

Stručni rad

ČETRDESET GODINA ISTRAŽIVANJA BILJNIH  
VIRUSA U BOTANIČKOM ZAVODU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA  
U ZAGREBU

With Summary in English

*NIKOLA JURETIĆ*

(Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 9. 09. 1994.

Istraživanja biljnih virusa u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu traju punih četrdeset godina. Utemeljitelj tih istraživanja bio je prof. dr. Davor Miličić, koji je u tom zavodu osnovao Virološki laboratorij i utemeljio istraživačku skupinu koju je vodio gotovo četrdeset godina. Baveći se različitim područjima biljne virologije, ta je skupina objavila oko 350 znanstvenih priopćenja u priznatim znanstvenim časopisima. U ovom je prikazu riječ o dostignućima kao i o sadašnjem stanju i budućnosti biljne virologije u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, odnosno u Hrvatskoj.

Uvod

Otkriće biljnih virusa zbilo se nešto prije jednog stoljeća (Ivanovskij 1892, Beijerinck 1898). Nakon tog otkrića, a osobito nakon što je Stanleyju (1935) pošlo za rukom izdvojiti virus mozaične bolesti duhana (VMD) u čistom stanju i kristalizirati ga, u mnogim se zemljama svijeta ubrzano osnivaju laboratoriji za istraživanje biljnih virusa i bolesti koje oni uzrokuju. Dva su razloga takvom interesu: s jedne strane nastojalo se upoznavanjem biljnih virusa spriječiti mnoge virusne bolesti biljaka i time smanjiti gospodarske štete, a, s druge strane, znanstvenici-prirodoslovci našli su u

biljnim virusima pogodne objekte na kojima su mogli istraživati temeljne osobine žive prirode na molekularnoj razini. Međutim, u Hrvatskoj su u to vrijeme znanstvene prilike bile takve da je trebalo proći pola stoljeća pa da se počne s istraživanjem biljnih virusa. Naime, tek je 1943. godine prvi put jedan naš stručnjak objavio znanstveni rad koji se odnosi na istraživanje biljnih virusa. Radi usporedbe, u Bugarskoj se prvi znanstveni rad o biljnim virusima pojavio punih dvadesetak godina ranije. Objavljivanjem prvoga znanstvenog rada iz područja biljne virologije jednoga našeg autora učinjen je prvi korak u razvoju u nas nove znanstvene discipline – *biljne virologije*. Zasluge za to pripadaju prof. dr. Milanu Panjanu (1906–1981) koji je najveći dio svoga znanstvenoistraživačkog vijeka proveo u *Institutu za zaštitu bilja* u Zagrebu.

Profesor M. Panjan studirao je agronomiju u Pragu još prije Drugog svjetskog rata. Pod utjecajem svog profesora i tadašnjeg istaknutog znanstvenika C. Blattnýja zarana se zainteresirao za biljne viruse. No, na njegovu konačnu odluku da se posveti znanstvenom istraživanju biljnih virusa utjecao je znameniti njemački biljni virolog dr. E. Köhler iz Berlina, kod kojeg je M. Panjan tijekom 1942. godine boravio na usavršavanju. Zajedno s E. Köhlerom objavljuje M. Panjan 1943. godine značajnu studiju o virusnoj bolesti duhana poznatoj pod imenom »paramozaik duhana« (Köhler i Panjan 1943), što je, kako je već spomenuto, prvi znanstveni članak iz područja biljne virologije jednoga hrvatskog istraživača. Vrativši se sa studijskog boravka u Njemačkoj, prof. Panjan intenzivno istražuje virusne bolesti krumpira u Hrvatskoj, koje su tada, baš kao i danas, uzrokovale velike gospodarske štete. Po završetku Drugog svjetskog rata značajno se pojačavaju istraživanja viroza krumpira u Panjanovu institutu. U to vrijeme on postupno uvodi u svom laboratoriju nove istraživačke tehnike, te proširuje svoja istraživanja na viroze različitih kultiviranih biljaka.

#### Početak i razvoj biljne virologije u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

Na temeljima koje je stvorio prof. Panjan, sredinom pedesetih godina započinju i drugi znanstvenici s istraživanjem biljnih virusa u nas. Prvi među njima bio je dr. Davor Miličić (1915–1993), tada docent u *Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*. On najprije studira viruse kakteja i otkriva da je na tim sukulentnim biljkama, uzgajanim u Hrvatskoj, jako rasprostranjen X-virus kakteja (Miličić 1954). D. Miličić u prvom redu istražuje virusne stanične inkluzije koje taj virus stvara u inficiranim stanicama. Rezultati, koje je postigao u istraživanju inkluzija X-virusa kakteja, potakli su dr. Miličića da istražuje stanične inkluzije i drugih virusa.

