

Dr Ana Šarić, inž. B. Cvjetković i inž. I. Butorac,
Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Zagrebu

PRIMJENA SEROLOŠKOG TESTA U ISTRAŽIVANJU VIRUSA IŠARANOSTI KARANFILA

U V O D

Između virusa koji su dosad izolirani iz karanfila, za uzgajivače su posebno važni oni, koji ne izazivaju vidljive simptome na biljci, ali smanjuju proizvodnju cvjetova i reznica a nepovoljno utječu i na oživljavanje reznica. Najrasprostranjeniji virus karanfila, virus išaranosti karanfila, VIK, (Carnation mottle virus, CarMV) manifestira se vrlo slabim simptomima, kao jedva primjetni difuzni mozaik, uglavnom na prvim listovima. Dok se biljke zaražene virusima koji se očituju dobro vidljivim simptomima mogu lako uočiti i odstraniti iz uzgoja, one zaražene virusom išaranosti karanfila zbog prividno zdravog izgleda, ostaju u uzgoju, od njih se uzimaju reznice i tako se virus dalje širi. Osim ovoga, velikoj rasprostranjenosti pridonose i sama svojstva tog virusa. VIK je vrlo stabilan virus koji se nalazi u visokoj koncentraciji u biljci; u soku inokulirane test biljke *Chenopodium quinoa* krajnja točka razrjeđenja iznosi 10^{-7} do 10^{-8} , točka termalne inaktivacije 85°C do 90°C , u sasušenom lisnom tkivu čuvanom na 4°C zadržava infektivnost više od tri godine, a u soku pri sobnoj temperaturi oko 50 dana. (3, 5, 6, 8, 13)

Budući da VIK smanjuje produktivnu sposobnost biljke, od velike je važnosti da matične biljke od kojih se uzimaju reznice ne budu zaražene tim virusom. Obzirom da simptomi zaraze nisu vidljivi, potrebno je matične biljke testirati tj. provjeriti uobičajenim sereološkim i biološkim testovima njihovo zdravstveno stanje. (1, 2, 11, 12)

Posljednjih godina u nas se znatno proširio komercijalni uzgoj karanfila u staklenicima. Sadni materijal se uvozi iz zemalja u kojima je VIK proširen, pa je postojala opravdana sumnja da smo tim sadnicama i reznicama uvezli i proširili VIK, upravo zbog toga što se uglavnom ne uvozi bezvirusni sadni materijal. Kako nema službenih podataka o prisutnosti toga virusa u nas, odlučili smo istražiti da li je taj virus proširen u nas i ustanoviti koja je metoda najpogodnija za njegovu brzu dijagnozu.

MATERIJAL I METODE

Materijal za istraživanje potječe od naših glavnih proizvođača karanfila: HEPOK—Mostar, Agrokombinat—Zagreb, VK /itnjak—Zagreb, PK Jadro—Split, Parkovi i nasadi—Split. Sadni materijal naši proizvođači su uvezli iz Nizozemske (Hilverda, LEK, Van Staaveren), Francuske (Barberet) i Danske (DCK). U istraživanje smo uključili gotovo sve varijetete karanfila koji

se u nas uzgajaju kao i domaći *Dianthus caryophyllus* Chabaud koji smo sakupili po vrtovima u raznim lokalitetima uglavnom oko Zagreba i Splita, te samoniklu vrstu *Dianthus croaticus* Borb. koju smo sakupili na prirodnim staništima u Zagrebačkoj i Samoborskoj gori. Od pojedinih varijeteta izdvojeno je slučajnim izborom po desetak biljaka od kojih su uzeti vršni listovi za testiranje.

Za dijagnozu virusa primijenjen je serološki test imunodifuzijom u gelu i biološki test.

Kao gel uzet je 0,9% Difco bactoagar otopljen u puferiranoj fiziološkoj otopini (0,85% NaCl) kojoj je kao antiseptik dodan Na-azid. Reakcije su izvođene u petri-posudama i na predmetnim stakalcima. Antigen u količini od 0,1 ml. smješten je u periferne rezervoare, dok je antiserum također u količini od 0,1 ml. bio u središnjem rezervoaru. (Sl. 3, 4). Antiserum VIK bio je titra 1:4096 a uziman je u razrjeđenju 1:16. Kao izvor antigena poslužio je sok iz listova karanfila procijeđen kroz gazu. Za usporedbu imali smo tipičan soj VIK (CarMV) koji nam je kao i njegov homologni antiserum poslao dr. M. Hollings (Glasshouse crop research institut, Little Hampton, V. Britanija), zatim naš soj VIK izoliran iz prirodno zaražene biljke *Chenopodium quinoa*.

