

UDC 576.858:582.998(497.1)=862

N A L A Z T O M B U S V I R U S A N A V R S T I E R I G E R O N
C A N A D E N S I S L.

With Summary in English

ZORAN JEKNIĆ, ŽIVOJIN ERIĆ i JULIJANA GRBELJA
(Prirodno-matematički fakultet, Sarajevo)

Primljeno 15. 12. 1987.

Iz listova zaraženih primjeraka korovne biljke *Erigeron canadensis* L. koji su rasli na nekoliko lokaliteta u Sarajevu izoliran je virus iz skupine tombusvirusi. Identifikacija virusa izvršena je na osnovi reakcije pokusnih biljaka, analize ultratankih presjeka kroz zaraženo tkivo, morfologije i veličine virusnih čestica, te na osnovi seroloških reakcija metodom dvostrukne imunodifuzije u agarskom gelu i čvrsto fazne imunoelektronske mikroskopije (SPIEM). U serološkim pokusima upotrijebljen je imuni serum protiv špinatskog soja virusa grmolike kržljavosti rajčice. Ovim je radom vrsta *E. canadensis* prvi put zabilježena kao prirodnji domaćin jednog tombusvirusa.

Uvod

Pripadnici skupine tombusvirusi veoma su rasprostranjeni, kako na zeljastim tako i na drvenastim biljnim vrstama. Kao prirodnji domaćini tobussvirusa među zeljastim biljkama do danas su poznate brojne vrste koje pripadaju raznim porodicama. U epidemiološkom smislu posebno su značajne korovske vrste, koje predstavljaju izvor infekcija za biljke koje su čovjeku od koristi (Lovisolo i sur. 1965, Allen i Davison 1967, Smith 1972).

U ovom radu iznosimo podatke o nalazu tombusvirusa u korovnoj vrsti *Erigeron canadensis* L. čiji su brojni primjeri s izraženim simptomima virusnog oboljenja nađeni na više lokaliteta na području Sarajeva.

Materijal i metode

Iz zaraženih biljaka *E. canadensis* virus je izoliran mehanički, uz dodatak 0,06 M fosfatnog pufera pH 7,6 s 0,1% tioglik. kiseline, na pokusne vrste *Chenopodium quinoa* i *Nicotiana tabacum* Samsun. Pri istraživanju kruga zeljastih domaćina korištena je također metoda me-

haničke inokulacije. Unutarnji simptomi infekcije istraženi su standardnom elektronsko-mikroskopskom analizom ultrakratkih presjeka. Serološka identifikacija virusa izvedena je metodom dvostrukog imunodifuzije u agarskom gelu i čvrsto faznom imunoelektronskom mikroskopijom (SPIEM), tehnika »trapping« (Nicolaieff i sur. 1980), s pomoću imunog seruma protiv špinatskog soja virusa grmolike kržljavosti rajčice (Erić i sur. 1986). Radi dobivanja podataka o morfologiji i veličini virusne čestice izvršena je purifikacija virusa uz korištenje n-butanolja, po postupku kojim su se koristili Erić i sur. (1986). Spektrofotometrijska mjerena učinjena su s pomoću DU-2 Beckman spektrofotometra koristeći $E_{260}^{0.1\%} = 4,5$ i $A_{260/280} = 1,62-1,66$ (Martelli i sur. 1971).