Početakom šezdesetih godina okuplja D. Miličić u svom laboratoriju nekoliko mladih suradnika: najprije se njemu priključuje 1959. godine Ana Zlata Štefanac a nešto kasnije Nikola Juretić i Nada Pleše, danas redoviti profesori u Botaničkom zavodu, te Đorđe Mamula, danas viši znanstveni suradnik u istom zavodu. U to vrijeme prof. Miličić upornim nastojanjima uspijeva namaknuti sredstva za proširenje stakleničkog prostora i za staju za pokusne životinje. Polazi mu za rukom također da,

zahvaljujući i tadašnjem *Institutu za botaniku Sveučilišta*, pribavi važnu laboratorijsku opremu: ultracentrifugu, niskoturažne centrifuge, rashladnu komoru i imunoelektroforetski uređaj, te sitniju laboratorijsku opremu. Sve to omogućuje njegovim mladim suradnicima da na vrijeme magistriraju i doktoriraju, te da poluče zapažene znanstvene rezultate. To je vrijeme kad prof. Miličić pojačava suradnju s brojnim inozemnim znanstvenicima i znanstvenim institucijama (tab. 1). Isto tako, u to vrijeme prof. Miličić i njegovi suradnici borave u najistaknutijim virološkim laboratorijima u svijetu, učeći nove istraživačke tehnike, naročito one, koje omogućuju istraživanje virusa na molekularnoj razini. Tako npr. mladi suradnici dr. Miličića borave krajem šezdesetih i početkom sedamdesetih godina u više europskih i

Tab. 1. Suradnja s inozemnim institucijama  
Table 1. Collaboration with foreign institutions

| U s t a n o v a (Institutions)                             | 1* | 2** | 3*** |
|--|----|-----|------|
| Botanisches Institut (Münster)                             |    |     |      |
| Botanisches Institut (Saarbrücken)                         | +  | +   | +    |
| Department of Botany (Missoula, Montana, SAD)              |    | +   | +    |
| Department of Plant Science (Alberta, Kanada)              |    | +   |      |
| Department of Plant Science (Huston, Texas)                |    |     | +    |
| Institut für Anatomie u. Physiologie der Pflanzen (Graz)   | +  | +   | +    |
| Horticultural Research Institute (Budimpešta)              | +  | +   |      |
| Institute of Phytopathology (Ivanka pri Dunaji, Slovačka)  | +  |     |      |
| Institute of Microbiology (Moskva)                         |    |     |      |
| Institute de Microbiologia (Madrid)                        |    |     |      |
| Institut für Phytopathologie (Aschersleben, Njemačka)      | +  |     | +    |
| Institute of Virology (Bratislava)                         |    | +   |      |
| Institut für Pflanzenschutz (Sofija)                       | +  |     | +    |
| Institut für Viroserologie (Braunschweig)                  | +  |     | +    |
| Department of Botany (Krakov)                              |    |     | +    |
| Laboratorio di fitovirologia Applicata (Milano)            |    |     |      |
| Laboratorium voor Virologie (Wageningen, Nizozemska)       |    | +   |      |
| Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin)        |    |     | +    |
| Pannonian University (Keszthely, Mađarska)                 |    |     | +    |
| Plant Virus Laboratory, Univ. Florida (Gainesville)        | +  | +   | +    |
| Institute for Plant Protection (Budimpešta)                | +  | +   | +    |
| Scottish Crop Research Institute (Invergowrie, Dundee)     | +  | +   | +    |
| Thompson Institute for Plant Research (New York)           |    | +   |      |
| Rutgers – the State University (New Brunswick, New Jersey) |    | +   |      |
| University of Wisconsin (Madison, SAD)                     | +  |     | +    |
| Institute of Experimental Botany (Prag)                    |    | +   | +    |
| Institute for Plant Pathology (Potenze, Italija)           | +  | +   | +    |
| University of Bari (Bari, Italija)                         | +  |     | +    |
| Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale (Rim)      | +  |     |      |
| Indiana State University (Terre Haute, SAD)                |    |     | +    |
| University of California (Davis)                           | +  |     |      |
| Instytut ziemniaka (Bonin i Warszawa)                      | +  |     |      |
| Estacos Agronomica Nacional (Oeiras, Portugal)             |    | +   |      |
| I. N. R. A. Institut de Biologie Moleculaire (Strasbourg)  |    | +   |      |

1\* Boravci na usavršavanju naših virologa (Specialization of Croatian virologists).

2\*\* Posjete inozemnih virologa laboratoriju u Zagrebu (Visits of foreign virologists to the laboratory in Zagreb).

3\*\*\* Koautorstvo s inozemnim virolozima (Coauthorship with foreign virologists).

+ znači (means) *da* (yes).

američkih sveučilišta i instituta: dr. Ana Zlata Štefanac provodi 13 mjeseci u Virološkom laboratoriju u Dundeeju (Škotska) i 11 mjeseci u Virološkom laboratoriju Sveučilišta u Davisu, California (SAD). Nešto kasnije boravi dr. Nikola Juretić 5 mjeseci na Sveučilištu u Saarbrückenu (Njemačka), te 10 mjeseci na Sveučilištu u Madisonu, Wisconsin (SAD), a u više navrata boravi dulje ili kraće vrijeme u Virološkom laboratoriju Mađarske akademije znanosti i umjetnosti u Budimpešti. Otrprike u isto vrijeme dr. Đorđe Mamula i dr. Nada Pleše provode 9, odnosno 6 mjeseci, na znanstvenom usavršavanju u Njemačkoj i Mađarskoj (Aschersleben, Braunschweig, Budimpešta). I danas ista istraživačka skupina održava suradnju s inozemnim laboratorijima. Na primjer, 1992. godine boravi dr. Mladen Krajačić 2 mjeseca na sveučilištima u Bariju i Rimu, a 1994. godine 5 mjeseci na Sveučilištu u Beču. Naravno da su svi ti boravci značajno utjecali na razvoj biljne virologije u nas. Zahvaljujući naučenim laboratorijskim tehnikama kao i uvidu u najnovije istraživačke pravce, biljni virolozi Botaničkog zavoda zarana postižu rezultate kojima su se mogli mjeriti u dobroj mjeri s onima u bilnovirološkim laboratorijima u Europi, pa i svijetu.

