

**Dorđe Mamula, Nikola Juretić, Dr Mercedes Wrischer,  
Dr Zvonimir Devidé i Dr Davor Miličić,**  
Institut za botaniku Sveučilišta i  
Institut »Ruđer Bošković« — Zagreb

## NOVI PODACI O VIRUSIMA KRUCIFERA U JUGOSLAVIJI

### UVOD

U ovom časopisu 1963. godine su autori Miličić, Štefanac-Uđbinac i Mamula objavili izvještaj o istraživanjima pod naslovom »Rasprostranjenost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji«. U tom izvještaju su iznijeli svoja zapažanja i pokuse na osnovi kojih su utvrdili da je virus mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) raširen na području naše zemlje i da je vrlo vjerojatno kod nas rasprostranjen i virus mozaika cvjetače (cauliflower mosaic virus). U istom izvještaju se nalaze i podaci o svim dotadašnjim istraživanjima virusa krucifera u Jugoslaviji.

Od dana izlaska navedene publikacije pa do danas izvršili smo daljnja istraživanja o virozama krucifera. Prilikom toga nastavili smo s proučavanjem svojstava i rasprostranjenosti virusa mozaika postrne repe (u daljnjem tekstu VMPPR). Osim toga, dokazali smo da virus mozaika cvjetače (u daljnjem tekstu VMC) u našoj zemlji stvarno postoji. U posljednje vrijeme smo otkrili da je u Jugoslaviji raširen i virus žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus). Rezultate tih istraživanja ćemo saopćiti u ovom novom izvještaju.

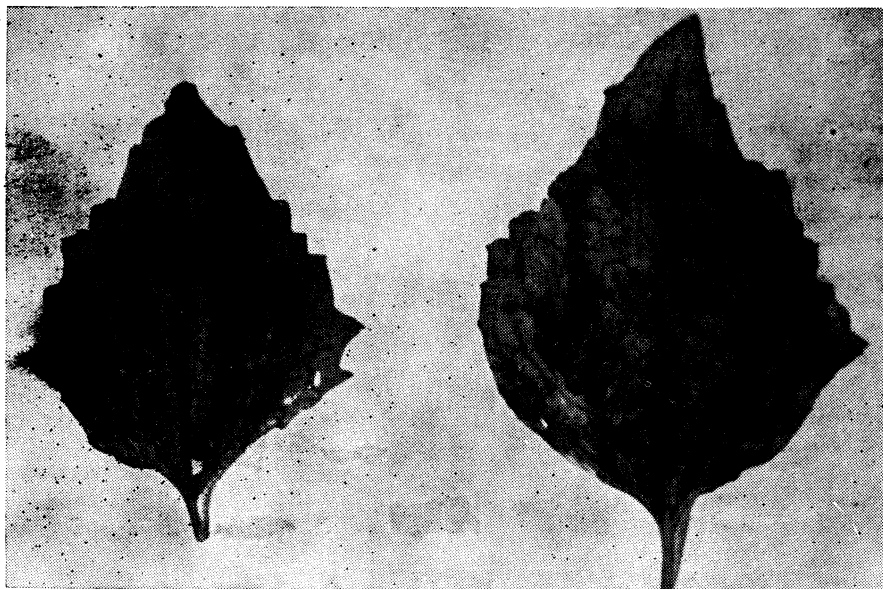
### VIRUS MOZAIČKE BOLESTI POSTRNE REPE

Ovaj virus je vjerojatno najrašireniji i gospodarski najvažniji virus krucifera u Jugoslaviji. Mi smo ga u više navrata nalazili na kupusu (*Brassica oleracea* var. *capitata*), češnjači (*Alliaria officinalis*) i ljubičini (*Matthiola incana*). Na listovima svih tih vrsta nastali su pod utjecajem virusa vrlo karakteristični simptomi (sl. 1 i 2; vidi i Miličić i dr. 1963, sl. 1). Iz takvih primjeraka s jasno izraženim simptomima bio je virus mehanički prenesen na veći broj test-biljaka, kao što su *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Brassica rapa* var. *rapifera*, *Chenopodium amaranticolor* i mnoge druge. Pri tom smo ustanovili da se na test-biljkama pojavljuju simptomi koji su svojstveni za VMPPR (Miličić i dr. 1963, 93; Štefanac-Uđbinac i dr. 1963.). Budući da neke test-biljke ponešto drukčije reagiraju na pojedine izolate (usp. tablicu 1), smatramo da izolati iz kupusa, ljubičine i češnjače predstavljaju razne sojeve VMPPR-a. Još se i danas ta tri ishodna izolata kultiviraju u stakleniku našeg laboratorija. Za održavanje virusa pokazale su se naročito podesne vrste *Brassica rapa* var. *rapifera* i *Petunia hybrida*.

### Sojevi virusa

Prvi soj, tj. soj iz kupusa, pronašli smo 1961. godine u okolici Splita, i to u nasadima koji su zapremali razmjerno malene površine. Prema usmenom saopćenju inž. Dejana Stakića (Pasterov zavod, Novi Sad) nasadi kupusa kod Futoga u okolici Novog Sada, gdje se ova kultura uzgaja na velikim

površinama, bili su 1964. god. do 30% inficirani sa VMPR. Kod oboljelih biljaka zapazili su se najčešće crni prstenovi na starijim, donjim listovima (vidi Miličić i dr. 1963, sl. 1).



Sl. 1. Šarenilo na listovima češnjače (*Alliaria officinalis*) inficirane virusom mozaika postrne repe (turnip mosaic virus).

Abb. 1. Scheckung auf den Blättern von *Alliaria officinalis*, die mit Kohlrübenmosaikvirus infiziert sind.

Drugi soj VMPR-a vrlo je obilno raširen na češnjači u okolici Zagreba gdje u nekim godinama 20—30% primjeraka ove vrste pokazuje jasne simptome oboljenja. Bolesni su primjerci vrlo upadljivi zbog intenzivnog šarenila na listovima (sl. 1). Prema Uschdraweitu i Valentinu (1957) ova je viroza na češnjači česta i na području Berlina, naročito u parkovima gdje se ponekad teško može pronaći zdrava biljka. I u drugim područjima Njemačke viroza je vrlo rasprostranjena (Bode i Brandes 1958). O dolaženju VMPR na češnjači u centralnim dijelovima ČSSR izvijestili su Brčák i Polák (1963).

