

## I. POBEGAJLO

### SEROLOŠKA ISPITIVANJA ŠARKE ŠLJIVE

Sadržaj: I Viroze voćaka — II Šarka šljive — III Fitopatogeni virusi i njihove osobine — IV Serološka ispitivanja virusa — 1 Opšti pojmovi iz serologije i terminologija — 2 Istorijat seroloških ispitivanja fitopatogenih virusa — 3 Tehnika dobijanja antiseruma fitopatogenih virusa — V Serološka ispitivanja šarke šljive — 1 Materijal i način ispitivanja — 2 Imunizacija i superimunizacija virusom šarke — VI Rezultati seroloških ispitivanja šarke — VII Zaključak — VIII Literatura — IX Summary.

#### I — Viroze voćaka

Viroze voćaka, izuzev nekolicine viroza roda *Prunus* (uglavnom viroza bresaka), slabo su proučene. Različne hloroze, slabo cvetanje, sterilnost, opadanje plodova, razne pegavosti (mozaik), kržljanje i slične pojave obično se pripisuju raznim spoljašnjim uzrocima (osobinama zemljišta, klimatskim prilikama, sortnim odlikama i dr.). Međutim, dublja ispitivanja u mnogim od ovih slučajeva pokazuju da su u pitanju virusna oboljenja. Nasuprot ovome, viroze drugog kulturnog bilja (krompira, duvana, paradajza i dr.) vrlo su dobro proučene i još se dalje detaljnije i svestrano proučavaju. Virozama, pak, voćaka, tek se u poslednje vreme posvećuje malo veća pažnja. Poslednjih desetak i nešto više godina pojavilo se nekoliko radova o virozama voćaka kod nas, a još ranije u susjednoj Bugarskoj, kao i u inostranstvu. Radovi bugarskih stručnjaka treba da nas naročito interesuju, pošto je Bugarska naš najbliži sused, a klimatske i poljoprivredne prilike Jugoslavije i Bugarske veoma su slične. Ipak broj radova i podaci o virozama voćaka mnogo zaostaju iza podataka o drugim virozama bilja. Ovo dolazi usled toga što je eksperimentalno proučavanje virusnih oboljenja voćaka dugotrajno, jer su voćke dugogodišnje biljke i što se virus u njima sporije širi i često docije ispoljava nego kod zeljastih biljaka. Voćke se teško gaje u staklarama i, uopšte uzev, celokupni rad oko njih skuplji je i komplikovaniji.

U voćarstvu se štetnost viroza povećava time što su voćke mnogogodišnje i skupe biljke, koje su podložne zaražavanju virusom u toku svog dugog života, kod kojih virus duže vremena može da se razvija i da se potencira a da ne bude primetan. Osim toga, način gajenja voćaka (kalem-ljenjem i izdancima) takođe naročito potstiče širenje viroza. U zaraženim voćkama virus se često sporo širi (osobine viroza su da se virus uopšte sporo širi u starijim tkivima), obuhvatajući celu voćku tek u toku 2—3 i više godina. Ovo povećava štetnost viroza kod voćaka, jer bolesti mogu duže vremena da ostanu neprimećene i da služe kao izvor zaraze za druge voćke.

## II — Šarka šljive

Jedna viroza šljive koja ima veliki ekonomski značaj, sticajem okolnosti (masovno gajenje šljive i postojanje veoma osetljive sorte požegače) proširila se na znatni deo Balkanskog Poluostrva. Još ne možemo tačno sagledati sve posledice njene masovne pojave u našim krajevima. Da se te posledice dobro uoče, treba da prođe više vremena. Ali, i ono što se u toku poslednjih 10—15 godina zapaža, daje povoda velikoj zabrinutosti. Problem je veoma krupan. Njegovom rešenju treba da pristupe ne samo stručnjaci-fitopatolozi nego i stručnjaci voćarstva, kao i merodavni faktori koji, u krajnjoj liniji, rukovode voćarstvom i određuju pravac njegovog budućeg razvitka.

Šarka se pod raznim nazivima u stranoj literaturi spominje odavno (18, 29, 4). Ali, kao rasprostranjena i ekonomski važna bolest, ona se pojavila u velikoj meri samo u Bugarskoj i Jugoslaviji (verovatno pre Prvog svetskog rata, iako je obratila na sebe veću pažnju stručnjaka tek nekoliko godina pre Drugog svetskog rata). U Jugoslaviji, kao i u Bugarskoj, bolest uzima takve razmere da nije isključeno da će se kroz desetak godina i samo postojanje šljivarstva, kao važne i rentabilne poljoprivredne grane, dovesti u pitanje.

Uzročnik bolesti je **Prunus virus 7 A. Chr. (Plum pox virus — Annulus pruni. Syn.: Marmor persicae Holmes).**

A t a n a s o v, koji je prvi dokazao (1932 g.) virusnost šarke, smatrao je (4, 7, 18) da od šarke obolevaju: šljiva, kajsija, breskva, trešnja, višnja, džanarika i još druge vrste roda **Prunus**. Polazeći od ovog naveo sam (1939 g., 30) mozaične bolesti na breskvi i trešnji, kao viroze koje su prouzrokovane istim virusom kao i šarka šljive. Međutim, posle detaljnijih istraživanja rejona, gde se šarka šljive pojavila u velikoj meri, već je 1940 g. iskrslo pitanje: zašto virus šarke ne prelazi tako lako na druge koštičave voćke? Po ovome bi se moglo zaključiti da je kod drugih voćaka u pitanju neki drugi virus. Na osnovu ovog 1940 g. izneo sam mišljenje da »kod nas šarka raznog drugog koštuničavog voća, osim šljive, zasada nema nikakvog praktičnog značaja, jer je u celoj zemlji nađeno samo 25—30 obolelih voćaka« (31, str. 27).

U određivanje virusa šarke uneo je više jasnoće H r i s t o v (20, 21). On je odvojio virus šarke šljive (**Prunus virus 7**), kao i samu bolest, od grupe drugih viroza — mozaika breskve i drugih vrsta **Prunus (Prunus virus 5)** i od treće grupe viroza — mozaika koji, osim mozaičnosti pokazuju i deformaciju lišća (**Prunus virus 6**). Kod šarke šljive H r i s t o v razlikuje širokoprugastu šarku (širina pruga od 2—15 mm), koja bi se mogla nazvati prava šarka, čiji je uzročnik **Prunus virus 7**, i uskoprugastu šarku (širina pruga 0,5—2 mm, retko 3 mm), čiji je uzročnik **Prunus virus 7a** (verovatno varijetet **Pr. virus 7**). Bolest, koja nanosi velike štete i o kojoj se sada najviše raspravlja, jeste prava šarka (**Pr. virus 7**). Verovatno omaškom neki autori virus šarke šljive po klasifikaciji H o l m e s'a nazivaju **Marmor cerasi**. U svojoj klasifikaciji (1944 odnosno 1948, 10) virus šarke H o l m e s (citirajući Hristova) nazvao je **Marmor persicae**, tj. identifikovao ga je sa virusom koji uzrokuje mozaik breskve (**Peach-mosaic virus**), što svakako nije ispravno i ne odgovara rezultatima istra-

živanja Hristova. Mislim da je zasada najbolje smatrati da ovaj virus nije ušao u klasifikaciju Holmes-a.

Osim domaće šljive (*Prunus domestica*) šarka (*Prunus virus 7*) napada trnošljivu (*Pr. insititia*), kajsiju (*Pr. armeniaca*), džanariku (*Pr. cerasifera* = *Pr. mirabolana*) i jednu ukrasnu šljivu (*Pr. triloba*). Druge vrste koštičavih voćaka i bresaka (*Pr. persicae*), trešnju (*Pr. avium*), višnju (*Pr. cerasi*) i badem (*Pr. amygdalus*), po ispitivanjima Hristova, šarka ne napada.

**Pojava bolesti u Jugoslaviji.** Prvi put bila je obraćena pažnja na šarku šljive 1935 g. Docije su objavljeni bliži podaci o mestima pojave, intenzitetu i štetnosti bolesti. Bilo je utvrđeno da je pojava šarke kod nas mnogo starijeg datuma nego što se ranije mislilo. Ispitivanja pre i posle Drugog svetskog rata ustanovila su da je bolest, u manjoj ili većoj meri, zahvatila gotovo celu teritoriju uže Srbije, utvrđena je u nekoliko mesta severnije od Beograda, rasprostranila se u više rejona na teritoriji Makedonije, u nekoliko mesta u istočnim krajevima Crne Gore, u više rejona Bosne i Hercegovine (Sarajevo, Visoko i dr.) i u jednom mestu Hrvatske (Nova Gradiška). Ukupno uzev, broj obolelih ili ugroženih stabala iznosi nekoliko miliona. Bolest već nanosi našem šljivarstvu velike štete. Ubuduće će se sa rasprostranjenjem bolesti i povećavanjem njenog intenziteta, štetnost šarke sve više povećavati. Po svemu sudeći, šarka šljive sada predstavlja najvažniji problem našeg voćarstva.

### Kratak opis bolesti

**Znaci na lišću.** Na lišću obolelih stabala pojavljuju se manje ili više uočljive šare otvorenozeleno boje. Najsigurniji je znak šarke pojava kružnih, prstenastih pega (okruglih pega otvorenozeleno boje sa tamnijim centrom). Lišće se normalno razvija i ujesen normalno opada. Habitus obolelih voćaka nije izmenjen.

**Znaci na plodovima.** Štetnost šarke ispoljava se u oboljenju plodova. Znaci su veoma karakteristični. Obično promene nastupaju kada plodovi dostignu normalnu veličinu i obično oko 15—20 dana pred sazrevanje. Još u zelenim plodovima pojavljuju se gromuljice smole, a docije nekrotirana ili rdasta mesta (crvenkastoplave boje). Mnogi plodovi pre vremena »sazrevaju«. Na površini plodova pojavljuju se karakteristična ulegnuća, koja često primaju kružni izgled. Veoma je uočljiv znak bolesti — masovno opadanje plodova pre sazrevanja. Osim ovog, plodovi su neukusni (bljutavi), bez dovoljno šećera, kiseliji, žilavi, često su sitniji i neprijatnog mirisa. Oni nisu dobri za jelo, sušenje, pekmez, kompot ili pečenje rakije.

**Prenošenje bolesti** vrši se pomoću lisne vaši (*Anuraphis padi*), kalemljenjem i izdancima zaraženih stabala. Bolest se ne prenosi semenom (koštice bolesnih voćaka daju zdrave sadnice), niti zemljištem.

