IZ DVOJEN IZ GRAŠKA
(*PISUM SATIVUM* L.)

With Summary in English

ZLATA ŠTEFANAC, JULIJANA GRBELJA i ŽIVOJIN ERIĆ

(Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
i Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu)

Primljeno, 10. 01. 1981.

Uvod

Vrsta *Pisum sativum* L. poznata je kao prirodni domaćin mnogih virusa (Hagedorn 1974). Međutim u literaturi je dosad bilo razmjerno malo podataka o izolaciji virusa kukumoskupine iz graška (cf. Pešić 1977, Diaz-Ruiz et al. 1979, Richter et al. 1979).

Skupina kukumovirusa obuhvaća virus mozaika krastavca (VMK, cucumber mosaic virus), virus besjemenosti rajčice (VBR, tomato aspermy virus), virus kržljivosti kikirikija (VKK, peanut stunt virus) te kao mogućeg člana virus prstenaste pjegavosti crnokice (cowpea ringspot virus) (Matthews 1979). Članovi te skupine zajedno s njihovim brojnim sojevima pokazuju različiti stupanj serološke srodnosti na osnovi čega su razvrstani u više seroloških skupina (Devergne i Cardin 1973, 1975, 1976, Beczner i Devergne 1979). Prilikom istraživanja kukumovirusa mogu nastati teškoće pri identifikaciji VMK i VKK, jer su ti virusi međusobno bliži, varijabilniji i manje stabilni od VBR. Teškoće nastaju zbog veoma varijabilnih bioloških svojstava tih virusa (Marrou et al. 1974, Fischer i Lockhart 1978, Francki i Hatta 1980), visokog stupnja raspadanja virusnih čestica u toku ekstrakcije i purifikacije (Scott 1968, Diaz-Ruiz et al. 1979, Francki i Hatta 1980) te zbog uže serološke srodnosti sojeva VMK sa sojevima VKK (Devergne i Cardin 1975, 1976, Beczner i Devergne 1979, Diaz-Ruiz et al. 1979). Kukumovirusi imaju tripartitni genom i mogu se prirediti pseudorekombinantni sojevi između različitih sojeva VMK i različitih članova skupine (cf. Tolin 1977). Rekombinantni sojevi vjero-

jatno nastaju i u prirodnim infekcijama, što također objašnjava teškoće pri identifikaciji tih virusa.

U radu iznosimo orijentacijska istraživanja izrazito labilnog kukumovirusa izdvojenog iz graška.

Materijal i metode

Virusno bolesne biljke graška nepoznate sorte sabrali smo na manjoj plohi zasijanoj graškom u okolici Maglaja, SR Bosna i Hercegovina. Zaražene biljke pokazivale su na listovima veoma izražene simptome tamnozelenog šarenila i mozaika.