### Istraživačka područja biljnih virologa u Botaničkom zavodu

Istraživanje biljnih virusa u Botaničkom zavodu odvijalo se u nekoliko područja.

#### 1. Otkrivanje i identifikacija biljnih virusa rasprostranjenih na području Hrvatske

Već na početku svojih viroloških istraživanja prof. Miličić sa suradnicima uvida da je nužno doznati što više o nazočnosti pojedinih biljnih virusa u našoj zemlji. Rezultati te vrste istraživanja bili su od velike koristi fitopatolozima-praktičarima, jer su na osnovi njih lakše mogli suzbijati virusne zaraze važnih kultiviranih biljaka. Rezultati tih istraživanja, radi dostupnosti domaćim stručnjacima, objelodanjeni su poglavito u domaćim časopisima (*Acta Botanica Croatica*, *Agronomski glasnik*, *Biološki glasnik*). U tablici 2 navedeni su kronološki virusi koje su istraživači Botaničkog zavoda otkrili i identificirali na području Hrvatske. Nađeni virusi su nakon identifikacije istraživani u pogledu bioloških, seroloških i molekularno-bioloških osobina. Ta su istraživanja zahtijevala poznavanje metoda izolacije virusa u čistom stanju, metode imunokemijskih istraživanja, metode elektronskomikroskopskih istraživanja i druge tehnike. Kako se iz tablice 2 vidi, prof. Miličić sa suradnicima utvrdio je više od 30 virusa i veći broj njihovih sojeva u divljim i kultiviranim biljkama na području Hrvatske. Zahvaljujući tim identifikacijskim istraživanjima, pronađeni su u Hrvatskoj posebni virusni sojevi za koje su, radi daljnjih istraživanja, pokazivali zanimanje mnogi virolozi u svijetu. Tako su npr. virolozi Botaničkog zavoda prvi u svijetu karakterizirali naročiti soj X-virusa kakteja (Miličić i sur. 1966), zatim tipični europski soj virusa mozaika rotkve (Štefanac i Mamula 1971), te posebni soj virusa crtičavosti duhana (Rana i sur. 1987). Zanimljivo je da je jedan soj virusa mozaika krastavca, nađen na djetelini u Hrvatskoj (Taraku i sur. 1977) dobio u svjetskoj literaturi naziv »Croatian strain of CMV«, tj. hrvatski soj virusa CMV. No, najveća dostignuća u toj vrsti istraživanja su otkrića u Hrvatskoj

T a b. 2. Virusi koje su virolozi Botaničkog zavoda utvrdili na biljkama u Hrvatskoj i imuni serumi pripremljeni za te viruse.

T a b l e 2. Viruses on plants in Croatia revealed by virologists of Botanical institute and immune sera prepared against those viruses.

| Otkriveni virusi<br>(Revealed viruses)                              | Biljke-prirodni domaćini (Established natural<br>plant hosts)   | Pripremljeni<br>serumi<br>(Prepared<br>antisera) |
|---|---|--|
| X-virus kakteja<br>(cactus virus X)                                 | <i>Opuntia brasiliensis</i><br><i>O. stricta</i><br><i>O. tomentosa</i><br><i>O. monacantha</i><br><i>O. microdasys</i><br><i>O. microdasys v. albispina</i><br><i>Schlumbergera bridgessi</i>                                      | +<br>(za više izolata)                           |
| Virus mozaika postrne repe<br>(turnip mosaic virus)                 | <i>Alliaria officinalis</i><br><i>Brassica oleracea v. capitata</i><br><i>B. rapa v. rapa</i><br><i>Matthiola incana</i><br><i>Sinapis arvensis</i><br><i>Tropaeolum majus</i>  | +<br>(za više izolata)                           |
| Virus žutog mozaika postrne<br>repe (turnip yellow mosaic<br>virus) | <i>Brassica rapa v. rapa</i><br><i>B. oleracea v. botrytis</i>  | +<br>(za više sojeva)                            |
| Virus mozaika cvjetače<br>cauliflower mosaic virus)                 | <i>Brassica rapa v. rapa</i><br><i>Brassica oleracea v. botrytis</i>  |  |
| Virus kovrčavosti postrne<br>repe (turnip crinkle virus)            | <i>Brassica rapa v. rapa</i>  | +  |
| Virus mozaika rotkve<br>(radish mosaic virus)                       | <i>Brassica oleracea v. botrytis</i><br><i>B. oleracea v. gemmifera</i><br><i>B. rapa v. rapa</i><br><i>B. napus v. napobrassica</i><br><i>B. napus. v. napobrassica f. rutabaga</i><br><i>Sinapis alba</i>                         | +  |
| Virus mozaika bagrema<br>(Robinia mosaic virus)                     | <i>Robinia pseudacacia</i>  |  |
| Virus mozaika ovsika<br>(brome mosaic virus)                        | <i>Agropyron repens</i>   | +  |
| Virus mozaika šećerne trske<br>(sugarcane mosaic virus)             | <i>Zea mays</i>   | +  |
| Virus mozaika krastavca<br>(cucumber mosaic virus)                  | <i>Aristolochia macrophylla</i><br><i>A. clematitis</i><br><i>Aquilegia vulgaris</i><br><i>Cucumis sativus</i><br><i>Echinocystis lobata</i><br><i>Forsythia suspensa</i><br><i>Hesperis dinarica</i><br><i>Leycesteria formosa</i> |  |

Nastavak tab. 2.

