

RASPROSTRANJENOST VIRUSA KARANFILA U JUGOSLAVIJI

U V O D

Prve podatke o virusima karanfila u Jugoslaviji iznijeli su Šarić et al. (1972). Oni su utvrdili nazočnost virusa išaranosti karanfila (u daljem tekstu VIK = carnation mottle virus) upotrebljavajući za identifikaciju pokusne biljke i serološke reakcije. Prilikom tih istraživanja utvrđeno je kako je velik broj kultiviranih sorata karanfila (*Dianthus caryophyllus* L.) koje se uzgajaju u staklenicima u primorskim krajevima i u unutrašnjosti bio zaražen VIK-om. Inficirani karanfili pripadali su sortama: Arthur Sim, Crowley's Sim, G. J. Sim, Red Sim, New Red Sim, William Sim, White Sim, Nora, Scania i drugim. Od 30 istraženih sorata samo su dvije bile bez virusa: Laddie i Dusty Yellow.

Šarić et al. (1972) također su zapazili da udomaćene stare sorte od *D. caryophyllus* i samonikla vrsta *D. giganteus* D'Urv. subsp. *croaticus* (Bo-rbás) Tutin nisu bile inficirane virusom. Na osnovi toga autori opravdano smatraju da je VIK unesen u našu zemlju zaraženim sadnicama. Nakon unošenja virusa infekcija se mogla lako prenositi dodirrom prilikom vegetativnog razmnožavanja te se proširila u staklenicima i na otvorenom.

Kasnije je zapaženo da je VIK vrlo raširen i u staklenicima Novog Sada i Beograda gdje izaziva velike štete (Perišić et al. 1977).

Nedavno je Kačić (1980) ponovno istraživala stakleničke karanfile i utvrdila da je od 15 istraženih sorata 14 sorata bilo inficirano VIK-om. Zbog potrebe testiranja matičnih biljaka pri uzgoju bezvirusnih karanfila metodom kulture vršnih meristema, u novije vrijeme priređen je u nas serum protiv VIK-a (Kačić et al. 1982).

Drugi virus karanfila koji je pronađen u Jugoslaviji bio je virus prstenaste pjegavosti karanfila (VPPK = carnation ringspot virus). Taj virus identificirali su u našoj zemlji Šarić et al. (1972) na osnovi reakcije pokusnih biljaka *Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. amaranticolor* Coste et Reyn., *D. barbatus* L. i *Gomphrena globosa* L.

U ovom radu iznosimo podatke iz koji izlazi da su još dva virusa prisutna na karanfilima u Jugoslaviji. To su virus išaranosti žila karanfila (VIŽK = carnation vein mottle virus) i virus mozaika krastavca (VMK = cucumber mosaic virus).

Nada BEZIĆ, dipl. inž. biol., Nastavnički studij Filozofskog fakulteta, Split.

Prof. dr Zlata ŠTEFANAC, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Prof. dr Davor MILIČIĆ, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

MATERIJAL I METODE

1. Materijal

U pokusima je upotrebljeno nekoliko sorata karanfila *D. caryophyllus* s punim cvjetovima koji su nabavljeni u cvjećarnici u Splitu. *Karanfili D. caryophyllus* i *D. carthusianorum* L. s jednostavnim cvjetovima potjecali su iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u kojem su se uzgajali na otvorenom. Primjerci *D. barbatus* sabrani su u mjestu Obrež kraj Zagreba, gdje su se uzgajali također na otvorenom, u manjim povrtnjacima.

2. Metode

Prijenos virusa lisnim ušima

Za odvajanje VIŽK iz smjese s VIK upotrijebili smo primjerke lisne uši *Myzus persicae* Sulz., čiju smo kulturu održavali na zdravoj postrnoj repi (*Brassica rapa* L. var. *rapifera*). Prenošenje virusa obavljeno je na neperzistentan način, tj. nakon kratkog hranjenja na zaraženoj biljci. Poslije gladovanja od dva sata uši su se hranile 2—3 minute na bolesnim primjercima *D. barbatus*, a poslije su prenesene u četiri skupine od 15 ušiju na četiri mlade biljke iste vrste. Poslije dva dana uši su uništene insekticidom, a biljke zadržane na promatranju u stakleniku u kojem nije bilo insekata. I ostali prijenosi s uši *M. persicae* obavljani su na neperzistentan način.