Soj iz ljubičine se može lako prepoznati po simptomima na laticama cvjetova koje zbog pojave svijetlih pjega i pruga izgube normalno jednolično ružičasto ili ljubičasto obojenje (sl. 2). Ova je viroza osobito jako raširena u našim primorskim krajevima, u okolici Splita i Dubrovnika, gdje bolesnih primjeraka ima od 20 do 40%. Za vrijeme zimskih mjeseci ljubičine se donose u većim količinama na tržišta u unutrašnjosti Jugoslavije. Često se među zdravim primjercima nalaze i bolesne biljke sa šarenim cvjetovima koje imaju manju tržišnu vrijednost od zdravih primjeraka. Da VMPR napada ljubičinu postoje podaci iz Njemačke (Uschdraweit i Valentin 1957, Weil 1964), iz Italije (Lovisol 1960) i iz ČSSR (Brčák i Polák 1963). Prema tome, čini se da su ljubičine u Evropi često inficirane ovim virusom.

Navedena tri izolata, odnosno soja VMPR, mogu se razmjerno lako diferencirati pomoću test-biljaka. Štefančeva (1964) je ustanovila da se izolati iz češnjače i ljubičine razlikuju od izolata iz kupusa prvenstveno po tome što ta dva izolata ne prelaze na razne varijetete vrste *Brassica oleracea*. U pogledu razlike između sojeva iz češnjače i ljubičine, utvrdilo se da prvi soj inficira sistemski vrstu *Nicotiana glutinosa* dok drugi soj — bar za ljetnih mjeseci — izaziva obično samo lokalnu infekciju. Odnose ovih sojeva prema spomenutim test-biljkama vidimo na tabeli br. 1 (Štefanac i Miličić 1965).



Sl. 2. Ljubičina (*Matthiola incana*) sa šarenim cvjetovima inficirana virusom mozaika postrne repe.

Abb. 2. *Matthiola incana* mit bunten Blüten, die mit Kohlrübenmosaikvirus infiziert ist.

**Tabela br. 1 — Reakcija nekih test-biljaka na sojeve VMPR**

Soj iz vrste	T e s t - b i l j k a		
	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Nicotiana</i>	<i>Nicotiana</i>
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	S	L	S
<i>Alliaria officinalis</i>	—	L	S
<i>Matthiola incana</i>	—	L	L

S = sistemski infekcija, L = lokalna infekcija, — = ne prelazi

Okolnost da naš soj iz češnjače, te soj iz češnjače koji su proučavali Brčák i Polák, ne prelazi na vrstu *Brassica oleracea*, ne znači da češnjača ne može sadržavati i takve sojeve VMPR koji napadaju vrstu *Brassica oleracea*. Čak, štoviše, vrlo je vjerojatno da se u češnjači mogu nalaziti i takvi virusi. Na to ukazuju i odnosi sa sojevima VMPR u ljubičini. Tako npr. naš izolat iz ljubičine te izolati mnogih drugih istraživača ne prelaze na kupus; nasuprot tome Uschdraweit i Valentin (1957) su iz ljubičine izolirali soj VMPR koji je bio u stanju inficirati kupus. Prema tome, viroze češnjače i ljubičine mogu biti opasne ne samo za gorušicu, ozimu repicu, šeboj i druge gospodarski važne krstašice nego i za varijetete vrste *Brassica oleracea*.

#### Elementarna virusna čestica

U novije vrijeme Bode i Brandes (1958) su tačnije odredili oblik i veličinu VMPR. Virus ima oblik fleksibilne niti koja je duga oko 754 nm\*, a široka 12 do 13 nm (sl. 3). VMPR je, dakle, oko 2,5 puta duži od virusa mozaika duhana čija dužina iznosi 300 nm. S obzirom na dužinu VMPR se podudara s virusom mozaičke bolesti lubenice, Y-virusom krumpira, virusom žutog mozaika graha, virusom mozaičke bolesti kukuruza i dr. Ovi virusi imaju ne samo približno jednaku dužinu, nego su im slična i neka druga svojstva: svi se prenose lisnim ušima, imaju termalnu tačku inaktivacije kod otprilike 60°C, a u domadarima se nalaze u razmjerno maloj koncentraciji. Serološka istraživanja su pokazala da između svih tih virusa postoji daleka srodnost. Zbog mnogih zajedničkih osobina ovu grupu produženih virusa, čija dužina iznosi oko 750 nm, nazivamo skupina Y-virusa krumpira (Brandes 1964).

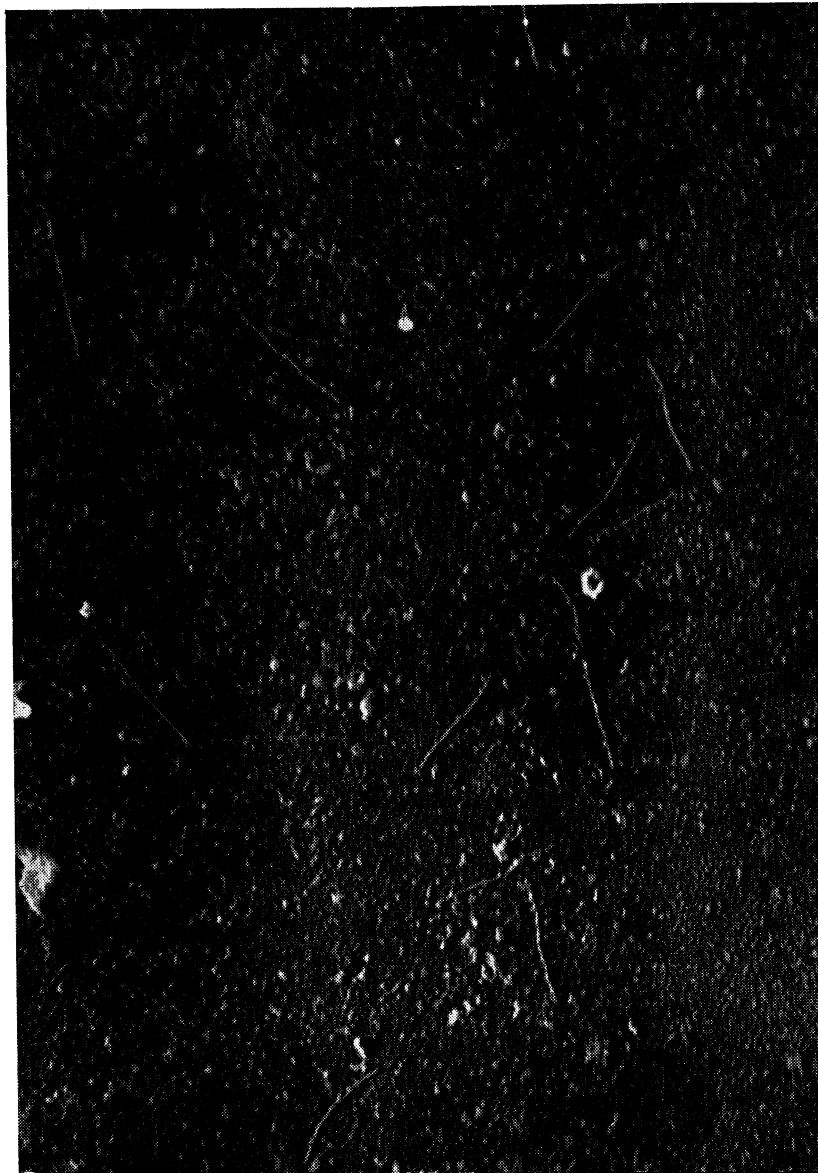
Da bi ustanovila da li se sojevi ljubičine i češnjače podudaraju po obliku i dužini s tipičnim izolatom iz kupusa, istražila je Štefančeva (1964) ove sojeve pomoću elektronskog mikroskopa. Preparati za istraživanje su priređeni pomoću metode uranjanja (Brandes 1957). Ta se jednostavna metoda sastoji u tome da se list oboljele biljke najprije prereže poprečno, a zatim ranjena površina lista uroni u kap vode koja se nalazi na predmetnici elektronskog mikroskopa. Nakon sušenja na zraku i sjenčenja preparat je spreman za promatranje. Da bi se izbjegle greške, redovno se na isti način prirede i kontrolni preparati od zdravih listova. Moramo napomenuti da je ova metoda vrlo podesna za istraživanje virusa, naročito produženih, zato što u soku zdravih biljaka nema dugih čestica koje bi bile nalik na produžene viruse. U elektronsko-mikroskopskim preparatima, koji su priređeni ovom metodom, Štefančeva je našla (1964) velik broj virusnih čestica čija je dužina iznosila oko 780 nm. Ta su se mjerenja dosta dobro podudarala s prije navedenim podacima iz literature o dužini drugih sojeva VMPR.