| Otkriveni virusi<br>(Revealed viruses)  | Biljke-prirodni domaćini (Established natural<br>plant hosts)   | Pripravljene<br>serumi<br>(Prepared<br>antisera) |
|---|---|--|
|   | <i>Lycium halimifolium</i><br><i>Lycopersicon esculentum</i><br><i>Maclura pomifera</i><br><i>Nicandra physaloides</i><br><i>Passiflora caerulea</i><br><i>Sonchus oleraceus</i><br><i>Scopolia carniolica</i><br><i>Solanum melongena</i><br><i>Trifolium repens</i><br><i>Chelidonium majus</i> |  |
| Virus mozaika duhana<br>(tobacco mosaic virus)  | <i>Capsicum annuum</i><br><i>Lycopersicon esculentum</i><br><i>Nicotiana tabacum</i>  | +<br>(za više sojeva)                            |
| Virus mozaika trpuca<br>(ribgrass mosaic virus)                                       | <i>Digitalis ciliata</i><br><i>Plantago media</i><br><i>Roripa amphibia</i>   | +<br>(za više sojeva)                            |
| Virus nekroze duhana<br>(tobacco necrosis virus)                                      | <i>Nicotiana tabacum</i>  | +  |
| Virus pjegavog venuća rajčice<br>(tomato spotted wilt virus)                          | <i>Nicotiana tabacum</i>  |  |
| Virus šarke šljive<br>(plum pox virus)  | <i>Prunus domestica</i>   |  |
| Virus nekrotične prstenaste<br>pjegavosti trešnje (prunus<br>necrotic ringspot virus) | <i>Prunus domestica</i><br><i>Rosa canina</i>   |  |
| Virus mozaika lobode<br>(sowbane mosaic virus)  | <i>Chenopodium murale</i><br><i>Prunus domestica</i>  | +  |
| Virus pjegavog mozaika kiselice<br>(dock mottling mosaic virus)                       | <i>Rumex obtusifolius</i>   |  |
| Virus grmolike kržljivosti<br>rajčice (tomato bushy stunt<br>virus)                   | <i>Spinacia oleracea</i>  | +  |
| Virus mozaika maklure<br>( <i>Maclura</i> mosaic virus)                               | <i>Maclura pomifera</i>   | +  |
| Latentni virus špinata<br>(spinach latent virus)                                      | <i>Spinacia oleracea</i>  | +  |
| Virus mozaika dragoljuba<br>(broad bean wilt virus)                                   | <i>Digitalis ferruginea</i><br><i>Tropaeolum majus</i><br><i>Vicia faba</i>   | +  |

Nastavak tab. 2.

| Otkriveni virusi<br>(Revealed viruses)                                     | Biljke-prirodni domaćini (Established natural<br>plant hosts)  | Pripravljene<br>serumi<br>(Prepared<br>antisera) |
|--|--|--|
| Virus uvijenosti lista<br>trešnje (cherry leaf roll virus)                 | <i>Sambucus ebulus</i><br><i>S. nigra</i>  | +  |
| Virus enacijskog mozaika graška<br>(pea enation mosaic virus)              | <i>Pisum sativum</i>   |  |
| Virus mozaika lucerne<br>(alfalfa mosaic virus)                            | <i>Ballota nigra</i><br><i>Ocimum basilicum</i><br><i>Origanum vulgare</i><br><i>Pittosporum tobira</i><br><i>Viburnum tinus</i> |  |
| Rabdovirus   | <i>Euonymus japonica</i><br><i>Laburnum anagyroides</i>  |  |
| Virus kržljivosti šljive<br>(prune dwarf virus)                            | <i>Prunus avium</i><br><i>P. amygdalus</i>   |  |
| Virus mozaika sunovrata<br>(narcissus mosaic virus)                        | <i>Narcissus sp.</i>   | +  |
| Virus šarenila velebilja<br>(belladonna mottle virus)                      | <i>Atropa belladonna</i>   | +  |
| Virus mozaika salate<br>(lettuce mosaic virus)                             | <i>Lactuca sativa v. capitata</i><br><i>Picris echioides</i>   |  |
| Virus žutog mozaika graha<br>(bean yellow mosaic virus)                    | <i>Fresia reflecta</i><br><i>Passiflora caerulea</i><br><i>Trifolium pratense</i>  |  |
| Virus išaranosti karanfila<br>(carnation mottle virus)                     | <i>Dianthus caryophyllus</i>   | +  |
| Virus linijskog mozaika<br>pelargonije (pelargonium<br>line pattern virus) | <i>Pelargonium zonale</i>  | +  |
| Virus kovrčanja lista pelargonije<br>(pelargonium leaf curl virus)         | <i>Pelargonium zonale</i>  |  |
| Virus mozaika kolokazije<br>(dasheen mosaic virus)                         | <i>Amorphophalus rivieri</i>   |  |
| Virus crtičavosti duhana<br>(tobacco streak virus)                         | <i>Clematis vitalba</i>  | +  |
| S-virus heleniuma<br>( <i>Helenium</i> virus S)                            | <i>Impatiens holstii</i>   |  |

dvaju posve novih, do tada znanosti nepoznatih virusa. Bili su to virus mozaika maklure (Pleše i sur. 1979), koji će vjerojatno postati i članom nove virusne skupine, te latentni virus špinata iz skupine ilarvirusi (Štefanac i Wrischer 1983).