Za biotestove primijenjena je uobičajena tehnika prenošenja virusa sokom, a kao test biljke, vrste *Chenopodium quinoa* i *Ch. amaranticolor*. Radi dijagnoze virusa prstenaste pjegavosti karanfila (Carnation ringspot virus) u test smo još uključili i vrste *Dianthus barbatus* i *Gomphrena globosa*. (4, 9)

Dvadesetak primjeraka zaraženih karanfila održavano je u toku čitave godine u stakleniku i mjesečno 1—3 puta kontrolirano serološkim testovima da bi se ustanovilo postoji li vrijeme kada je koncentracija virusa u soku tako niska da ga se ne može serološkim testom dokazati.

REZULTATI

U toku protekle dvije godine istraženo je nekoliko stotina primjeraka karanfila različitih varijeteta. Gotovo svi primjerci bili su zaraženi virusom išaranosti karanfila, dapače smo ustanovili zarazu i na materijalu koji je bio deklariran kao bezvirusni (virus free) (Sl. 3). Tako npr. od 4 testirana uzorka varijeteta William Sim jedan je bio zaražen, kao i oba uzorka varijeteta G. J. Sim (Sl. 3).

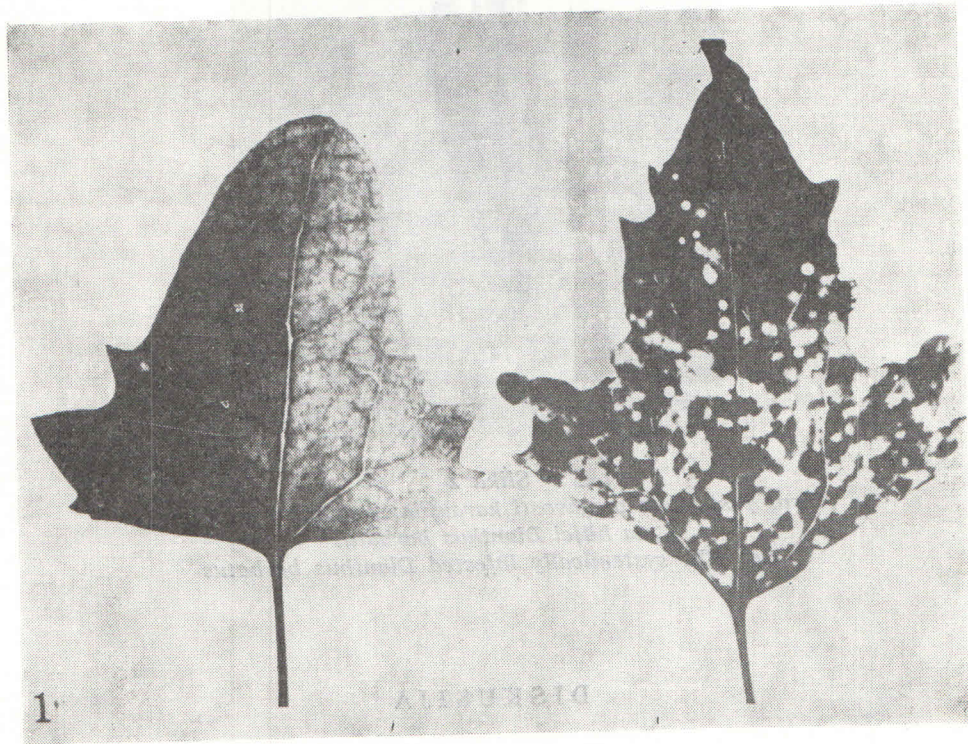
U tabeli 1 prikazani su paralelno rezultati seroloških i bioloških testova iz kojih je vidljivo da se VIK može serološki dokazati direktno u soku karanfila jednako uspješno kao i biološkim testom.

