

UDC 576.858.8:582.739=862

VIRUS MOZAIKA KRSTAVCA IZOLIRAN IZ GRAHA NA KOSOVU

With Summary in English

NYSRET TARAKU

(Biotehnički institut, Peć)

Primljeno 16. 12. 1981.

Iz graha gajenog na Kosovu (okolica Peći) autor je izolirao virus mozaika krastavca (VMK) koji je označio kraticom G1. Na osnovi simptoma na pokusnim biljkama, vladanju *in vitro* i seroloških reakcija, čini se da istraživani izolat pripada takozvanim zelenim sojevima VMK-a. Ustanovljeno je također da se taj izolat prenosi lisnom uši *Myzus persicae*, ali ne i zemljom. Izolat G1 je, kao i drugi izolati VMK-a, dosta labilan. Unatoč tomu autor je uspio purificirati virus i snimiti njegove elementarne čestice.

Uvod

Do sada postoji samo jedno saopćenje (Babović i sur. 1979) o nalazu virusa mozaika krastavca (VMK) na grahu koji se gaji u našoj zemlji. Međutim, više je podataka o nalazu VMK na drugim leguminozama kultiviranih na području Jugoslavije. Poznati su podaci o nalazu VMK na crvenoj djetelini (Grbelja 1974, Malak 1974), bijeloj djetelini (Taraku 1980a) i na lucerni (Babović 1965).

U mjesecu lipnju 1976. na površinama pod grahom u okolici Peći zapazio sam veći broj biljaka s virusnim simptomima. Iz nekih od tih biljaka izolirao sam virus običnog mozaika graha (bean common mosaic virus) (Taraku 1980b), a iz nekih VMK.

U ovom radu inosim neke osobine VMK nađenog na grahu na Kosovu.

Materijal i metode

Istraživani izolat G1 potječe iz graha (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Tetovac*) gajenog u okolici Peći (Kosovo).

Izolat sam pročistio metodom lezije. Prijenos virusa lisnom uši *Myzus persicae* vršio sam na slijedeći način: lisna uš je nakon prethodnog gladovanja u trajanju od 2 sata sisala 40 min. na inficiranoj biljci. Lisne uši sam zatim prenio kistom na zdrve biljke i ostavio ih na njima 24 sata. Na svaku zdravu biljku stavljao sam 20—30 lisnih uši.

Virus sam purificirao metodom koju su razradili Shohara i Osaka (1974). Pri tom sam se koristio inficiranim listovima vrste *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*.

Elektronskomikroskopska istraživanja purificirane virusne suspenzije vršio sam uz kontrastiranje s uranil-acetatom.

U serološkim pokusima koristio sam se imunim serumom, koji sam dobio zahvaljujući ljubaznosti dr E. Luisonija (Torino). Te sam pokuse izvodio u agarском gelu na uobičajen način, ali s tom razlikom što sam imuni serum zasićivao sokom zdrave biljke, jer je taj serum posjedovao i antitijela protiv normalnih bjelančevina.

Simptomatološke osobine istraživao sam pomoću biljaka koje dosta karakteristično reagiraju na VMK.

Rezultati

Simptomi na pokusnim biljkama

Već su simptomi na prvim pokusnim biljkama pokazali da bi izolat G1 mogao pripadati VMK-u. Zbog toga sam u daljnjim istraživanjima simptomatoloških osobina tog izolata koristio biljke iz kruga domaćina VMK-a, a naročito one koje dosta karakteristično reagiraju na VMK. To su bili primjerci vrsta *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* i *C. murale*, koje na VMK reagiraju isključivo lokalnim simptomima, te vrste *Datura stramonium* i *Nicotiana glutinosa*, koje na VMK reagiraju sistemičnim simptomima. U ta sam istraživanja uključio 12 biljnih vrsta (tab. 1). Rezultati prikazani u tablici navode na zaključak da bi ispitivani izolat po simptomima mogao pripadati VMK-u. U prilog tome najviše govore simptomi na vrstama *C. quinoa*, *N. glutinosa* i *D. stramonium* (U schdraweit 1955; Gibbs and Harrison 1970).

