

NALAZ VIRUSA MOZAIKA CELERA U JUGOSLAVIJI

With Summary in English

IVAN BUTURAC, ANA ŠARIĆ i NIKOLA LJUBEŠIĆ

(Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Zagrebu i
Institut »Ruder Bošković«, Zagreb)

Primljeno 6. 12. 1973.

Uvod

U nasadima pastrnaka (*Pastinaca sativa* L.) vrlo se često nailazi na biljke koje imaju na listovima simptome mozaika koji su karakteristični za virusne zaraze. Između virusa koji su dosad izolirani iz pastrnaka u literaturi se spominje najčešće: virus mozaika pastrnaka (parsnip mosaic virus, M u r a n t et al. 1970), virus žute pjegavosti pastrnaka (parsnip yellow fleck virus, M u r a n t i G o o l d 1968) virus išaranosti pastrnaka (parsnip mottle virus, W a t s o n et al. 1964) i virus mozaika celera (celery mosaic virus = CeMV, W a l k e y i C o o p e r 1971). O raširenosti virusa na štitarkama u našoj zemlji nije dosad bilo u stručnoj literaturi nikakvih podataka. To nas je potaklo da u ovom radu opišemo svojstva i izvršimo identifikaciju virusnog izolata iz pastrnaka.

Materijal i metode

Listovi pastrnaka sa simptomima virusne zaraze macerirani su u 0,066 M fosfatnom puferu koji je sadržavao i 0,015 M Na-DIECA (diethyl-ditiokarbamat). Tim sokom inokulirane su druge vrste štitarki kao i neke vrste iz familije *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Labiatae*, *Scrophulariaceae* i *Solanaceae*. Fizikalna svojstva *in vitro* ispitana su u soku celera (*Apium graveolens* L. var. *dulce*), koji je poslužio i za dobivanje djelomično purificiranog virusnog preparata.

Za djelomičnu purifikaciju virusa primijenjeni su ovi postupci:

1. Listovi inficiranog celera homogenizirani su u 0,5 M fosfatnom puferu pH 8,0 ili 0,5 M boratnom puferu pH 8,5 koji su još sadržavali 0,2% Na₂SO₃, 0,2% Na-DIECA i 0,01 M EDTA (etilendiamino tetraacetat). Na 1 g lišća uzeto je 1,5 ml pufera. Homogenat je klarificiran na 2 načina: a) emulgiranjem s jednakim volumenom kloroforma uz miješanje pomoću magnetske mješalice u toku 25 min na 6° C i b) grijanjem soka 10 min na 45° C nakon čega je emulgiran s kloroformom i centrifugiran 15 min na 7000 g.

Iz klarificiranog soka virus je oboren ili izravno pomoću dva ciklusa diferencijalne centrifugacije (90 min na 100 000 g i 10 min na 12 000 g) ili je prethodno oboren s 4% polietilenglikolom (PEG 6000) i 4% NaCl, centrifugiran 15 min na 7000 g pa tek onda diferencijalno centrifugiran.

Talag nakon prvog ultracentrifugiranja otopljen je u 0,05 M fosfatnom puferu ili u 0,05 M boratnom puferu s dodatkom 0,05% 2-merkaptotetanola i 1 M uree, a u tom puferu otopljen je i virus iz precipitata s polietilenglikolom. U istom puferu samo bez dodatka uree otopljen je virus nakon završnog ultracentrifugiranja.

2. Virus je purificiran prema postupku koji su opisali Shepard i Grogan (1967, 1971) za virus mozaika celera. Po tom postupku lišće je homogenizirano u 0,5 M boratnom puferu, sok klarificiran kloroformom, a virus oboren s pomoću dva ciklusa diferencijalne centrifugacije.

Dobiveni djelomično purificirani virusni preparati kontrolirani su na elektronskom mikroskopu (Siemens Elmiskopu I Instituta za biologiju Sveučilišta u Zagrebu) i spektrofotometrijski (Unicum SP 500 i Cary 16 K). Za elektronsku mikroskopiju preparati od djelomično purificiranog virusa priređeni su negativnim kontrastiranjem fosfovolframskom kiselinom. Ultratanki prerezi napravljeni su od listova inficirane biljke *Anthriscus cerefolium*. Komadići lista nakon fiksacije i dehidracije uklopljeni su u Epon 812 i rezani ultramikrotomom (Reichert Om U2). Prerezi su zatim kontrastirani uranilacetatom i olovnom citratom (Reynolds 1963).