### III — Fitopatogeni virusi i njihove osobine

Od vremena otkrića virusnih oboljenja biljaka bilo je izneseno oko desetak raznih pretpostavki (hipoteza) o suštini i prirodi fitopatogenih virusa. Radovi niza stručnjaka (Mulvania 1926 g., McKinney 1927 g., Vinson i Petre

1929 g., Barton-Wright i McBain 1933 g., 8) uputili su ispitivanja virusa u hemijskom smeru. Na osnovu njihovih radova sve više se dalo nazreti da su fitopatogeni virusi hemijske supstance. Preokret u poznavanju biljnih virusa napravio je rad Stanley-a (1935 g., 39), kome je pošlo za rukom da izdvoji virus mozaika duvana u čisto hemijskom stanju. Bilo je ustanovljeno da je ovaj virus nukleoproteid kristalnog oblika. Docnije je bilo utvrđeno i za druge fitopatogene viruse da su nukleoproteidi i da, po svemu sudeći, nisu živi organizmi (uzimajući u obzir definiciju života po Engelsu). Elektronski snimci omogućili su proučavanje oblika virusa. Dosada je izdvojeno u čistom stanju i manje više proučeno više od desetka fitopatogenih virusa. Verovatno će se i za druge fitopatogene viruse utvrditi slične osobine. Polazeći od rezultata ovih najnovijih istraživanja, definicija fitopatogenih virusa mogla bi da bude sledeća: fitopatogeni virusi su jednorodna (homogena) monomolekularna hemijska jedinjenja belančevinaste prirode sposobna da se samoreprodukuju u živim ćelijama biljaka, tj. da pomoću autokatalize stvaraju iz belančevina ćelica biljaka sebi istovetna jedinjenja.

Važna je odlika fitopatogenih virusa mala specifičnost, koja ih jasno odvajava od drugih uzročnika bolesti. Još i sada se ponekad iznosi mišljenje, a ima i praktičnih pokušaja da se ono dokaže, da su razni virusi u suštini jedna zarazna materija koja menja svoje osobine u zavisnosti od biljaka, sorti, ekoloških i drugih uslova. Ipak je nadvladalo mišljenje, koje se slaže sa praktičnom stvarnošću, da postoje raznovrsni i autonomni virusi sa naročitim osobinama.

U biljnoj virologiji, kao i u svakoj nauci, posle izvesnog perioda prikupljanja materijala o pojavama i pojedinim faktima, pristupilo se rešavanju problema klasifikacije virusa; odnosno virusnih bolesti. Slaba specifičnost virusa i raznovrsno ispoljavanje oboljenja, naročito podvlače važnost i teškoće rešenja ovog problema. Rad na ovome neophodan je ne samo sa teoriske nego i sa praktične tačke gledišta. Borba protiv viroza zahteva poznavanje osobina virusa, protiv koga se bore. Često razni virusi sa različitim osobinama prouzrokuju slična oboljenja. Pored toga, nije retka pojava kombinovanih viroza — kada dva, a nekad i više virusa komplikuju oboljenje, a prema tome i borbu protiv oboljenja. Postoji pojava takozvanog antagonizma virusa: biljka obolela od jednog virusa može da oboli ili da ne oboli od drugog virusa.

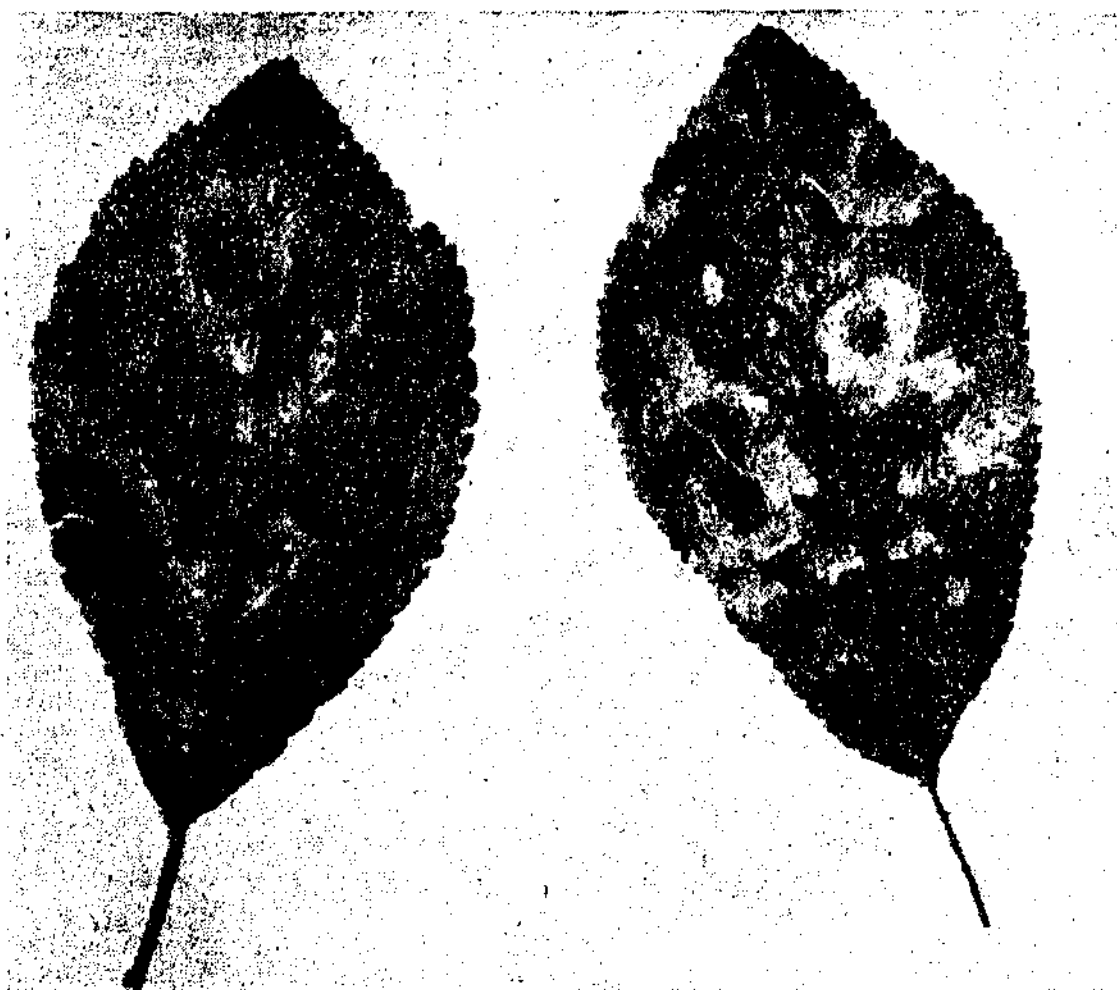
U suštini gotovo sve mere borbe kojima sada raspolažemo svode se na profilaktiku ili pronalaženje ili odgajivanje otpornih vrsta ili sorti. Od presudnog je značaja za profilaktiku znanje osobina i vrste virusa. Poznato je da je kod mikroza i bakterioza, kao i kod bolesti ili oštećenja koje prouzrokuju razne štetocine životinjskog porekla, vrlo česta pojava stroge specifičnosti imuniteta. Otpornost prema jednom parazitu ne čuva biljku od napada bliske vrste ili čak rase istog parazita. Stoga proučavanje imuniteta i selekcija imunih sorti zahteva dobro poznavanje uzročnika. U pogledu viroza »svako tretiranje pitanja imuniteta protiv virusnih bolesti mora da se otpočne klasifikacijom virusa« — kaže V. Riškovič (34).

Postoji nekoliko načina raspoznavanja virusa, ne samo kod jedne određene vrste biljke, nego i kod drugih biljnih vrsta ili sorti. U mnogim slučajevima se to raspoznavanje može izvršiti po izgledu i toku bolesti. Lako je odrediti virus koji napada jednu, ili sasvim ograničen broj bliskih vrsta. Isto tako nije teško da se odredi virus koji napada više vrsta biljaka, ali koji izaziva karakteristične znake oboljenja. Međutim, samo morfološki, anatomski i fiziološki znaci bolesti nisu dovoljni za diferencijalnu diagnostiku virusa, jer simptomi bolesti jako variraju ne samo u zavisnosti od vrste ili sorte biljaka i okolnih uslova nego ponekad čak i od individualnih osobina pojedinih biljaka. Rasprostranjena je i obratna pojava: razni virusi mogu da izazovu oboljenja sasvim slična po spoljašnosti.

Predloženo je bilo više načina za razlikovanje virusa među sobom, a po ovome i za njihovu klasifikaciju: karakter filtrabilnosti virusa, način prenošenja oboljenja sa jedne biljke na drugu, sposobnost zaražavanja raznih domaćina i tok bolesti na njima, odnos virusa prema fizičkim, hemijskim i električnim faktorima (temperaturi, alkoholu, sušenju, rastvaranju

u kiselinama i dr.). Međutim, u pogledu ovih faktora mnogi virusi pokazuju slične, ili čak i istovetne osobine.

U poslednje vreme predložen je i uvodi se način razlikovanja, odnosno klasifikacije virusa po simptomima (V. Riškov, Holmes). Prema ovom načinu u jednu grupu ušli bi virusi koji izazivaju mozaike, u drugu oni koji izazivaju žutice itd. Poznata je takva klasifikacija Holmes-a, koja se u poslednje vreme širi (10). Već i na prvi pogled vidi se neprirodnost ove podele. Osim toga, predlaže se svega nekoliko opširnih grupa sa više



Sl. 1 — Šarka šljive (*Prunus virus 7*) kod sorte požegača. Desna slika snimljena je sa crvenim filtrom. (Foto I. Pobegajlo)

(često sa desetinama) bolesti, koje osim jednog ili dva znaka nemaju nikakvih zajedničkih osobina, što svakako otežava raspoznavanje i klasifikaciju virusa. Izgleda da je među fitopatolozima najveći broj pristalica našla klasifikacija ili, bolje reći, nomenklatura virusa K. Smitha, po kojoj se virus naziva latinskim imenom roda biljke kod koje je prvi put opisan, uz dodatak reči virus i broja koji pokazuje koja je po redu viroza kod dotičnog roda opisana (na primer *Prunus virus 7*). Mi se pridržavamo ove klasifikacije u našem radu.

