

VIRUSNA BOLEST POLJSKOG BRIJESTA (*Ulmus minor* Mill.) U HRVATSKOJ

VIRUS DISEASE OF FIELD ELM (*Ulmus minor* Mill.) IN CROATIA

Nada PLEŠE* i Nikola JURETIĆ**

SAŽETAK: Utvrđeno je po prvi puta da je u Hrvatskoj na poljskom brijestu (*Ulmus minor* Mill.) raširena virusna bolest poznata pod nazivom **šarenilo brijesta** (elm mottle). Propadanju brijesta, pored poznate **nizozemske bolesti** (Dutch elm disease), pridonose i virusi te slični patogeni, koji smanjuju vitalnost biljke, a time i otpornost prema drugim patogenima. Zbog toga je u radu, na temelju literaturnih podataka, dan i kratak prikaz virusnih i virusima sličnih bolesti na brijestu - drvenastoj biljci koja je zadnjih desetljeća zbog napada različitih patogena postala vrlo ugrožena. Iznijeti podaci mogu biti od posebne koristi našim šumarskim fitopatolozima.

Ključne riječi: brijest, bolesti, virusi, fitoplazme.

UVOD – Introduction

Na temelju rezultata mnogobrojnih istraživanja, znanstvenici su zaključili da je današnje uginuće drveća i propadanje šuma uzrokovano sinergističkim djelovanjem mnoštva međusobno povezanih abiotičkih i biotičkih nepogoda. Susljedno novim saznanjima o propadanju šuma, u biotičke čimbenike propadanja šumskog drveća ubrojani su, pored bakterija i gljivica, također i virusi, viroidi, fitoplazme (mikoplazme) te drugi srodni ili slični patogeni (Nienhaus, 1985; Nienhaus i Castello, 1989; Juretić, 1990; Cooper 1993). Vrste roda *Ulmus* spadaju među najugroženije šumsko drveće u svijetu i u nas. Tako je i u Hrvat-

skoj rasprostranjena vrlo opasna mikoza, koju znamo pod nazivom **nizozemska bolest brijesta** (Dutch elm disease; usmeno priopćenje dr. D. Dimića, Šumarski fakultet, Zagreb), a saznajemo da i neki štetnici imaju udjela u nestajanju brijesta u nas (Gradečki i sur., 1997). Sve to ponukalo nas je da identificiramo uzročnika virusne bolesti poljskog brijesta, koju smo već prije nekoliko godina zapazili u okolici Zagreba. Osim toga, našli smo shodnim da se ukratko osvrnemo i na najvažnije virusne i slične bolesti koje su dosada nađene na brijestu u svijetu.

MATERIJAL I METODE – Material and Methods

Bolesno stablo poljskog brijesta (*Ulmus minor* Mill.) opazili smo u svibnju 1996. godine u podnožju Medvednice. Sabrali smo nekoliko grana s listovima na kojima su se nalazili virusni simptomi u obliku šarenila, u kojem su se opažale klorotične i žućkaste pjege i prstenovi (S1. 1).

Virus smo mehaničkom inokulacijom iz listova brijesta prenosili na zeljaste pokusne biljke. U tu smo svrhu mlade listove brijesta sa simptomima homogenizirali u 1/15 M fosfatnom puferu pH 7,1 koji je sadržavao desetak miligrama antioksidansa natrij-askorbata, kako bi se inhibirala oksidacija biljnog soka i gubitak infektivnosti virusnih čestica.

Pri istraživanju kruga domaćina virusa među zeljastim biljkama i simptomima na tim pokusnim biljkama, inokulume smo pripremili iz prethodno inficiranih zeljastih biljaka, i to tako da smo inokulima dodavali pufer bez antioksidansa. Naime, zeljaste biljke uglavnom

* Prof. dr. Nada Pleše, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, Marulićev trg 9a, Zagreb

** Prof. dr. Nikola Juretić, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, Marulićev trg 9a, Zagreb

ne sadrže veće količine spojeva koji bi ometali mehaničko prenošenje virusa s jedne na drugu zeljastu vrstu.

Za elektronskomikroskopsku analizu virusnih čestica služio je infektivan sok listova pokusne biljke *Chenopodium quinoa* (na kojoj je virus razmnožen) ko-

ji smo djelomično pročistili organskim otapalom (kloroform/butanol) te virus istaložili polietilenglikolom (PEG 6000) i niskookretajnim centrifugiranjem. Tim je postupkom odstranjen veći dio grubljih staničnih dijelova, kako bi virusne čestice postale uočljivije.