Serološke reakcije izvedene su imunodifuzijom u 0,85% agar-gelu i 0,85% gelu od agaroze. Gelu je dodan Na-azid u koncentraciji od 1%. Kao antigen poslužio je sirovi sok inficiranog celera, klarificirani sok i djelomično purificirani virusni preparat. Antigen u sirovom soku priređen je kemijskim cijepanjem virusnih čestica s pomoću etanolamina i Na-dodecilsulfata (Gooding i Bing 1970). U klarificiranom i djelomično purificiranom preparatu virusne čestice su fragmentirane s pomoću ultrazvuka. Tretiranje ultrazvukom izvedeno je na staničnom dezintegratoru od 100 W kod 24 Kc/sek u trajanju od 30 sek pri amplitudi 6 i 30 sek pri amplitudi 7. Od antiseruma upotrijebljeni su serumi protiv izolata CeMV koje smo dobili iz Engleske i Italije, te homologni antiserum protiv izolata iz pastrnaka koji smo sami priredili. Dva engleska antiseruma (a, b) bili su priređeni od izolata iz celera i njihov titar bio je 1 : 1024 (a) i 1 : 128 (b), antiserum od izolata iz korijandra (c) imao je titar 1 : 128. Talijanski serum (d) protiv izolata iz celera imao je titar 1 : 1024. Homologni antiserum imao je titar u gelu 1 : 64, a u agarozu 1 : 128. S normalnim bjelančevinama biljke reagirao je samo u razrjeđenju 1 : 1. Serološke reakcije izvedene su i sa serumom protiv njemačkog izolata CeMV (titar 1 : 1024) u Institutu za fitopatologiju u Ascherslevenu (DDR) ljubežnošću dr Wolfa.

Rezultati

Krug domaćina i simptomi

Izolat iz pastrnaka uspješno se prenosio sokom samo na štitarke na kojima su se pojavili karakteristični simptomi. Sve su štitarke bile samo sistemično zaražene osim biljke *Ammi majus* koja je i lokalno reagirala.

Apium graveolens L. var. *dulce*: Simptomi na ovoj biljci vrlo su različiti ovisno o dobi inficirane biljke. Mlade zaražene biljke pokazuju u periodu od devetog do trideset i prvog dana nakon infekcije na novozraslim listovima simptome najprije poput svjetlozelenog mozaika, a poslije postupno dolazi do deformacije i suženja plojke. Mlade biljke nakon infekcije često zakržljaju, a starije ne pokazuju izrazito zaostajanje u rastu (sl. 3).

Pastinaca sativa L.: Simptomi se pojavljuju nakon 30 dana poput svjetlozelenih ili žutih pjega po listovima, koje kasnije mogu i nekrotizirati (sl. 6).

Coriandrum sativum L.: Prvi uočljivi simptomi su tamnozeleno pjege koje se jasno ističu. Mlade biljke jako zakržljaju, ali ne ugibaju. Starije inficirane biljke imaju izobličene listove maslinasto zelene boje s jako približenim nervima i suženim dijelovima lista (sl. 1).

Petroselinum hortense Hoffm.: Inficirane biljke imaju približene nerve i vrlo sužene dijelove lista (sl. 5 b).

Daucus carota L. ssp. *sativum* (Hoffm.) Thell.: Biljke nakon infekcije obično zakržljaju. Listići su slični listićima paprati, a često su svinuti i imaju žute nerve. Na biljkama koje ne pokazuju kržljivost dijelovi lista jako su suženi i izgledaju kao iglice ili listovi kopra (sl. 4).

Ammi majus L.: Biljke inokulirane u ljetnim mjesecima reagiraju lokalno s pojavom žutih lezija difuznog ruba koje se povećavaju. U zimskom dijelu godine imaju simptome u obliku malih nekrotičnih lezija oštrog ruba. Nakon lokalne reakcije uvijek slijedi sistemična infekcija (sl. 2).