Serološke reakcije nastupale su prosječno za 7—8 sati. Linije precipitacije u gelu bile su vrlo oštre i dobro vidljive tako da prilikom očitavanja nije bilo poteškoća. Linije precipitacije različitih varijeteta su se međusobno potpuno spajale što znači da se uvijek radilo o istom soju virusa. Također

su se stapale i linije precipitacije izolata iz karanfila i tipičnog soja VIK, a to ukazuje da su izolati iz karanfila serološki vrlo srodni ili čak identični s tipičnim sojem (Sl. 4).

VIK se sokom iz karanfila vrlo lako prenosi na zeljaste test biljke. Na biljci *Chenopodium quinoa* lokalni simptomi pojavili su se nakon 3—4 dana, a već šesti dan došlo je do sistemične infekcije (Sl. 1).

Vrste *Dianthus barbatus* i *Gomphrena globosa* reagirali su u nekim slučajevima simptomima karakterističnim za virus prstenaste pjegavosti karanfila, VPPK (Cornation ringspot virus Car RV). Tim virusom bilo je zaraženo nekoliko uzoraka varijeteta Keefer's cheri, William Sim, Harvest moon. Na inokuliranim biljkama *Dianthus barbatus* pojavili su se kloritični prstenovi i linije (Sl. 2), a *Gomphrena globosa* reagirala je sistemičnom infekcijom. Naprotiv VIK u toj biljci izaziva samo lokalnu infekciju. VIK nismo uspjeli

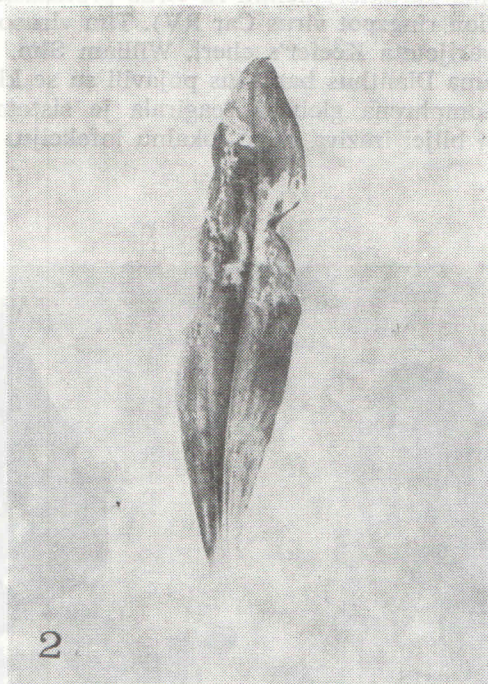


Slika 1
VIK: lokalni (lijevo) i sistemični (desno) simptomi na
biljci *Chenopodium quinoa*
Car MV: local (left) and systemic symptoms
on *Chenopodium quinoa*

prenijeti na *Dianthus barbatus* iz razloga što su samo neki posebni klonovi osjetljivi na taj virus, a takve klonove nismo imali.

Također smo ustanovili da se serološkim testovima tijekom čitave godine može dokazati VIK u soku karanfila, jer je koncentracija virusa uvijek bila prilično visoka.

Zarazu nismo ustanovili ni u jednom ispitivanom uzorku domaćeg *Chabaud* karanfila kao ni u samonikloj vrsti *Dianthus croaticus*. Borb.