REZULTATI – Results

1. Izolacija i identifikacija virusa iz poljskog brijesta u Hrvatskoj

Isolation and identification of a virus from field elm in Croatia

Najpoznatija i čini se u svijetu najraširenija virusna bolest brijesta jest **šarenilo brijesta** (elm mottle). Uzrokovana je **virusom šarenila brijesta** (elm mottle virus, Jones, 1974) iz skupine ilarvirusi. To su biljni virusi koji posjeduju sferične čestice koje su po veličini i izgledu pomalo heterogene.

Simptomi se najbolje zapažaju u proljeće tek što drvo izlista. Na lisnoj plojci simptomi se vide u obliku klorotičnih i žučkastih pjega i prstenova. Viroza je utvrđena na vrstama *Ulmus glabra* i *U. carpinifolia* (= *U. minor*) u Bugarskoj, Čehoslovačkoj, Rusiji, Njemačkoj i Velikoj Britaniji (Schmelzer i sur., 1966; Schmelzer, 1969; Jones i Mayo, 1973).

Virusni izolat iz poljskog brijesta s podnožja Medvednice izdvojen je iz stabla koje je bilo u vrlo slaboj kondiciji. Pojedine grane su se osušile, a listovi su na nekim granama nosili tipične prije opisane simptome (Sl. 1). Virus smo uspjeli izdvojiti mehaničkom inokulacijom na zeljaste pokusne biljke u proljeće, i to iz razvijenih mladih listova na kojima su se vidjeli simptomi. Iz pupova virus nismo uspjeli izdvojiti, iako se taj način vrlo često primjenjuje upravo pri izolaciji virusa iz drvenastih biljaka. Naime, lisni pupovi sadrže manje fenolnih spojeva koji oksidacijom mogu inaktivirati virus i onemogućiti njegovo prenošenje. Očito je da je u našem slučaju koncentracija virusa u mladim pupovima bila nedovoljna za mehaničko prenošenje virusa.

Postupak izolacije virusa iz brijesta tekao je tako, da smo infektivnim sokom listova brijesta natrljali listove zeljaste biljke *Chenopodium quinoa* posute abrazivom. Nakon tjedan dana pojavile su se na nekim od natrljanih listova po jedna do dvije žučkastoklorotične virusne lezije. Izdvajanjem dobivenih lezija i ponovnom inokulacijom virus je razmnožen na istoj zeljastoj vrsti. Pri nižim stakleničkim temperaturama virusni simptomi u obliku žute pjegavosti pojavili su se i na neinokuliranim gornjim listovima pokusne vrste *Ch. quinoa* (Sl. 2), što je bio dokaz da niže temperature pogoduju



Slika 1. List poljskog brijesta (*Ulmus minor* Mill.) sa simptomima klorotične pjegavosti koju uzrokuje virus šarenila brijesta (elm mottle virus).

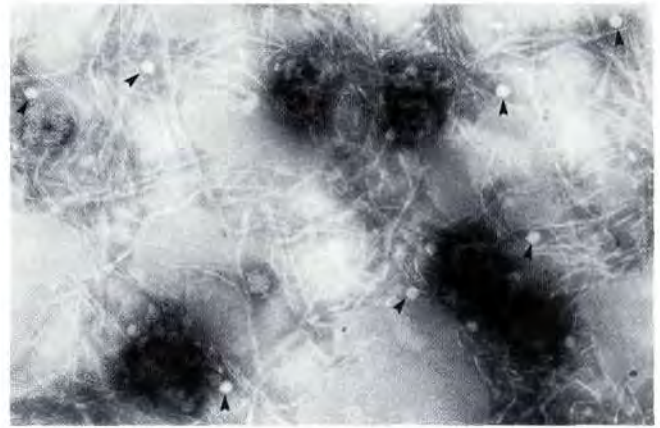


Slika 2. Klorotična pjegavost na listovima pokusne biljke *Chenopodium quinoa* sistemski zaražene virusom šarenila brijesta (elm mottle virus).

sistemičnoj zarazi pokusne biljke. S biljke *Ch. quinoa* virus je dalje prenesen na druge pokusne vrste. Na vrstama *Ch. amaranticolor*, *Ch. murale* i *Tetragonia expansa* nastala je lokalna infekcija, tj. samo na inokuliranim listovima razvile su se brojne klorotične virusne lezije. Duhani *Nicotiana clevelandii*, *N. megalosiphon* i *N. tabacum* "Samsun" reagirali su latentnom lokalnom infekcijom.