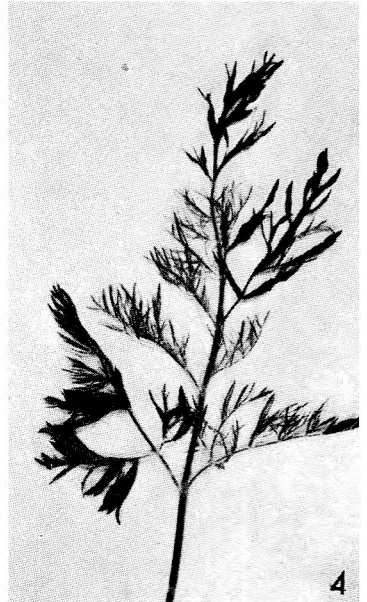
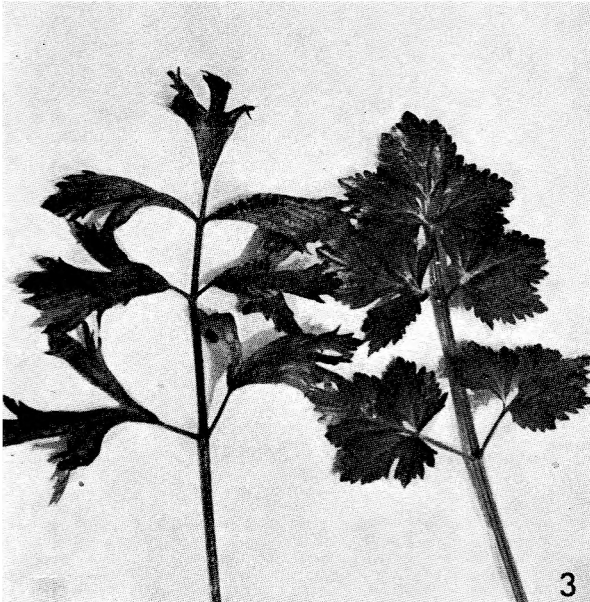
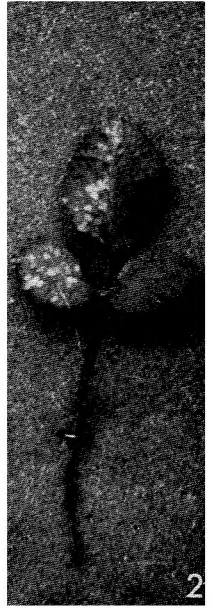
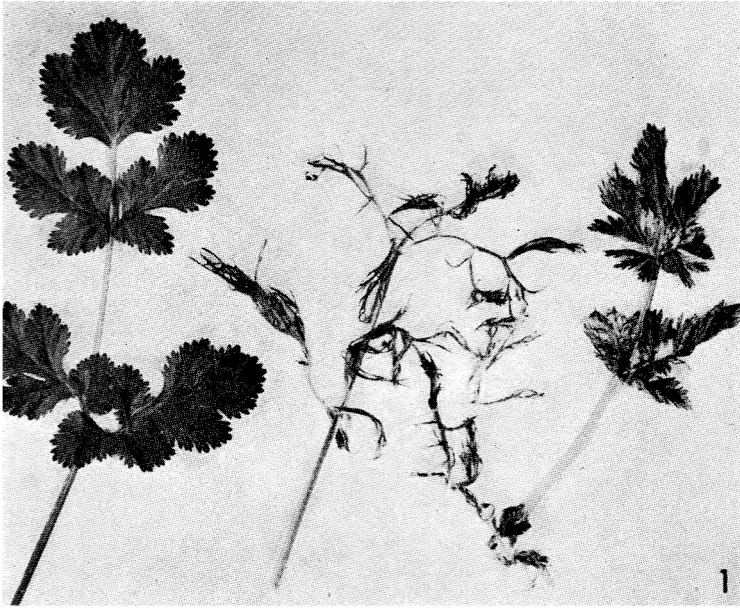
Anthriscus cerefolium (L.) Hoffm.: Dijelovi lista su lagano naborani, a nervatura svjetlozelene do žute boje. Biljke zakržljaju, ali ne tako jako kao biljke korijandra.

Vrste *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *Ch. album* Willd., *Ch. murale* L., *Ch. quinoa* Willd., *Torenia founieri* Lind. i *Datura stramonium* L. nisu pokazale nikakve simptome; povratnom inokulacijom na celer ustanovilo se da nisu bile latentno zaražene.