#### Serološka istraživanja

Za vrijeme boravka u Institutu za virusnu serologiju u Braunschweigu mali smo priliku sa serumom protiv virusnog soja iz češnjače ispitati sojeve VMPR iz Njemačke koje su nam ljubazno stavili na raspolaganje prof. dr R. Bercks i prof. dr O. Bode. Prilikom tih istraživanja dobili smo rezultate koje iznosimo na tabeli br. 2. Kako se vidi na tabeli, serum protiv našega soja iz

\* 1 nm (nanometar) =  $\frac{1}{1,000,000}$  mm

češnjače koji je imao homologni titar 1:256, reagirao je prilično snažno i s antigenima iz Brunschweiga i pri tom imao gotovo jednak titar. To znači da je naš soj dosta srodan s njemačkim sojevima.



Sl. 3. Elektronsko-mikroskopska snimka. Vidi se veći broj nitastnih čestica virusa mozaika postrne repe. Metoda uranjanja. Povećanje 24.000 ×.

Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme. Mehrere fadenartige Partikeln des Kohlrübenmosaikvirus sind sichtbar. Tauchmethode. Vergr. 24.000 mal.

**Tabela br. 2 — Serološke reakcije triju izolata VMPR iz Braunschweiga sa serumom protiv našega soja iz češnjače**

Antiserum	Antigen Tu jaki (Bode) razrjeđenja			Antigen Tu slabi (Bode) razrjeđenja			Antigen TVI (Bercks) razrjeđenja		
	1/2	1/5	1/25	1/2	1/5	1/25	1/2	1/5	1/25
	Soj iz vrste Alliaria officinalis (Štefanac)	128*	128	256	256	512	512	32	256

\* = recipročna vrijednost titra seruma

Najzad je Štefančeva (neobjavljeni podaci) nedavno priredila serume s titrom 1:1024 i 1:2048 protiv svih naših sojeva, dakle protiv soja iz kupusa, češnjače i ljubičine. Pomoću unakrsnih seroloških istraživanja ustanovila je da naši sojevi reagiraju pozitivno sa svim priređenim antiserumima, i to do dosta visokog stupnja razrjeđenja. Na osnovu toga možemo zaključiti da su tri istražena soja međusobno prilično srodna.

#### VIRUS MOZAIČKE BOLESTI CVJETAČE

U već spomenutom radu opisali su Miličić, Štefanac-Uđbinac i Mamula (1963) nalaz ovog virusa u cvjetačama na području Splita. Međutim, u to vrijeme virus još nije bio sigurno identificiran. Tek kasnije su Mamula, Wrischer i Miličić (1966) iznijeli podatke o istraživanjima toga virusa na osnovu kojih se moglo već sigurno zaključiti da se radi o VMC. Ovdje ćemo prikazati posebno simptomatologiju ovog oboljenja, rezultate istraživanja postojanosti virusa, elektronsko-mikroskopska istraživanja elementarne virusne čestice i dr.

#### Simptomi na domadarima

U već citiranim radovima, naročito u posljednjem, može se naći najvažnija literatura o VMC. Kako se iz priručnika Klinkowskoga (1958) može saznati, prvi simptom koji VMC izaziva na cvjetači jest prosvjetljivanje nerava. Simptom nije jako izražen, a očituje se obično najprije na bazi plojke pa se odatle širi i na ostale njene dijelove. Kasnije nervi postaju žuti, a granica prema okolnom tkivu dosta oštra. Pojavljuju se i veće klorotične šare na plojci s malenim nekrotičnim pjegama. Ako prosvjetljivanje zahvati samo jednu stranu plojke središnje se rebro savije u stranu. Obole li biljke u ranim razvojnim stadijima često izostane stvaranje »glave« cvjetače pa su zbog toga gubici često vrlo veliki. I kod zaraženih biljaka, koje su određene za produkciju sjemena, prinosi su znatno manji nego kod zdravih egzemplara.

Na kupusu VMC prouzrokuje nekrotične pjege koje nastaju i na vanjskim i na unutarnjim listovima, ali obično ne na svima. Pored toga često otpadaju vanjski listovi.

Ovaj je virus u našem laboratoriju proučavao Mamula (1966) i ustanovio da prilično karakteristično reagiraju vrste. *Sinapis alba*, *S. arvensis* (sl. 4), *Brassica rapa* var. *rapifera* i *B. perviridis*. Prilikom infekcije s ovim virusom nastaju osobito velike promjene na mladim listovima koji se razvijaju poslije inokulacije. Oni su mnogo manji od zdravih listova, epinastički se savijaju, naboraju i djelomično nekrotiziraju. Osim toga, kod vrsta *Sinapis* znatno se skrate i internodiji između vršnih listova tako da se u vršnom dijelu obrazuje kržljava rozeta koja se sastoji od većeg broja deformiranih listo-



Sl. 4. *Sinapis arvensis*. Lijevo zdrava biljka, desno biljka inficirana mozaikom cvjetače (cauliflower mosaic virus). Vršni su listovi inficirane biljke zakržljali i epinastički savijeni.