Proučavanje virusa mnogo je otežano utvrđenjem činjenice da mnogi virusi postoje u obliku jedne ili više odlika ili rasa (sojeva, štamova virusa, strains). Ove rase se razlikuju po znacima oboljenja koje one uzrokuju kod jednog istog domaćina, po sposobnosti zaražavanja drugih biljaka, po prenosničima-insektima i drugim osobinama. Često su rase jednog istog virusa antagonisti među sobom. Tako jedna rasa virusa može braniti biljke od

zaražavanja drugom, možda opasnijom rasom istog virusa. Bawden (8) kaže da je ova pojava možda opšte pravilo.

Dva otkrića u virologiji znatno su unapredila i olakšala proučavanje virusa. Prvo, utvrđivanje značaja lokalnih oštećenja (local lesions) pri veštačkim zaražavanjima, na osnovu čega se može kvantitativno odrediti koncentracija virusa (Holmes, 1928 g.), i, drugo, utvrđivanje antigenosti virusa ili primena serološke metode ispitivanja virusa (Dvořák 1927 g. i Purdy-Beale 1928—1931).

Serološka ispitivanja u proučavanju virusa sve se više usavršavaju i nalaze sve veću primenu. Ova proučavanja već su dala niz važnih podataka biljnoj virologiji. »Dugotrajan je i nesiguran način identifikovati viruse po simptomima bolesti i pomoću zaražavanja kontrolnih biljaka (test-biljaka), kao i pomoću proučavanja virusa in vitro. Međutim, serološki način daje sasvim tačne podatke i svega u toku nekoliko minuta.« (F. Bawden 1950 g., 8). Pomoću serološkog načina ispitivanja mogu se mnogo brže i lakše nego pomoću nekih drugih načina rešavati raznovrsna pitanja, kao što su: 1) pitanje nesumnjivog i brzog utvrđivanja zdravstvenog stanja biljaka s obzirom na oboljenje nekom virozom, 2) pitanje diagnoze skrivenih virusnih oboljenja, 3) pitanje utvrđivanja srodnosti pojedinih virusa ili njihovih rasa (štamova, strena), 4) pitanje utvrđivanja širenja virusa u biljkama i njegove koncentracije, 5) pitanje gubitka infektivnosti virusa pod uticajem vremena ili nekih drugih faktora (fizičkih ili hemijskih), 6) utvrđivanje imuniteta pojedinih sorti biljaka ili pojedinih delova biljaka prema oboljenju, što ima veliki praktični značaj za selekciju otpornih sorti itd.

Serološka ispitivanja se sada praktično primenjuju u prilično velikom opsegu u kulturama krompira i duvana, a i nekih drugih poljoprivrednih biljaka. Blagodareći njima, rešen je niz praktičnih problema, koji su od veće važnosti za ove kulture kod kojih su viroze — faktor koji ograničava njihovo uspešno gajenje. O ovom sada postoji bogata literatura (Stapp, Köhler, Bercks i drugi).

Serološki način ispitivanja sada se ne ograničava samo na rad sa virozama. On se sada uvodi i u agronomiju radi rešenja nekih spornih pitanja koja se inače teško rešavaju, naprimer, određivanje istovetnosti ili različitosti bliskih vrsta ili sorti kulturnih biljaka, određivanje srodnosti nekih vrsta biljaka i drugo.

#### IV — Serološka ispitivanja virusa

##### 1) Opšti pojmovi iz serologije i terminologija

Serološka proučavanja virusa nedavnog su datuma i u fitopatologiji se tek u poslednje vreme uvode. Mnogi pojmovi, terminologija i hipoteze uzeti su iz medicine i veterine, te nisu dobro poznati ne samo agronomima, nego ni fitopatolozima. Štaviše, mnogim praktičnim radnicima nisu dovoljno jasni osnovi serologije. Stoga je potrebno da se, makar i u sasvim kratkim crtama, opiše suština seroloških ispitivanja i razni nazivi (termini) koji su uobičajeni u serologiji.

Ako se nekoj životinji, naprimer, kuniću (pitomom zecu), mišu i dr., svakog drugog ili trećeg dana ubrizgavaju u venu (intravenozno), pod kožu (subkutano) ili u mišiće (intramuskularno) manje količine belančevine ili neke belančevinaste materije, belančevinasti otrovi, kulture bakterija ili gljivica, — u krvi ili u drugim tečnostima tela obrazuju se naročite hemijske materije, koje su u stanju da suzbijaju dejstvo ubrizganih, stranih materija (koje često mogu da budu štetne za organizam). Njihov je zadatak da te za životinje tuđe materije rastvore ili da se s njima spoje, neutrališući, ili obeštećujući njihov uticaj na organizam. Ponekad iste materije mogu da se obrazuju i pri uvođenju u organizam nekih otrova preko crevnog kanala (sa hranom). Ukoliko se duže vremena i veće količine pomenutih materija ubrizgavaju, utoliko će se više takvih protivmaterija proizvesti u organizmu kunića i ostalih životinja. Materije, koje se pojavljuju u krvi nazivaju se **antitela**. One su koloidalne prirode rastvorene u surutki (serumu) krvi, u kojoj ostaju

i posle izdvajanja iz krvi crvenih i belih krvnih telesca. U serumu antitela, naročito pri čuvanju na hladnom mestu i dodavanju nekih otrova (fenola, hlороформа i dr.) mogu da se zadrže duže vremena (u toku nekoliko godina).

Materije koje se ubrizgavaju kuniću i koje su sposobne da izazovu obrazovanje antitela nazivaju se **antigeni**. Prema tome antigeni su materije koje imaju sposobnost da u krvi životinja izazivaju obrazovanje antitela. Za takve materije kaže se da imaju **antigenska svojstva**. Ranije se mislilo da samo proteini imaju antigenska svojstva. Sada se zna da ima izvesnih izuzetaka: neki složeni ugljeni hidrati bakterijskog porekla i složena jedinjenja lipoida i ugljenih hidrata mogu imati antigenska svojstva (ali samo u prisustvu proteina).

Naročito je važna osobina antitela **specifičnost**, tj. ona stupaju sa antigenima, blagodareći kojima su postala, u razne karakteristične reakcije, sjedinjujući se i praveći razne taloge, neutrališući njihovo dejstvo, smanjujući ili poništavajući njihovu virulentnost itd. — Dve su važne osobine antigena koje treba podvući: svaki antigen mora da ima sposobnost izazivanja obrazovanja antitela i da posle sa njim reaguje specifično, tj. samo sa onim antitelom koji je on proizveo. Ovo se specijalno naglašava, pošto postoje materije koje sa antitelima reaguju specifično, ali nemaju sposobnost obrazovanja antitela. Takvi nepotpuni antigeni nazivaju se **delimični antigeni** ili **hapteni**. Antigeni su koloidni rastvori, što znači da se oni sastoje iz velikih molekula ili agregata molekula. — Pretpostavlja se da antigeni imaju na svojoj površini takozvane »**determinantne grupe**«, koje, verovatno, imaju različnu strukturu i koje omogućavaju specifičnost seroloških reakcija.

Postoje različite vrste antitela. U našim ispitivanjima proučavani su precipitini i precipitinske reakcije koje su, uostalom, najosnovnije u istraživanjima fitopatogenih virusa. Stoga o njima treba progovoriti nešto opširnije.

**Precipitini** su antitela u serumu, koja pri mešanju sa providnim rastvorima odgovarajućih antigena (rastvorenim proteinima) daju zamućivanja, a zatim beli pahuljasti dobro vidljivi talog. Precipitini, prema tome, imaju sposobnost da u antigenu ili u tečnosti koja ga sadrži zgrušavaju rastvorene materije, blagodareći kojima su oni ranije nastali u krvi kunića. Mutljag ili talog koji se pojavljuje pri ovom mešanju zove se **precipitat**. Kod precipitina naročito je izražena važna osobina — **specifičnost**, jer oni pod naročitim uslovima daju reakciju (**precipitaciju**) samo sa onim antigenima koji su po poreklu istovetni, identični ili po fizičko-hemijskim osobinama bliski antigenima koji su poslužili za spravljanje (injekcijama) dotičnog seruma. Mešanje precipitina sa nekim drugim antigenima ne daje taloga ili daje samo jedva primetno zamućivanje rastvora, i to često samo za izvesno vreme.

Prema tome, injekcije nekog rastvorenog proteina u krvi životinja stvaraju antitela — precipitine koji precipitiraju (zamućuju, talože) iste proteine u njihovim rastvorima (in vitro). Naprimer, ako se rastvor belanceta jaja nekoliko puta u razmaku od nekoliko dana ubrizga u kunića, izazvaće surutka krvi ovog kunića, ako se kapne u isti rastvor belanceta, obrazovanje precipitata. Umesto belanceta jaja, može da se upotrebi koloidna suspenzija belančevina bakterija, raznog životinjskog i biljnog tkiva i dr. Precipitacija se od aglutinacije razlikuje time što se kod prve u reakciji nalazi rastvoreni protein, a kod druge bakterije u suspenziji. Inače su ove pojave veoma bliske i srodne po svojoj suštini. Reakcija precipitacije je tako precizna da se pomoću nje može tačno odrediti razlika između belančevina pojedinih vrsta životinja ili biljaka, što nikakva hemijska ni mikroskopska analiza ne može da učini.

Blagodareći specifičnosti, može se odrediti istovetnost ili srodnost nekih mikroba, belančevina i uopšte raznovrsnih materija, koje su u stanju da obrazuju antitela, tj. koje imaju antigenska svojstva. Što je interesantno i važno, i razni biljni sokovi, sokovi biljaka raznih vrsta, micelija i spore gljivica itd. često imaju specifična antigenska svojstva. Tako, naprimer, ubrizgavanjem kuniću soka neke vrste ili varijeteta, ponekad čak i sorte neke biljke, mogu da se dobiju serumi, koji će davati reakciju (precipitaciju) samo sa belančevinom dotične vrste, varijeteta ili sorte. Na ovaj način može da se odredi istovetnost ili srodnost raznih vrsta biljaka, varijeteta itd. U toku poslednjih pet godina objavljeno je više radova o takvim serološkim ispi-

tivanjima (*Tilletia*, *Puccinia*, *Triticum* i dr.). Izgleda da takvi radovi, koji su sada tek u začetku, mogu da dadu mnogo interesantnih rezultata i da rasvetle mnoga pitanja od praktične važnosti.

**Imunizacija** (u opštem smislu) zove se ubrizgavanje (injekcija) u krv, pod kožu ili u mišiće životinja nekih materija, čije se antigenske osobine ispituju. Obično se imunizacija sastoji iz nekoliko (6—10) injekcija sa prekidima od 1—4 dana među pojedinim injekcijama. Već posle prve injekcije počinju da se stvaraju antitela; ali u većini slučajeva serum sadrži najviše antitela 10—15 dana posle poslednje injekcije, kada se iz životinja i uzima krv. Serum koji je dobijen posle imunizacije, ponekad se zove **specifični serum** ili **antiserum** ili **imuni serum**.