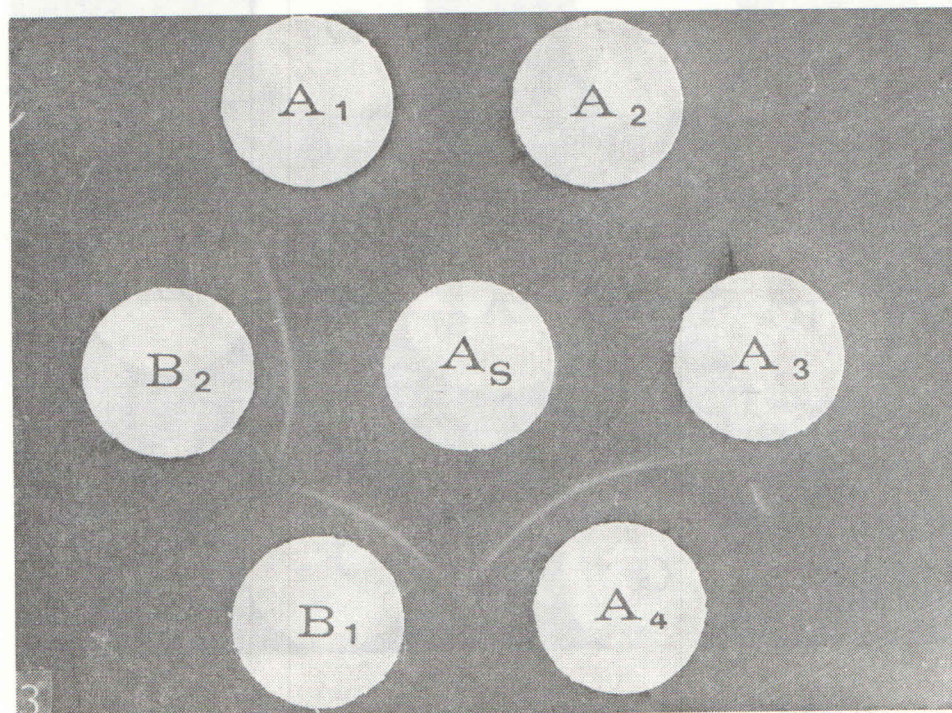


Slika 2
Virus prstenaste pjegavosti karanfila: sistemni simptomi
na biljci Dianthus barbatus
Car RV: systemically infected Dianthus barbatus

DISKUSIJA

Serološka reakcija imunodifuzijom u gelu pokazala se u našim istraživanjima kao vrlo pogodan i siguran dijagnostički test za VIK. Taj se test pokazao jednako osjetljiv kao biotest a ima izvjesne prednosti; rezultati se dobiju mnogo brže, reakcije se odvijaju pod kontroliranim laboratorijskim uvjetima i nije potreban staklenički prostor.

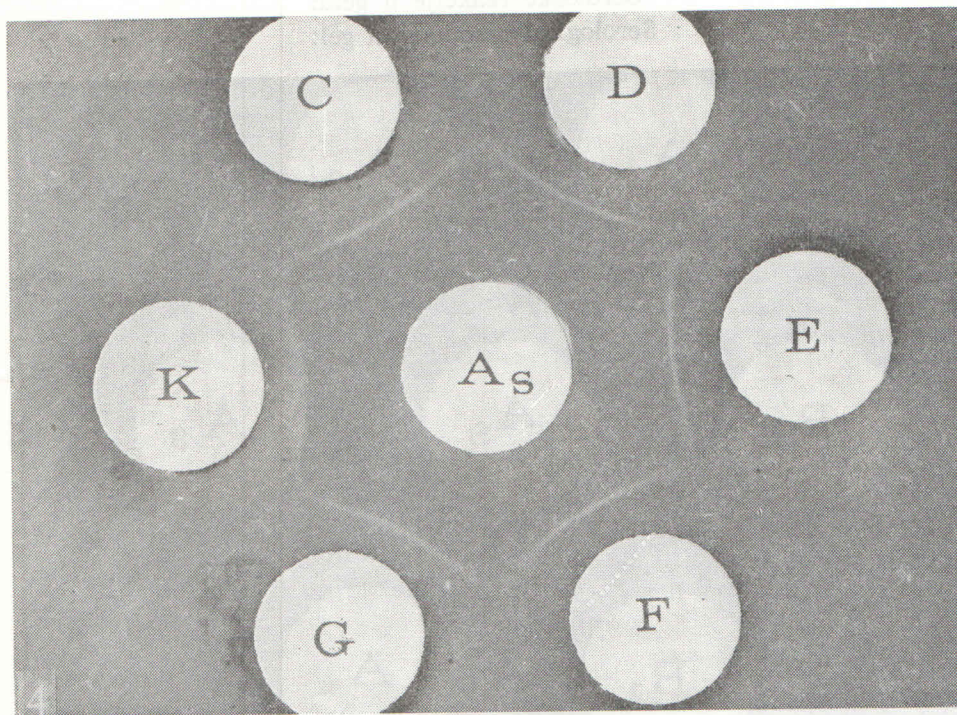
Serološke reakcije u gelu:
Serological reactions in gel:



Slika 3

As-antiserum VIK raz. 1/16; As-antiserum to CarMW dil. 1/16
Antigeni raz. 1/2; William Sim = A₁, A₂, A₃, A₄, G. J. Sim = B₁, B₂.
Antigens dil. 1/2; William Sim = A₁, A₂, A₃, A₄, G. J. Sim = B₁, B₂.