Abb. 4. *Sinapis arvensis*. Links gesunde Pflanze; rechts Pflanze, die mit Blumenkohlmosaikvirus infiziert ist. Die oberen Blätter der infizierten Pflanze sind verkümmert und epinastisch gebogen.

va (sl. 4). Kod vrsta *Brassica rapa* i *B. perviridis*, kod kojih svi listovi u vegetativnoj fazi tvore prizemnu rozetu, zapaža se naročito oštro razlika između donjih listova rozete, koji su se razvili prije infekcije i koji stoga imaju normalnu veličinu, i gornjih listova rozete koji su vrlo kratki, nabrani, deformirani i savijeni.

Što se tiče drugih simptoma kod različitih krucifera, moramo spomenuti da se ponekad stvaraju lezije na inokuliranim listovima. Dosada smo zapazili takve lezije samo na vrstama *Sinapis arvensis*, *Sisymbrium officinale*, *Brassica chinensis*, *B. oleracea*, *B. rapa* var. *rapifera*, *B. napus* var. *napobrassica* i *Eruca sativa*, ali ni kod ovih vrsta ne nastaju redovito. Kao prvi simptom sistemične infekcije pokatkad se umjesto prosvjetljivanja nerva ili usporedno s prosvjetljivanjem pojavljuju klorične pjege veličine 2—4 mm (sl. 4). Ova

dva simptoma se mogu zajedno pojaviti na istim listovima ili mogu prethoditi jedan drugome. Treba istaknuti da je prosvjetljivanje nerava mnogo češći simptom od klorotičnih pjega.

Tek poslije tih prvih simptoma dolazi do kržljavljenja, deformacija i savijanja vršnih listova. Često se kao kasniji simptom sistemske infekcije obrazuju i vrpčasti nervi (vein-banding) koji su dosta karakteristični simptom za VMC.

### **Krug domadara**

VMC se odlikuje još jednom osobitošću, tj. karakterističnim krugom svojih domadara. Ovaj virus je vezan samo za porodicu krstašica tako da ne prelazi ni na jednu vrstu iz drugih biljnih porodica. Mamula je (1966) ispitao 23 vrste iz raznih drugih porodica, ali nijednu od njih nije uspio inficirati ovim virusom.

### **Intracelularne inkluzije**

Karakteristično je za VMC da stvara intracelularne inkluzije amornog karaktera, dakle X-tijela. Inkluzije se odlikuju homogenom građom i dosta čvrstom konzistencijom. Tim se dosta oštro razlikuju od intracelularnih inkluzija VMPR koje su redovno zrnaste strukture i više tekućeg karaktera. Zbog tih svojstava inkluzije VMC mnogo jače lome svjetlo nego inkluzije VMPR tako da prve veoma nalikuju na masna tijela. Osim toga se prve boje Lugolovom otopinom vrlo intenzivno crvenosmeđe. Uslijed toga se amorfne inkluzije ovih dviju viroza mogu poslije izvjesne vježbe lako jedne od drugih razlikovati. Moramo napomenuti da inkluzije VMC imaju uvijek amorfni karakter dok VMPR stvara pored amornih još i kristalična tijela.

### **Elementarna virusna čestica**

Tek je nedavno VMC izoliran iz svojih domadara i dobiven u posve čistom stanju (Pirone, Pound i Shepherd 1960; Day i Venables 1960). Pri tom se ustanovilo da se virus u domadarima nalazi u vrlo niskoj koncentraciji od svega 4 mg/l. To je malena vrijednost ako se usporedi s koncentracijom virusa mozaika duhana koja iznosi u duhanu 2 g/l ili virusa žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) koja doseže izuzetno čak 4 g/l.

Spomenuti autori uspjeli su po prvi put snimiti VMC u elektronskom mikroskopu i utvrditi da su čestice »sferične« s promjerom od 50 nm. Povodeći se za metodom Pironea, Pounda i Shepherd, Mamula, Wrischer i Miličić su više puta izvršili djelomičnu purifikaciju VMC (sl. 5). Prilikom snimanja elementarnih čestica poslije sušenja na zraku konstatirali su da se čestice jako spljošte; zbog toga su dobivali opetovano prilikom mjerenja promjera čestica veće vrijednosti od 50 nm. Tek kad se virusna suspenzija neposredno poslije purifikacije fiksirala otopinom 1 %-nog formaldehida nije dolazilo do deformacija čestica, pa su mjerenja dala rezultate koji su se podudarali s podacima navedenih američkih i australskih istraživača.



Interesantno je da se VMC s obzirom na veličinu elementarne čestice znatno udaljuje od mnogih drugih biljnih virusa »sferičnog« oblika. Čestice gotovo svih ostalih »sferičnih« virusa imaju dijametar oko 30 nm. Vrlo je vjerojatno da čestica VMC ima — kao i čestice drugih sličnih virusa — poliedrični oblik i da se sastoji od dva dijela, i to od proteinskog omotača i od ribonukleinske kiseline. Proteinska komponenta sadrži velik broj okruglih proteinskih podjedinica koje okružuju ribonukleinsku kiselinu smještenu u centru čestice.

### Fizikalna svojstva

VMC je termostabilan virus kojemu termalna tačka inaktivacije leži kod 75°C. Za razliku od toga postojanost infektivnog biljnog soka *in vitro* nije tako velika jer sok već poslije pet dana gubi infektivnost kod sobne temperature. Zanimljivo je da je virus mnogo otporniji u isušenom stanju. Tako npr. osušeni listovi po metodi McKinneya (1947) zadrže svoju infektivnost preko 23 mjeseca ako se drže u hladnjaku kod niske temperature. Isto tako i listovi sušeni na sobnoj temperaturi zadrže infektivnost preko sedam mjeseci.