## 2. Citopatološke promjene u inficiranoj stanici

Svi članovi istraživačke skupine prof. Miličića istraživali su manje ili više tzv. virusne stanične inkluzije (uklopine, tijela), koje kao amorfne ili kristalične tvorbe nastaju pod utjecajem virusa u citoplazmi ili jezgri inficirane stanice. Slobodno se može reći da je ta skupina istraživača dosegla najveće domete u svom istraživačkom radu baš u području istraživanja virusnih staničnih inkluzija. Oni virusne inkluzije studiraju ne samo na svjetlosnomikroskopskoj razini nego i na submikroskopskoj razini. Pri tom surađuju s *Laboratorijem za elektronsku mikroskopiju Instituta »R. Bošković«* u Zagrebu, odnosno s članovima toga laboratorija: prof. Z. Devidéom, prof. Mercedes Wrischer i prof. N. Ljubešićem. Prof. Miličić i njegovi suradnici po radovima iz područja virusnih inkluzija svjetski su prepoznatljiviji, osobito po istraživanjima submikroskopske građe inkluzija tobamovirusa (građa tzv. okruglastih pločica; Miličić i sur. 1968). Zapažena su i njihova istraživanja inkluzija virusa mozaika cvjetače (Mamula i Miličić 1968), virusa mozaika rotkve (Štefanac i Ljubešić 1971), virusa mozaika sunovrata (Štefanac i Ljubešić 1974), virusa venuća boba (Miličić i sur. 1976), submikroskopskih inkluzija potyvirusa (tzv. pin-wheel structures; Pleše i sur. 1979), te napose x-tijela virusa šuštavosti duhana (Harrison i sur. 1970). Njihovi su radovi iz tog područja virologije citirani ne samo u primarnim časopisima nego i u udžbenicima i knjigama. Znanstvene članke iz toga područja objavljivali su u najistaknutijim virološkim časopisima u svijetu, npr. u *Virology*, *Protoplasma*, *Phytopathologische Zeitschrift*, *J. General Virology* i dr. O istraživanjima virusnih inkluzija držao je prof. Miličić pozivna predavanja na svjetskim virološkim kongresima i drugim međunarodnim znanstvenim skupovima.

## 3. Utvrđivanje serološkog srodstva među virusima

Jedno od važnih područja istraživanja biljnih virologa u Botaničkom zavodu bilo je, i još je uvijek, istraživanje imunokemijskih osobina virusa i u svezi s tim istraživanje seroloških srodstvenih odnosa među virusima. Preduvjet za takva istraživanja jest posjedovanje virusnih imunih seruma. Zbog toga su virolozi Botaničkog zavoda za mnoge viruse morali pripravljati imune serume, što često nije bilo lako, jer se svi virusi ne odlikuju dobrom imunogenošću niti potrebnom postojanošću *in vitro*. Unatoč tomu, uspjelo im je za preko 40 različitih virusa i njihovih sojeva pripraviti imune serume (tab. 1). Na početku rada na pripravi imunih seruma od znatne pomoći bila im je suradnja s dr. M. Panjanom i osobito s dr. M. Zeljkom iz *Veterinarskog instituta u Zagrebu*, te s dr. B. Pendecom iz *Imunološkog zavoda u Zagrebu*. Zbog visoke specifičnosti i zadovoljavajućih titara virusni serumi priređeni u Botaničkom zavodu visoko su bili cijenjeni u virološkim krugovima, pa su ih mnogi laboratoriji u svijetu tražili za svoja imunokemijska istraživanja. U serološkim istraživanjima u Virološkom laboratoriju Botaničkog zavoda primjenjivane su različite serološke metode. Neke od korištenih tehnika znatno su poboljšane: npr. u tom je laboratoriju pokazano da se



metodom jednostruke radijalne imunodifuzije u agarskom gelu može uspješno utvrditi ne samo količina virusa u suspenziji nego i srodstvo među virusima (Juretić i Mamula 1980). Isto tako istraživački Virološkog laboratorija u Botaničkom zavodu su dokazali da se virus mozaika duhana, jedan od najčešćih biljnih virusa u prirodi, može u nepročišćenom biljnom soku otkriti imunoelektroforetski (Juretić 1981). Virolozi Botaničkog zavoda prvi su u svijetu uspjeli prirediti imuni serum u ribi protiv biljnog virusa (Juretić i sur. 1977). Svoja su dostignuća o imunokemijskim osobinama virusa objavljivali u istaknutim međunarodnim časopisima (*Intervirology*, *Phytopath. Z.*, *J. Phytopathology*, *Ann. Applied Biology*, *Naturwissenschaften* i dr.).

#### 4. Istraživanja u području molekularne biljne virologije

Unatoč oskudnoj opremi u Virološkom laboratoriju Botaničkog zavoda stalno se nastojalo da istraživanja budu što je moguće više na razini na kojoj se istražuju virusi u vodećim laboratorijima u svijetu. Riječju, težilo se istraživanju fine građe same virusne čestice, te molekularno-bioloških osobina virusa. I po najskromnijoj procjeni u tom je laboratoriju učinjeno četrdesetak radova koji se isključivo odnose na molekularna svojstva virusa (molekularna građa virusnih inkluzija, Miličić i sur. 1968; aminokiselinski sastav kapside nekih virusa, Chessin i sur. 1980; utjecaj virusa na mitohondrije i plastide, Harrison i sur. 1970; podijeljenost virusnog genoma, Juretić i Fulton 1974; virusne dvolančane RNA i satelitne RNA, Krajačić i Lorković 1992, Lorković i Krajačić 1992; unapređivanje metoda izolacije virusa u čistom stanju, Mamula 1980). U molekularno-biološkom smjeru danas najviše radi najmlađi član Laboratorija dr. Mladen Krajačić i očekuje se da će on na tom području dati daljnje doprinose.