Postoje razni načini merenja **jačine precipitinske reakcije** jednog seruma, koja se označuje brojkama i zove se **titar**. U fitopatologiji obično se upotrebljava sledeći način razblaživanja: serum se razblažuje fiziološkim rastvorom (0,85% NaCl) 1 : 200, 1 : 300, 1 : 2000 itd., i posmatra se koje najveće razblaživanje seruma još daje reakciju precipitacije sa odgovarajućim antigenom. To razblaživanje zove se titar 1 : 200, 1 : 300, 1 : 2000 itd. U cilju dobijanja seruma sa visokim titrom (2000, 3000 i većim) primjenjuje se takozvana **superimunizacija**, tj. još jedna imunizacija ponavlja se posle prekida od desetak dana posle prve imunizacije. Superimunizacija ne daje uvek veći titar.

U serološkim ispitivanjima fitopatogenih virusa često se umesto izraza »zdrava biljka« ili »zdravi biljni sok« upotrebljavaju izrazi »normalna biljka«, »normalni biljni sok«.

Od seroloških reakcija u ispitivanjima fitopatogenih virusa najčešće se primenjuju precipitinske reakcije, inaktivacija virusa neutralizacijom pomoću antiseruma, fiksacija komplementa i pojava reakcija anafilaksije.

## 2) Istorijat seroloških ispitivanja fitopatogenih virusa

Mulvanija (Mulvania) bio je prvi koji je utvrdio (1926 g.) smanjenje virulentnosti virusa mozaika duvana pod uticajem normalnog seruma kunića (27). Prvi podatak o antigenosti fitopatogenog virusa dao je M. Dvořak 1927 g. (8). Perdi-Bil (Purdy-Beal, 12) 1928 i 1929 g. potvrdila je rezultate istraživanja Mulvanije, a osim toga utvrdila je da je serum kunića imunizovanog ekstraktom lišća duvana obolelog duvanskim mozaikom mnogo efektivniji u smanjenju virulentnosti, nego normalni serum. Na ovaj način ona je pokazala antigenost virusa duvana. T. Matsumoto (»Antigenic properties of tobacco mozaic«, *Journal of Tropic Agriculture*. Vol. I Formosa, 1929), T. Matsumoto i K. Somazava (T. Matsumoto a. K. Somazawa, 1930 — »Immunological studies of mozaic diseases«, *ibid.* I, II. 1930) potvrdili su i detaljnije proučili antigenske osobine virusa duvana. Sledeće godine Perdi-Bil objavila je rad o specifičnosti precipitinskih reakcija kod duvanskih mozaika (»Specificity of the precipitin reaction in tobacco mozaic disease«. *Contribution from Boce Thomson Instit.* Vol. III, Nr. 4. 1931). Uskoro zatim ona je proučavala serološke reakcije, kao sredstvo za određivanje koncentracije virusa (»Serological reaction as a means of determining the concentration of tobacco mozaic virus«. *Phytopath.* Vol. 23. 1932). Gratia (1933 g.) pokazao je da virusi imaju specifična antigenska svojstva.

Dalja ispitivanja dokazala su da normalni serum deluje kao razne nespecifične belančevinaste supstance i da samo antiserumi imaju specifično dejstvo neutralizacije virusa (12). Docniji radovi Čestera (K. Chester, 13, 14) nesumnjivo su potvrdili apsolutnu specifičnost antiseruma mozaika duvana, prstenaste pegavosti duvana (ring-spot) i mozaika krastavaca. Svaki od ovih virusa potpuno se neutrališe njemu odgovarajućim-homolognim, a ne heterolognim serumom. Pored toga reakcija nije samo kvalitativna, nego i kvantitativna, tj. određena količina antiseruma neutrališe odgovarajuću količinu virusa. Docnija istraživanja Chester-a (15) dokazala su antigenske sposobnosti biljnih virusa i praktičnu vrednost seroloških ispitivanja u proučavanju pojedinih vrsta tih virusa.



Blagodareći radovima ovih istraživača, kao i nekolicine drugih (Silberschmidt, Birkeland, Kassanis i dr.), bilo je utvrđeno da se antigenska svojstva virusa ne menjaju u zavisnosti od biljaka nosilaca virusa ili, drukčije, antiserum reaguje sa njemu odgovarajućim virusom bez obzira na poreklo virusa, tj. bez obzira na biljku u kojoj se on nalazi.

Prilikom gore navedenih istraživanja bila je zapažena otpornost ili postojanost nekih virusa. Naprimer, virus duvanskog mozaika, koji je bio podvrgnut čišćenju u cilju prosvetljavanja i udaljavanja iz biljnog soka raznih elemenata (ćelica, hlorofilnih zrnaca i t. sl.) i dejstvu raznih sredstava (olovnog acetata, acetona, tripsina, aluminium-hidroksida, barijum-hidroksida, srebrenog nitrata, naizmeničnog smrzavanja i otopljanja i dr.) u svim slučajevima zadržavao je osobinu da specifično reaguje sa antiserumom spremljenim od neočišćenog ili očišćenog soka biljke. Štaviše, njegova precipitinska moć i posle čišćenja ostajala je konstantna. Isti virus pri inaktivaciji (ubijanju virulentnosti) azotnom kiselinom zadržava moć flokulacije antiseruma (Stanley W. 1936, 37). Prema tome obrađeni i inaktivirani virus može takođe da posluži za imunizaciju.

U toku poslednjih nekoliko godina serološka proučavanja su usavršena. U ovim proučavanjima počeo je da se primenjuje i elektronski mikroskop. — Ispitivanja pokazuju da virusi nisu jednostavni antigeni. Svaki virus ima svoje determinantne grupe. Na ovaj način i antiserumi imaju nekoliko antigena od kojih svaki reaguje specifično sa njemu odgovarajućom determinantnom grupom. Kombinacijom seroloških reakcija sa raznim antiserumima mogu da se određuju štamovi virusa, kao i njihove determinatne grupe. Pomoću uporednih seroloških ispitivanja mogu se određivati čak i relativna veličina i oblici virusa.

Serološka ispitivanja su dosada (kraj 1952 g.) primenjena kod oko 15 raznih fitopatogenih virusa. Kod nekih virusa još nije dosada pošlo za rukom da se utvrdi njihova antigenost ili, tačnije, nije pošlo za rukom da se proizvede antiserum. Nije isključeno da je uzrok ovome suviše slaba koncentracija dotičnih virusa u biljkama. Uočeno je da jaku antigenost imaju virusi koji su infektivni i pri najvećim razblaživanjima, a slabu antigenost i slabi titar daju slabo infektivni virusi. Stoga će se veštačkom koncentracijom virusa, verovatno, moći ustanoviti antigenost i kod onih virusa, kod kojih ona dosada nije mogla biti utvrđena. — Najbolje uspevaju serološke reakcije kod virusa koji se prenose inokulacijom soka.

### 3) Tehnika dobijanja antiseruma fitopatogenih virusa

U kratkim crtama praksa imunizacije i dobijanja antiseruma u fitopatologiji bila bi sledeća:

Kuniću (pitomom zecu) ubrizgavaju se injekcije materijala, čija se antigenska svojstva ispituju, svakog drugog ili trećeg dana. Ubrizgavanje se vrši pomoću špriceva parenteralno, tj. u tkiva tela neposredno ili u marginalnu venu na uvu, koja je veoma pogodna za to. Da bi se kod kunića izbegle anafilaktične pojave, prva jedna, ili dve doze su manje (0,5—1 ml.), ali se one postupno povećavaju (do 5—6 ml.). U fitopatološkim istraživanjima anafilaktičke pojave su retke (usled malog sadržaja belančevinastih materija u biljnom soku). Posle 8—10 injekcija kunić se ostavlja na miru. U to vreme u njegovoj krvi (serumu) vrši se nagomilavanje antitela. Otprilike 7—10 dana posle poslednje injekcije iz kunića se vadi krv na aseptički način. Krv se prikuplja u kolbicu iz karotidne vene. Kunić se zatim zakolje, pošto je odigrao svoju ulogu. Ako treba malo krvi, a još treba da se ispita i superimunizacija, kunić se ne kolje, nego se krv vadi pomoću šprica iz usne vene (nekoliko kubika — nekoliko ml.). Nakon izvesnog vremena (desetak dana), a ponekad i sutradan, može da počne superimunizacija.

Prema intenzivnosti reakcije između antitela i antigena određuje se specifičnost antitela. Intenzivnost reakcije obično se beleži ili odmah ili posle izvesnog vremena (najčešće posle 3 minuta). Intenzivnost se određuje znacima: + (plus) i — (minus) prema sledećoj skali:

- (—) odsustvo zamućivanja odnosno taloga; nema nikakve reakcije;
- (—+) sumnjivi, jedva приметni tragovi reakcije, odnosno tragovi taloga;
- (+) jasno vidljiva reakcija i dobro uočljivi talog;
- (++) jaka reakcija i obrazovanje većeg taloga;
- (+++) jako izražena reakcija sa mnogo taloga;
- (++++) obilni pahuljasti talog.

Baktericidna moć normalnog seruma, koji sadrži nespecifične ili malo specifične materije (aleksine, opsonine, komplemente i dr.), navela je na pomisao da se ispita njegovo dejstvo na viruse. Docnije se logično postavilo pitanje: da li je moguće dobiti imunizacijom kunića sokom sa biljnim virusima antiserum koji bi davao pozitivnu reakciju sa sokom biljke koja sadrži isti virus? Kako je već izloženo, ovi su pokušaji uspešni. Ali postoji niz teškoća kojih nema u medicinskoj ili veterinskoj serologiji. O ovim teškoćama treba da se ukratko progovori.