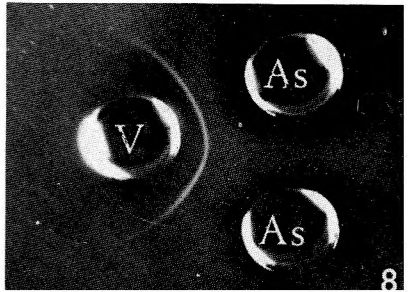
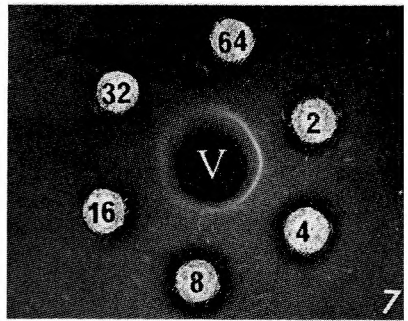
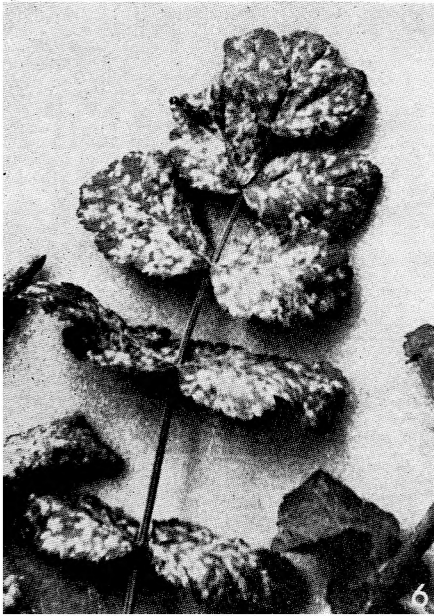
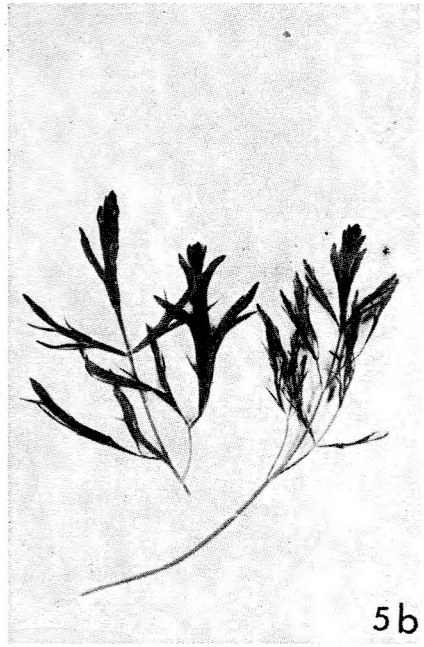
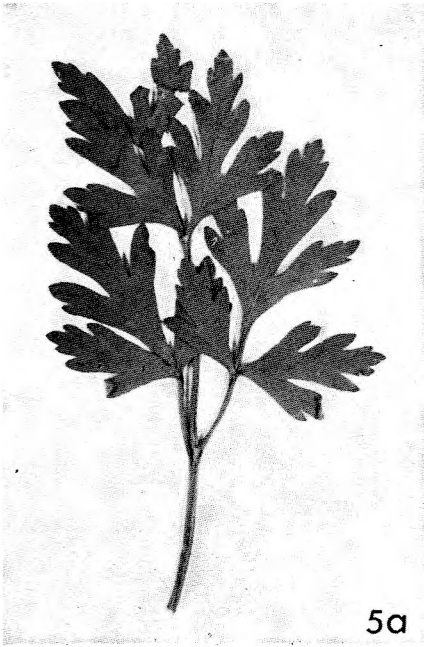
Prenošenje virusa lisnim ušima

Pokusi prenošenja lisnim ušima izvedeni su na neperzistentan način zelenim lisnim ušima *Myzus persicae*. Nakon gladovanja od tri sata i hranjenja od 5 min na inficiranom celeru, uši su prenesele virus na zdravi celer.

