

IZOLACIJA NEKATERIH VIRUSOV ČESNA (*Allium sativum* L.)

Irena Mavrič¹ in Maja Ravnikar¹

IZVLEČEK

Zaradi vegetativnega razmnoževanja je česen okužen s številnimi različnimi virusi, ki se s sajenjem strokov prenašajo iz generacije v generacijo. V Sloveniji smo do sedaj na česnu identificirali tri viruse iz skupine karlavirusov, dva iz skupine potivirusov in viruse, ki jih prenašajo pršice. Z inokulacijo testnih rastlin *Allium porrum*, *Allium cepa*, *Celosia argentea* var. *plumosa* in *Nicotiana occidentalis* smo uspeli osamiti navadni latentni virus česna (GCLV) in viruse, ki jih prenašajo pršice (MbFVs). Z nadaljnjo inokulacijo rastlin *Chenopodium murale* z izolatom MbFV in s prenosom posameznih lokalnih lezij na nove rastline smo osamili izolat iz te skupine virusov, ki reagira le z enim od dveh antiserumov, ki ju imamo na voljo.

Ključne besede: česen, EM, GCLV, MbFVs, osamitev virusov, testne rastline

ABSTRACT

ISOLATION OF SOME GARLIC VIRUSES

Due to the vegetative propagation, garlic is infected with many different viruses which are transmitted from generation to generation. In Slovenia we identified three carlaviruses, two potyviruses and mite-borne filamentous viruses. Garlic common latent virus (GCLV) and mite-borne filamentous viruses (MbFVs) were separated from mixed infection with inoculation of test plants *Allium porrum*, *Allium cepa*, *Celosia argentea* var. *plumosa* and *Nicotiana occidentalis*. With further inoculation of *Chenopodium murale* and single lesion transfer we obtained one isolate of MbFV, which is reacting with only one of the two antisera that we have.

Key words: electron microscopy, garlic, GCLV, MbFVs, test plants, virus separation

1 UVOD

Česen je čebulnica, ki jo uporabljamo kot začimbo v prehrani in kot sestavino v pripravkih farmacevtske industrije. V Sloveniji ga pridelujemo na 300-400 ha (Černe, 1992).

Razmnožujemo ga vegetativno s sajenjem posameznih strokov. Prav vegetativno razmnoževanje je vzrok, da se virusi, s katerimi je česen okužen, prenašajo iz generacije v generacijo.

Ekonomsko najpomembnejši virus, ki okužuje česen, je virus rumene pritlikavosti čebule (OYDV). Sodi v skupino potivirusov, prav tako kot virus rumene črtavosti pora (LYSV). Okuženost rastlin se kaže kot rumena črtavost listov, posledica pa je tudi manjši pridelek.

Za karlaviruse menijo, da niso ekonomsko pomembni. Lahko pa se pojavljajo močnejša bolezenska znamenja pri hkratni okužbi s potivirusi, kot je v primeru

¹ Inštitut za biologijo Ljubljana

okužbe z LYSV in latentnim virusom šalotke (SLV). Poleg SLV so na česnu našli še navadni latentni virus česna (GCLV) in latentni virus nagelja (CLV), ki tudi spadata v skupino karlavirusov.

Tretja skupina virusov, ki okužujejo česen še ni identificirana, v začetku pa so te viruse napačno uvrstili v skupino rimovirusov znotraj družine Potyviridae (Barg *et al.*, 1994; Van Dijk *et al.*, 1991). Za vse je značilna prečno-progasta struktura in značilna zvitost posameznih virusov. Prenašajo jih pršice, zato jih imenujemo filamentozni virusi, ki jih prenašajo pršice (MbFVs). V okuženih celicah ne najdemo značilnih inkluzij, ki jih povzročajo virusi iz družine Potyviridae, čeprav poročajo tudi o pojavljanju granularnih inkluzijskih teles v okuženih celicah šalotke, čebule in pora (Barg *et al.*, 1994; Van Dijk *et al.*, 1991). Tudi virusi iz te skupine naj na česnu ne bi povzročali vidnih znamenj okužbe, vendar to še ni dokazano. Z uporabo monoklonskih in poliklonskih protiteles so do sedaj ugotovili že vsaj pet serološko različnih tipov MbFV (Barg *et al.*, 1994). Vse opisane predstavnike treh skupin rastlinskih virusov smo identificirali tudi v Sloveniji (Ravnikar *et al.*, 1996).