Serološki pokusi

Serološke pokuse VIK-om obavljali smo metodom dvostruke difuzije u agarском gelu (0,9 % otopina agara u fiziološkoj otopini) koristeći serum koji je bio priređen ranije u našem laboratoriju. Virus smo testirali u grubom nepročišćenom soku karanfila.

Elektronska mikroskopija

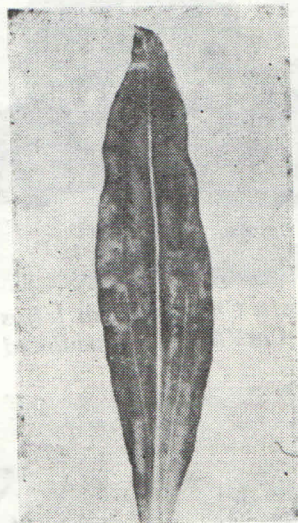
Za elektronsku mikroskopiju upotrebljeni su listovi vrsta *D. barbatus* i *Ch. quinoa*. Mali dijelovi listova fiksirani su u 1 % (v/v) glutarnom aldehidu u kakodilatnom puferu tokom 30 min. i poslije toga su ponovo fiksirani u 1 % (w/v) osmijevom tetroksidu kroz 2 sata. Fiksirani komadići bili su dehidrirani u seriji alkohola i poslije toga uklopljeni u aralditu. Ultratanki rezovi obojeni su uranilnim acetatom i olovnim citratom. Najzad su rezovi istraženi u Siemensovu Elmiskopu I (Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb) ili u elektronskom mikroskopu JEM 100 B (Prirodno-matematički fakultet, Sarajevo).

REZULTATI

Najveći dio karanfila s punim cvjetovima (staklenički uzgoj iz Splita) koje smo istražili serumom protiv VIK bio je zaražen tim virusom. To potvrđuje ranija istraživanja da je VIK vrlo raširen u našoj zemlji (Šarić et al. 1972, Perišić et al. 1977, Kačić 1980).

1. Nalaz virusa išaranosti žila karanfila

Prvi izolat VIŽK potječe od karanfila s punim cvjetovima tamnoljubičaste boje koji je nabavljen u Splitu. Virus je prenesen najprije mehaničkom inokulacijom na *D. barbatus* gdje je izazvao išaranost u području lisnih žila. Na osnovi nastalog simptoma mogli smo naslutiti da se radi o VIŽK. Budući da smo u izvornom karanfilu iz Splita serološki utvrdili VIK, smatrali smo da se u biljci *D. barbatus* nalaze oba virusa u smjesi. Stoga smo VIŽK pokušali izdvojiti na zdrave primjerke vrste *D. barbatus* s pomoću uši *M. persicae*, koja ne prenosi VIK. Deset do 20 dana poslije inokulacije ušima pojavile su se na mladim listovima *D. barbatus* intenzivne klorotične promjene (sl. 1). Kloroze su naročito bile izražene duž žila. Sta-



Sl. 1. List vrste *Dianthus barbatus* sistemski zaražen s VIŽK.
Fig. 1. *D. barbatus* leaf systemically infected with CarVMV.

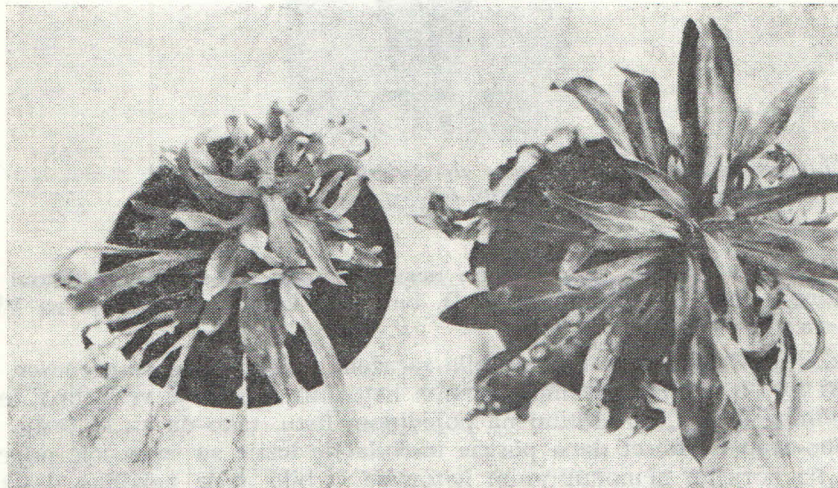
renjem listova kloroza je postupno nestajala tako da su stariji listovi bili normalno zeleni. Taj simptom na *D. barbatus* karakterističan je za VIŽK (Kassanis 1955).