Elektronskomikroskopskom analizom djelomično pročišćenog infektivnog biljnog soka, utvrđene su u pripravku okrugle virusne čestice promjera od oko 25-30 nm (Sl. 3).

Sudeći po izgledu virusnih simptoma na matičnom stablu brijesta, po reakciji i simptomima zeljastih pokusnih biljaka te po izgledu i veličini izoliranih virusnih čestica (Jones, 1974), virozno je stablo brijesta *U. minor* s podnožja Medvednice također zaraženo **virusom šarenila brijesta** (elm mottle virus).



Slika 3 Elektronskomikroskopska snimka sferičnih čestica (strelice) virusa šarenila brijesta (elm mottle virus) u djelomično purificiranom soku listova pokusne biljke *Chenopodium quinoa*.

2. Pregled drugih virusnih i sličnih bolesti brijesta

Review of other virus and virus-like diseases of elm

Budući da se u nas malo istraživača bavi virusnim bolestima biljaka, a osobito je malo onih čiji su predmet istraživanja virusne bolesti drveća, navest ćemo ukratko virusne i fitoplazmatske bolesti brijesta koje su dosad nađene na toj drvenastoj biljci. Osim već opisane virusne bolesti **šarenila brijesta** (elm mottle), koju smo kako smo naveli u prvom dijelu ovoga članka našli i u Hrvatskoj, to su još i sljedeće opisane bolesti brijesta. Simptomi se zapažaju ili na listovima, ili na stablu i listovima.

A. Bolesti lista – (*Foliage diseases*)

Prugavost brijesta (elm stripe)

Bolest je opisana u Njemačkoj na vrsti *U. glabra* (Schmelzer i sur., 1966). Simptomi se vide kao pjegavost te klorotična i nekrotična prugavost na plojci i duž glavne žile lista (Sl. 4). Iz listova s navedenim simptomima izoliran je **elm mottle virus**, a u soku brijesta nađene su i **produžene fleksibilne virusne čestice** od oko 750 nm (Schmelzer, 1969). Nije rasvijetljeno je li uzrok bolesti sinergističko djelovanje smjesne virusne infekcije.

Mozaik brijesta (elm mosaic)

To je virusna bolest koja je zabilježena u više država SAD, i to na vrsti *U. americana* (Swingle et al., 1941 i 1943).

Opisani simptomi variraju od pojave abnormalno velikih tamno zelenih listova, smanjenih listova sa simptomima pjegavosti i deformacijama do žutozelenog šarenila ili klorotične prstenaste pjegavosti. Kora i drvo bolesnih stabala postaju krhki i stabla naginju postup-

nom sušenju. Budući da je sindrom mozaične bolesti bio prenosiv cijepljenjem, ali ne uvijek i inokulacijom infektivnog soka, to je vrlo vjerojatno da je većina zapažanja učinjena na stablima koja su bila zaražena različitim patogenima ili smjesnom infekcijom. Zabilježeno je prenošenje virusa sjemenom, a bilo je indicija da dolazi i u polenu.

Iz brijestova s mozaičnim simptomima izoliran je izometričan virus koji je dao serološku reakciju s nepovirusom, poznatim pod nazivom **uvijenost lista trešnje** (cherry leaf roll virus) (Jones i Murant, 1971).



Slika 4. Prugavost brijesta (elm stripe); klorotična i nekrotična prugavost na plojci i duž glavne žile lista (prema K. Schmelzeru, 1977).

B. Bolesti stabla – (*Stem diseases*)

Zonirani rak brijesta (elm zonate cancer)

Bolest je zabilježena na brijestu *U. americana* u SAD (Swingle i Bretz, 1950). Nije zapažena u prirodi, već je utvrđena na nekim stablima pri pokusima prenošenja mozaika brijesta cijepljenjem.