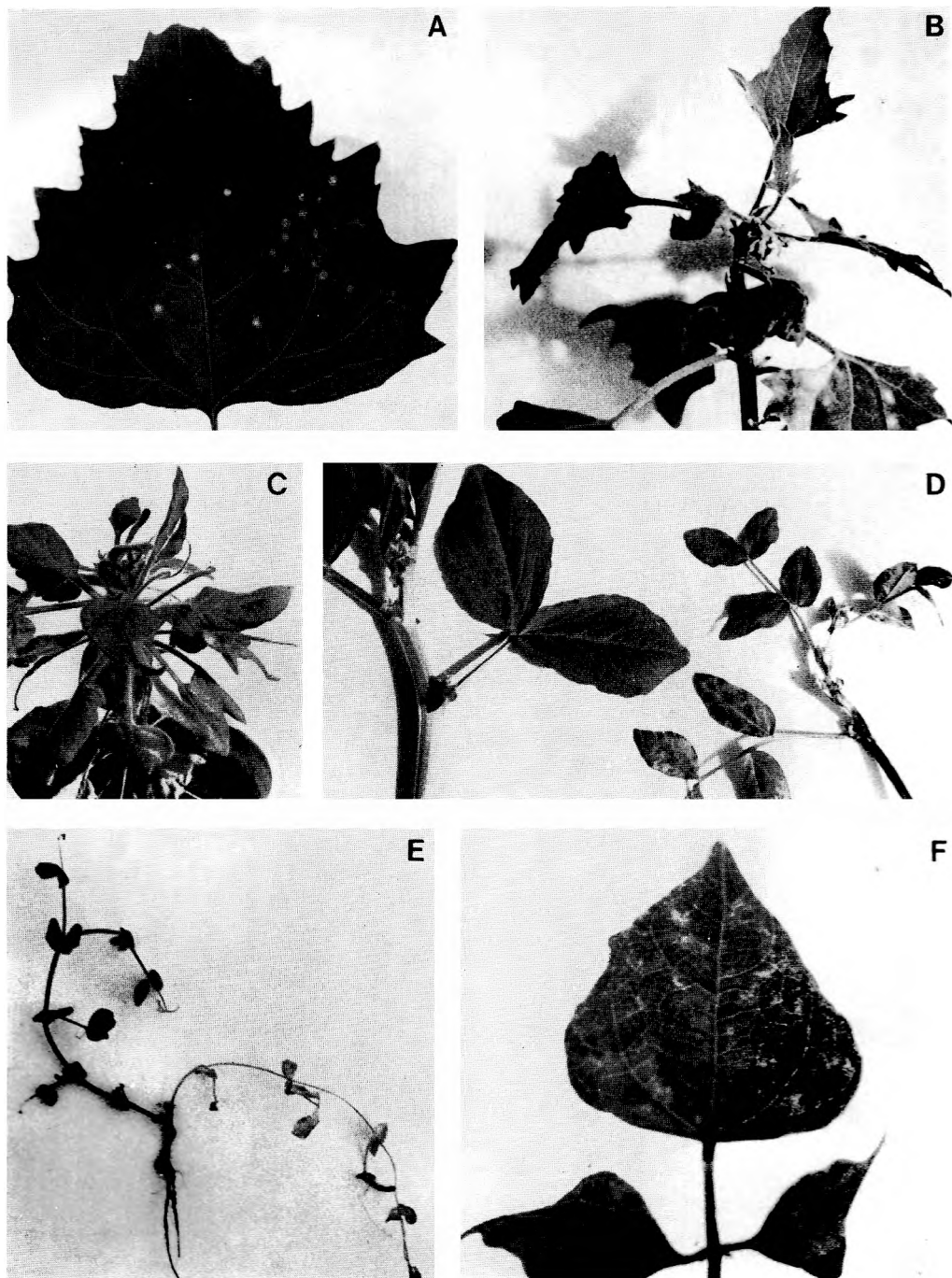
Iz zamrznutih listova izolirali smo virus mehaničkim prenošenjem na riz uobičajenih pokusnih biljaka uz pomoć 0,03 M fosfatnog pufera pH 7,2 koji je sadržavao 0,1% tioglikolne kiseline (TGK). Vrijeme inkubacije trajalo je 5—8 dana. Virus smo pročistili metodom jedne lezije na vrsti *Chenopodium amaranticolor* (u daljem tekstu izolat PY) i zatim održavali na duhanu (*Nicotiana tabacum* Samsun NN). U pokusima povratnog prenošenja upotrebljavali smo *C. quinoa*.

Kao izvor virusa za utvrđivanje svojstava virusa u soku upotrijebili smo sirovi sok ekstrahiran iz duhanskih biljaka. Pri utvrđivanju krajnje točke razrjeđenja infektivni smo sok razrjeđivali vodovodnom vodom.