Rezultati i diskusija

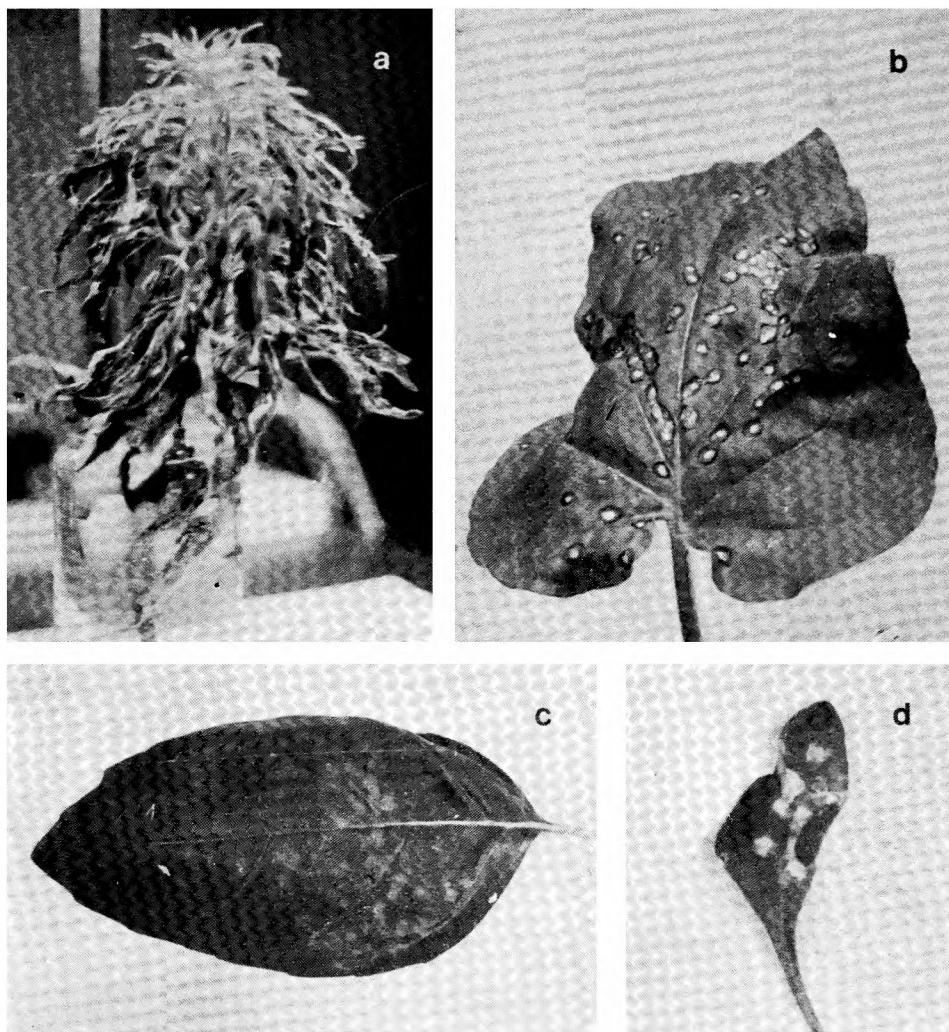
Simptomi na izvorno zaraženim biljkama vrste *E. canadensis* sa stojali su se od izraženih žutih pjega i vrpeča duž nerava, mozaika s blago napuhanim tamnozelenim područjima, neznatnog sužavanja lisnih plojki do pojave potpuno končastih listova u vršku. Internodiji su u gornjem dijelu izdanka bili znatno skraćeni, te je vršni dio biljke imao izgled rozete (sl. 1a).

Izdvojeni izolat prenijeli smo na 6 pokusnih vrsta koje su reagirale slijedećim simptomima: *Chenopodium quinoa* — Na inokuliranim listovima brojne hlorotične lezije koje nekrotiziraju; sistemični simptomi slični lokalnim, ponekad praćeni nekrozom vrška. *Gomphrena globosa* — Na inokuliranim listovima brojne nekrotične lezije obrubljene rđastosmedim prstenom; ne dolazi do sistemične infekcije. *Nicotiana glutinosa* — Infekcija lokalna. Dva do 3 dana nakon inokulacije razvijaju se mnogobrojne smeđe nekrotične lezije (sl. 1b). *N. tabacum* Samsun — Lokalna infekcija u obliku manjeg broja nekrotičnih lezija promjera 2—3 mm. *Ocimum basilicum* — Na inokuliranim listovima sive nekrotične lezije (sl. 1c). *Tetragonia expansa* — Infekcija lokalna. Na inokuliranim listovima nekrotične lezije promjera 2—3 mm (sl. 1d). Navedena reakcija pokusnih biljaka, posebno vrsta *G. globosa*, *N. glutinosa* i *O. basilicum*, bila je karakteristična za tombusviruse (Martelli i sur. 1971).

Elektronsko-mikroskopskim istraživanjima ultratankih prereza zaraženih listova *C. quinoa* utvrdili smo da izdvojeni virus izaziva citopatogene promjene slične onima pod utjecajem tombusvirusa, uključujući i pojavu dijagnostički značajnih multivezikularnih tijela (sl. 2a) (cf. Martelli 1981, Franck i sur. 1985).