Simptomi su se javljali na površini kore u obliku uzdignutih svjetlijih i tamnijih koncentričnih prstenova (Sl. 5), koji su postupno prelazili u nekrotični rak, sežući u drvo i uzrokujući uginuće dijelova krošnje. Gljivično oboljenje nije utvrđeno, pa je zaključeno da je uzročnik latentan u brijestu, a bolest rezultat kombinacije dvaju ili više patogena.



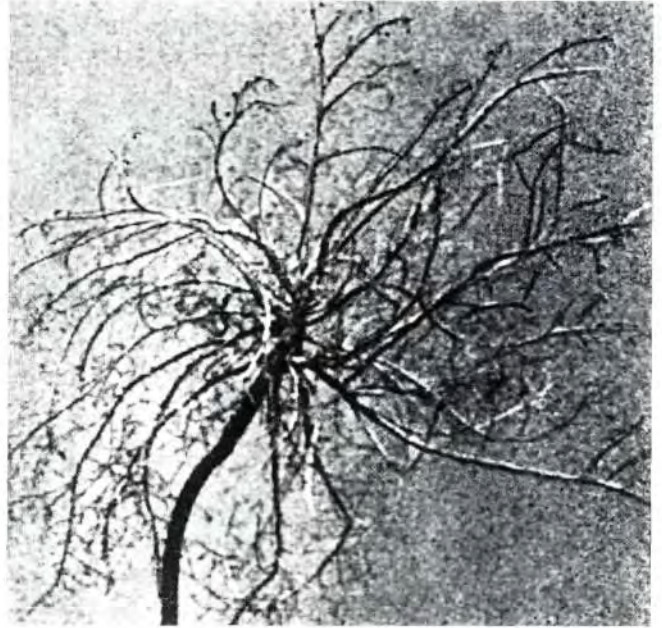
Slika 5. Zonirani rak brijesta (elm zonate cancer); simptomi u obliku koncentričnih uzdignuća na kori brijesta (prema J. S. Cooperu, 1993).

Bolest vještice metle brijesta (elm witches broom)

Bolest je zapažena na vrsti *U. carpinifolia* (= *U. minor*) u Italiji (Gualaccini, 1963), Čehoslovačkoj (Bojnansky, 1969) i Velikoj Britaniji (Cooper, 1993), a vjerojatno dolazi i drugdje budući da se simptomi mogu maskirati.

Simptomi su obilježeni vrlo smanjenim klorotičnim listovima na skraćenim internodijima grančica, pa se listovi nalaze u tzv. rozeti. Stanice asimilacijskog parenhima lisne plojke se skraćuju, zbog čega se sve manje razlikuju od stanica transpiracijskog parenhima. Dolazi i do kasnog, ljetnog istjerivanja novih slabih ograna-

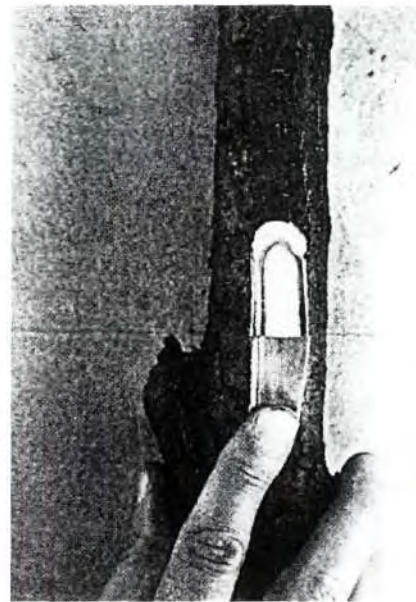
ka, tako da krošnja poprima grmolik izgled (Sl. 6). Grane se suše i postupno dolazi do uginuća cijelog stabla. Uzročnik nije identificiran, ali simptomatologija odgovara mikoplazmozama, tj. bolestima koje uzrokuju biljne mikoplazme, tj. **fitoplazme**.



Slika 6. Simptom vještice metle brijesta (elm witches broom); krošnja stabla je grmolika zbog skraćenih internodija i prekomjernog broja ogranaka (prema K. Schmelzeru, 1977).

Nekroza floema brijesta (elm phloem necrosis)

Bolest je opisana na brijestu *U. americana* u više država SAD (Bretz i Swingle, 1946; Swingle i sur., 1949; Seliskar, 1966; Sinclair, 1972 i dr.).