Pouzdanost seroloških testova ovisna je o koncentraciji virusa u biljci a ona tijekom godine varira. Pri niskim koncentracijama ne dolazi do precipitinske reakcije. Prema podacima Kempa (11) u uvjetima uzgoja karanfila u Ontariu (Kanada) koncentracija virusa je najniža u mjesecu lipnju i tada se virus ne može otkriti serološkim testom. Međutim, u našim se prilikama uzgoja pokazalo da je koncentracija virusa uvijek bila dovoljno visoka, jer su se tijekom cijele godine dobivale jasne precipitinske reakcije. Prema tome se serološki test može s velikom sigurnošću primijeniti u odabiranju zdravih matičnih biljaka.



Slika 4

As-antiserum VIK raz. 1/16: As-antiserum dil. 1/16
 Antigeni raz. 1/2: New red Sim = C, Scania₁ = D, Don Diablo = E
 Scania₂ = G, kontrola, tipični soj VIK = K
 Antigens dil. 1/2: New red Sim, = C, Scania₁ = D, Dou Diablo = E,
 Scania₂ = G, typical strain of CarMW = K

Ovako velika rasprostranjenost virusa išaranosti karanfila posljedica je uvoza već zaraženog sadnog materijala. Mi smo u nekoliko navrata ustanovili zarazu virusom išaranosti karanfila kao i virusom prstenaste pjegavosti u materijalu koji je bio tek uvezen, dakle prije nego što je uopće bio posađen. Domaći Chabaud karanfil kao ni samonikla vrsta *D. croaticus* nisu bili zaraženi ni s jednim virusom te prema tome ne predstavljaju izvor infekcije.

Zarazu nisu mogli proširiti ni insekti jer nijedan od dva spomenuta virusa ne prenose insekti. Očito je dakle da uvezeni zaraženi sadni materijal predstavlja izvor zaraze, a budući da se karanfil razmnaža vegetativno, zaraza se tako brzo dalje širila.

Tabela 1

Rasprostranjenost virusa išaranosti karanfila (VIK) u raznim varijetetima
Occurrence of Carnation mottle virus in different carnation varieties

Red. br. No.	Varijetet Varieties	testovi serološki seroassay	biološki bioassay	Porijeklo istraživanog materijala — Origin of investigated material
1	2	3	4	5
1.	ALEC	+	+	PK Jadro — Split
2.	ARTHUR SIM	— + +	O + +	Agrokombinat PK Jadro — Split VK Žitnjak
3.	CARNEVAL	+	O	Agrokombinat
4.	CLEAR YELLOW	+ —	+ —	Agrokombinat VK Žitnjak
5.	CROWLEY'S SIM	— +	+ +	Agrokombinat VK Žitnjak
6.	DARK LENA	+	O	VK Žitnjak
7.	DARK PINK	+	+	Hepok
8.	DIAMOND	+	+	Hepok
9.	DON DIABLE	+	+	Parkovi i nasadi — Split PK Jadro — Split
10.	ESPERANCE	+ + +	+ +	Agrokombinat Hepok VK Žitnjak
11.	G. J. ŠIM	+ + ++	O O +	Agrokombinat Hepok VK Žitnjak
12.	HARVEST MOON	+	+	Agrokombinat
13.	KEEFER'S CHERI	+ + +	+ O O	Agrokombinat Hepok VK Žitnjak
14.	LADDIE	—	O	Agrokombinat
15.	LENA	+	O	Hepok

1	2	3	4	5
16.	MAUDY	+	+	Hepok
17.	MAJESTIC BLANC	+	O	Parkovi i nasadi — Split
18.	NEW RED SIM	+	O	Parkovi i nasadi — Split
19.	NORA	+	O	Parkovi i nasadi — Split Parkovi i nasadi — Split
20.	ORCHID BEAUTY	+	+	Agrokombinat
21.	PINK	+	+	PK Jadro — Split
22.	RED SIM	+	+	PK Jadro — Split VK Žitnjak Parkovi i nasadi — Split
23.	SCANIA	+	+	Hepok PK Jadro — Split Parkovi i nasadi — Split
24.	SHOCKING PINK	+	O	Agrokombinat VK Žitnjak
25.	TANGERINE	+	+	Agrokombinat PK Jadro — Split VK Žitnjak
26.	YELLOW DUSTY	—	—	VK Žitnjak
27.	WHITE SCANIA	+	O	Parkovi i nasadi — Split
28.	WHITE SIM	+	+	Agrokombinat Hepok VK Žitnjak
29.	WILLIAM SIM	+	+	Agrokombinat PK Jadro — Split VK Žitnjak
30.	DIANTHUS CARYOPHYLUS CHABAUD	—	—	Razni lokaliteti SRH
31.	DIANTHUS CROATICUS BORB.	—	—	Zagrebač. i Samobor. gora