Vladanje izolata in vitro

Ustanovio sam slijedeća osnovna fizička svojstva izolata G1: točka termalne inaktivacije (TTI) bila je između 65° i 70° C, krajnja točka razrjeđenja (KTR) između 10^{-3} i 10^{-4} , dok je postojanost *in vitro* (PIV) bila oko 4 dana na sobnoj temperaturi. Kao pokusne biljke za određivanje TTI, KTR i PIV služile su mi vrste *C. quinoa* i *C. amaranticolor*. Izvor infektivnog soka bila je inficirana vrsta *N. megalosiphon*.

Rezultati su istraživanja osnovnih fizičkih svojstava u granicama koje su karakteristične za sojeve VMK-a (Doolittle i Zaumeyer 1953, Gibbs i Harrison 1970, Bos i Maat 1974, Babović i sur. 1979, Taraku 1980a).

Rezultati istraživanja prijenosa lisnom uši M. persicae

U istraživanjima koristio sam se kao pokusim biljkama primjercima vrste *N. megalosiphon*, a kao prenosiocima virusa primjercima lisne uši *M. persicae*. Nakon 25 dana na oko 50 % pokusnih biljaka pojavili su se virusni simptomi. Prema tome, izolat G1 prenosi se lisnom uši *M. persicae*.

Tablica 1. Simptomi koje uzrokuje izolat G1
Table 1. Symptoms caused by isolate G1

Pokusna biljka Test plant	Simptomi Symptoms	
	Lokalni Local	Sistemični Systemic
CHENOPODIACEAE		
<i>Chenopodium quinoa</i> *	Kl (sl. A)	—
<i>C. amaranticolor</i>	Kl	—
<i>C. murale</i>	Kl, Nl	—
CUCURBITACEAE		
<i>Cucumis sativus</i>	Kp, Np	Kš (sl. B)
FABACEAE		
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. <i>Trešnjevac</i>	Kp, Kn, D	Kš, Es, Kč
<i>Pisum sativum</i>	—	Zm, Zr
SOLANACEAE		
<i>Datura stramonium</i>	—	Kp
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Samsun</i>	—	Š
<i>N. clevelandii</i>	KNp	Bš, Ni, Zr
<i>N. megalosiphon</i>	KNp	Kš, Ni, Zr
<i>N. glutinosa</i>	—	Kš, Ni, Zr
<i>Lycopersicum esculentum</i>	—	—

* Bš blago šarenilo (mild variegation), D deformacije (deformations), Es epinastičko savijanje lista (leaf epinasty), Kl klorotične lezije (chlorotic lesions), Kp klorotične pjege (chlorotic spots), KNp klorotično-nekrotične pjege (chlorotic-necrotic spots), Kš klorotično šarenilo (chlorotic variegation), Kč mjehuravost lista (blistering), Nl nekrotične lezije (necrotic lesions), Ni nitavost lista (shoestring), Np nekrotične pjege (necrotic spots), Š šarenilo (variegation), Zr zastoj u rastu (stunting).

Rezultati istraživanja prijenosa zemljom

Pokusi su pokazali da se izolat G1 ne prenosi zemljom. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Babovića (1965), Malaka (1974) i Tarakua (1980a), koji su također ustanovili da se njihovi izolati VMK-a ne prenose zemljom.

Serološka istraživanja

U istraživanjima, kako sam naveo u poglavlju »Materijal i metode«, koristio sam antiserum protiv VMK-a, koji sam dobio od dr. E. Luisonija. Titar antiseruma bio je 1/64. Rezultati seroloških reakcija bili su pozitivni, tj. između bazena s antiserumom i bazena s infektivnim sokom stvorila se tipična virusna precipitinska linija (sl. 1D). Istraživani virus reagirao je do homolognog titra seruma. Prema tome, i serološke su reakcije pokazale da izolat G1 pripada VMK-u.