#### 5. Istraživanje virusa nađenih u tlu i vodi

Biljni virusi dolaze u prirodi ne samo u biljkama nego i u tlu i riječnim i jezerskim vodama. U te dijelove okoliša dospijevaju oni u prvom redu iz uginulih biljaka i preko živog korijenja. U zadnjih nekoliko godina virolozi Botaničkog zavoda izolirali su biljne viruse iz voda nekih naših rijeka i stajaćica. (Juretić i sur. 1986). Ustanovili su također da u tlima nekih šumskih ekosustava u Hrvatskoj dolaze biljni virusi (Pleše i sur. 1993). Istraživanja biljnih virusa u šumskim ekosustavima na pravcu su ekoloških istraživanja koja tragaju za uzročnikom današnjeg propadanja šuma.

#### Suradnja s virološkim laboratorijima u inozemstvu

Prof. Miličić i suradnici od samog početka istraživanja virusa uspostavljaju blisku suradnju s mnogim laboratorijima u inozemstvu. U tablici 1 navedene su inozemne ustanove u kojima su se virolozi Botaničkog zavoda usavršavali i s kojima danas održavaju znanstvenu suradnju. S mnogim znanstvenicima tih ustanova objavili su i više zajedničkih radova. U tablici se nalaze i podaci o posjetima inozemnih znanstvenika Virološkom laboratoriju u Botaničkom zavodu. Treba spomenuti da su virolozi Botaničkog zavoda članovi nekoliko uglednih međunarodnih znanstvenih udruženja, kao što su *Assoc. of Appl. Biologists*, *American Phytopathol. Soc.*, *Internat. Soc. for Horticultural Scien.* i *Soc. for General Microbiology*.

## Objavljeni radovi

Ako se gleda zbir radova dobiven na temelju popisa radova pojedinih istraživača, do sada su virolozi Botaničkog zavoda objavili preko 350 znanstvenih radova publiciranih u priznatim znanstvenim časopisima. Taj je broj istini za volju nešto manji s obzirom da su neki radovi zajednički, tj. da je u njima više suautora, pa se isti rad opetovano navodi u popisima radova više istraživača. Treba istaknuti da su virolozi Botaničkog zavoda od samog početka razvoja biljne virologije u Zavodu nastojali objavljivati svoje znanstvene radove ne samo u domaćim znanstvenim časopisima nego i u istaknutim međunarodnim znanstvenim časopisima. To je, zahvaljujući i međunarodnim recenzijama, značajno pridonijelo podizanju kvalitete njihovih radova. Znan broj tih radova objavljen je u časopisima koji su uključeni u *Current Contents* i koji su citirani u *Science Citation Index*. Popis većine tih radova može se naći u *Bibliografiji radova biljnih virologa*, koju su priredili Miličić i Šutić (1969, I. svezak) i Štefanac i Tošić (1976, 1981, 1986; II., III., i IV. svezak). Virolozi Botaničkog zavoda objavljivali su u sljedećim časopisima koji se citiraju u *Current Contents* i *Science Citation Index: Protoplasma, Phyton, Virology, Biologia Plantarum, Naturwissenschaften, J. General Virology, Phytopathology, Phytopath. Zeitschrift, J. Phytopathology, Intervirology, Acta Horticulturae, Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung., Acta Phytopath. Entomol. Hung., Arch. Phytopath. Pflanzenschutz, Z. Pfl.-Krankh. Pfl.-Schutz., Periodicum Biologorum* i *Ann. Appl. Biology*.

Radovi virologa Botaničkog zavoda, osim što su često citirani u primarnim i sekundarnim časopisima, također su citirani u više svjetski priznatih monografija, udžbenika i knjiga. Citirani su npr. u Matthews u svjetski poznatom udžbeniku *Plant Virology* (Academic Press), Smith u priručniku *A Text Book of Plant Virus Diseases* (Longman, London), zatim u Gibbsom i Harrisonom udžbeniku *Plant Virology* (E. Arnold, London). Citirani su također petnaestak puta u knjizi *Immunochemistry*, čiji je autor poznati molekularni virolog Van Regenmortel (Academic Press, 1982). No, najviše ih citira poznati njemački udžbenik Klinskog *Pflanzliche Virologie* (Akademie-Verlag, Berlin). Taj je udžbenik preuzeo iz radova virologa Botaničkog zavoda petnaestak ilustracija. Njihovi su rezultati citirani i u knjizi *Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* (Elsevier/Nord-Holland Biomedical Press, Amsterdam), *Atlas of Plant Viruses* (CRC Press, Florida), *Applied Plant Virology* (Chapman and Hall, London), *The Plant Viruses* (Plenum Press, New York and London) te u posebnoj virološkoj publikaciji poznatoj širom svijeta *Descriptions of Plant Viruses* (C. M. I./A. A. B., Kew, Surrey, London) kao i u brojnim drugim knjigama.

Osim u pisanim radovima biljni virolozi iz Botaničkog zavoda izlagali su rezultate svojih istraživanja na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima, uključujući veći broj europskih i svjetskih simpozija i kongresa.