Iz vrste *D. barbatus* koja je bila zaražena ušima izolat je prenesen mehanički na *Ch. quinoa*. Na inokuliranim listovima nastao je velik broj lezija nepravilnog oblika, do stotinu na pojedinom listu, tako da su se lezije međusobno stapale. Deset dana poslije inokulacije lezije su se počele pojavljivati i na gornjim neinokuliranim listovima, a bilo ih je nekoliko desetaka na pojedinom listu. Za razliku od lezija koje je na *Ch. quinoa* izazivao VMK i koje su bile smeđe (vidi potpoglavlje 2), lezije VIŽK bile su bjelkaste. Na vrsti *Ch. amaranticolor* izolat je prouzročio samo lokalne lezije na inokuliranim listovima koje su u zreloom stanju imale nekrotičan centar i crveni prsten oko centra, pa su odgovarale lezijama koje je opisao Hollings

(1956) za VIŽK. Posebno je karakteristično reagirala vrsta *C. foliosum* (Moench.) Asch. na čijim su se listovima formirale okrugle klorotične odn. nekrotične lezije (sl. 2). Simptomi na vrsti *Silene armeria* L. bili su tokom zimskih mjeseci osobito izraženi i također karakteristični. Sastojali su se



Sl. 2. Klorotične lezije na listu *Chenopodium foliosum* inokuliranom s VIŽK.
Fig. 2. Chlorotic lesions of CarVMV on inoculated leaf of *Ch. foliosum*.



Sl. 3. Jaki simptomi na vrsti *Silene armeria* nakon zaraze s VMK (lijevo i VIŽK (desno). Biljke su iste starosti.
Fig. 3. Severe symptoms induced in *S. armeria* by CMV (left) and CarVMV (right). Plants are of similar age.

od klorotičnog mozaika i klorotičnih pjegica na mladim vršnim listovima te većih klorotičnih pjega obrubljenih smeđim nekrotičnim linijama i općeg žućenja na starijim listovima (sl. 3).

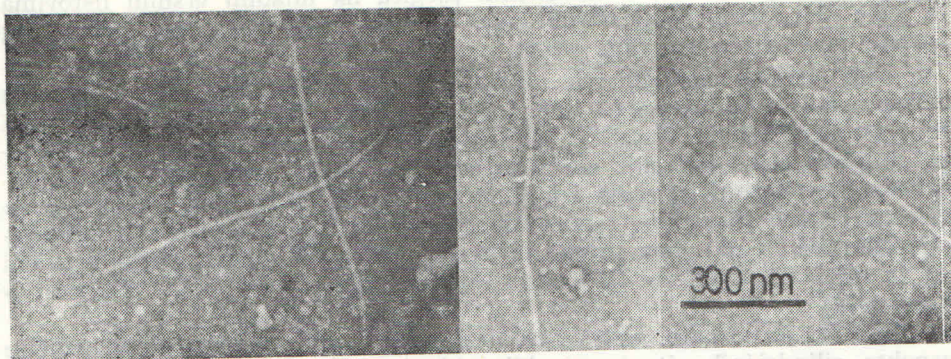
Radi sigurne identifikacije virusa izvršena je analiza tkiva s pomoću elektronskog mikroskopa (Bezić et al. 1983). U ultratankim presjecima kroz zaražene listove vrsta *Ch. quinoa* i *D. barbatus* vidjele su se cilindrične citoplazmatske inkluzije u obliku smotaka, petlja, cijevi, struktura »pin-wheel«, laminatnih agregata (sl. 4, 5) i snopova. Osim toga pronađene su virusne čestice paralelno raspoređene u nizu uz rub citoplazme. Konfiguracija cilindričnih uklopina te nađeni agregati virusnih čestica karakteristični su za infekcije VIŽK-om (Weintraub i Ragetli 1970, Edvardson 1974).