Virusi svojim mnogim osobinama liče na koloidne rastvore, koji prolaze kroz bakterijalne filtre i ultra-filtre, i imaju osobine providnih tečnosti. Prema tome precipitinske osobine u antiserumima (zamućivanje, stvaranje taloga i tsl.) mogle bi se lako proučavati i promatrati. Ali je teško očistiti biljni sok od svih primesa, da posluži za stvaranje antiseruma sa specifičnijim i jačim antitelima, koji bi mogao istovremeno i da se praktički primenjuje u dijagnozi bolesti. U mnogim početnim ispitivanjima reakcija precipitacije nije bila uvek nesumnjivo jasna. Ovo je nastupalo iz sledećih uzroka. U soku biljke obolele od neke viroze, koji se upotrebljava za imunizaciju, nalazi se ne samo virus, nego i mnogo drugih materija koje takođe imaju antigenska svojstva. To su ćelice tkiva, hlorofilna zrnca, razne belančevinaste materije i tsl. Pri imunizaciji ove materije, koje takođe imaju antigenska svojstva, stvaraju nezavisno od virusa u krvi svoja antitela (antitela normalne biljke). Stoga će dobijeni antiserum reagirati ne samo sa sokom virusne, nego i sa sokom zdrave biljke, usled reakcije antitela i antigena zdrave biljke. Na taj način reakcija precipitacije kod zdrave i bolesne biljke često nije jasna, ili nesumnjiva, jer kod zdrave biljke reaguju normalni antigeni i antitela.

Da bi povećao jasnost čitanja precipitinske reakcije Chester je prethodno (pre precipitacije) čistio već dobijeni antiserum, dodajući mu na 1 deo 2—5 delova soka zdrave biljke, čija se viroza proučavala. Posle stajanja 2 sata u termostatu kod 37°C., ostavljanja u toku 12 sati u hladnjači i centrifugiranja, antiserum se potpuno oslobađao od antitela normalne biljke (13). Drugi je način manje savršen; to je prethodno čišćenje (pre imunizacije) virusa od antigena zdrave biljke pomoću centrifugiranja biljnog soka i odvajanje većih količina sporednih antigena u talogu. U rastvoru, ostajao je virus, kao lakši, donekle čistiji i nešto koncentrisaniji.

U cilju čišćenja virusa primenjivani su i mnogi adsorbenti: kaolin, aluminium-hidroksid, geli silicijumove kiseline, neutralni olovni acetat, barijum-hidroksid itd. Pokazalo se da mnogi adsorbenti slabo, ili nikako ne utiču na virulentnost nekih virusa. Naprimer, aluminium-hidroksid ne utiče na X-virus krompira, aceton ne utiče, ili malo utiče na infektivnost virusa prstenastog mozaika duvana (ring-spot) itd. Pomoću tako očišćenih virusa dobijaju se dovoljno specifični antiserumi koji ne daju reakcije sa sokom zdravih biljaka, ili takvu reakciju daju samo tada, kada su nerazblaženi. Pri razblaživanju antiseruma (naprimer, 10 puta) precipitacija nastupa samo sa biljnim sokom koji sadrži virus. U cilju čišćenja primenjuje se još i smrzavanje materijala, posle kojeg se pomoću prese lako odvaja čisti i bistri sok sa rastvorenim virusom u njemu.

Čišćenje virusa na spomenute načine nije lako, a nije ni potpuno, jer u zavisnosti od biljke, odnosno osobine njenih sokova, zavisi i uspeh čišćenja. Osim toga, adsorbent treba da dejstvuje na materije koje se nalaze u soku, a istovremeno da ne dejstvuje, ili što manje dejstvuje, na sam virus. Kako je poznato, virusi se u ovom pogledu veoma razlikuju jedan od drugog, a pored toga se pri čišćenju uvek udalji i izvestan, ponekad veliki, deo samog

virusa. Stoga je pri serološkom ispitivanju nekog virusa najpre potrebno tražiti odgovarajući adsorbent. Ovo se radi empirički. Zatim se proučava uticaj tog adsorbenta na virus i tek posle toga pristupa se serološkim ispitivanjima. Teškoće se još povećavaju pri ispitivanju virusa koji se ne prenosi ubodom, trljanjem i tsl., nego insektima ili kalemljenjem (naprimer virus šarke sljive). jer je u ovom slučaju teško kontrolisati uticaj adsorbenta na virulentnost virusa.

M. Dunin i N. Popova predložili su (1936 g.) i razradili dovoljno oštrouman način čišćenja virusa antiserumom zdrave biljke, iskorišćavajući antigenske osobine soka normalne (zdrave) biljke (19). Postupak je sledeći. Kunić se imunizira sokom ne bolesne, nego zdrave biljke, dakle antigenima koje ta biljka ima u svom soku (antigenima normalne biljke). Dobijeni antiserum daje dobru precipitaciju sa sokom zdrave biljke. On može da posluži i za taloženje (precipitaciju) soka virusne biljke. U ovom slučaju precipitini normalne biljke stupaju u reakciju sa njima odgovarajućim antigenima biljke, a virusni antigeni, tj. virus ostaje nedirnut u rastvoru. Pomoću centrifugiranja, ili na neki drugi način, odvaja se precipitat (talog), a očišćeni sok sa virusom iskorišćuje se za imunizaciju drugih kunića. U ovom slučaju u serumu kunića stvaraju se samo antivirna antitela. Takav serum daviće precipitaciju samo sa sokom virusnih biljaka, a sa sokom zdravih neće davati reakciju.

Dunin i Popova proverili su i isprobali svoju metodu serodijagnostike na mnogobrojnim uzorcima krompira, paradajza, duvana, datulje (*Datura stramonium*) i dr. biljaka zaraženih raznim virusima. Spremljeni serum imao je nevisok titar: 1:300, 1:500. Pri superimunizaciji titar se povećao do 1:800. Spremljeni serum konzervise se sa 0,5% fenola i može da se sačuva u toku 2—3 meseca bez primetnog smanjenja titra. Pomenuti istraživači docnije su radili na spremanju polivalentnih antiseruma, tj. antiseruma koji bi reagovali sa nekoliko virusa (imunizacija se vrši smesom virusa).

Da učine serološka istraživanja što pristupačnijima i širim krugovima poljoprivrednika, Dunin i Popova uprostitili su precipitinsku reakciju. Oni su predložili takozvanu »kapljičastu metodu analize virusa«, prema kojoj se specijalni antiserumi u malim ampulama šalju zainteresovanima. Diagnoza se vrši na taj način što se na predmetno staklo metne kapljica antiseruma i pomeša sokom biljke čije se zdravstveno stanje ispituje. U slučaju pozitivnog nalaza nastupa precipitacija (zgrušavanje soka).

Isti autori ističu mnogostruke mogućnosti primene seroloških ispitivanja i navode niz pitanja koja bi mogla da se reše primenom ove metode: 1) diferencijalna dijagnostika viroza (biljaka u vegetaciji, semena, krtola itd.) i pseudovirusnih oboljenja, 2) određivanje koncentracije virusa, 3) brzina rasprostranjenja i raspodela virusa u biljkama, 4) klasifikacija virusa i određivanje tipova raznih virusa u zavisnosti od biljaka i geografskih uslova, 5) proučavanje inaktivacije virusa i, u vezi s tim, raznih mera lečenja viroza, 6) imunitet sorata, 7) nalaženje antagonističnih virusa, 8) pronalaženje biljaka (korova i dr.) rezervatora virusa i primarnih izvora zaraze, 9) pronalaženje insekata prouzročnika virusa i uloga mikroba i gljivica u rasprostranjenju virusa, 10) dugovečnost virusa pod različitim uslovima, 11) uticaj raznih uslova i faza razvika biljaka na viruse, kao i maskiranje virusa, 12) istraživanje ontogenetičkog razvika bilja, 13) određivanje sadržaja, vrste i taloženje vitamina, hormona i alkaloida u biljkama — pošto po mišljenju autora, oni verovatno imaju antigenska svojstva, 14) dijagnostika bakterioza, 15) filogenetički odnos raznih vrsta, varijeteta, sorti, sojeva itd. (u botanici, fitopatologiji i entomologiji) itd., itd.

Iz napred navedenog moglo bi se zaključiti da autori ističu ovu metodu kao neku univerzalnu, mada sami kažu da bi »bila ipak nedopuštena greška smatrati ovaj način ispitivanja nekom panacejom«.

## V — Serološka ispitivanja šarke šljive

### 1) Materijal i način ispitivanja

Kako je već podvučeno, virusno oboljenje — šarka šljive je najosnovniji problem našeg voćarstva. Imajući u vidu važnost svestranog poznavanja virusa, pristupili smo serološkim ispitivanjima ove bolesti. Nama je poznat samo jedan rad koji saopštava rezultate seroloških istraživanja virusa drvenastog bilja (Kunkel, 1936 g., 25). Ali nam nisu poznati nikakvi detalji o tehnici rada, u dobijanju antiseruma, koju je primenio pomenuti autor, jer smo podatke o ovome radu našli samo u Review of Applied Mycology (R. A. M.).

Dobiti antiserum jednog takvog virusa znači pokazati i njegovu antigenost i mogućnost izvođenja raznih seroloških reakcija za rešenje praktičkih pitanja: širenja virusa u voćkama, prisustvo virusa u otpornim sortama, postojanje virusa u pojedinim granama, latentnost virusa kod pojedinih vrsta roda *Prunus* itd. Selekcija otpornih sorti može da se otpočne od grana voćaka, koje se ne »zaražavaju« šarkom (iako je cela voćka zaražena), što bi se takođe moglo kontrolisati serološkim ispitivanjima.

Najpre je trebalo savladati tehniku seroloških ispitivanja fitopatogenih virusa uopšte, a naročito tehniku takvih ispitivanja kod drvenastog bilja (voćaka). Ispitivanja su bila otpočeta i sprovedena 1938 g. u Zavodu za poljoprivredna istraživanja u Topčideru (Beograd). U ovim istraživanjima, koja traže mnogo vremena i napora, ukazali su mi pomoć drugovi fitopatolozi inž. Srboljub Todorović i inž. Milivoje Perišić. Docnije (posle Oslobođenja) serološka ispitivanja bila su nastavljena, ovog puta sa savršenijom tehnikom i pod povoljnijim uslovima (u samoj blizini jako zaraženih šljivika). Rezultati ovih istraživanja iznose se dalje.

Lišće i plodovi zaraženi šarkom dostavljani su u laboratorijum radi ispitivanja svakog drugog ili trećeg dana neposredno iz zaraženih šljivika. Bila je osigurana potpuna svežina materijala. Kao materijal za spremanje soka uzimani su jače i tipično obolelo lišće i plodovi požegače, trnošljive i jače zaraženo lišće belošljive koja ponekad pokazuje tipične znake bolesti i izvesno opadanje plodova.