#### Današnje stanje i perspektive biljne virologije u Botaničkom zavodu

Danas se u Virološkom laboratoriju Botaničkog zavoda virusi istražuju sve manje na primijenjenoj, dijagnostičkoj razini a sve više na molekularno-

biološkoj razini. Na taj se način želi ići ukorak s istraživanjima u svijetu. Međutim, za takva je istraživanja potrebno imati ne samo odgovarajuću laboratorijsku opremu nego, što je još važnije, mlađi znanstveni kadar. Nažalost, i jedan i drugi uvjet danas je teško ostvariti u našim okolnostima. Kao posljedica tog nazire se u istraživanjima biljnih virologa u Botaničkom zavodu stagnacija, koja znači zapravo zaostajanje za razinom svjetskih istraživanja. To gubljenje daha u razvoju biljne virologije u Botaničkom zavodu povezano je i s gašenjem drugih biljnoviroloških laboratorija u Hrvatskoj. Naime, kako je već spomenuto, razvoj biljne virologije u Hrvatskoj započeo je četrdesetih godina da bi osamdesetih godina dostigao svoj najveći zamah. Nakon toga dolazi, ako se gleda broj istraživača koji se bave biljnim virusima u cijeloj Hrvatskoj, do naglog zaostajanja: nestaje kritične mase u broju istraživača-virologa. Sažeto rečeno, šezdesetih godina biljna je virologija u našoj zemlji imala žarišta svog razvoja u tri znanstvene institucije, od kojih su sve tri bile u Zagrebu: u *Institutu za zaštitu bilja*, na *Prirodoslovno-matematičkom fakultetu* i na *Agronomskom fakultetu*. Očekivalo se da ta znanstvena disciplina pusti korijenje i u drugim hrvatskim sveučilišnim središtima. Nažalost, ne samo da do takvog proširenja nije došlo, nego je, od nekadašnja tri žarišta danas ostalo samo jedno jedino. Naime, u Institutu za zaštitu bilja i na Agronomskom fakultetu u Zagrebu odlaskom dr. M. P a n j a n a, odnosno, dr. A n e Š a r i ć, nitko se više znanstveno ne bavi biljnim virusima. Preostala je samo skupina od pet istraživača u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Međutim, četvero od njih uskoro ispunjava uvjete za mirovinu. Takvo nazadovanje u jednoj danas propulzivnoj znanstvenoj disciplini, koja je i temeljna i primjenjiva, teško je shvatiti. Naime, dok u svijetu pa i u nama susjednim zemljama (npr. u Mađarskoj, Italiji) postoji i po više biljnoviroloških laboratorija s nekoliko desetaka istraživača, u nas je pred osipanjem i jedna jedina preostala istraživačka skupina koja se bavi biljnim virusima. Ne može se reći da je glavni razlog tomu nedovoljna briga o odgoju potrebnog kadra, jer je u zadnjih tridesetak godina magistriralo u Hrvatskoj iz područja biljne virologije petnaestak, a doktoriralo desetak kandidata. Dobar dio tih ljudi ostao je u znanosti radeći u središtima širom Hrvatske. Međutim, oni većinom rade u drugim znanstvenim područjima, a ne u području biljne virologije. Razlog njihova bijega iz biljne virologije leži u nedostatku odgovarajućih laboratorija, odnosno odgovarajućih radnih mjesta u središtima njihova boravka. Naravno da je to posljedica neshvaćanja, čak i agronomskih stručnjaka, koliko važnost u biljnoj proizvodnji, kojom se oni bave, imaju biljni virusi.

Umjesto zaključka može se reći da je danas na biljnim virolozima u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, jedinoj preostaloj skupini biljnih virologa u Hrvatskoj, da pokušaju osigurati znanstveni podmladak kako bi ta znanstvena disciplina, utemeljena u nas prije pedeset godina, dobila nove poticaje za svoj razvoj.

#### Literatura

- Beijerinck, M. W.*, 1898; Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de vlekziekte der tabaksbladen. Versl. Gewone. Vergad. Wis. Natuurk. Afd. K. Akad. Wet. Amsterdam 7, 229-235.
- Chessin, M., N. Juretić, D. Miličić, J. Perryman, L. Giri*, 1977: A distinctive strain of ribgrass mosaic virus from Montana, USA. *Phytopath. Z.* 97, 295-301.