+ zaražen sa ViK (infected with Car.M.V.) — nije zaražen (not infected) O nije ispitan (not investigated)

THE USE OF SEROLOGICAL TEST FOR THE DETECTION OF CARNATION MOTTLE VIRUS IN CRUDE SAP

S u m m a r y

The experiments were carried out to prove whether the serological method by immunodiffusion in gel could be used as a routine test for the detection of CarMV in crude sap. This serological method gave satisfactory results. It could be used as a reliable test over all the year, because under our conditions the concentration of virus in crude sap was always high enough to give visible precipitin patterns.

Carnation mottle virus was detected quite in all commercial varieties. On the contrary, carnation ring spot virus was detected only in few of them.

LITERATURA

1. Devergne, J—C..1966: Études préliminaires des maladies a virus de l'Oeillet en France. *Atti Primo Congr. Fitopat. Medit.* 2, 553—557.
2. Devergne, J—C., et L. Cardin, 1967. b: Utilisation de la réaction sérologique en immunodiffusion, comme test de diagnostic du virus du »mottle« de l'Oeillet. *Ann. Epiphyties* 18. n. H. S., 85—103.
3. Hollings, M. and O. M. Stone, 1964: Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle virus. *Ann. appl. Biol.* 53, 103—118.
4. Hollings, M. and O. M. Stone., 1965: Investigation of carnation viruses. II. Carnation ringspot. *Ann. appl. Biol.* 56 73—86.
5. Hollings, M., 1967: In: *Annual Rep. Glasshouse Res. Inst.* 1966, 92.
6. Hollings, M., 1968: In *Annual Rep. Glasshouse res. Inst.* 1967, 94.
7. Hollings, M. and O. M. Stone 1968. In: *Second symposium on virus diseases of ornamental plants.* Lyngby-Danemark.
8. Hollings, M., and O. M. Stone, 1970: Carnation mottle virus. CMI/AAB Description of plant viruses No. 7.
9. Hollings, M., and O. M. Stone, 1970: Carnation ringspot virus CMI/AAB Description of plant viruses No 21.
10. Kassanis, B., 1955: Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. appl. Biol.* 43, 103—113.

11. Kemp, W. G. 1964: The identity of two sap transmissible viruses of carnation in Ontario. *Canad. J. Bot.* 43, 45—55.
12. Kemp, W. G., 1967: The reliability of seroassay for the detection of carnation mottle virus in crude sap. *Can. Plant dis. surv.* 47 (4), 89—93.
13. Šarić, A. 1972: Natürliches Vorkommen von Carnation mottle virus in *Chenopodium quinoa* Willd. *Acta Bot. Croat.* 31, 9—14.

LITERATURA

- J. B. ... 1964: ... *Canad. J. Bot.* 43, 45—55.
- J. B. ... 1967: ... *Can. Plant dis. surv.* 47 (4), 89—93.
- A. Šarić, 1972: ... *Acta Bot. Croat.* 31, 9—14.
- J. Hollings, M. and G. M. Stone, 1964: Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle virus. *Ann. appl. Biol.* 51, 103—118.
- J. Hollings, M. and G. M. Stone, 1965: Investigation of carnation viruses. II. Carnation ring spot virus. *Ann. appl. Biol.* 52, 73—84.
- J. Hollings, M., 1967: In Annual Rep. Glasshouse Res. Inst. 1966, 93.
- J. Hollings, M., 1968: In Annual Rep. Glasshouse Res. Inst. 1967, 84.
- J. Hollings, M. and G. M. Stone, 1968: In: Second symposium on virus diseases of ornamental plants. Langley-Cambridge.
- J. Hollings, M. and G. M. Stone, 1970: Carnation mottle virus (CMI/MAB). Description of plant viruses No. 7.
- J. Hollings, M. and G. M. Stone, 1970: Carnation ring spot virus (CMI/RAB). Description of plant viruses No. 21.
- Dr. K. ... 1972: Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. appl. Biol.* 43, 103—111.