Z namenom, da bi ugotovili kakšne simptome povzročajo posamezni virusi na naših sortah česna, smo z inokulacijo testnih rastlin poskušali iz mešane okužbe osamiti različne viruse.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Material

Rastline, ki smo jih uporabili kot izvorne rastline za inokulacijo testnih rastlin so bile rastline česna (*Allium sativum* L.) sorte 'ptujski spomladanski' in 'ptujski jesenski' ter rastline česna neidentificirane sorte. Inokulirali smo naslednje testne rastline: *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Celosia argentea* var. *plumosa* "Miss Nippon Mix", *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana occidentalis*, *Allium porrum* in *Allium cepa*.

2.2 Inokulacija testnih rastlin

Za mehansko inokulacijo testnih rastlin s sokom smo uporabili 0.05 M fosfatni pufer, pH 7.7 z 0.1 % cistein hidrokloridom in 0.02M fosfatni pufer z 0.01M Dieca pH 7.6. Kot abraziv smo uporabili karborund 400.

2.3 Elektronska mikroskopija

Za identifikacijo virusov v izvornih rastlinah in inokuliranih testnih rastlinah smo uporabili metodo negativnega kontrastiranja z 1% uranilnim acetatom in metodo imunske elektronske mikroskopije - dekoracije s protitelesi.

Sok rastlin smo nekaj minut inkubirali na mrežici za elektronsko mikroskopijo, sprali z bidestilirano vodo in kontrastirali z uranilnim acetatom. Pri metodi dekoracije smo sok sprali z 0.1M fosfatnim pufrom pH 6.8, nato petnajst minut na mrežici inkubirali primerno razredčen antiserum, sprali z bidestilirano vodo in kontrastirali z uranilnim acetatom.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Z uporabo imunske elektronske mikroskopije - dekoracije s protitelesi, smo ugotovili, da česen, ki smo ga kasneje uporabili za inokulacijo testnih rastlin, okužujejo

naslednji virusi: GCLV, CLV, OYDV, MbFVs, LYSV in SLV. SLV smo našli le v rastlinah neidentificirane sorte.

Z inokulacijo testnih rastlin smo želeli osamiti posamezne viruse, ki okužujejo česen. To je težko izvedljivo, kajti večina gostiteljskih rastlin je skupna več virusom. Tako smo se odločili, da inokuliramo poleg rastlin iz rodov *Chenopodium* in *Nicotiana* še rastline pora, čebule in *Celosia argentea* var. *plumosa*. Na ta način nam je uspelo osamiti GCLV in MbFV.

Na 4 od 17 inokuliranih rastlin pora smo osamili viruse, ki jih prenašajo pršice (MbFVs). V treh primerih je prišlo do prenosa vsaj dveh seroloških tipov virusa, v enem primeru pa samo enega tipa, kar smo ugotovili z imunsko elektronsko mikroskopijo. S sokom ene od rastlin pora, kjer smo osamili MbFV, smo inokulirali rastline *Chenopodium murale*, ki reagirajo na okužbo s tem virusom s tvorbo značilnih lokalnih lezij v obliki obročev na inokuliranih listih. S prenosom posameznih lokalnih lezij na nove rastline *Chenopodium murale* smo uspeli osamiti nekaj izolatov, ki reagirajo le z enim od dveh antiserumov, ki ju imamo na voljo. Vse izolate bomo primerjali med seboj in poskušali ugotoviti, ali prihaja med njimi do razlik v tipu in času pojavljanja lokalnih lezij. Lokalne lezije se pri naših izolatih začnejo pojavljati 8 - 9 dni po inokulaciji kot drobne nekrotične pike na inokuliranih listih. Kasneje se okoli njih razvijejo značilni klorotični obroči. Opazili smo, da se lezije med seboj razlikujejo po velikosti, obliki in po tem ali so nekrotične pike v sredini lezije ali ne, ugotoviti pa moramo, katere od teh razlik so pomembne za razlikovanje obeh seroloških tipov virusa.