Rezultati purifikacije izolata

Iz literature je poznato da je izolate VMK-a teško purificirati. Razlog tome je njihova nestabilnost. Do takva zaključka došao sam i ja nakon nekoliko bezuspješnih pokušaja da purificiram izolat G1. Do zadovoljavajućeg rezultata došao sam tek onda kad sam se poslužio metodom Shohare i Osakija (1974). Uspješnost purifikacije provjeravao sam elektronskomikroskopskom analizom purificirane virusne suspenzije. U toku rada jedan dio virusne suspenzije fiksirao sam u 1%-otopini formaldehida (jednom volumnom dijelu virusne suspenzije dodao sam isti volumni dio 2%-formaldehida), a drugi dio ostavio sam nefiksiran. Obje suspenzije podvrgao sam elektronskomikroskopskoj analizi. U fiksiranoj suspenziji bile su jasno vidljive izometrične virusne čestice (sl. 1C), koje su po veličini odgovarale česticama VMK-a. Međutim, u nefiksiranoj virusnoj suspenziji čestica skoro da i nije bilo, jer su se gotovo sve bile raspale. Prema tome, izolat G1 može se purificirati uz primjenu odgovarajuće metode. Osim toga, virusnu suspenziju prije podvrgavanja elektronskomikroskopskoj analizi treba fiksirati.