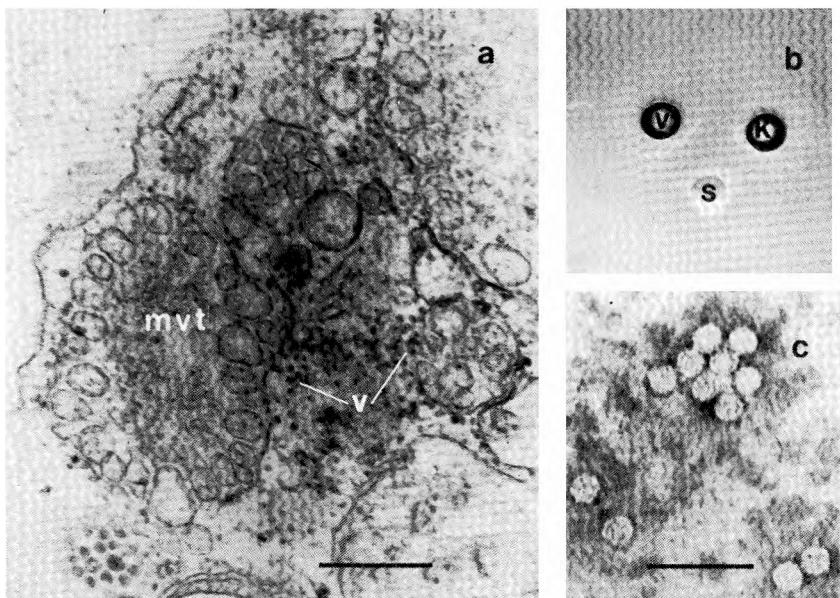
Purificirana virusna suspenzija sadržavala je mnogobrojne izometrične partikule promjera oko 28 nm. Njihova veličina i morfologija također odgovaraju česticama tombusvirusa (sl. 2c) (Franck i sur. 1985). Isto se odnosi i na apsorpcijski spektar koji je imao maksimum kod 260 nm, a minimum na 240 nm, i odnos $A_{260/280} = 1,65$ (cf. Hollings i sur. 1970, Martelli i sur. 1971).

U orijentacijskim serološkim pokusima izvedenim metodom dvostrukog imunodifuzije u agarskom gelu virus je reagirao pozitivno (sl. 2b) s imunim serumom protiv špinatskog soja virusa grmolike kržljavosti rajčice (spinach strain of tomato bushy stunt virus). Pozitivna reakcija je dobivena i metodom čvrsto fazne imunoelektronske mikroskopije (sl. 2c). Na osnovi svega iznesenog može se zaključiti da virus izoliran iz vrste *E. canadensis* pripada skupini tombusvirusi.



Sl. 1. Simptomi infekcije. a *Erigeron canadensis* L. Prirodna infekcija. b *Nicotiana glutinosa*. Nekrotične lokalne lezije. c *Ocimum basilicum*. Lokalna infekcija sa karakterističnim nekrotičnim lezijama. d *Tetragonia expansa*. Bijele nekrotične lezije na inokuliranom listu.

Fig. 1. Symptoms of disease. a *Erigeron canadensis* L. A natural infection. b *Nicotiana glutinosa*. Local necrotic lesions. c *Ocimum basilicum*. Local infection with characteristic necrotic lesions. d *Tetragonia expansa*. White necrotic lesions in inoculated leaf.



- S1. 2. a Karakteristične citopatogene promjene u obliku multivezikularnih tijela (mvt), virusne čestice (v). b Pokus imunodifuzije sa virusom (v) u nepročišćenom infektivnom soku i serumom protiv špinatskog soja virusa grmolike kržljavosti rajčice (s). c Preparat pripremljen postupkom SPIEM.

Skale predstavljaju 500 nm (a) i 100 nm (c).

- Fig. 2. a Characteristic cytopathogenic changes in the form of multivesicular bodies (mvt), virus particles (v). b Immunodiffusion test with the virus (v) in unpurified infective sap and serum against spinach strain of tomato bushy stunt virus (s), control sap of a healthy plant (k). c Electron micrograph of virus particles, preparation made by SPIEM method. Bars represent 500 nm (a) and 100 nm (c).

Skupina tombusvirusi obuhvaća osam članova (Francki sur. 1985). Većina članova skupine s izuzetkom virusa prstenaste pjegavosti cimbidija (*cymbidium ringspot virus*) i virusa šarenila glicinije (*glycine mottle virus*) pokazuje međusobnu serološku srodnost (Hollings i Stone 1975, Makkouk i sur. 1981, Koeing i Gibbs 1986). Polazeći od toga kao i biofizičkih i fizičkokemijskih svojstava tobussvirusa (Gallitelli i sur. 1985), a na osnovi kriterija koje su postavili Hamilton i sur. (1981), svi serološki srođni tombusvirusi mogu se tretirati sojevima virusa grmolike kržljavosti rajčice (cf. Erić i sur. 1986). Prema istim kriterijima mogao bi se i virus izoliran iz *E. canadensis* smatrati, šire uzevši, sojem virusa grmolike kržljavosti rajčice. Daljnja karakterizacija toga virusa utvrđit će njegovo pravo mjesto unutar skupine.