GCLV smo uspeli osamiti na rastlinah pora, čebule in na eni rastlini *Nicotiana occidentalis*. Na rastlini *Nicotiana occidentalis* so se izrazila sistemska znamenja okužbe, ki pa so se nekoliko razlikovala od tistih, opisanih v literaturi. Znano je tudi, da vsi izolati GCLV na inokuliranih rastlinah *Nicotiana occidentalis* ne povzročajo sistemskih znamenj okužbe (Van Dijk, 1993). Virus nam je uspelo prenesti na 6 od 31 inokuliranih rastlin čebule ter na 9 od 53 inokuliranih rastlin pora. GCLV je zastopan v česnu skoraj po vsem svetu. Zelo je soroden s CLV, medtem ko ni soroden s SLV. To so ugotovili na osnovi seroloških analiz in primerjave aminokislinske sekvence plaščnega proteina (Barg *et al.*, 1995).

Z izolati GCLV še nismo inokulirali rastlin *Chenopodium murale*. Tudi GCLV na teh testnih rastlinah povzroča podobne simptome, kot jih povzročajo virusi, ki jih prenašajo pršice. Od njih se razlikuje po tem, da povzroča lokalne lezije na rastlinah *Chenopodium quinoa* in *Celosia argentea* var. *plumosa* (Van Dijk, 1993; Van Dijk *et al.*, 1991).

Ko smo v predhodnih poskusih inokulirali rastline *Chenopodium murale* s sokom dveh rastlin česna, od katerih je bil le eden okužen tudi z virusi, ki jih prenašajo pršice, smo opazili, da večina lezij postane po treh do štirih tednih nekrotičnih, medtem ko so nekatere še vedno klorotične. Te smo prenesli na *Chenopodium murale* in na njem izolirali viruse, ki jih prenašajo pršice. Glede na to, da GCLV in virusi, ki jih prenašajo pršice, povzročajo na rastlinah *Chenopodium murale* podobne lokalne lezije, je ugotavljanje razlik v tipu in času pojavljanja lokalnih lezij lahko eden od načinov razlikovanja med njimi.

4 SKLEPI

Z nadaljevanjem dela želimo osamiti še ostale viruse, ki smo jih našli v česnu. S posameznimi virusi in s kombinacijami določenih virusov bomo lahko inficirali zdrave rastline česna, ki so bile pridobljene s pomočjo termoterapije in tkivne kulture (Ravnikar *et al.*, 1994). Na ta način bomo lahko na slovenskih sortah česna opazovali vpliv okužbe na izražanje bolezenskih znakov.

5 LITERATURA

- Barg, E./Lesemann, D.-E./Vetten, H. J. 1994. Identification, partial characterisation, and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and Southeast Asia.- Acta Horticulturae, 1994, vol. 358, s. 251-258.
- Barg, E./ Lesemann, D.-E./Vetten, H. J./Maiss, E. 1995. Characterisation and detection of *Allium carlaviruses*. Proceedings of the 8th Conference on Virus Diseases of Vegetables: Advances in Vegetable Virus Research. Jul. 1995. Praga, 1995, s. 26-28.
- Černe, M. 1992. Čebulnice: čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak, šalotka.- Zbirka nasvetov 40. Ljubljana, Kmečki glas, 1992.
- Ravnikar, M./Plaper, I./Ucman, R./Žel, J. 1994. Establishment of an efficient method for virus elimination in meristem culture and regeneration of high quality plants.- Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture, Dec. 1994, Rogla, Planprint, Ljubljana, 1994, s. 97-102.
- Ravnikar, M./Mavrič, I./Ucman, R./Ivanovič, S./Kus, M./Žel, J. 1996. Virusi česna (*Allium sativum* L.) in vzgoja zdravih rastlin v tkivni kulturi.- Novi izzivi v poljedelstvu '96, zbornik simpozija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, 1996, s. 189-193.
- Van Dijk, P. 1993. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses.- Netherlands Journal of Plant Pathology, 1993, vol. 99, s. 233-257.
- Van Dijk, P./Verbeek, M./Bos, L. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae.- Netherlands Journal of Plant Pathology, 1991, vol. 97, s. 381-399.