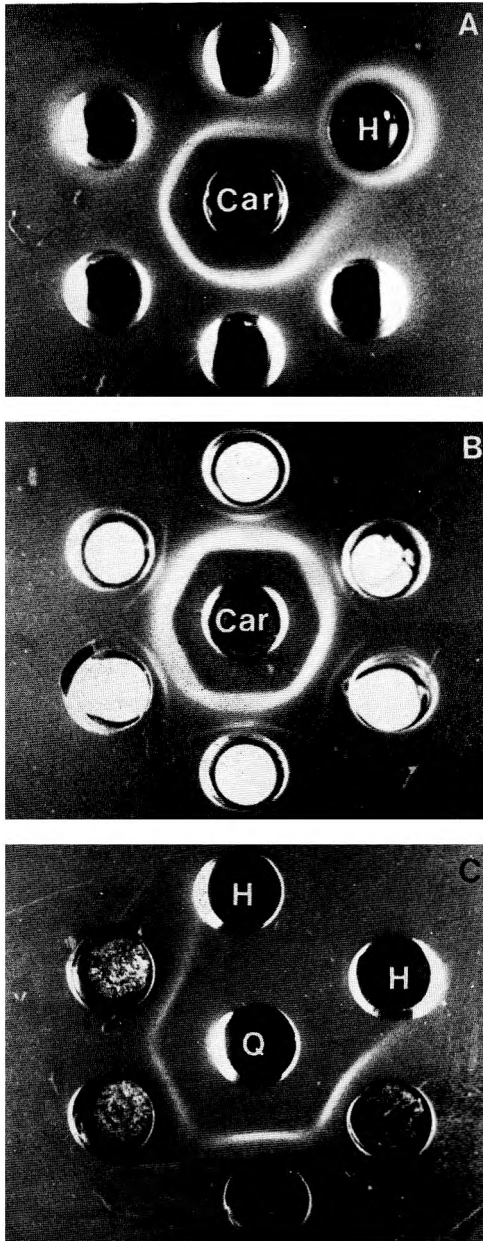
Serološke pokuse izvodili smo metodom dvostruke difuzije u 0,7% agarozu s 0,05% NaN_3 koja je bila priređena u destiliranoj vodi ili u 0,1 M veronalnom puferu pH 8,6. Izvor virusnog soka bili su inokulirani listovi *C. quinoa*. Upotrijebili smo serume protiv sojeva Car i Q VMK iz skupine ToRS (Devergne i Cardin 1973). Serum protiv soja Car sadržavao je antitijela protiv virusnih (neoštećenih) čestica i protiv raspadnutog (topljivog) virusnog proteina, tj. proteinskih podjedinica do titra 1/128. Serum protiv soja Q bio je specifičan i sadržavao samo antitijela protiv virusnih čestica (homologi titar 1/64). Navedene serume ustupili su nam dr. E. Luisoni (Torino, Italija) i dr. R. I. B. Franki (Glen Osmond, Australija).

Sl. 1. Simptomi izolata PY iz graška na pokusnim biljkama. A. Lokalne lezije na vrsti *Chenopodium amaranticolor*. B. Sistemični simptomi na vrsti *C. quinoa*. C. *Nicotiana glutinosa* cv. Corvallis strain zaražena tokom zime. D. Izbojak zdravog (lijevo) i sistemično zaraženog (desno) boba (*Vicia faba*) s izraženom kržljivošću, nekrotičnim pjegama na listovima te nekrozom stabljike. E. Sistemično zaraženi grašak (*Pisum sativum* cv. Telephone) s uginulim starijim izbojkom (desno). F. Mozak i lagana deformacija sistemično zaraženog lista graha (*Phaseolus vulgaris*).

Fig. 1. Symptoms in test plants infected by isolate PY from pea. A. Local lesions in *C. amaranticolor*. B. Systemic symptoms (only during winter) in *C. quinoa*: note epinasty and top necrosis. C. *N. glutinosa* cv. Corvallis strain infected during winter. D. Shoot from healthy (left) and systemically infected (right) broad bean (*V. faba*) showing stunting, leaf necrotic flecks and stem necrosis. E. Systemically infected pea (*P. sativum* cv. Telephone) showing necrosis of older shoot (right). F. Mosaic and slight distortion in systemically infected leaf of French bean (*P. vulgaris*).



Sl. 1. — Fig. 1.



Sl. 2. — Fig. 2.

Rezultati

Krug domaćina i simptomi

Reakcija domaćina na infekciju izolatom PY veoma je varirala ovisno o temperaturi. U toku proljeća, ljeta i jeseni, kad je u pokusnom stakleniku bilo toplije, neki domaćini reagirali su na infekciju samo lokalno ili sistemski latentno, dok su zimi razvijali sistemski simptome. Druge vrste, kao npr. dinja (*Cucumis melo*), lakše su se zaražavale kod povišenih temperatura. Ukupno smo ispitali reakciju 18 zeljastih domaćina.