Kao što je poznato, smoci i ostali navedeni oblici predstavljaju različite aspekte cilindričnih citoplazmatskih uklopina, karakterističnih submikroskopskih struktura proteinske prirode koje prate infekcije virusima iz skupine potyvirusa. Radi jasnije predodžbe shematski su prikazana tri modela takvih cilindričnih uklopina (sl. 6).

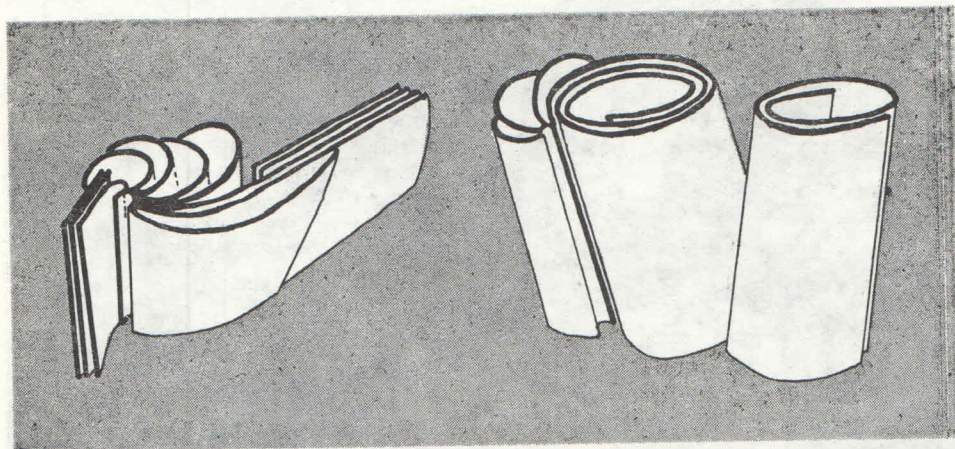


Sl. 4. Cilindrične uklopine na ultratankom presjeku kroz list *D. barbatus* zaražen s VIŽK. Uklopine se vide u poprečnom presjeku (»pin-wheel« — PW, petlja — L) i uzdužnom presjeku (cijev — T), te kao laminatni agregati — LA. (Snimljeno u Institutu »Ruđer Bošković«, Zagreb).

Fig.4. Cylindrical inclusions in ultrathin sections of *D. barbatus* leaf infected with CarVMV. The inclusions are seen in cross (the »pin-wheel« — PW, 100p — L) and in longitudinal (tube — T) sections, and as laminated aggregates — LA. (Micrographed at »Ruđer Bošković« Institute, Zagreb).



Sl. 5. Cilindrične uklopine u *Ch. quinoa* zaraženom s VIZK.
 »Pin-wheel« — PW, smotak — S, laminatni agregat — LA. (Snimljeno na
 Prirodno-matematičkom fakultetu, Sarajevo).
 Fig. 5. Cylindrical inclusions induced by CarVMV in *C. quinoa*.
 »Pin-wheel« — PW, scroll — S, laminated aggregate — LA. (Micrographed
 at Faculty of Science, Sarajevo).