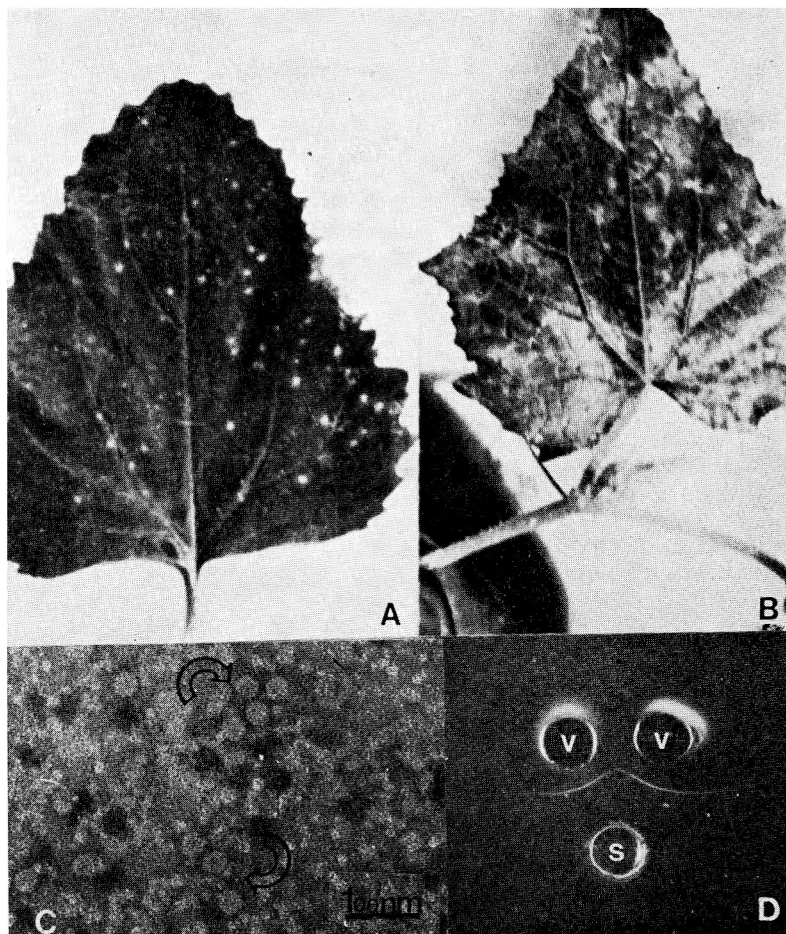
Diskusija

Izolat G1 izaziva često nitavost listova inficiranih biljaka. Osobito je ta nitavost izražena na inficiranim primjercima vrste *Nicotiana clevelandii* i *N. megalosiphon*. Nitavost listova inficiranih biljaka jedna je od karakteristika mnogih izolata VMK-a. Taj tip simptoma uzrokovali su i izolati VMK-a nađeni na leguminoznim biljkama (Babović 1965, Malak 1974, Taraku 1980a). Treba istaći da se nitavost listovva pod utjecajem izolata G1 javljala kod umjerenih temperatura (oko 22°C), a kod viših i nižih temperatura ti su se simptomi rijetko javljali. Slična zapažanja navodi i Mogendorff (1930). Simptome koje izolat G1 izaziva na inficiranim primjercima *N. tabacum* cv. *Samsun* dosta su blagi. Ti su simptomi slični onima koje na toj biljci izaziva izolat VMK koji su istraživali Bos i Maat (1974), a koji je također potjecao iz graha. Prema Ushdraweitu (1955), za izolate je VMK-a karakteristično da na inficiranim primjercima vrste *C. quinoa* izazivaju oker-žute lokalne lezije. Takve je simptome na toj vrsti uzrokovao i moj izolat G1.

Serološki pokusi s imunim serumom protiv VMK-a, koji je pripremio dr. E. Luisoni, bili su pozitivni. Međutim, u toku tih pokusa pojavljivale su se teškoće. Naime, osim virusnih precipitinskih linija pojavljivale su se i nevirusne precipitinske linije, koje su vjerovatno potjecale od

Sl. 1. A, B, simptomi koje uzrokuje izolat G1: A lokalne lezije na inokuliranom listu vrste *Chenopodium quinoa*, B sistemični simptomi na listu vrste *Cucumis sativus*; C elektronsko-mikroskopski snimak purificirane virusne suspenzije, strelica pokazuje virusne čestice; D serološka reakcija u agarskom gelu s izolatom G1 (v infektivni sok, s imuni serum protiv VMK).

Fig. 1. A, B symptoms caused by the isolate G1: A local lesions on inoculated leaf of *Chenopodium quinoa*, B systemic symptoms on leaf of *Cucumis sativus*; C electron microscope photo of purified virus suspension, the arrow shows the virus particles; D serological reaction in agar gel with isolate G1 (v infective sap, s immune serum to CMV).



Sl. 1. — Fig. 1.

normalnih bjelančevina. Da bih izbjegao te nespecifične reakcije, morao sam imuni serum prije upotrebe zasićivati sokom zdravih biljaka. Tako zasićeni serum nije stvarao nespecifične precipitinske linije. To zasićivanje seruma sugerirao mi je i sam dr. E. Luisoni. Treba spomenuti da Mink i sur. (1975) ističu da izolati VMK-a dolaze obično u smjesi s virusom kržljivosti kikirikija (peanut stunt virus) i s virusom blagog šarenila krizanteme (*chrysanthemum mild mottle virus*), tako da je česta pojava da imuni serum protiv VMK sadrži i antitijela protiv tih dvaju virusa.

Doolittle i Zaumeyer (1953) navode da se izolati VMK-a koje su oni istraživali prenose lako na neperzistentan način lisnom uši *Aphis gossypii*. Do sličnih su rezultata došli i drugi autori (Babović 1965, Malak 1974, Taraku 1980a) koristeći lisnu uš *Myzus persicae*. Moj se izolat prenosi tom lisnom uši, ali postotak zaraženih biljaka bio je niži od postotka koje navode drugi autori. Izolat G1 ne prenosi se zemljom. Ti se rezultati podudaraju s rezultatima do kojih su došli Babović (1965), Malak (1974) i Taraku (1980a) istražujući također izolate VMK-a iz leguminoznih biljaka.