Capsicum annum L. Infekcija sistemski. Na mladim listovima klorotično šarenilo i žute vrpce duž nerava. Na starijim listovima nastaje blaga deformacija.

Chenopodium amaranticolor Coste et Reyn. Na inokuliranim listovima klorotične lezije s nekrotičnim središtem do 2 mm promjera (sl. 1A). Ne dolazi do sistemski infekcije.

C. quinoa Willd. Na inokuliranim listovima klorotične lezije koje se povećavaju i stapaju. U toku zime biljke reagiraju sistemski klorotičnim lezijama, uvijanjem listova te ugibanjem vrha (sl. 1B).

Cucumis melo L. Dinja se zaražava kod razmjerno viših temperatura. Na inokuliranim listovima ponekad nastaje difuzna kloroza. Na vršnim listovima razvijaju se izraziti mozaik i klorotične pjege te dolazi do nabranosti površine plojke. Biljke zaostaju u rastu.

C. sativum L. cv. Delicatess. Na inokuliranim listovima klorotične lezije. Sistemski zeleni mozaik, šarenilo, tamnozeleno vrpce uz nerve, staklasti i deformirani listovi.

Cucurbita maxima Dcne. Na manjem broju primjeraka blagi sistemski simptomi u obliku mjestimičnog prosvjetljivanja nerava i manjih klorotičnih lezija.

C. pepo L. Na inokuliranim listovima brojne klorotične lezije. Sistemski vrlo izraženo prosvjetljivanje nerava s uvijanjem listova prema dolje, kasnije žutozeleno šarenilo na staklastim i deformiranim listovima.

Datura stramonium L. Na inokuliranim listovima brojne klorotične lezije. Zimi nastaje latentna sistemski infekcija s vrlo malo virusa.

Gomphrena globosa L. Infekcija sistemski. Okrugle ili ovalne nekrotične lezije okružene rdastosmeđim prstenom.

Lycopersicon esculentum Mill. Na inokuliranim listovima sive nekrotične lezije obrubljene smeđim prstenom. Sistemski blago klorotično šarenilo. Poremećeno su biljke bez simptoma.

Nicotiana glutinosa L. cv. Corvallis strain. Inokulirani listovi bez simptoma. Sistemski prosvjetljivanje nerava i žutozeleno šarenilo. Kod starijih infekcija tamnozeleni mozaik s mjehurastim ispupčenjima zelenih dijelova plojke, nitavost listova (sl. 1C) te tokom zime izrazito krhljavanje i ugibanje biljaka.

Sl. 2. Reakcija imunodifuzije izolata PY s antiserumima protiv VMK-Car (Car) i VMK-Q (Q). Rubni bazeni sadrže izolat PY: A) u čistom sirovom soku, B, C) u sirovom soku kojem je prilikom ekstrakcije dodan stabilizirajući pufer, tako da ekstrakt pored topljivog proteina (ravne linije) sadrži i neoštećene virusne čestice (zakrivljene linije). Sok zdravog *C. quinoa* (H).

Fig. 2. Immunodiffusion reactions obtained with isolate PY and antisera against CMV-Car (Car) and CMV-Q (Q). Peripheral wells contain the isolate PY: A) in raw sap, B, C) in raw sap extracted by stabilizing buffer in which in addition to soluble protein (straight lines) intact virus particles are also present (curved lines). Healthy sap of *C. quinoa* (H).

Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN. Sistemično šarenilo, nekrotične šare i linije duž nerava, lagano kovrčanje i lagana ušiljenost listova. Oporavak.

N. tabacum L. cv. Xanthi-nc. Sistemično blago prosvjetljivanje nerava, kasnije žutozeleno šarenilo i ušiljenost listova. Povremeno, kod povišene temperature, oporavak.

Phaseolus vulgaris L. Lokalna i sistemična infekcija. Na inokuliranim listovima blaga kloroza i epinastija. Povremeno na vršnim listovima epinastija, tamnozeleno vrpce duž nerava, mjehurasta ispupčenja i mozaik (sl. 1F). Tokom zime venuće vrha i ugibanje biljaka.