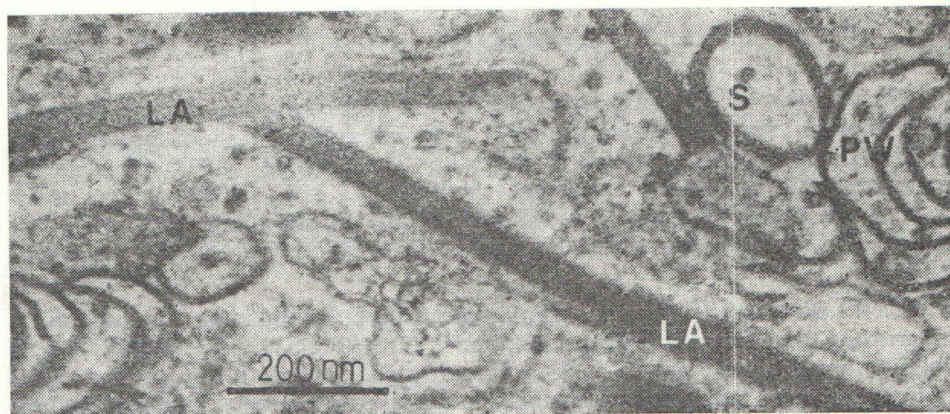


Sl. 6. Shematski prikaz prostornog izgleda cilindričnih citoplazmatskih uklo-
 pina dvaju potyvirusa (prema Edwardsonu i sur. 1968).
 Fig. 6. Diagramatic representation of a portion of three-dimensional cylin-
 drical cytoplasmic inclusions induced by two potyviruses (according to Ed-
 wardson et al. 1968).

Drugi izolat VIZK potječe od vrste *D. barbatus*. Virus je izdvojen na mehanički način uz dodatak fosfatnog pufera 0,01 M, pH 7 na sjemenjake iste vrste. Da bismo ustanovili prenosi li se taj izolat ušima, izvršili smo pokus prijenosa pomoću uši *M. persicae* i utvrdili da se virus prenosi na zdrave primjerke *D. barbatus* na neperzistentan način. Budući da su to svojstva karakteristična za VIZK, pristupili smo i u ovom slučaju elektron-

skomikroskopskim istraživanjima. Snimke su pokazale da se u stanicama nalaze cilindrične citoplazmatske inkluzije karakteristične za VIŽK (Edwardson 1974). Osobito su bile česte inkluzije u obliku kruga.

Treći izolat VIŽK potječe od vrste *D. carthusianorum*. Iz biljke, koja nije pokazivala zamjetljive vanjske simptome, izolirali smo virus pomoću vrste *Ch. quinoa*. Simptomi na vrstama *Ch. quinoa* i *Ch. amaranticolor* nisu se razlikovali od simptoma našeg prvog izolata. U elektronskom mikroskopu snimljeno je 12 virusnih čestica tog izolata. Čestice su bile savitljivi štapići (sl. 7) čija je normalna dužina iznosila 770 nm. Na ultratankim prerezima kroz inficirane listove *Ch. quinoa* nađene su cilindrične citoplazmatske inkluzije u obliku laminatnih agregata, snopova, cijevi i dr.



Sl. 7. Čestice VIŽK u sirovom soku *Ch. quinoa*. (Snimljeno u Institutu »Ruđer Bošković«, Zagreb)

Fig. 7. CarMV particles in crude sap from infected *C. quinoa*. (Micrographed at »Ruđer Bošković« Institute, Zagreb).

Četvrti izolat VIŽK potječe od primjerka *D. caryophyllus* koji je bio inficiran još i VMP-om. Identifikacija toga izolata izvršena je na sličan način kao i identifikacija triju prethodnih izolata.

2. Nalaz virusa mozaika krastavca

Virus je izoliran iz vrste *D. caryophyllus* mehaničkim prijenosom na *Ch. quinoa*. Na nalazištu u Botaničkom vrtu bila su sabrana četiri primjerka *D. caryophyllus*, od kojih su dva sadržavala VMK. Iz jednog od dva primjerka, zajedno s VMK, bio je izoliran također VIŽK. VMK odvojen je od smjese pasažom kroz krastavac koji ne prihvaća VIŽK.

VMK najprije je bio istražen na pokusnim biljkama. Na vrsti *Ch. quinoa* tri dana nakon inokulacije nastale su na obrađenim listovima karakteristične lokalne lezije velike oko 2 mm, smeđe boje i barem djelomično nekrotične. Sistemična infekcija nije se razvila. Vrsta *C. murale* L. reagirala

je najprije okruglim lezijama na inokuliranim listovima. Lokalne lezije bile su nekrotične i sivkastozelene boje, a sistemični simptomi u obliku prosvjetljivanja žila i nekroza. Sistemični simptomi na vrsti *Silene armeria*, koja je bila zaražena tokom zime, bili su opće žućenje i naglašeno suženje lisne plojke s osobito izraženom kržljavošću (sl. 3).