- Sl. 1—6. Simptomi virusa mozaika celera iz pastrnaka.
Figs. 1—6. Symptoms of parsnip isolate of celery mosaic virus.
- Sl. 1. Koriandar (*Coriandrum sativum*); lijevo zdravi list, desno zaraženi listovi.
Fig. 1. Coriander (*Coriandrum sativum*); left healthy leaf, right infected leaves.
- Sl. 2. Morač (*Ammi majus*); lokalne lezije na inokuliranoj polovici lista.
Fig. 2. Bishop's Weed (*Ammi majus*); local lesions on the inoculated half of the leaf.
- Sl. 3. Celer (*Apium graveolens* var. *dulce*); listovi inficirane biljke u kasnoj fazi infekcije (lijevo) i zdravi list (desno).
Fig. 3. Celery (*Apium graveolens* var. *dulce*); leaves of infected plant in the late stage of infection (left) and healthy leaf (right).
- Sl. 4. Mrkva (*Daucus carota*); list inficirane biljke s jako suženom plojkom.
Fig. 4. Carrot (*Daucus carota*); leaf of infected plant showing a severe reduction of leaf blade.
- Sl. 5. Peršun (*Petroselinum hortense*); zdravi list (a) i jako suženi listovi zaražene biljke (b).
Fig. 5. Parsley (*Petroselinum hortense*); healthy leaf (a) and severely reduced leaves of infected plant (b).
- Sl. 6. Pastrnak (*Pastinaca sativa*); listovi s izraženim mozaikom u početnoj fazi zaraze.
Fig. 6. Parsnip (*Pastinaca sativa*); leaves in the initial stage of infection showing mosaic.
- Sl. 7. Difuzijski pokus u gelu. Klarificirani sok obrađivan ultrazvukom 30 sek (V). Homologni antiserum u razrjeđenju 1 : 2 — 1 : 64.
Fig. 7. Gel-diffusion test with clarified sap sonicated 30 sec (V). Homologous antiserum diluted 1 : 2 — 1 : 64.
- Sl. 8. Difuzijski pokus u gelu. Djelomično purificirani virusni preparat obrađivan 30 sek ultrazvukom (V). Homologni antiserum (As) u razrjeđenju 1 : 2.
Fig. 8. Gel-diffusion test with partially purified virus preparation sonicated 30 sec (V). Homologous antiserum (As) diluted 1 : 2.
- Sl. 9. Strukture »pinwheel« u listu inficirane biljke *Anthriscus cerefolium*. 40 000 : 1.
Fig. 9. Pinwheel structures in infected *Anthriscus cerefolium* 40.000 : 1.
- Sl. 10. Fragmentirane i agregirane virusne čestice iz preparata djelomično purificiranog pomoću dva ciklusa diferencijalne centrifugacije. 50 000 : 1.
Fig. 10. Fragmented and aggregated virus particles from a partially purified preparation obtained after two cycles of differential centrifugation. 50.000 : 1.



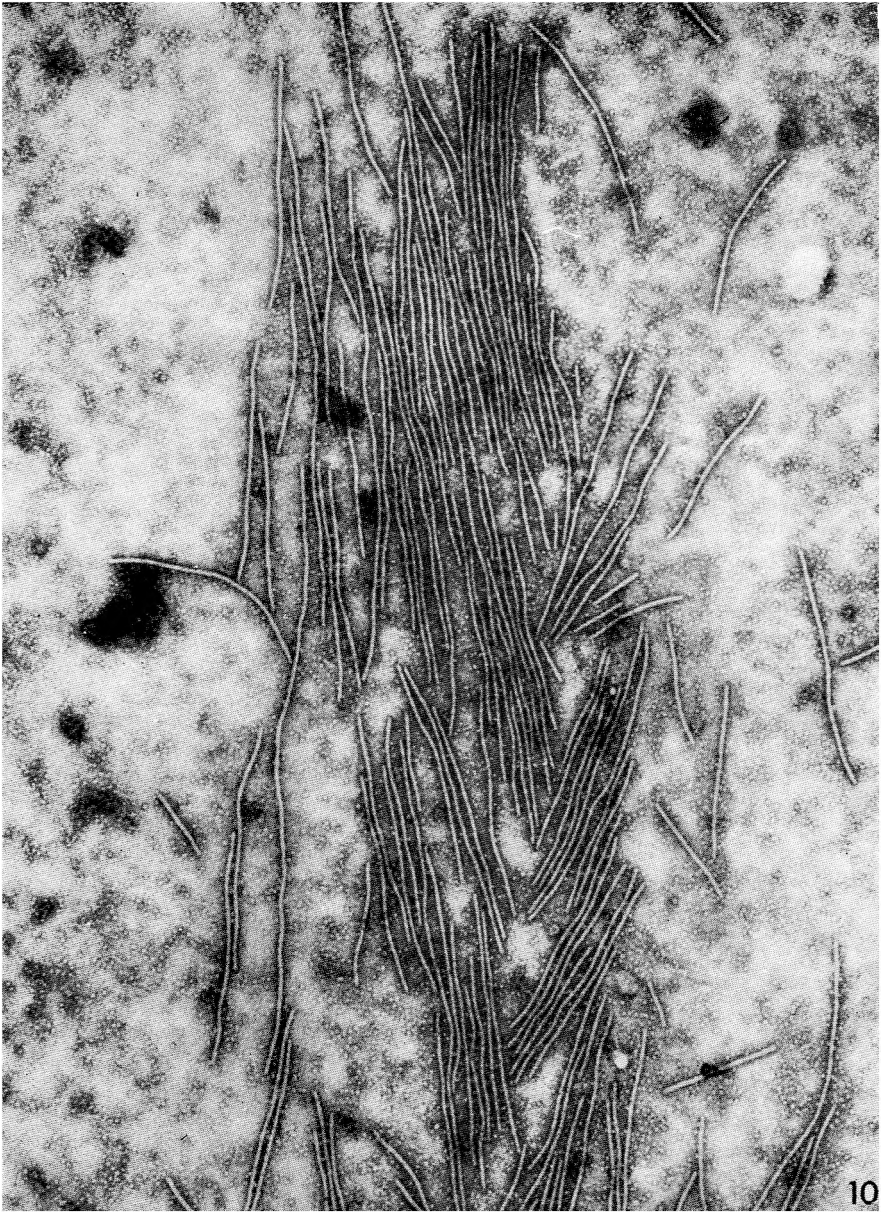
Sl. 1—4. — Fig. 1—4.