Pisum sativum L. cv. Telephone. Infekcija sistemična. Povremeno na listovima žutozeleni mozaik, šarenilo, klorotične i nekrotične pjege. Povremeno venuće i ugibanje listova i stabljike od baze prema vrhu biljke; iz donjeg dijela uginule stabljike izbija nova stabljika (sl. 1E) koja s vremenom također može uginuti. Opći zastoj u rastu.

Tetragonia expansa Thumb. Na inokuliranim listovima klorotično šarenilo. Sistemično oveće difuzne klorotične pjege promjera 4—5 mm.

Vicia faba L. Na inokuliranim listovima oveće rdastosmeđe nekrotične lezije. Na mladim blago narovašenim listovima klorotične pjege i prsteni ili klorotične linije koje starenjem nekrotiziraju, nekroze na stabljici, opći zastoj u rastu (sl. 1D). Povremeno oporavak. Opći izgled zaraženih biljaka sličan izgledu zaraženog graška.

Vigna sinensis (Torner) Savi et Hassk. cv. Black eye. Lokalno brojne nekrotične lezije osrednje veličine. Sistemično prosvjetljivanje nerava, mozaik, šarenilo, vrpce uz nerve.

Postojanost u sirovom soku

Točka termalne inaktivacije virusa bila je iznad 60° C, krajnja točka razrjeđenja između 10⁻³ i 10⁻⁴, a postojanost in vitro kod sobne temperature (24° C) između 48—60 sati.

Serološki pokusi i pokušaj stabiliziranja virusa

U sirovom soku koji je bio istisnut iz zaraženih listova bez dodatka pufera izolat PY reagirao je sa serumom protiv soja Car (sl. 2A). Precipitacijska linija bila je ravna, što upozorava na to da je reagirao raspadnuti virusni protein. U paralelnom pokusu sa serumom protiv soja Q, koji je sadržavao samo antitijela protiv virusnih čestica, nije došlo do reakcije. Ti pokusi pokazali su da je izolat PY vrlo nestabilan kukumovirus.

Virus smo pokušali stabilizirati s pomoću citratnog pufera visoke molarosti (0,5 M citratni pufer pH 6,5 s 5 nM EDTA i 0,5% TKG), koji preporučuju Frank i Hatt (1980) u svrhu stabiliziranja VMK pri izvođenju imunodifuzijskih pokusa sirovim sokom. Pufer smo dodavali listovima u odnosu 1 ml/l g pri istiskivanju soka. Međutim taj pufer nije zaštitio virus od raspadanja. Kao i u prethodnim pokusima, i u ovom slučaju reagirao je samo topljivi antigen sa serumom protiv soja Car.

Stanovito stabiliziranje virusa PY postigli smo snižavanjem molariteta citratnog pufera (0,1 M citratni pufer pH 6,5 s 20 nM EDTA i 0,1% TKG), što se već ranije pokazalo pogodnim pri purifikaciji nestabilnog izolata VMK (Devergne et al. 1972) i pri purifikaciji nestabilnog izolata VKK (Diaz-Ruiz et al. 1979). U reakcijama sa serumom protiv soja Car osim jake nespecifične linije topljivog virusnog proteina, javljala se također, iako tanka, specifična virusna linija uz virusni bazen (sl. 2B). U ovom slučaju izolat je reagirao i serumom protiv soja Q (Sl. 2C), ali je titar seruma bio niži od homolognog, SDI = 3¹. Virus PY je

¹ Serological Differentiation Index (van Regenmortel and von Wechmar 1970).

obično bio bolje sačuvan u ekstraktima koje smo dobivali ponovnim gniježenjem ostataka tkiva s odgovarajućom količinom pufera (cf. Hollings et al. 1968).

Slične rezultate dobivali smo u agarozu koja je bila priređena u destiliranoj vodi ili u veronalnom puferu, ali su precipitacijske linije uz upotrebu destilirane vode bile oštrije.

Diskusija

Na osnovi reakcije zeljastih domaćina te vladanja u serološkim pokusima virus izoliran iz graška na području SR Bosne i Hercegovine nedvojbeno pripada skupini kukumovirusa (Matthews 1979), i to VMK ili možda VKK (Marrou et al. 1974, Devergne i Cardin 1975, Fischer i Lockhart 1978).