Reakcije pokusnih vrsta upozoravale su na mogućnost da je infekciju prouzročio VMK. Budući da smo u laboratoriju imali na raspolaganju antiserum od VMK, koji nam je pred više godina poslao dr. E. Luisoni (Torino, Italija), pošlo nam je za rukom serološkim pokusima u agarском gelu utvrditi da naš izolat pripada VMK. Prema reakciji pokusnih biljaka i svojoj stabilnosti virus je vrlo blizak talijanskom izolatu (Bezić et al. 1983).

DISKUSIJA

Nesumnjivo je VIK najopasniji virus na kulturama karanfila u Jugoslaviji. Tijekom naših istraživanja našli smo ga gotovo u svim primjercima karanfila koji su bili određeni za prodaju. Hollings (1968) tvrdi da taj virus uzrokuje vrlo slabe simptome na listovima koji se lako mogu previdjeti. Osim toga ističe da je u toku 12 godina istražio nekoliko tisuća karanfila iz komercijalnih zaliha i utvrdio da su svi primjerci bili inficirani VIK-om.

Da bi se smanjio broj zaraženih karanfila u ovom kraju, priređene su za potrebe Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu veće količine antiseruma protiv VIK-a. Pored toga institut u Splitu već neko vrijeme nastoji kulturom vršnih meristema eliminirati VIK iz komercijalnih sorata i uzgojiti bezvirusne karanfile (Kačić et al. 1982).

Važnost odstranjivanja VIK-a iz nasada karanfila vrlo je velika. Hollings (1968) ističe da su štete od VIK-a podmukle i moguće ih je utvrditi samo ako se bolesne biljke mogu izravno usporediti sa zdravima. Prinos cvjetova zdravih biljaka je oko 50 % veći, a rast i jedrina mnogo su izraženiji nego u biljaka inficiranih VIK-om.

Drugi virus karanfila koji je nađen u Jugoslaviji jest VPPK (Šarić et al. 1972). Taj je virus također vrlo infekciozan i otporan te se lako prenosi od biljke na biljku prilikom rada zaraženim karanfilima i kad se listovi taru jedan o drugi. No, VPPK lako se može prepoznati zbog jasno vidljivih simptoma na listovima, pa se inficirane biljke mogu ukloniti. Zbog toga je VPPK praktički odstranjen iz svih nasada karanfila. Mi taj virus dosad nismo uspjeli izolirati. Nedavno je Lawson (1981) u opširnom elaboratu o kontroli virusa ukrasnih biljaka naveo šest virusa koji prouzrokuju najveće teškoće u uzgoju karanfila. VPPK postavljen je na posljednje mjesto.

Mного veće značenje ima VIŽK koji je u navedenom popisu Lawsona (1981) na drugom mjestu, odmah iza VIK. VIŽK rasprostranjen je u svim krajevima gdje se uzgaja karanfil, a posebno u sredozemnom području. Nije, prema tome, čudno, što smo tražeći viruse karanfila naišli odmah na četiri izolata koji gotovo sigurno pripadaju VIŽK-u.

Četvrti virus karanfila, o kojem je ovdje bilo govora, jest VMK (Bezić et al. 1983). Reakcija pokusnih biljaka i serološki pokusi pokazuju da je naš izolat VMK vrlo sličan izolatu koji su proučavali Lovisolo et al. (1968). Što se tiče značenja VMK za kulture karanfila, ona vjerojatno nije velika. Taj virus nije naveden među šest najvažnijih virusa karanfila koje spominje Lawson (1981).

Da bi se zaštitila produkcija karanfila u Jugoslaviji, trebalo bi utvrditi koji su virusi često prisutni na karanfilima iz stakleničkih kultura. Ovaj rad je prilog toj potrebi.

SAŽETAK

Iz stakleničkog uzgoja karanfila (*Dianthus caryophyllus* L.) u Splitu izoliran je virus išaranosti žila karanfila (VIŽK = carnation vein mottle virus). Isti virus izoliran je i iz vrsta *D. caryophyllus*, *D. barbatus* L. i *D. carthusianorum* L. koje su rasle na otvorenom u Zagrebu i okolici. Svi izolati VIŽK identificirani su na osnovi istraživanja kruga domaćina, neperzistentnog prenošenja s pomoću lisne uši *Myzus persicae* Sluz. te s pomoću elektronsko-mikroskopskih istraživanja.