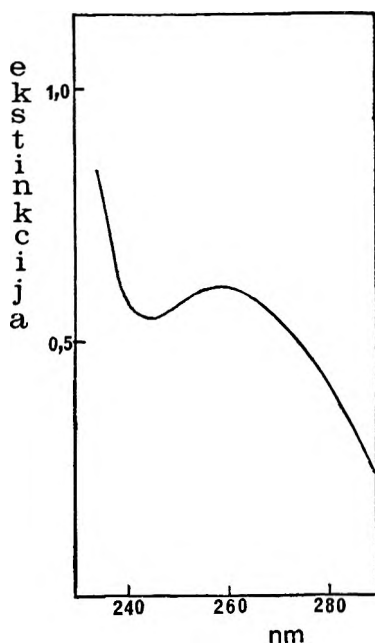
Sl. 5—8. — Fig. 5—8.



Sl. 9. — Fig. 9.



Sl. 10. — Fig. 10.



Sl. 11. Ultravioletni apsorpcijski spektar virusnog preparata prikazanog na sl. 10.

Fig. 11. UV absorption spectrum of the virus preparation represented in Fig. 10.

Svojstva virusa in vitro

Krajnja točka razrjeđenja. Sok zaraženog celera razrijeđen 0,06 M fosfatnim puferom pH 7,7 bio je još infektivan pri razrjeđenju od 10^{-3} , ali je izgubio infektivnost pri razrjeđenju od 10^{-4} .

Stabilnost virusa. Infektivnost soka izgubila se nakon grijanja od 10 min na 55 do 60° C, ili nakon stajanja četiri dana u zataljenim epruvetama pri sobnoj temperaturi. U sasušanim listovima celera čuvanim pri temperaturi od 4° C infektivnost se sačuvala i nakon godinu dana.

Elektronska mikroskopija

Snimci virusnih čestica na elektronskom mikroskopu pokazali su da ispitivani virus ima čestice dužine 740 nm i debljine 13,5 nm (sl. 10). U tkivu inokulirane biljke *Anthriscus cerefolium* nađene su uklopine »pinwheel« karakteristične za skupinu poti-virusa (sl. 9) (E d w a r d s o n et al. 1968).

Purifikacija

Djelomično purificirani virusni preparat, dobiven postupkom direktne koncentracije virusa iz klarificiranog soka s pomoću diferencijalne centrifugacije, sadržavao je mnogo virusnih čestica, ali i dosta nečisti. Postupak obaranja virusa iz klarificiranog soka s pomoću PEG-a dao je manje nečisti, ali i manje virusnih čestica. Postupkom klarifikacije s pomoću kloroforma bez prethodnog grijanja postiže se bolje uklanjanje nečistoća, a virusne čestice su manje agregirane. Ultravioletni apsorpcijski spektri purificiranih virusnih preparata bili su karakteristični za nukleoproteine. Maksimalum apsorpcije bio je na 258—260 nm, a minimum na 240—245 nm (sl. 11).

Purifikacija prema Shepardu i Groganu (1967, 1971) nije zadovoljavala, jer su se virusne čestice znatno agregirale i zaostajale u talogu nakon niskoturažnog centrifugiranja. Dio virusnih čestica vjerojatno se izgubio i u toku klarifikacije, jer upotrijebljeni puferi nisu sadržavali tvari za sprečavanje procesa oksidacije i agregacije virusa.

Serološki pokusi

Sirovi sok zaraženog celera obrađen etanolaminom i Na-dodecilsulfatom nije reagirao s homolognim antiserumom. Do formiranja precipitacijske linije u gelu nije došlo niti nakon dva tjedna, što znači da cijepanje virusa kemijskim postupkom nije uspjelo.