Rezultati purifikacije virusnog izolata G1 pomoću metode koju su razradili Shohare i Osaki (1974) zadovoljavajući je. Međutim, treba istaći da su virusne čestice bile sačuvane samo u suspenziji koja je odmah poslije purifikacije fiksirana formaldehidom, a virusne su se čestice u nefiksiranoj suspenziji redovito raspadale. To potkrepljuje otprije poznatu činjenicu da izolati VMK-a imaju veoma nestabilne virusne čestice.

References

- Babović, M., 1965: Viroze lucerke u Jugoslaviji. *Agrohemija* 12, 701—707.
- Babović, M., M. Perišić, S. Marinković, M. Spasić i S. Miličić, 1979: Occurrence of cucumber mosaic virus on bean in Yugoslavia. *Zaštita bilja* 29, 335—336.
- Bos, L., D. Maat, 1974: A strain of cucumber mosaic virus seed transmitted in beans. *Neth. J. Pl. Path.* 80, 113—123.
- Doolittle, S. D., W. J. Zaumeyer, 1953: A pepper ringspot caused by strains of cucumber mosaic virus from pepper and alfalfa. *Phytopathology* 43, 333—337.
- Gibbs, A. J., B. D. Harrison, 1970: Cucumber mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses No. 1.
- Grbelja, J., 1974: Istraživanja virusnih izolata iz djeteline. IV kongres biologa Jugoslavije. Rezime referata, str.133, Sarajevo
- Malak, J., 1974: Crvena djetelina kao domaćin virusa mozaika krstavca. *Zaštita bilj* 130, 219—226.
- Mogendorff, N., 1930: Fern-leaf of tomato. *Phytopathology* 20, 25—46.
- Mink, I., G. N. Izuka, K. Kiriyama, 1975: Some cucumber mosaic virus antisera contain antibodies specific for both peanut stunt virus and chrisanthemum mild mottle virus. *Phytopathology* 65, 65—68.
- Shohara, K., T. Osaki, 1974: Precipitation and purification of cucumber mosaic virus by polyethylen glycol (PEG) and reverse concentration PEG gradient centrifugation. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 40, 265—267.
- Taraku, N., 1980a: Natural infections of white clover (*Trifolium repens*) with cucumber mosaic virus in Croatia. *Acta Biol. Med. Exp.* 5, 99—102.

- Taraku, N., 1980b: Occurring of some legume viruses in the province Kosovo (Yugoslavia). Proc. 5th Congr. Un. Phytopath. Mediterr., Patras, Greece 1980, p. 12—14.
- Uschdraweit, H. A., 1955: *Chenopodium quinoa* als Testpflanze für das Gurkenmosaik virus. Nachrichtenblatt des Deutsch. Pflanzenschutzdienst 7, 151—152.

SUMMARY

CUCUMBER MOSAIC VIRUS FOUND IN BEAN IN KOSOVO

Nysret Taraku

(Biotechnical Institute, Peć)

The virus isolate G1 found in bean which was collected in Kosovo (southeast province of Yugoslavia) was studied. Until now virus diseases in this province of Yugoslavia were rarely the object of research; even virus diseases of legume plants in Kosovo have not been studied. Bean and some other legume plants are very important crops in this region.

The reactions to test plants caused by the isolate G1 are very similar to those of other cucumber mosaic virus (CMV) isolates. Its properties in crude infected sap were: TIP between 65 and 70°C, DEP between $0,5 \times 10^{-3}$ and 10^{-4} , and LIV about 4 days at room temperature. The virus is transmissible by aphids but not by soil. The isolate investigated was purified and electron microscope analyses revealed that the virus had isometric virus particles about 30 nm in diameter. It reacted positively in agar gel double diffusion tests with immune serum to CMV.

Dr. Nysret Taraku
Biotehnički institut
YU—38300 Peć (Jugoslaviya)