Izolat PY iz graška razlikuje se od VBR izuzetnom labilnošću i po tome što ne stvara enacije na vrstama roda *Nicotiana* i što može zaraziti krastavac sistemski (cf. Štefanac i Plazibat 1981). Sistemski reakcija biljaka iz porodice *Fabaceae* ukazuje na sličnost s VKK (Tolin 1977), ali i sa sojevima VMK koji su bili izdvojeni iz leguminoza (Bos i Maat 1974, Pešić 1977, Taraku et al. 1977, Babović et al. 1978, Beczner i Devergne 1979). Sistemski infekcija vrste *C. quinoa* manje je česta kod VMK negoli kod VKK (Beczner i Devergne 1979, Štefanac 1980) i također ukazuje na stanovita intermedijarna svojstva između VMK i VKK. Ako izuzmemo sistemski reagiranje pripadnika porodice *Fabaceae*, izolat PY iz graška po reakciji pokusnih vrsta i svojoj labilnosti pokazuje dosta sličnosti s izolatom VMK koji je nedavno opisan na češnjaku (Štefanac 1980). Kako su za točnu serološku identifikaciju kukumovirusa potrebni purificirani i stabilizirani virusni preparati i strogo specifični serum, kukumovirus izdvojen iz graška moći će se točnije serološki odrediti tek nakon što se izvrši njegova purifikacija.

Zasad nema sigurnih podataka o nalazu VKK u Jugoslaviji, premda je u posljednje vrijeme taj virus opisan na leguminozama u više evropskih zemalja (cf. Beczner i Devergne 1979, Richter et al. 1979). Što se tiče VMK, izuzev izolata iz češnjaka (Štefanac 1980), svi ostali izolati opisani u Jugoslaviji vrlo vjerojatno pripadaju nešto stabilnijim sojevima VMK, jer u publiciranim radovima nema podataka o nespecifičnim reakcijama s topljivim proteinom a na priloženim fotografijama seroloških reakcija precipitacijske linije su izgledom tipične virusne.

Zaključak

Iz primjeraka graška (*Pisum sativum* L.) sa simptomima virusne bolesti sabranih u okolici Maglaja, SR Bosna i Hercegovina, izolirali smo izrazito labilan kukumovirus PY. Po biološkim svojstvima i vladanju u sirovom soku virus PY je pokazivao sličnost sa sojevima virusa mozaika krastavca (VMK) koji zaražavaju sistemski pripadnike porodice *Fabaceae*, te stanovitu sličnost s virusom kržljivosti kikirikija (VKK). Virus je reagirao specifično sa serumima protiv sojeva Car i Q VMK (SDI = 3), ako je pri istiskivanju soka listovima dodan citratni pufer niske molarnosti. Kad se bude izolat PY iz graška purificirao i stabilizirao, moći će se podrobnije utvrditi pripada li VMK ili VKK.

Rad je financirala Samoupravna interesna zajednica za znanstveni rad SR Hrvatske (SIZ IV) i Samoupravna interesna zajednica nauka SR Bosne i Hercegovine (Osnovna zajednica nauke).