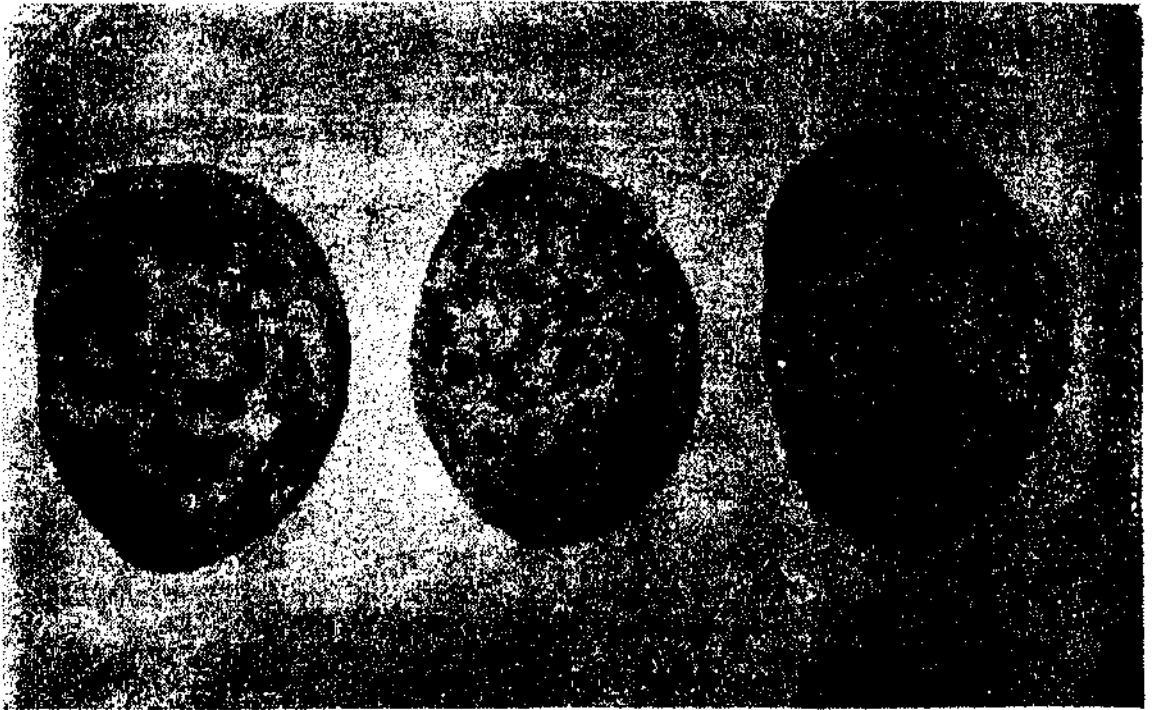
Serološkim proučavanjima šarke bili su postavljeni sledeći zadaci:

1) utvrditi da li virus šarke (virus jedne viroze drvenastog bilja) ima antigenska svojstva;

2) proizvesti antiserum šarke: a) pomoću injekcija neočišćenog centrifugiranog soka bolesnog lišća i plodova; b) pomoću injekcija hemijski očišćenog virusa (soka bolesnog lišća i plodova); kao adsorbent za čišćenje uzet je aluminium-hidroksid; c) pomoću injekcija virusa očišćenog antiserumom normalne biljke (lišća i plodova);

3) po dobijanju antiseruma proizvesti specifične precipitinske reakcije: a) sa odgovarajućim materijalom — lišćem i plodovima sorti koje su poslužile za imunizaciju, b) sa materijalom iz raznih mesta, c) sa lišćem i plodovima drugih sorti i vrsta koštičavih voćaka bolesnih od šarke, d) serološki ispitati vezu između obične šarke i uskoprugaste šarke šljive, i e) između šarke i mozaika šljive (rukovodeći se opisom Hristova, 18).

Za ispitivanje po navedenim tačkama vršena je imunizacija 4 kunića sokom iz lišća i sokom iz plodova požegače i trnošljive. Za dobijanje antiseruma normalne biljke vršena je imunizacija 2 kunića sokom zdravih stabala šljive, i to iz lišća i plodova. Osim ovog, 3 kunića su imunizovana očišćenim virusom — sokom (čišćenje antiserumom norm. biljke i aluminijum-hidroksidom). Radi upoređenja i kontrole precipitinskih reakcija bio je spremljen normalni serum od neimunizovanog zeca. Svega je, prema tome, rađeno sa 10 kunića. Pregled imunizacije pretstavljen je na Tablici I — Imunizacija kunića.



Sl. 2 — Šarka šljive (*Prunus virus 7*) kod požegače. (Foto I. Pobegajlo)

Injekcije su vršene rekord-špricovima od 2 i 5 ml, i to u marginalnu venu uva. Za bubrenje vene i dezinfekciju upotrebljavan je 70%-ni rastvor alkohola, jer se pokazalo da hloroform nije pogodan za to (jako nadražuje i nikrotizira kožu). Da bi se izbegla jača reakcija kunića ili pojava anafilaksije, prve injekcije bile su male — od 0,75 ml do 1 ml. Postupno su se doze povećavale do 2,5—3,5 ml. Za vreme ispitivanja svega jedan kunić je uginuo od paralize zadnjeg dela tela (bio je zamenjen drugim). Kod *Chester*-a pri intravenoznim injekcijama ginulo je 25% zečeva (radio je sa sokom duvana i krompira).

Kako vidimo, kod nas maksimalne doze nisu bile velike, ali je zato ubrizgavanje rađeno češće: svakog drugog dana ili svakog dana. Ubrzana imunizacija vršena je zbog toga što su plodovi brzo zreli i što je bilo potrebno više vremena za prethodno spravljanje antiseruma normalnih biljaka radi docnijeg čišćenja virusa ovim serumom. Osim toga bilo je potrebno vreme i za superimunizaciju. *K. Chester* je intraperitonealno imunizovao većim dozama (5—6 ml) u 8 injekcija sa prekidima od 3—4

dana među injekcijama (13). Kod njega intravenozne doze bile su 2—3 ml u 8—16 injekcija sa intervalima od 3—4 dana. Neki istraživači prelazili su na intraperitonealne injekcije zbog većeg ugibanja kunića od intravenoznih injekcija, o kojima je maločas spomenuto. Prema Chester-u intraperitonealne injekcije mogu da posluže za otporne viruse (virus mozaika krastavaca, prstenastu pegavost duvana i dr.). Za manje stabilne viruse zadovoljavajuće rezultate daju samo intravenozne injekcije. Intravenozne injekcije daju veći titar.

Svaki je kunić dobio od 9—10 injekcija. Kod nekih je broj injekcija bio 11—13.

### 1. Pripremanje soka za imunizaciju

Biljni sok sprema se na sledeći način. Uzima se bolesno lišće sa jakim nesumnjivim i tipičnim znacima bolesti. Sve oštećeno lišće, lišće sa znacima hloroze ili nekih gljivičnih bolesti izbacuje se, kao i sve lišće sa tragovima čađavice (od prisustva lisnih vašiju). Oko 50—60 grama takvog lišća dobro se opere u čistoj vodi. Zatim se još jedanput opere u sterilnoj (dobro prokuvanoj) vodi. Posle toga lišće se suši do nestanka kapljica vode i vlage na površini. Lišće isitnjeno nožem tuče se u avanu dok se ne dobije vlažna kašasta masa. Za drobljenje lišća može dobro poslužiti mašina za sečenje mesa. Uvijena u til pogačica od zdrobljenog lišća presuje se pod jakim pritiskom pomoću male laboratorijske prese za voćne sokove. Dobije se otprilike 8—10 ml neprovidne tečnosti — soka lišća. Od svih operacija pri imunizaciji kunića najviše oduzima vremena i napora baš ovo spremanje soka. Nekad je pogačicu potrebno formirati nekoliko puta da se iscedi potrebna količina tečnosti. Verovatno ovo se može objasniti suvim vremenom u toku oglada i dobom uzimanja lišća (pri kraju leta). Prosečno je reakcija soka pH 5.0.

Mnogo je lakše dobiti sok od plodova. Odvojeno od koštica meso šljiva tuče se u avanu i isceduje na presi. Kod jače zaraženih plodova sok je tamniji, crvenkastije boje. Kod slabije zaraženih je žućkast. — Reakcija soka plodova nešto je kiselija od reakcije lišća — pH oko 4.0.

Dobijeni sok centrifugira se u epruvetama na električnoj centrifugi (3000 okretaja na minut) u toku 10 minuta. Na dnu epruveta odvaja se prilična količina taloga.

Sok od lišća daje neprovidnu tečnost tamnozeleno boje, a sok od plodova je poluprovidan. Posle centrifugiranja sok se odmah ubrizgava kunićima.

Na čisti način, ali samo od zdravih biljaka, sprema se sok za imunizaciju kunića za dobijanje antiseruma zdravih biljaka.

U jedan deo centrifugiranog soka od zaraženog lišća i plodova dodaje se kao adsorbent 1,5% aluminium-hidroksida. Smesa se drži u termostatu na t. 37° C u toku 2 sata uz povremeno mućkanje. Posle centrifugiranja (u toku 10 minuta, 3000 okretaja na minut) odvaja se gusti zeleni talog. Tako dobijeni hemiski očišćeni rastvor virusa šarke ubrizgava se kunićima. Kako je poznato, virus šarke ne prenosi se ubodom ili ubrizgavanjem, stoga nije moguće kontrolisati uticaj adsorbenta na virulentnost virusa. Isto tako usled toga nije moguće ispitati neutralizaciju virusa u soku zdrave biljke (dodavanjem antiseruma

šarke). Ovo su nezgodne strane serološkog ispitivanja virusa koji se prenose samo kalemljenjem ili insektima. Ovih nezgoda nije bilo kod dosadašnjih seroloških ispitivanja lako prenošljivih virusa (X — virusa krompira, virusa raznih mozaika duvana, prstenaste pegavosti duvana, mozaika krastavaca i dr.). Pri ispitivanju lako prenošljivih virusa ispitivač stalno kontroliše svoj rad, zaražavajući ogledne biljke. U poslednjem slučaju ogledne biljke su indikatori promena koje pretrpi virus pod uticajem adsorbenta ili antiseruma. U našem slučaju, tj. u slučaju kada se ne može kontrolisati virulentnost pomoću oglednih biljaka, jedino bi se po antitelima obrađenog virusa (precipitinskom reakcijom antiseruma sa sokom zaražene biljke) moglo videti da li se virus menja ili gubi svoju virulentnost pod uticajem adsorbentata ili antiseruma. Ali ni ovo nije sasvim sigurno, jer, kako su pokazala neka ispitivanja u toku poslednjih nekoliko godina, neki inaktivirani virusi mogu da sačuvaju svoja antigenska svojstva. Ipak u našim ispitivanjima, sve dok se ovo pitanje ne prouči bolje i na više virusa, antigenske osobine virusa posle obrade adsorbentom smatraćemo funkcijom, odnosno značkom neoštećenosti virulentnosti virusa.