Iz karanfila *D. caryophyllus* koji je restao na otvorenom u Zagrebu izoliran je virus mozaika krastavaca (VMK = cucumber mosaic virus). Virus je identificiran analizom na pokusnim biljkama i serološkim metodama. VIŽK i VMK ranije nisu bili utvrđeni na karanfilima u Jugoslaviji.

U radu se ističe važnost poznavanja virusa na karanfilima u nas te njihove eliminacije iz komercijalnih sorta.

Zahvaljujemo ing. Jakovu Biličiću iz Vrtlarskog kombinata »Žitnjak« u Zagrebu za materijal i korisne podatke. Rad su financirali Samoupravna interesna zajednica za znanstveni rad SR Hrvatske (SIZ IV) i navedeni Institut iz Splita.

DISTRIBUTION OF CARNATION VIRUSES IN YUGOSLAVIA

N. Bezić, Z. Štefanac and D. Miličić

(Teacher's College, University of Split; Department of Botany,
Faculty of Science, University of Zagreb)

S u m m a r y

In addition to carnation mottle and carnation ringspot viruses, previously detected in Yugoslavia, two other viruses were recently found on carnation plants in this country: carnation vein mottle virus (Car VMV) and cucumber mosaic virus (CMV). Car VMV was isolated from glasshouse-grown *Dianthus caryophyllus* L., and from *D. caryophyllus*, *D. barbatus* L. and *D. carthusianorum* L. which were grown in the open. The isolates were identi-

fied by analyse of the host range, non-persistent way of transmission by *Myzus persicae* Sulz., and by electron microscopy of virus particles and cylindrical cytoplasmic inclusions. CMV was isolated from *D. caryophyllus* grown in the open. Accentuated is the importance of detecting viruses present on carnations in Yugoslavia and of their elimination from commercial varieties.

LITERATURA

- Bezić, N., Z. Štefanac, D. Miličić and M. Wrischer, 1983:** Occurrence of carnation vein mottle and cucumber mosaic viruses on carnations in Yugoslavia. *Acta Bot. Croat.* 42 (u tisku).
- Edwardson, J.R., 1974:** Some properties of the potato virus Y-group. *Florida Agric. Exp. Sta. Monograph Series* 4, 398 pp.
- Edwardson, J.R., D.E. Purcifull and R. G. Christie, 1968:** Structure of cytoplasmic inclusions in plants infeced with rod-shaped viruses. *Virology* 34, 250-263.
- Hollings, M., 1956:** *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. as a test plant for plant viruses. *Plant Path.* 5, 57—60.
- Hollings, M., 1968:** The problem of virus diseases in ornamental plants. *Phytopath. mediterr.* 7, 57—59.
- Kačić, S., 1980:** Istraživanje pogodnosti purifikacijskih postupaka za virus išaranosti karanfila. Magistarski rad, Fakultet poljoprivrednih znanosti, Sveučilište u Zagrebu. Str. 1—50.
- Kačić, S., M. Jug-Dujaković i I. Kuzmičić, 1982:** Virusi karanfila i mogućnosti njihove eliminacije. Posvetovanje o virusnih infekcijah, Zveza mikrobioloških društva Jugoslavije, Kranjska Gora, Zbornik, str. 111—112.
- Kassanis, B., 1955:** Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. appl. Biol.* 43, 103—113.
- Lawson, R.G., 1981:** Controlling virus diseases in major international flower and bulb crops. *Plant Dis.* 65, 780—786.
- Lovisolò, O., M. Conti e E. Giussani, 1968:** Su di un ceppo del virus del mosaico del Cetriolo (OMV) isolato da Garofano. *Phytopath. mediterr.* 7, 71—76.
- Perišić, M., M. Babović i S. Marković, 1977:** Pojava viroznog šarenila karanfila u staklarama u okolini Beograda i Novog Sada. *Zaštita bilja* 28, 161—166.
- Sarić, A., B. Cvjetković i I. Butorac, 1972:** Primjena serološkog testa u istraživanju virusa išaranosti karanfila. *Agronomski glasnik* 9—10, 581—590.
- Weintraub, M., and W.J. Ragetli, 1970:** Distribution of viruslike particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus. *Virology* 40, 868—881.