Rasprostranjenost korovne vrste *E. canadensis* doseže do subalpskog pojasa, a česta je na obrađenim i na neobrađenim površinama (Šarić 1978). Vjerujemo da je zaraženost vrste *E. canadensis* izdvojenim tombusvirusom prisutna i na širem području njezine rasprostranjenosti.

Literatura

- Allen, W. R., T. R. Davidson*, 1967: Tomato bushy stunt virus from *Prunus avium* L. I. Field studies and virus characterisation. Can. J. Bot. 45, 2375—2383.
- Erić, Ž., Z. Štefanac, B. Plavšić*, 1986: Characteristics of the tombusvirus from spinach (*Spinacia oleracea*). Acta Bot. Croat. 45, 7—19.
- Francki, R. I. B., R. G. Milne, T. Hatta*, 1985: Atlas of Plant Viruses, Vol. I, pp. 181—197. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Gallitelli, D., R. Hull, R. Koenig*, 1985: Relationship among viruses in the tombusvirus group: nucleic acid hybridization studies. J. gen. Virol. 66, 1523—1531.
- Hamilton, R. I., J. R. Edwardson, R. I. B. Francki, H. T. Hsu, R. Koenig, R. G. Milne*, 1981: Guidelines for the identification and characterisation of plant viruses. J. gen. Virol. 54, 223—241.
- Hollings, M., O. M. Stone*, 1975: Serological and immunoelectrophoretic relationships among viruses in the tombusvirus group. Ann. appl. Biol. 80, 37—48.
- Hollings, M., O. M. Stone, G. C. Bouttell*, 1970: Carnation Italian ringspot virus. Ann. appl. Biol. 65, 299—309.
- Koenig, R., A. Gibbs*, 1986: Serological relationship among tombusviruses. J. gen. Virol. 67, 75—82.
- Lovisolo, O., O. Bode, J. Völk*, 1965: Preliminary studies on the soil transmission of petunia asteroid mosaic virus («petunia» strain of tomato bushy stunt virus). Phytopath. Z. 53, 323—342.
- Makkouk, K. M., R. Koenig, D. E. Lesemann*, 1981: Characterisation of a tombusvirus from eggplant. Phytopathology 71, 572—577.
- Martelli, G. P.*, 1981: Tombusviruses. In: E. Kurstak (ed.) Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, pp. 61—90. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Martelli, G. P., A. Quacquarelli, M. Russo*, 1971: Tomato bushy stunt virus. C.M.I./A.A.B Descriptions of Plant Viruses No 69.
- Nicolaijeff, A., G. Obert, M. H. V. Van Regenmortel*, 1980: Detection of rotavirus by serological trapping on antibody-coated electron microscope grids. J. Clin. Microbiol. 12, 101—104.
- Smith, K. M.*, 1972: A Textbook of Plant Virus Diseases, pp. 537—540. Academic Press, Inc., New York.

S U M M A R Y

OCCURRENCE OF A TOMBUSVIRUS ON ERIGERON CANADENSIS L.

Zoran Jeknić, Živojin Erić and Julijana Grbelja

(Faculty of Science, University of Sarajevo)

Many samples of the species *Erigeron canadensis* L. with marked symptoms of viral disease were found in many locations in Sarajevo area, Yugoslavia. A virus belonging to the group of tombusviruses was isolated from infected plants.

The identification of the virus is based on reactions of diagnostic herbaceous species, characteristic cytopathogenic changes, morphology and size of viral particles, serological test of double diffusion in agar gel, and immune electron microscopy by »trapping« method (SPIEM). In serological test the serum against spinach strain of tomato bushy stunt virus was used.

This experiment, has shown for the first time that the species *Erigeron canadensis* is a natural host plant for a tombusvirus.

Zoran Jeknić
Mr. Živojin Erić
Prof. dr. Julijana Grbelja
Prirodno-matematički fakultet
Vojvode Putnika 43
YU-71000 Sarajevo (Jugoslavija)