- Harrison, B. D., Z. Štefanac, I. M. Roberts, 1970: Role of mitochondria in the formation of x-bodies in cells of *Nicotiana clevelandii* infected by tobacco rattle virus. *J. gen. Virol.* 6, 127–140.
- Ivanowski, D., 1892: Ueber die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze. *Bulletin de l' Académie Impériale des Sciences, St. Petersburg* 35, 67–70.
- Juretić, N., 1981: Demonstration of tobacco mosaic virus in unpurified plant sap by agar gel immunoelectrophoresis. *Phytopath. Z.* 100, 366–368.
- Juretić, N., R. W. Fulton, 1974: Some characteristics of the particles types of radish mosaic virus. *Intervirology* 4, 57–68.
- Juretić, N., Vuković, J. Grbelja, N. Guzina, 1977: Immunogenicity of turnip yellow mosaic virus in green tench (*Tinca tinca*). *Naturwissenschaften* 64, 440.
- Juretić, N., Đ. Mamula, 1980: Application of single radial immunodiffusion for qualitative comparison of plant virus particles. *Intervirology* 13, 209–213.
- Juretić, N., J. Horváth, M. Krajačić, 1986: Occurrence of a tobamovirus similar to ribgrass mosaic virus in water of the Hungarian river Zala. *Acta Phytopath. Entomol. Hungarica* 21, 291–295.
- Köhler, E., M. Panjan, 1943: Das Paramosaikvirus der Tabakpflanze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 61, 175–180.
- Krajačić, M., Z. Lorković, 1992: Optimizing alternative chromatographic approach in isolation of viral replicative dsRNA from infected plant tissue. *Acta Biologica* 16, 1–9.
- Lorković, Z., M. Krajačić, 1992: Double-stranded RNA from plants infected with two tymoviruses. *Acta Biologica* 16, 11–19.
- Mamula, Đ., D. Miličić, 1968: Über die Eigenschaften von zwei jugoslawischen Isolatzen des Blumenkohlmosaik-Virus. *Phytopath. Z.* 61, 232–252.
- Mamula, Đ., 1980: Purification of Belladonna mottle virus by ammonium sulphate. *Acta Bot. Croat.* 39, 15–20.
- Miličić, D., 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* 43, 228–236.
- Miličić, D., N. Pleše, R. Berćek, J. Brandes, R. Casper, M. Chessin, 1966: Vergleichende serologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Isolatzen des Kakteen-X-Virus. *Phytopath. Z.* 55, 211–217.
- Miličić, D., Z. Štefanac, N. Juretić, M. Wrischer, 1968: Cell inclusions of Holmes' ribgrass virus. *Virology* 35, 356–362.
- Miličić, D., D. Šutić, 1969: Bibliografija o biljnim virozama Jugoslavije. Svezak I., Prir.-mat. fakultet Zagreb i Polj. fakultet Beograd.
- Miličić, D., N. Juretić, N. Pleše, M. Wrischer, 1976: Some data on cell inclusions and natural hosts of broad bean wilt virus. *Acta Bot. Croat.* 35, 17–24.
- Pleše, N., M. Rilović, M. Wrischer, 1969: Novi domadari i intracelularne inkluzije virusa šarke. *Zaštita bilja* 104, 143–150.
- Pleše, N., R. Koenig, D. E. Lesemann, R. F. Bozarth, 1979: Maclura mosaic virus – an elongated plant virus with uncertain group membership. *Phytopathology* 69, 471–475.
- Pleše, N., N. Juretić, Đ. Mamula, Z. Polák, M. Krajačić, 1993: Plant virus contamination of soil and water in forest ecosystems of Zagreb area. *Environ. Virology* (u tisku).
- Rana, G. Z., M. Krajačić, Z. Štefanac, N. Pleše, L. Rubino, D. Miličić, 1987: Properties of a new strain of tobacco streak virus from *Clematis vitalba* (*Ranunculaceae*). *Ann. appl. Biol.* 111, 153–160.
- Stanley, W. M., 1935: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science* 81, 644–645.
- Štefanac, Z., Đ. Mamula, 1971: A strain of radish mosaic virus occurring in turnip in Yugoslavia. *Ann. appl. Biol.* 69, 229–234.
- Štefanac, Z., N. Ljubešić, 1971: Inclusion bodies in cells infected with radish mosaic virus. *J. gen. Virol.* 13, 51–57.
- Štefanac, Z., N. Ljubešić, 1974: The spindle – shaped inclusion bodies of narcissus mosaic virus. *Phytopath. Z.* 80, 148–152.
- Štefanac, Z., M. Wrischer, 1983: Spinach latent virus: some properties and comparison of two isolates. *Acta Bot. Croat.* 42, 1–9.
- Štefanac, Z., M. Tošić, 1976/81/86: Bibliografija o biljnim virozama Jugoslavije. Svezak II. (1976), Svezak III. (1981), Svezak IV. (1986). Prir.-mat. fakultet Zagreb i Polj. fakultet Beograd.
- Taraku, N., N. Juretić, D. Miličić, 1977: Properties of two virus isolates from clovers in Croatia. *Acta Bot. Croat.* 36, 47–55.

## SUMMARY

## FORTY YEARS OF PLANT VIRUS RESEARCH IN BOTANICAL INSTITUTE OF ZAGREB UNIVERSITY

Nikola Juretić

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

Plant virus research started in Croatia fifty years ago. The founder of that work was dr. Milan Panjan (1906–1981) who in 1943 published the first report on plant viruses (Köhler and Panjan 1943). After that M. Panjan continues to investigate plant viruses in the *Institute for Plant Protection in Zagreb*. Ten years later dr. Davor Miličić (1915–1993) began to study plant viruses in *Botanical institute of the Faculty of Science in Zagreb* as well. In 1954. he published his first article concerning plant viruses (Miličić 1954). Step by step professor Miličić formed the modern plant virus laboratory in Botanical institute. In addition he has composed the research group which was consisted of four younger researchers. Leader of this research team was D. Miličić almost for forty years. He and his coworkers have maintained close connections with numerous plant virus laboratories in the world (Table 1) specializing in some of them. The main directions of research work of this group were: identification of plant viruses occurring in Croatia (Table 2), virus cell inclusions, serological relationship among viruses, molecular properties of viruses and plant virus contamination of soil and water. The members of the group have published about 350 scientific papers in relevant journals. Professor Miličić's group has certainly earned the reputation of being one of the esteemed plant virus groups in Europe. Unfortunately, today the work of this group is stagnant because of faint financial support and deficiency of laboratory equipment. In addition, today in the group there is only one younger researcher, while the rest four researchers are in front of pension. However, hoping the situation will be better because Croatian government will be soon in position to support more than up to now important research programs and scientific disciplines.

Prof. dr. Nikola Juretić

Botanički zavod

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Marulićev trg 20/II

41000 Zagreb, Hrvatska (Croatia)