Literatura

- Babović, M., S. Marković, M. Perišić, M. Spasić, S. Milijić, 1978: Pojava virusa mozaika krastavca na pasulju u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 146, 329—336.
- Beczner, L., J. C. Devergne, 1979: Characterisation of a new peanut stunt virus strain isolated from *Trifolium pratense* L. in Hungary. I. Symptomatological and serological properties. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 14, 247—267.
- Bos, L., D. Z. Maat, 1974: A strain of cucumber mosaic virus, seed-transmitted in beans. *Neth. J. Pl. Path.* 80, 113—123.
- Devergne, J. C., L. Cardin, 1973: Contribution à l'étude du virus de la Mosaïque du Concombre (CMV). IV. Essai de classification de plusieurs isolates sur la base de leur structure antigénique. *Ann. Phytopathol.* 5, 409—430.
- Devergne, J. C., L. Cardin, 1975: Relations sérologiques entre Cucumovirus (CMV, TAV, PSV). *Ann. Phytopathol.* 7, 255—276.
- Devergne, J. C., L. Cardin, 1976: Caractérisation de deux sérotypes du virus du Rabougrissement de l'Arachide (PSV). *Ann. Phytopathol.* 8, 449—459.
- Devergne, J. C., J. Marrou, H. Lot, L. Cardin, 1972: Contribution à l'étude du virus de la Mosaïque du Concombre (CMV). I. Influence de différentes solutions salines sur le pouvoir infectieux, la stabilité et les propriétés antigéniques de deux isolats. *Ann. Phytopathol.* 4, 5—23.
- Diaz-Ruiz, J. R., J. M. Kaper, H. E. Waterworth, J. C. Devergne, 1979: Isolation and characterisation of peanut stunt virus from alfalfa in Spain. *Phytopathology* 69, 504—509.
- Francki, R. I. B., T. Hatta, 1980: Cucumber mosaic virus — variation and problems of identification. *Acta Horticulturae* 110, 167—174.
- Hagedorn, D. J., 1974: Virus diseases of pea, *Pisum sativum*. *Amm. Phytopathol. Soc. Monogr.* 9, 1—47.
- Hollings, M., O. M. Stone, A. A. Brunt, 1967: Cucumber mosaic virus. Annual report of the Glasshouse Crops Research Institute, Littlehampton, Sussex, pp. 95—98.
- Marrou, J., J. B. Quiot, G. Marchoux, M. Duteil, 1974: Caractérisation par la symptomatologie de quatorze souches du Virus de la Mosaïque du Concombre et de deux autres Cucumovirus: tentative de classification. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 40, 107—121.
- Matthews, R. E. F., 1979: Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* 12, 131—296.
- Pešić, Z., 1977: Identifikacija nekih viroza graška. *Zaštita bilja* 140, 155—159.
- Richter, J., E. Proll, M. Musil, 1979: Serological relationships between robinia mosaic, clover blotch and peanut stunt viruses. *Acta virol.* 23, 489—496.
- Scott, H. A., 1968: Serological behaviour of cucumber mosaic virus (strain Y) and the virus protein. *Virology* 34, 79—90.
- Štefanac, Z., 1980: Cucumber mosaic virus in garlic. *Acta Bot. Croat.* 39, 21—26.
- Štefanac, Z., M. Plazibat, 1981: Biological, serological and immunoelectrophoretic studies of tomato aspermy virus from chrysanthemums in Yugoslavia. *Acta Bot. Croat.* 40, 43—49.
- Taraku, N., N. Juretić, D. Miličić, 1977: Properties of two virus isolates from clovers in Croatia. *Acta Bot. Croat.* 36, 47—55.
- Tolin, S. A., 1977: Cucumovirus (cucumber mosaic virus) group. *Ultrastructure in Biological Systems* 8, 303—307.
- van Regenmortel, M. H. V., M. B. von Wechmar, 1970: A reexamination of the serological relationship between tobacco mosaic virus and cucumber virus 4. *Virology* 41, 330—338.

SUMMARY

A CUCUMOVIRUS ISOLATED FROM PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

Zlata Štefanac, Julijana Grbelja i Živojin Erić

(Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb, and Faculty of Science, University of Sarajevo)

From pea (*Pisum sativum* L.) plants with prominent virus symptoms collected in the surroundings of Maglaj, Bosnia, an extremely unstable cucumovirus was isolated. According to the host range, symptom expression and stability in sap the virus was similar to the strains of cucumber mosaic virus (CMV) which infect systemically species from the family *Fabaceae* and showed certain properties typical of peanut stunt virus (PSV). The virus reacted specifically with serum against Car and Q strains of CMV (SDI = 3) in crude plant extracts obtained by grinding infected plant tissue in low molarity citrate buffer. It would be possible to detect whether the virus (isolate PY) belongs to CMV or to PSV only in more precise serological tests with purified and stabilized virus preparations.

Prof. dr Zlata Štefanac
Botanički zavod
Prirodoslovno-matematički fakultet
Marulićev trg 20
YU-41000 Zagreb (Jugoslavija)

Doc. dr Julijana Grbelja
Prirodno-matematički fakultet
Vojvode Putnika 43
YU-71000 Sarajevo (Jugoslavija)

Ing. Živojin Erić
Prirodno-matematički fakultet
Vojvode Putnika 43
YU-71000 Sarajevo (Jugoslavija)