### VIRUS ŽUTOG MOZAIKA POSTRNE REPE

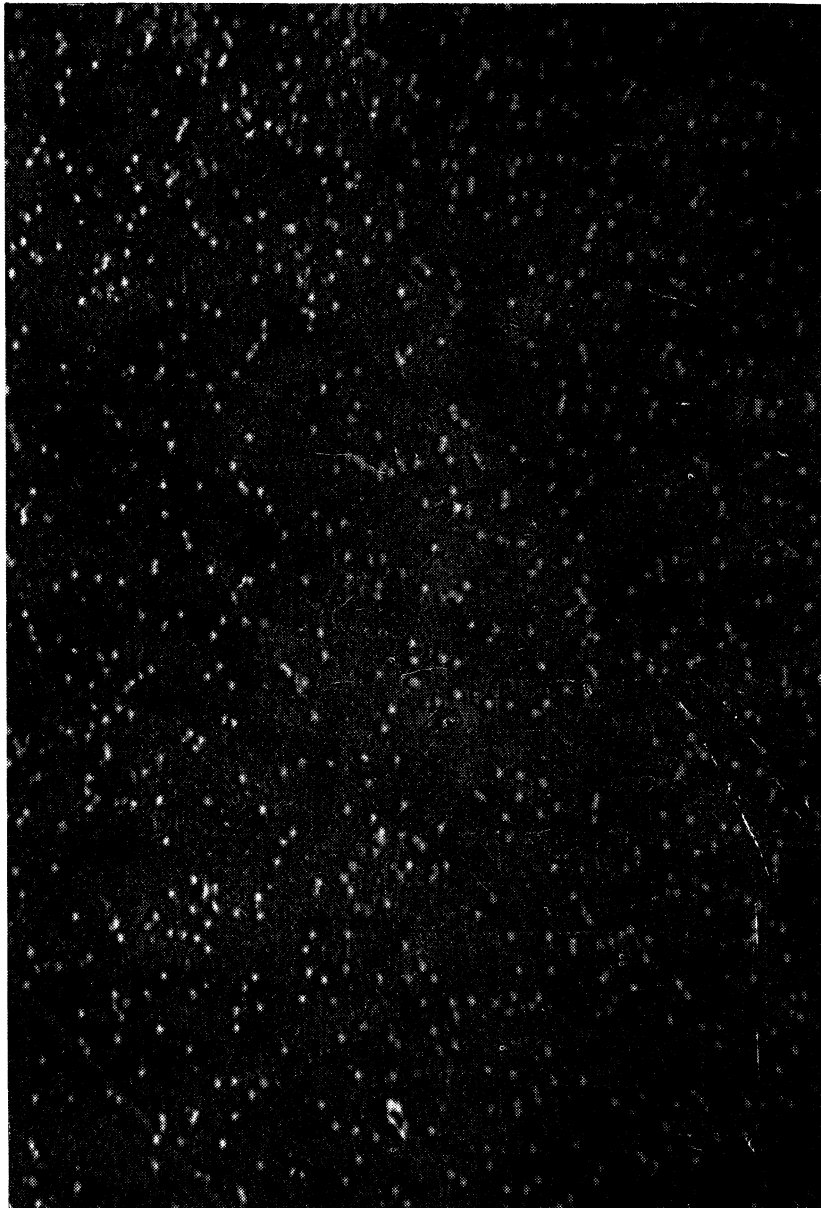
Godine 1965. pronašao je N. Juretić kod mjesta Žalec u Sloveniji virusno bolesne primjerke vrste *Brassica rapa* var. *silvestris*. Bolesni egzemplari su rasli u nasadima hmelja. Iz tih primjeraka je izoliran virus koji je u toku istraživanja identificiran kao virus žutog mozaika postrne repe (u daljnjem tekstu VZMPR). To je prvi put da je ovaj virus pronađen na teritoriju Jugoslavije.

### Simptomi na domadarima

Na primjercima vrste *Brassica rapa* var. *silvestris* su se zapažale dosta istaknute žutozelene šare. Iz tih ishodnih primjeraka prenijeli smo virus mehaničkom inokulacijom uz pomoć karborunda na slijedeće krstašice:

*Brassica chinensis* L.,  
*Brassica napus* L. var. *napobrassica* (L.) Rehb.,  
*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L., sorta varaždinsko zelje,  
*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L. f. *violacea*,  
*Brassica perviridis* Bailey,  
*Brassica rapa* L. var. *rapifera* Metzg.,  
*Eruca sativa* Mill.,  
*Raphanus sativus* L.,  
*Sinapis alba* L.,  
*Sinapis arvensis* L.,  
*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.

Na svim ovim vrstama nakon isteka inkubacijskog vremena nastali su jasni simptomi oboljenja. Vrlo su se često kao prvi simptom pojavljivale lezije klorotičnog karaktera na inokuliranim listovima. Lokalne lezije su bile naročito brojne u vrste *Raphanus sativus*, ali su nastajale i na vrstama *Bras-*



Sl. 5. Elektronskomikroskopska snimka virusa mozaika cvjetače. Vidi se vrlo velik broj »okruglih« virusnih čestica. Djelomično purificirani preparat. Povećanje 24.000 puta.

Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Blumenkohlmosaikvirus. Grosse Anzahl von »sphärischen« Viruspartikeln ist sichtbar. Teilweise purifiziertes Präparat. Vergr. 24.000mal.

sica chinensis, *B. perviridis* i *B. rapa* var. *rapifera*. Na mladim listovima kao prvi znak sistemične infekcije dolazilo je na mnogim vrstama *Brassica* do prosvjetljivanja nerava. Nekoliko dana poslije toga posve razvijeni listovi pokazivali su većinom intenzivne simptome u obliku mozaika (sl. 6b), šarenila ili vrpčastog mozaika (sl. 6a). Karakteristično je da su pri tom svjetlije obojeni dijelovi plojke poprimali često žutu boju, ponekad čak bijelu. Zbog tih izrazito žutih područja dobila je ova viroza naziv »žutog« mozaika. Osim navedenih simptoma mogli smo još zapaziti i pojavu vrpčastih nerava (vein-banding) i to naročito često na vrsti *Raphanus sativus*.



Sl. 6. a postrna repa (*Brassica rapa* var. *rapifera*), b *Brassica perviridis*. Mozaik na listovima. Infekcija s virusom žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus).

Abb. 6. a *Brassica rapa* var. *rapifera*, b *Brassica perviridis*. Mozaik auf den Blättern. Infiziert mit Wasserrübelgelbmosaikvirus.

Kao test-biljke za ovaj virus često se navode *Brassica chinensis* i *B. rapa* var. *rapifera*. I mi smo ustanovili da na ovim dvjema vrstama dolazi do naročito jake reakcije pri čemu se pojedina područja lista intenzivno žuto oboje što je karakteristično za ovu virozu. Vrsta *Brassica perviridis* isto je dobro reagirala pa se i ona također može upotrijebiti kao test-biljka za identifikaciju VŽMPR. Na listovima ove vrste nastaje intenzivni žuti mozaik ili žuto šarenilo (sl. 6b).