Klarificirani sok obrađen 30 sek ultrazvukom stvarao je s homolognim antiserumom u agar-gelu precipitacijsku liniju samo u slučaju kad je središnji bazen s virusom bio veći od bazena s antiserumom (sl. 7). Djelomično purificirani virusni preparat obrađen ultrazvukom 30 sek reagirao je s homolognim antiserumom dajući dobro vidljivu liniju precipitacije (sl. 8). Isti virusni preparat u imunodifuzijskom pokusu reagirao je s oba engleska seruma (a i b) protiv izolata CeMV iz celera do razrjeđenja seruma 1:8 (a), odnosno 1:4 (b); s antiserumom (c) izolata iz korijandra nije reagirao. Sa serumom protiv talijanskog izolata reagirao je do razrjeđenja 1:4. Sa serumom protiv njemačkog izolata CeMV, prema pismenom saopćenju dra Wolfa, reagirao do razrjeđenja 1:64. Ti rezultati upozoravaju na to da je izolat iz pastrnaka srodan, ali ne i istovjetan, s engleskim, talijanskim i njemačkim izolatom CeMV iz celera.

Diskusija

CeMV vrlo je rasprostranjen virus štitarki. Njegovom velikom rasprostranjenju pridonose lisne uši kao i okolnosti da se štitarke uzgajaju kao dvogodišnje kulture. Samonikle štitarke često su okužene tim virusom i predstavljaju stalan izvor zaraze.

CeMV izoliran je u raznim zemljama iz različitih vrsta štitarki. Izdvojen je već bio i iz pastrnaka (Walkey i Cooper 1971), ali svojstva tog izolata nisu opisana. Pojedini izolati razlikuju se uglavnom po simptomima i krugu domaćina. Većina izolata ima krug domaćina ograničen na štitarke koje su sistemski zaražene (Brandes i Luisoni 1966, Purcifull i Shepard 1967, Marchoux et al. 1969, Walkey i Cooper 1971, Avgelis i Quacquarelli

1972). Međutim njemački izolat iz celera (Wolf 1968) te kalifornijski izolati iz kukute (*Conium maculatum*) i peršuna (*Petroselinum crispum*), (Sutabutra i Campbell 1971) izazivaju lokalne simptome na biljkama *Chenopodium amaranticolor* i *Ch. quinoa*. Izolat iz pastrnaka ograničen je na štitarke, ali na biljci *Ammi majus* pored sistemične zaraze izaziva i lokalnu reakciju što nije slučaj s drugim izolatima. Ništa nije poznato postoje li serološke razlike između pojedinih izolata CeMV.

Virus mozaika celera vrlo je rasprostranjen na pastrnaku u okolici Zagreba, a vjerojatno i na drugim štitarkama.

Ovo je prvi nalaz CeMV u Jugoslaviji, a ujedno i prvi prilog poznavanju virusa štitarki u nas.

Z a k l j u č a k

Iz biljke *Pastinaca sativa* L. izoliran je nitasti virus koji je identificiran kao soj virusa mozaika celera (celery mosaic virus, CeMV) prema simptomima na pokusnim biljkama, krugu domaćina, svojstvima *in vitro*, dimenziji čestica i serološkim pokusima. Prenosio se lako sokom i zelenom lisnom uši *Myzus persicae* na neperzistentan način. Za purifikaciju tog virusa primjenjeni su različiti postupci koji su se razlikovali s obzirom na upotrijebljeni pufer za ekstrakciju virusa iz lisnog tkiva, način klarifikacije soka i koncentracije virusa iz klarificiranog soka. Najčišći virusni preparat, iako s manje virusnih čestica, dobio se kad je virus iz klarificiranog soka oboren polietilenglikolom i potom koncentriran pomoću dva ciklusa diferencijalne centrifugacije. Više virusnih čestica, ali s više onečišćenja, dobilo se kad je virus iz klarificiranog soka bio direktno koncentriran pomoću diferencijalne centrifugacije. Serološke reakcije su pokazale da je izolat CeMV iz pastrnaka srodan, ali ne i identičan, s izolatima CeMV iz Engleske, Italije i DR Njemačke. Ovo je prvi nalaz CeMV u Jugoslaviji, a ujedno i prvi prilog poznavanju virusa štitarki u nas.

*

Zahvaljujemo dru G. A. Walkeyju (Wellesbourne, Engleska) i dru A. Quacquarelliju (Bari, Italija) za antiserume, a dru P. Wolfu (Aschersleben, DDR) za izvođenje seroloških reakcija.