Pri čišćenju virusa (soka zaraženih biljaka) antiserumom normalne biljke (tačka 2, c) bio je sledeći postupak: Od soka lišća i plodova centrifugiranog i spremljenog za ispitivanje po tački 1 i 2, a odvaja se 3—4 ml. Ovom soku dodaje se isto takva količina odgovarajućeg antiseruma zdrave biljke (lišća ili plodova). Posle dobrog mućkanja smesa se ta loži 2 sata u termostatu na t. 37° C. U epruvetama se pojavljuje prilično velik pahuljasti talog, koji se lako odvaja centrifugom. Centrifugirani sok poluprovodne zelenkaste boje služi za injekcije. Pri dodavanju antiseruma zdravih biljaka soka šljive nastupa reakcija između antitela zdravih biljaka u antiserumu i antigena istih biljaka u soku. Kao rezultat ispada talog koji se odvaja centrifugom.

Superimunizacija je vršena kod 3 kunića kod kojih je prethodno bilo uzeto po 15 ml krvi desetog dana posle prve serije injekcija (radi određivanja titra i precipitinskih reakcija). Sutradan po uzimanju krvi bila je otpočeta druga serija od 9 odnosno 10 injekcija, koja je vršena na isti način, kao i prva. Ali pri superimunizaciji doze ubrizgavanja bile su jače — od 2,5 ml do 3,5 ml. Superimunizovanim kunićima uzimana je krv otprilike desetog dana posle poslednje injekcije.

#### Obrada seruma odnosno antiseruma i određivanje titra

Krv je uzimana na sterilan način i u sterilne kolbe iz karotide desetog ili jedanaestog dana posle poslednje injekcije. Pre uzimanja krvi kunićima nije davata hrana u toku 24 sata.

Uzeta krv radi zgrušavanja stavljena je na dva sata u termostat na t. 37° C. Kolbice su stavljene u kosom pravcu radi dobnijeg lakšeg odvajanja antiseruma od grušća. Zgrušćana krv ostavljana je preko noći u hladnjači na t. 0,5 — 1° C., posle čega se antiserum dekantirao ili odvajao usisavanjem pomoću sterilnih pipeta. Dekantirani antiserum centrifugirao se 2 puta (po 3000 okretaja na minut) u toku 10 minuta pomoću električne centrifuge. Dobijeni antiserum imao je žućkastu ili ređe ružičasto-žućkastu boju i bio je providan. On se čuvao u hladnjači u epruvetama ili razliven u ampule od 1, 2, 5 ml. U neke antiserume radi dužeg čuvanja dodavano je 0,5% fenola. Izvestan sasvim mali broj ampula kroz 1—2 meseca pokazivao je zamućivanje

(verovatno od slučajne infekcije za vreme spremanja). Prosečno od jednog kunića dobijalo se oko 80 ml. krvi, koja je davala 15—20 ml. antiseruma. Veći kunići davali su oko 30 ml.

Postoje dva načina određivanja precipitinskog titra antiseruma. Prvi se vrši progresivnim razblaživanjem antiseruma u fiziološkom rastvoru i probom (reakcijom precipitacije) sa konstantnim ekstraktom virusa (u dobro centrifugiranom ili očišćenom biljnom soku). Drugi je način — progresivno razblaživanje rastvora virusa (u soku biljke) i proba tog rastvora sa konstantnim rastvorom antiseruma. Smatra se da je drugi način zgodniji iz sledećih razloga: 1) razblaživanjem biljnog soka sa virusom razblažuju se i nespecifični proteini, kojih u biljnom soku uopšte ima malo; antiserum pak ima velike količine proteina: reakcija između nejednakih količina ovih materija biće minimalna, te neće otežati čitanje precipitinske reakcije, 2) u slučaju razblaživanja antiseruma, koji sadrži veće količine proteinskih materija, u reakciju bi stupala dva rastvora sa većim sadržajem tih materija, što bi zamaglilo jasnost precipitinske reakcije. Osim ovog, drugi način je zgodniji i zbog toga što se reakcija obavlja u providnom rastvoru antiseruma. Međutim, biljni sok retko kada može da bude dovoljno providan. Postoje i drugi razlozi koji govore za drugi način ispitivanja titra.

Naš konstantni rastvor antiseruma bio je 1:5 (1 deo antiseruma na 5 delova fiziološkog rastvora). Progresivno razblaživanje biljnog soka sa virusom vršeno je sledećim redom: 1:10, 1:50, 1:100, 1:300 itd. Precipitinska reakcija vršena je flokulacijom, a ne prstenastom reakcijom (ring test).

## 2) Imunizacija i superimunizacija virusom šarke

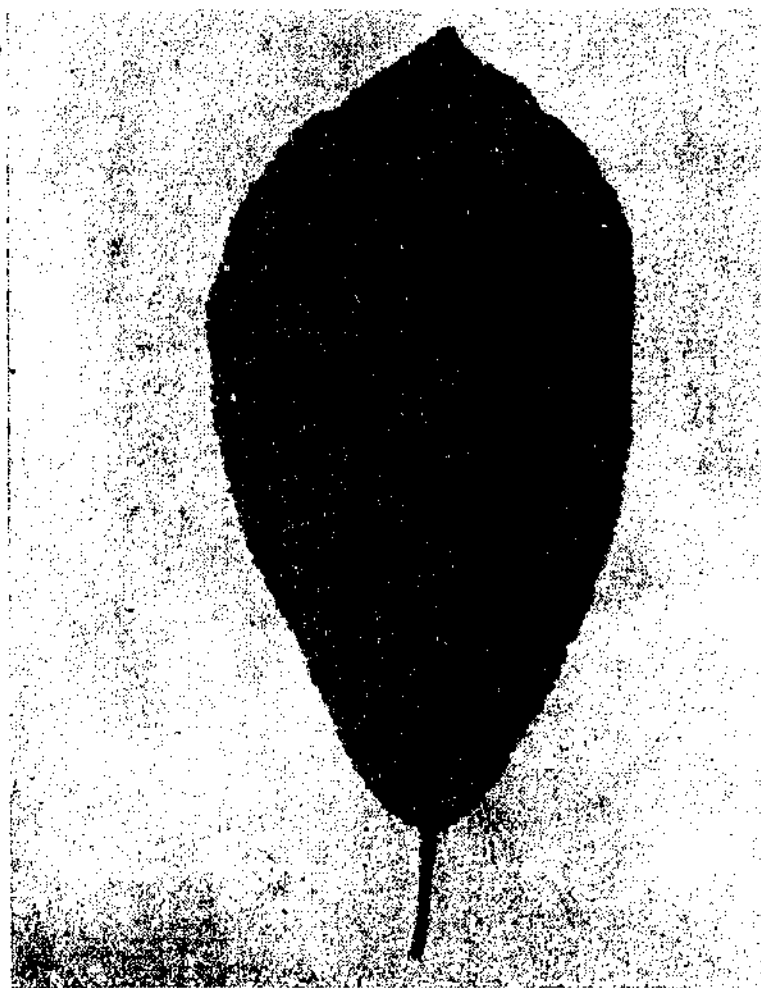
Zbog preglednosti celokupan tok imunizacije pretstavljen je u Tablici I — Imunizacija kunića, i u Tablici II — Superimunizacija kunića.

Posmatranje precipitinskih reakcija vršilo se u malim epruvetama (50,5 × 5 mm unutrašnjeg prečnika). Antiserumu u količini 0,4 ml dodaje se ista količina (0,4 ml) rastvora virusa (soka biljke), dobro se meša i drži se u termostatu na t. 37° C u toku 2 sata, posle čega se posmatra i beleži reakcija prema već ranije pomenutoj skali. Posle toga epruvete sa smesom virusa i antiseruma stave se u hladnjače na t. oko 3° C da se idućeg jutra (otprilike kroz 15—16 sati) vrši ponovno posmatranje reakcije i beleži definitivni zaključak o intenzitetu precipitacije. U slučaju postojanja reakcije, na dnu epruvete prikuplja se talog zelenkaste boje. Ukoliko je precipitinska reakcija jača, utoliko je talog veći. Obično smo vršili i paralelna posmatranja u nekoliko (4—5) epruveta. Istovremeno radi upoređenja i kontrole pravljen je nekoliko puta reakcija istog virusnog materijala (soka biljke) sa normalnim serumom, a takođe i reakcija antiseruma šarke sa sokom od nesumnjivo zdravog materijala.

Sok plodova šljive prilično je bistar za posmatranje reakcije, ali sok lišća često nije dovoljno providan, što otežava čitanje reakcije. Da bi se ovo otklonilo, na nekim primercima isproban je način »absorbovanja seruma« prema sledećem postupku K. Chestera. Pre ispitivanja precipitacije 1 delu antiseruma dodaje se 2 dela soka zdrave biljke pripremljenog kao ranije za imunizaciju. Zatim se smesa stavi na 2 sata u termostat na t. 37° C, a zatim preko noći u hladnjaču. Posle centrifugiranja smese dobije se prilično providna tečnost. Na ovaj



način je Chester potpuno odstranjivao reakciju između antiseruma i proteina normalno prisutnih u soku obolelih biljaka. Tako absorbovani serum kod nas je u mnogim slučajevima davao jasnije reakcije. Takvi slučajevi naročito su padali u oči kod antiseruma od kunića br. 1 i 2. Kod antiseruma od kunića br. 3 i 4 reakcija nije bila tako uočljiva. Ovo bi moglo značiti da čišćenje virusa aluminijum-hidroksidom nije bilo potpuno. Štaviše, kod nekoliko ispitanih primeraka antiseruma virusa očišćenog antiserumom normalne biljke absorbovani antiserum davao je jasniju reakciju.



Sl. 3 — Šarka šljive (*Prunus virus 7*) kod belošljive. (Foto I. Pobegajlo)

Rezultati ispitivanja raznih antiseruma pretstavljeni su u Tabl. III — Precipitinske reakcije raznih antiseruma sa biljnim sokovima. U tablicu su unesene i precipitinske reakcije raznih seruma sa sokom lišća šljive, koje bi se (lišće) prema karakteru raznih pega i šara moglo uvrstiti u lišće obolelo od mozaika šljive, o kojem je ranije bilo govora. Napominjemo da je nekrotični mozaik na talijanskoj štovetan po opisu i izgledu oboljenju od šarke koje je D. A t a n a s o v opisao na dolanskoj šljivi (2, str. 129). Precipitinska reakcija ispitana je i na soku šljive nesumnjivo i tipično obolele od obične hloroze (fiziološke žutice).