Slika 7. Nekroza floema brijesta (elm phloem necrosis); na oguljenom dijelu kore vidi se smeđe obojenje floema (prema J. S. Cooperu, 1993).

Simptomi se javljaju u obliku žućenja i kovrčanja listova koji zatim kolabiraju, suše se i otpadaju. Ako proces započinje u proljeće, tada najčešće tijekom ljeta propada i cijelo stablo. Floemsko tkivo kore stabla i korijena odumire (nekrotizira) i poprima tamno smeđu boju (Sl. 7).

Bolest se prenosi cijepljenjem i cikadama (cvrčcima). Uzročnik je identificiran neizravno. Naime, opće

je poznato da bolesti koje se prenose cikadama i koje pokazuju k tome simptome žutice i nekrozu floema, a ne mogu se prenijeti mehaničkom inokulacijom, predstavljaju mikoplazmatske, a ne virusne bolesti. Kad su bolesna stabla u SAD bila tretirana tetraciklinom, došlo je do remisije simptoma i kratkog oporavka, što dokazuje da je uzročnik nekroze floema brijesta **fitoplazma**.

RASPRAVA – Discussion

Općenito je poznato za virusne bolesti drveća i grmlja da u određeno doba godine njihovi simptomi mogu iščeznuti, tako da nema vidljivih znakova bolesti; može se dogoditi i da virus ostane stalno latentan u biljci (Schmelzer, 1977; Cooper, 1993). Pri maskiranim infekcijama obično se simptomi javljaju u proljeće na mladim razvijenim listovima, i to često samo na pojedinim ograncima i dijelovima krošnje. Povišenje temperature prema ljetu inhibira razmnožavanje i širenje virusa, pa simptomi iščezavaju, da bi se eventualno opet pojavili krajem ljeta.

Tako je bilo i u slučaju naše viroze *elm mottle* na brijestu *Ulmus minor* s podnožja Medvednice. Virus smo mogli izolirati u proljeće samo iz razvijenih listova prekrivenih simptomima, koji se kasnije na novorazvijenim listovima nisu pojavljivali. Vjerojatno je u pupovima bila premala koncentracija virusa za uspješnu izolaciju.

Na temelju istraživanja simptoma bolesti na brijestu vrste *Ulmus minor* koji je rastao u okolici Zagreba, te na temelju rezultata preliminarnih istraživanja izdvojenog virusa, zaključili smo da opisanu bolest na poljskom brijestu u Hrvatskoj uzrokuje **virus šarenila brijesta** (*elm mottle virus*; Jones, 1974). Uostalom, šarenilo brijesta dosta je raširena viroza i u ostalim dijelovima Europe.

Spomenimo da same virusne infekcije, iako štete drveću, uglavnom (nasuprot mikoplazmozama ili mikozama) nisu letalne za drvenaste biljke. Virusne bolesti samo smanjuju, i to značajno, vitalnost drveća, tako da

su takva stabla osjetljivija na infekcije drugim virusom, ili nekim drugim patogenom te su podložnija tzv. oportunističkim bolestima. Sinergističko djelovanje dvaju ili više biotičkih čimbenika ili njihove kombinacije s abiotičkim utjecajima svakako mogu dovesti do postupnog odumiranja stabala i propadanja šuma. Naš virozni brijest sa svojim osušenim dijelovima krošnje vjerojatno je bio zaražen još nekim patogenom, jer sam **elm mottle virus** ne izaziva tako drastične simptome. Sudeći po variranju simptoma niti *elm mosaic* u Americi (Cooper, 1973) nije rezultat utjecaja samo jednog patogena. Moguće je da je u propadanje brijesta upleten i neki od abiotičkih čimbenika.

Što se tiče istraživanja virusa šumskih ekosustava, u nas je dosad vrlo malo učinjeno. Istraživane su viroze na svega nekoliko šumskih drvenastih biljaka (Juretić i sur., 1996), a o nalazu virusa u šumskom tlu tek je na raspolaganju jedan rad (Pleše i sur. 1996.). Prema tomu, gotovo se ništa ne zna o rasprostranjenosti virusa u našim šumskim ekosustavima, pa se o udjelu virusa u propadanju šuma u nas može samo nagađati.

ZAHVALA – Acknowledgment

Zahvaljujemo prof. dr. Mercedes Wrischer (Institut "R. Bošković") za elektronskomikroskopsku analizu virusnog pripravka i tehničarki Darinki Belošević za kompjutorsko oblikovanje teksta.