L i t e r a t u r a

- Avgelis, A. e A. Quacquarelli, 1972: Le virusi delle piante ortensi in Puglia. X. Il mosaico del sedano. *Phytopath. medit.* 11, 124—126.
- Brandes, J., und E. Luisoni, 1966: Untersuchungen über einige Eigenschaften von zwei gestreckten Sellerieviren. *Phytopath. Z.* 57, 277—288.
- Edwardson, J. R., D. E. Purcifull and R. G. Christie, 1968: Structure of cytoplasmic inclusions in plant infected with rod-shaped viruses. *Virology* 34, 250—263.
- Gooding, G. V. and W. W. Bing, 1970: Serological identification of potato virus Y and tobacco etch virus using immunodiffusion plates containing sodium dodecyl sulfate. *Phytopathology* 60, 1293.
- Marchoux, G., J. C. Navatel, J. Rougier et M. Duteil, 1969: Identification dans le Sud-Est de la France du virus de la mosaïque du celeri (Brandes) comparable au Western celery mosaic virus (Severin). *Ann. Phytopathol.* 1, 227—235.

- Murant, A. F. and R. A. Goold, 1968:* Purification, properties and transmission of parsnip yellow fleck, a semi-persistent aphid borne virus. *Ann. appl. Biol.* 62, 123—137.
- Murant, A. F., T. Munthe and R. A. Goold, 1970:* Parsnip mosaic virus, a new member of the potato virus Y group. *Ann. appl. Biol.* 65, 127—135.
- Purcifull, D. E. and J. F. Shepard, 1967:* Western celery mosaic virus in Florida celery. *Pl. Dis. Repr.* 50, 502—505.
- Reynolds, E. S., 1963:* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208—212.
- Shepard, J. F. and R. G. Grogan, 1967:* Partial purification, properties, and serology of Western celery mosaic virus. *Phytopathology* 57, 1104—1110.
- Shepard, J. F. and R. G. Grogan, 1971:* Celery mosaic virus. *C. M. I./A. A. B. Descriptions of plant viruses* 50.
- Sutabutra, T. and R. N. Campbell, 1971:* Strains of celery mosaic virus from parsley and poison hemlock in California. *Pl. Dis. Repr.* 55, 328—332.
- Walkey, D. G. A. and V. C. Cooper, 1971:* Effect of western celery mosaic on celery crops in Britain and occurrence of the virus in umbelliferous weeds. *Pl. Dis. Repr.* 55, 268—271.
- Watson, M., E. P. Serjeant and E. A. Lennon, 1964:* Carrot motley dwarf and parsnip mottle viruses. *Ann. appl. Biol.* 54, 153—166.
- Wolf, P., 1968:* Viruskranheiten an Knollensellerie und Möhre in Europa. *Der deutsche Gartenbau.* 15, 106—108/131—134.

SUMMARY

OCURRENCE OF CELERY MOSAIC VIRUS IN PARSNIP IN YUGOSLAVIA

Ivan Buturac, Ana Šarić and Nikola Ljubešić

(Faculty of Agriculture of the University and
Ruder Bošković Institute — Zagreb)

A filamentous virus 740 nm in length and 13.5 nm in width was isolated from parsnip (*Pastinaca sativa*) showing mosaic symptoms. The virus was easily transmissible by sap and also by aphid *Myzus persicae* in a non persistent manner. It had a restricted host range, infecting systemically only members of the *Umbelliferae* (except *Ammi majus*). In the leaf cells of *Anthriscus cerefolium* it induced the formation of pinwheel structures.

According to its properties *in vitro*, its host range, particle morphology and the serological reactions obtained it was identified as a strain of celery mosaic virus related to but not identical with the isolates from England, Italy and East Germany.

The purification treatment by chloroform clarification followed by polyethyleneglycol precipitation and concentration by differential centrifugation produced preparations free of host material although containing somewhat fewer virus particles. For obtaining a good yield of virus it was necessary to use buffers containing substances which prevent the oxidation of sap and the aggregation of virus particles.

This is the first report of celery mosaic virus in Yugoslavia.

Ivan Buturac, dipl. inž. i
prof. dr Ana Šarić
Poljoprivredni fakultet
Šimunska 25
41000 Zagreb (Jugoslavija)

Dr Nikola Ljubešić
Institut »Ruder Bošković«
Bijenička 54
41000 Zagreb (Jugoslavija)