### Intracelularne promjene

Interesantne su i unutrašnje promjene koje nastaju kod raznih domadara VŽMPR. Već je Rubio (1956) utvrdio da pod utjecajem ovog virusa dolazi do anomalija u unutrašnjosti stanice koje zahvaćaju plastide. Prema ovom autoru plastidi se međusobno spajaju stvarajući intracelularne inkluzije. Usporedno sa stapanjem plastidi se razgrađuju tako da se na kraju procesa potpuno raspadnu što dovodi do formiranja granularnih i vakuoliziranih inkluzija.

Za vrijeme ovih istraživanja mogli smo uglavnom potvrditi zapažanja Rubia (1956). Stvarno se pod utjecajem VŽMPR mijenjaju plastidi. Prvi znak alteracije plastita je njihova vakuolizacija koja se naročito dobro vidi kod kloroplasta, jer se u zelenim plastidima obrazuju bezbojne vakuole. Vakuole mogu nastati u sredini kloroplasta pa je tada središnji dio plastida bezbojan, dok zelena plastidska masa okružuje poput prstena bezbojni centar plastida. Ako vakuola nastane na rubu, tada često preostane sa jedne strane plastida tanka, jedva vidljiva opna koja dijeli plastid od citoplazme, a sa druge se strane nalazi glavni dio plastida. Takvi plastidi imaju oblik polumjeseca. Vakuolizirani plastidi se mogu lako pronaći u mezofilu u raznim stadijima razvitka bolesti i u raznim domadarima. Vakuolizacija zahvaća ne samo intenzivno pigmentirane kloroplaste iz mezofila, nego i blijede kloroplaste iz epidermskih stanica. Mi smo istražili plastide od deset navedenih krstašica, koje smo inficirali sa VŽMPR, i u svim tim vrstama lako smo mogli pronaći vakuolizirane plastide. Čini se, prema tome, da je vakuoliziranje plastida vrlo karakteristična pojava za VŽMPR jer pod utjecajem drugih virusa krstašica, kao što su VMPR i VMC, ne dolazi do te pojave.

Vakuolizirani plastidi pokazuju tendenciju da se međusobno stope u veće mase koje se nakon spajanja vladaju kao jedinstvena tijela. Citoplazmatska strujanja nose ova tijela po stanici tako da ona mogu dospjeti u razne njene dijelove. Ipak se tijela najčešće nalaze uz jezgru, vjerojatno zato što su prema jezgri usmjerena strujanja citoplazme i što se i sami plastidi zdravih biljaka često nalaze u tom položaju. U ovim nakupinama vakuoliziranih plastida često se još može zapaziti klorofil tako da su nakupine mjestimično zelene obojene. Ponekad je zelena boja ovih agregata djelomično razgrađenih plastida — naročito u mezofilu — dosta dobro sačuvana.

Da bismo što sigurnije identificirali naš izolat iz Slovenije, nabavili smo dva soja VŽMPR, i to jedan iz Njemačke dobrotom prof. dr R. Bercksa (Braunschweig), a drugi iz Škotske dobrotom dr C. H. Cadmana (Invergowrie, Dundee). Simptomi, koje su ovi virusi prouzrokovali na raznim kruciferama, dobro su se podudarali sa simptomima našeg izolata. To naročito vrijedi za virus iz Škotske koji je na vrstama Brassica rapa var. rapifera i B. perviridis izazvao intenzivno žute šare i mozaik. Te su promjene bile vrlo slične onima koje je uzrokovao naš virus. Osim toga su u svim biljkama, na koje smo prenijeli viruse iz Škotske i Njemačke, nastajale i karakteristične promjene u plastidima, tj. vakuolizacija i međusobno stapanje plastida.

### Elementarna virusna čestica

Ovaj virus bio je do sada vrlo često predmet istraživanja. Kako je vrlo stabilan i jer se lako može dobiti u kristaličnom stanju, postao je VŽMPR modelni objekt za biokemijska i serološka istraživanja virusa. Njegova je elementarna čestica poliedrična s dijametrom oko 28 nm u vlažnom stanju (Markham 1959). I ovaj se virus sastoji samo od dvije komponente, i to od proteina i ribonukleinske kiseline. Proteinska se komponenta nalazi na površini virusne čestice, a sadrži oko 60 sferičnih podjedinica. U unutrašnjosti čestice je smještena ribonukleinska kiselina koja čini 37% od ukupne težine čestice.

Da naš virus ima stvarno poliedričnu česticu, dokazali smo elektronsko-mikroskopskim istraživanjima. Pri tom smo upotrebili Brandesovu (1957) metodu uranjanja kojom smo istražili i inficirane i kontrolne zdrave biljke. Ustanovili smo da se u inficiranim biljkama nalazi velik broj jednolično velikih »sferičnih« čestica. U kontrolnom soku iz zdravih biljaka nije bilo takvih čestica.

### Serološka istraživanja

Ljubaznošću dr C. H. Cadmana dobili smo iz Škotske i serum protiv VŽMPR koji nam je također trebao poslužiti u svrhu identifikacije našeg izolata. Da bismo prilikom izvođenja serološke reakcije dobili što pouzdaniji rezultat, izvršili smo djelomičnu purifikaciju našeg i škotskog virusa po metodi Markhama (1959). Prema toj metodi infektivni se sok najprije obradi 90%-tnim etanolom koji obara normalne bjelančevine dok virus ostaje u otopini; zatim se virus taloži pomoću otopine amonijeva sulfata. Ovako pročišćene antigene upotrijebili smo za serološke reakcije koje smo izveli na dva načina, i to na predmetnom stakalcu (»kapljični test«) i imunodifuzijom u agar-gelu. Reakcije smo izvršili i sa koncentriranim antigenom i s antigenom razrijeđenim destiliranom vodom u omjeru 1:5. Rezultati ovih istraživanja su prikazani na tabeli br. 3.

Tabela br. 3 — Rezultati seroloških istraživanja izolata VŽMPR

Antiserum	Antigen		Antigen	
	VŽMPR (Škotska) Konc	1/5	Izolat iz Jugoslavije Konc.	1/5
VŽMPR (Škotska)	64*	64	64	64

Kako se vidi na tabeli, naš je izolat pozitivno reagirao sa serumom protiv VŽMPR, i to s istim titrom kao i izolat VŽMPR iz Škotske. Na osnovi toga može se sigurno zaključiti da naš izolat pripada VŽMPR.