LITERATURA – Literature

- Bojnansky, V. (1969): Elm witches-broom - a new virus disease in Czechoslovakia. Proc. 6th Conf. Czech. Plant Virologists, Olomouc, 1967, 211-213.
- Bretz, T. W., Swingle, R.U. (1946): Known distribution of phloem necrosis of the American elm. Plant Dis. Repr. 30, 156-159.
- Gradečki, M., Poštenjak, K., Hrašavec, B. (1997): Početna istraživanja cvatnje i plodonošnja grupe stabala poljskog brijesta (*Ulmus minor* Mill.) u istočnoj Hrvatskoj. Zbornik sažetaka priopćenja Šestog kongresa biologa Hrvatske, Opatija, str. 181. Hrvatsko biološko društvo, Zagreb.
- Cooper, J. I. (1993): Virus Diseases of Trees and Shrubs. Chapman and Hall, London, Glasgow, New York etc.
- Gualaccini, F. (1963): Primi risultati di esperienze su scopazzi foglie ad imbuto ed altro anomalie

- dell' olmo campestre (*Ulmus campestris* L.) Boll. Staz. Patol. veg. Roma, 21, Ser. 31, 25-43.
- Jones, A. T. (1974): Elm mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 139, 4 str.
- Jones, A. T., Mayo, A. F. (1973): Purification and properties of elm mottle virus. Ann. Appl. Biol. 75, 347-357.
- Jones, A. T., Murant, A. F. (1971): Serological relationship between cherry leaf roll, elm mosaic and golden elderberry viruses. Ann. Appl. Biol. 69, 11-14.
- Juretić, N. (1990): Virusi i šumsko drveće. Šumarski list 3-5, 171-180.
- Juretić, N., Mamula, Đ., Pleše, N. (1996): Biljni virusi u tlu i vodi nekih šumskih ekosistema Hrvatske s pregledom virusa nađenih u šumskom i ukrasnom drveću. Šumarski list 11-12, 477-485.
- Nienhaus, F. (1985): Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. Experientia 41, 597-603.
- Nienhaus, F., Castello, J. D. (1989): Viruses in forest trees. Ann. Rev. Phytopathol. 27, 165-186.
- Pleše, N., Juretić, N., Mamula, Đ., Polak, Z., Krajačić, M. (1996): Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia. Phytion (Horn, Austria) 36, 135-143.
- Schmelzer, K. (1969): Das Ulmenscheckungs - Virus. Phytopath. Z. 64, 39-67.
- Schmelzer, K. (1977): Zier-, Forst- und Wildgehölze. In: Pflanzliche Virologie (Ed. M. Klinowski), Band 4, 276-405.
- Schmelzer, K., Schmidt, H. E., Schmidt, H. B. (1966): Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen, Arch. Forstw. 15, 107-120.
- Seliskar, C. E. (1966): FAO/IUFRO Symposium on internationally dangerous forest diseases and insects 44, Oxford 1964. (FAO/FOREST 64-65, 1966).
- Sinclair, W. A. (1972): Phloem necrosis of American and slippery elms in New York. Plant Dis. Repr. 56, 159-161.
- Swingle, R. U., Bretz, T. W. (1950): Zonate cancer, a virus disease of American elm. Phytopathology 40, 1018-1022.
- Swingle, R. U., Tilford, P. E., Irish, C. F. (1941): A transmissible mosaic of American elm. Phytopathology 31, 22.
- Swingle, R. U., Tilford, P. E., Irish, C. F. (1943): A graft transmissible mosaic of American elm. Phytopathology 33, 1196-1200.
- Swingle, R. U., Witten, R. R., Joung, H. C. (1949): The identification and control of elm phloem necrosis and Dutch elm disease, Spec. Circ. Ohio Agric. Exp. Stn. No. 80.

SUMMARY: For the first time virus disease elm mottle of the field elm (Ulmus minor Mill.) is stated in Croatia. The virus was isolated on herbaceous test plants and investigated.

Beside the well-known Dutch elm disease virus and virus-like pathogens, which decrease vitality and resistance of the plant, are also responsible for the widely distributed elm decline. Therefore, in this paper short review of virus and virus-like diseases of elm is given. The information could be especially useful for our forest phytopathologists.