\* = recipročna vrijednost titra seruma

## OSVRT

Iz dosadašnjih istraživanja virusa krucifera u Jugoslaviji proizlazi da su u našoj zemlji rasprostranjena tri gospodarski najvažnija virusa krucifera, i to: VMPR, VMC i VŽMPR. U ovom je radu po prvi put objavljeno da je VŽMPR raširen u Jugoslaviji. Kako proizlazi iz podataka u priručniku Klin-kowskoga (1958), ovaj virus postoji i u Engleskoj, Danskoj, Njemačkoj, Fran-cuskoj i Portugalu. Prema Markhamu (1959) VŽMPR izaziva teška oboljenja postrne repe, cvjetače i drugih krucifera koje imaju gospodarsko značenje.

Ova tri virusa mogu se donekle razlikovati već po simptomima koje izaziva-ju na krstašicama, npr. na postrnoj repi. Tako npr. VMPR uzrokuje na po-strnoj repi mozaik, šarenilo i često pojavu vrpčastih nerava; osim toga listovi su nabrani, a biljke zaostanu u rastu za zdravim egzemplarima. Za razliku od toga VMC izazove naglo smanjenje listova koji se razvijaju poslije infekcije ta-ko da su mladi listovi mnogo manji od starijih. Osim toga, mladi listovi su nabrani, epinastički savijeni i djelomično nekrotizirani. Ako je biljka rano in-ficirana, i ako su se simptomi ispoljili prije prelaska u reproduktivnu fazu, svi se listovi nalaze u prizemnoj rozeti, i to donji stariji listovi koji su dosta veliki, i gornji mladi listovi koji su jako zakržljali i deformirani. Moramo na-pomenuti da i pod utjecajem VMPR i VMC postrna repa može uginuti. Treći virus krucifera, tj. VŽMPR, oštro se razlikuje od prvih dvaju virusa po tome što su deformacije listova postrne repe mnogo manje izražene, a na listovima nastaju intenzivno žute pjege i šare zbog kojih je virus zaslužio pridjevak »žuti«.

**Tabela br. 4 — Neke karakteristike triju virusa krucifera**

Svojstva	VMPR	VMC	VŽMPR
Krug domadara	Cruciferae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Caryo-phyllaceae itd.	Cruciferae	Cruciferae, Capparida-ceae ( <i>Cleome spinosa</i> ), Resedaceae ( <i>Reseda odo-rata</i> )
Oblik i veličina virusne čestice	Fleksibilna nit duga 750 m $\mu$ a široka 12–13 nm	Poliedrična čestica s di-jametrom oko 50 nm	Poliedrična čestica s dija-metrom oko 28 nm
Inkubacija	Oko 10 dana	20 do 30 dana	Oko 10 dana
Termalna tačka inaktivacije	56 do 65°C	70 do 80°C	70 do 80°C
Intracelularne promjene	X-tijela zrnaste građe koja slabo lome svjetlo; kod krstašica i kristali-čne iglice	X-tijela homogene gra-đe koja jako lome svjet-lo; nema kristaličnih iglica	Vakuoliziranje plastida i spajanje više plastida u jedinствена tijela

Kako se vidi na tabeli br. 4 ova se tri virusa razlikuju i po krugu svojih domadara. Dok je VMC vezan isključivo za porodicu krucifera, VŽMPR pre-lazi još i na vrste koje pripadaju drugim porodicama i to: na *Cleome spinosa* i *Reseda odorata*. Za razliku od tih virusa VMPR ima velik broj domadara me-đu vrstama iz drugih biljnih porodica. Jasna razlika postoji među njima i s obzirom na oblik i veličinu elementarne virusne čestice te s obzirom na pro-mjene koje izazivaju u stanicama domadara.

Osim toga, ove se viroze prenose raznim vektorima. Tako se npr. i VMPR i VMC mogu prenijeti pomoću vrste *Myzus persicae* dok VŽMPR većinom nije moguće prenijeti pomoću ove lisne uši. Jedan od najpoznatijih vektora VŽMPR je kornjaš *Phyllotreta*.

U pogledu zaštite kultura krucifera od navedenih virusa, moramo istaknuti da je potrebno sačuvati od infekcije naročito biljke u klijalštima jer su štete mnogo veće ako obole mlade biljke. Budući da se sva tri virusa prenose insektima, korisno je u klijalštima suzbijati insekte. I uništavanje korova, naročito korova koji pripadaju porodici krstašica u kojima ovi virusi prezimljuju, predstavlja često vrlo korisnu mjeru. Budući da mogu prezimiti i u sjemenjacima, moraju se takve biljke uzgajati oko 2 km daleko od područja glavne kulture.

### ZAKLJUČAK

Na području Jugoslavije rasprostranjena su tri različita soja virusa mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) koji su izolirani iz kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*), češnjače (*Alliaria officinalis*) i ljubičine (*Matthiola incana*). Ta se tri soja mogu lako razlikovati na osnovi vladanja prema test-biljkama *Brassica oleracea*, *Nicotiana tabacum* i *N. glutinosa*. Jedan od tri spomenuta soja, i to soj iz ljubičine, smatrao se dugo vremena posebnom virusnom vrstom. Da ipak sva tri soja pripadaju jednoj te istoj virusnoj vrsti, proizlazi iz činjenice što imaju sličan krug domadara, što imaju elementarnu česticu jednake dužine (oko 750 nm) i širine (12 do 13 nm) što se podudaraju s obzirom na fizikalna svojstva, što stvaraju vrlo slične ili jednake amorfne i kristalinične intracelularne inkluzije i što njihovi antiserumi pozitivno reagiraju prilikom unakrsnih reakcija sa svim sojevima.

U primorskim područjima Jugoslavije dosta je čest virus mozaika cvjetače (cauliflower mosaic virus) za koga je karakteristično da je vezan za porodicu krstašica. Ovaj virus, koji kod nas izaziva velike gubitke u kulturama cvjetače, ima poliedričnu elementarnu česticu s dijametrom oko 50 nm. U stanicama njegovih domadara obrazuju se amorfne inkluzije, tzv. X-tijela, koja imaju homogenu strukturu i ističu se jakim lomom svjetla.

U ovom je radu po prvi put objavljeno da je u Jugoslaviji pronađen i virus žutog mozaika postrne repe (turnip yellow mosaic virus) koji također u mnogim zemljama uzrokuje velike gubitke u kulturama krucifera. Virus je pronađen u mjestu Žalec u Sloveniji. I ovaj virus ima poliedričnu česticu, ali njen dijametar iznosi samo 28 nm. Karakteristično je za nj da izaziva vakuoliziranje kloroplasta i međusobno spajanje odnosno sljepljivanje ovih plastida. Vjerojatno su promjene u plastidima uzrok tome što neki njegovi domadari, kao npr. *Brassica rapa* var. *rapifera*, *B. chinensis* i *B. perviridis*, imaju intenzivno žuto obojene dijelove listova po kojima je virus dobio pridjevak »žuti«.

## NEUE ANGABEN ÜBER DIE KRUIZIFEREN-VIREN IN JUGOSLAWIEN

### Zusammenfassung

Von

**Dorđe Mamula, Nikola Juretić, Dr. Mercedes Wrischer, Dr.  
Zvonimir Devidé und Dr. Davor Miličić**

**Botanisches Institut der Universität und Institut »Ruđer  
Bošković« Zagreb**

In Jugoslawien gibt es drei Stämme von Kohlrübenmosaikvirus (turnip mosaic virus), die stark verbreitet sind und die die Verfasser vom Weisskohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*), vom Knoblauchkraut (*Alliaria officinalis*) und von der Levkoje (*Matthiola incana*) isoliert haben. Diese Stämme können auf Grund ihrer Verhalten gegenüber den Testpflanzen *Brassica oleracea*, *Nicotiana tabacum* und *N. glutinosa* voneinander leicht unterschieden werden. Der von der Levkoje gewonnene Stamm wurde lange Zeit als eine besondere Virusart (Buntstreifigkeit-Virus der Levkoje, *Matthiola virus 1*) gehalten. Die Zugehörigkeit aller drei Stämme dem Kohlrübenmosaik-Virus beweisen folgende Tatsachen: sie haben gleich grosse Viruspartikeln (Länge um 750 nm Breite 12 bis 13 nm); ihre physikalischen Eigenschaften stimmen überein; sie verursachen ähnliche oder gleiche amorphe und kristalline Zelleinschlüsse; und ihre Antiseren geben in Überkreuzungsreaktionen mit allen drei Stämmen die gleichen positiven Ergebnisse.

In den Küstengebieten Jugoslawiens ist das Blumenkohlmosaik-Virus (*cauliflower mosaic virus*) ziemlich stark verbreitet, das nur Angehörige der Familie *Cruciferae* befallen kann. Dieses Virus, das in den Kruziferenkulturen grosse Verluste verursachen kann, hat polyedrische Elementarpartikeln mit einem Durchmesser von 50 nm. In den Zellen seiner Wirtspflanzen bildet es amorphe Zelleinschlüsse, sog. X-Körper, die sich durch optische Homogenität und einen hohen Lichtbrechungsindex auszeichnen.

Schliesslich wurde in der vorliegenden Mitteilung zum ersten Mal festgestellt, daß in Jugoslawien auch das Wasserrübelgelbmosaik-Virus (*turnip yellow mosaic virus*) vorkommt. Dieses Virus, das bekanntlich in vielen Ländern beträchtliche Verluste in den Kruziferenkulturen hervorruft, wurde in Slowenien unweit des Ortes Žalec festgestellt. Es besitzt polyedrische Teilchen mit einem Durchmesser von 28 nm. Für dieses Virus ist es charakteristisch, dass es eine Vakuolisierung von Plastiden und nachher eine Verklebung von mehreren Plastiden zu einheitlichen Körpern verursacht. Wahrscheinlich sind diese Plastidenveränderungen die Ursache, dass verschiedene Testpflanzen dieses Virus, wie z. B. *Brassica rapa* var. *rapifera*, *B. chinensis* und *B. perviridis*, intensiv gelb gefärbte Blatteile besitzen, nach denen das Virus den Namen »Gelbmosaikvirus« bekommen hat. Dass es sich im vorliegenden Fall wirklich um das Wasserrübelgelbmosaik-Virus handelt, wurde nicht nur auf Grund symptomatologischer, sondern auch auf Grund serologischer Untersuchungen geschlossen, die mit einem von Dr. C. H. Cadman (Invergowrie, Dundee, Schottland) liebenswürdigerweise übersendeten Antiserum ausgeführt wurden (vgl. Tabelle 3).



## LITERATURA

1. Bode, O., und J. Brandes, 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kohlrübenmosaik-Virus (turnip mosaic virus). *Phytopath. Z.* 34, 103—106.
2. Brandes, J., 1957: Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffelfeldunkelkeimen. *Nachrichtenbl. dtsh. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig)* 9, 151—152.
3. Brčák, J., and Z. Polák, 1963: Identification of the virus responsible for the mosaic disease of *Alliaria officinalis* Andr. in Central Bohemia. *Preslia* 35, 110—117.
4. Day, M. F., and D. G. Venables, 1960: Purification of cauliflower mosaic virus. *Virology* 11, 502—505.
5. Klinkowski, M., 1958: *Pflanzliche Virologie*. Akademie-Verlag, Berlin.
6. Lovisolo, O., 1960: Segnalazione di una nuova virosi della *Moricandia arvensis* ed osservazioni su altre virosi di piante ornamentali. *Not. Malattie Piante* 53—54, 233—253.
7. Mamula, Đ., Mercedes Wrischer i D. Miličić, 1966: Virus mozaičke bolesti cvjetače (*Marmor cruciferarum* H.) u Jugoslaviji. »Zaštita bilja« (u štampi).
8. Mamula, Đ., 1966: Istraživanje svojstava virusa mozaika cvjetače (*Marmor cruciferarum* H.). Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
9. Markham, R., 1959: The biochemistry of plant viruses. U knjizi: F. M. Burnet and W. M. Stanley, *The viruses*. Vol. 2. Academic Press, New York — London.
10. McKinney, H. H., 1947: Stability of labile viruses in dessicated tissue. *Phytopathology* 37, 139—142.
11. Miličić, D., Z. Štefanac-Uđbinac i Đ. Mamula, 1963: Rasprostranjenost nekih virusa krucifera u Jugoslaviji. »Agronomski glasnik« 13, 92—100.
12. Pirone, T. P., G. S. Pound and R. J. Shepherd, 1960: Purification and properties of cauliflower mosaic virus. *Nature* 186, 656—657.
13. Rubio, M., 1956: Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopathology* 46, 553—556.
14. Štefanac, Z., 1964: Prilog poznavanju virusa mozaika postrne repe (*Marmor brassicae* Holmes). Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
15. Štefanac, Z., und D. Miličić, 1965: Zelleinschlüsse des Kohlrübenmosaikvirus. *Phytopath. Z.* 52, 349—362.
16. Štefanac-Uđbinac, Z., D. Miličić i M. Zeljko, 1963: Virus mozaika postrne repe (turnip mosaic virus) u Jugoslaviji. *Acta bot. Croatica* 22, 107—117.
17. Uschdraweit, H. A., und H. Valentin, 1957: Untersuchungen über ein Kruziferen-Virus. *Phytopath. Z.* 31, 139—148.
18. Weil, B., 1964: Beobachtungen zur Virusausbreitung im Freiland. *Z. Pflanzenkrankh.* 71, 302—310.