## Objašnjenje k tablicama

Tabl. I — Kao antigen za imunizaciju uzet je sok lišća i plodova sorte požegača (vrsta *Prunus domestica*), lišća i plodova sorte trnošljiva (turgunja, vrsta *Prunus insititia*) i lišća sorte belošljiva (varijetet *Pr. domestica*).

Tabl. II — Za superimunizaciju uzeti su kunići koji su u Tabl. I označeni brojevima 2, 7 i 8.

Tabl. III — Latinski nazivi sorti prema Tabl. I. Osim toga radi ispitivanja precipitinskih reakcija uzete su: kajsija (*Prunus armeniaca*),

Tabl. I — IMUNIZACIJA

Broj ku- nića	Čime je imunizovan	D a t u m u b r i z g a v a n j a i						
1	Centrifug. sok bole- snog lišća požegače	9/VIII 1.0	11/VIII 1.2	13/VIII 1.5	14/VIII 2.0	16/VIII 2.5	17/VIII 2.5	19/VIII 2.5
2	Centrifug. sok bole- snih plodova požegače	9/VIII 0.75	11/VIII 1.0	12/VIII 1.5	14/VIII 2.0	16/VIII 2.0	17/VIII 2.5	19/VIII 3.0
3	Očišćeni virus bolesn. lišća trnošljive (sok lišća + alum. hidro- ksidi)	10/VIII 0.75	12/VIII 1.0	13/VIII 1.5	15/VIII 2.0	17/VIII 2.0	19/VIII 2.5	20/VIII 3.0
4	Očišćeni virus bolesn. plodova trnošljive (sok plodova + alum. hidroks.)	9/VIII 0.75	11/VIII 1.0	13/VIII 1.5	15/VIII 2.0	17/VIII 2.5	18/VIII 2.5	20/VIII 3.0
5	Centrifug. sok lišća norm. biljke (požega- če)	6/VIII 1.0	8/VIII 1.2	9/VIII 1.6	11/VIII 2.0	14/VIII 2.5	16/VIII 3.0	17/VIII 3.4
6	Centrifug. sok plodo- va norm. biljke (po- žegače)	7/VIII 1.0	9/VIII 1.0	11/VIII 1.5	13/VIII 2.0	14/VIII 2.5	16/VIII 3.0	17/VIII 3.2
7	Očišćeni virus (sok bolesn. lišća požega- če + antiser. norm. lišća)	6/IX 0.75	8/IX 1.0	9/IX 1.2	11/IX 1.5	12/IX 2.0	14/IX 2.0	16/IX 2.5
8	Očišćeni virus (sok bolesn. plodova pože- gače + antiser. norm. plodova)	8/IX 1.0	7/IX 1.5	9/IX 1.7	10/IX 2.0	12/IX 2.5	13/IX 2.5	15/IX 2.8
9	Hem. očišćen virus bo- lesn. lišća belošljive (sok + alum. hidro- ksidi)	7/VIII 1.0	9/VIII 1.2	11/VIII 1.2	12/VIII 1.8	14/VIII 2.0	16/VIII 2.2	18/VIII 2.5
	Redni broj injekcije	I	II	III	IV	V	VI	VII

džanarika (*Prunus mirabolana* ili *Pr. cerasifera*), breskva (*Prunus persica*), trešnja (*Prunus avium*) i sorta talijanka (*Prunus demestica* var. *prunea*). Marmorasti mozaik nije retka pojava kod požegače: zelenkasto-bele šare pokrivaju svu lisnu, ostavljajući nešto tamnije zelene pege u obliku mazotina; prilično često biva i deformacija listova. Prema tome mogao bi u ovom slučaju doći u obzir, kao skupni uzročnik *Prunus virus 6*. Nekrotični mozaik karakteriše se pojavom malih poligonalnih nekrotičnih pega razbacanih neravnomerno na listu. U serološka ispitivanja, više radi kontrole, uzeta je i nezarazna (fiziološka) hlороza (opis i foto ovih bolesti mogu se naći u lit. 30, str. 80—81).

## KUNIČA

k o l i č i n a s o k a u m l						Prosečno pH soka za injek- ciju	Datum spremanja antise- ruma	Titar antise- ruma
21/VIII	23/VIII	25/VIII	27/VIII			5.25	6/IX	1:500
3.0	3.0	3.0	3.0					
21/VIII	23/VIII	24/VIII				4.06	4/IX	1:700
3.0	3.0	3.0						
22/VIII	24/VIII	26/VIII				5.27	6/IX	1:1000
3.0	2.5	3.0						
22/VIII	24/VIII	26/VIII				4.12	6/IX	1:900
3.0	2.5	3.0						
20/VIII	22/VIII	24/VIII	26/VIII			5.26	5/IX	1:500
3.2	3.5	3.5	3.5					
19/VIII	22/VIII	24/VIII	26/VIII			4.06	5/IX	1:800
3.5	3.5	3.5	3.5					
17/IX	19/IX	20/IX	22/IX	24/IX	26/IX	6.03	6/X	1:900
3.0	3.2	3.5	3.5	3.2	3.5			
17/IX	19/IX	20/IX	22/IX	24/IX	26/IX	3.76	6/X	1:1200
3.2	3.5	3.2	3.5	3.5	3.5			
20/VIII	22/VIII					5.80	2/IX	1:300
3.0	3.0							
VIII	IX	X	XI	XII	XIII			

Tabl. II — SUPERIMUNIZACIJA

Broj kunića	Čime je imunizovan	Datum ubrizgavanja i					
		6/IX	8/IX	10/IX	12/IX	13/IX	15/IX
2	Centrifug. sok bolesnih plodova požegače	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	3.2
7	Očišćeni virus (sok bolesn. lišća požegače + antiser. norm. lišća)	2.0	2.5	2.5	3.0	3.2	3.5
8	Očišćeni virus (sok bolesn. plodova požegače + antiser. norm. plodova)	2.0	2.5	3.0	3.2	3.5	3.4
Redni broj injekcije		I	II	III	IV	V	VI

## VI — Rezultati seroloških ispitivanja šarke šljive

Na osnovu rezultata imunizacije kunića sokom lišća i plodova šljiva obolelih od šarke (predstavljenih u Tabl. I i II) i precipitinskih reakcija (predstavljenih u Tabl. III) mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Virus šarke šljive nesumnjivo ima antigenska svojstva. Antiserum bolesnih plodova daje jaču precipitinsku reakciju, nego antiserum bolesnog lišća, što verovatno zavisi od visine titra (vidi tačku 5). Koliko mi je poznato, ovo je svega drugi slučaj ispitivanja antigenskih svojstava jednog virusa drvenastog bilja.

2. Kunići sasvim dobro podnose imunizaciju sokom lišća i plodova šljive. Najveće doze koje su bile upotrebljene (3,0 — 3,5 ml) imale su za posledicu samo privremenu klonulost, malaksalost i odsustvo apetita u toku 2—3 sata posle injekcija. Kunići su jače reagirali na ubrizgavanje soka očišćenog aluminijum-hidroksidom (br. 3 i 4 Tabl. I). Ponekad je reakcija (klonulost, sanjivost, odsustvo apetita) primećivana i sledeći dan. Ali već nakon 3—4 injekcije reakcija se smanjivala. Za sve vreme oglada nijedan kunić nije uginuo od injekcija. Od početka injekcija do uzimanja krvi kunići su dobili u težini od 600—900 g (od 1100—1200 g do 1800—2000 g), što je verovatno posledica bolje nege.

3. Titar dobijenih antiseruma nije velik: obično od 1:500 do 1:900, ređe 1:1200 ili 1:300. Superimunizacija ne povećava mnogo titar seruma; najviši dobijeni titar od superimunizacije bio je 1:1500.

4. Antigenske osobine virusa u soku lišća u mnogim su slučajevima neodređeno izražene (— +). Ali ipak i one postoje, ako se uporede precipitinske reakcije bolesnog lišća sa normalnim lišćem, normalnim plodovima i zaraženim plodovima (Tabl. III, red. br. 1, 3, 7, 9).

## KUNIĆA

količina soka u ml				Prosečno pH soka za injek- ciju	Datum spremanja antise- ruma	Titar antise- ruma
16/IX 3.5	18/IX 3.4	20/IX 3.5		4,04	1/X	1:1200
17/X 3.4	18/X 3.5	20/X 3.2	21/X 3.5	5,8	31/X	1:1000
17/X 3.0	18/X 3.5	20/X 3.2	21/X 3.5	4,6	31/X	1:1500
VII	VIII	IX	X			

Primedba: Broj kunića i prethodna imunizacija prema Tabl. I.

5. Jasno (+), više puta i jako (++) izražene antigenske osobine postoje kod virusa u soku plodova. Bolesni plodovi daju veći titar antiseruma, nego bolesno lišće.

6. Specifičnost antigena odnosno precipitinske reakcije nesumnjiva je. Nju sam sa svojim saradnicima proveravao više puta na sledeći demonstrativni način. U običnu epruvetu istiskivao sam sok ili bacao komadić mesa od ploda šljive, prethodno zabeleživši da li je sok od zdravih ili bolesnih plodova. Sok, odnosno komadić ploda šljive, mućkan je u vodi (1:30—40) da bi se voda pomešala sa sokom ploda. Bez znanja ispitivača (da li sok, odnosno komadić ploda potiče od zdrave ili bolesne šljive) određivalo se zdravstveno stanje uzetog soka odnosno plodova. U svim slučajevima dijagnoza je bila potpuno tačna i nesumnjiva: pri dodavanju kapljice razblaženog antiseruma (1:10) u sok od zaraženih plodova odmah se u tečnosti pojavljivao beličasti trag taloga od reakcije kapljice sa sokom bolesne šljive. Talog se postupno spuštao na dno.

7. Pri upoređenju jasnosti i intenziteta precipitinske reakcije pada u oči da nema gotovo nikakve razlike u precipitinskoj reakciji antiseruma od neočišćenog virusa (iz soka lišća) i očišćenog aluminium-hidroksidom. Ovo bi se moglo objasniti malim količinama proteinskih materija u soku lišća, koje imaju antigenske osobine. Ovaj bi zaključak bio opravdan da ne postoji jasno vidljiva reakcija (+) kod antiseruma normalnih biljaka (Tabl. III, red. br. 5, 6).

Veća je razlika u intenzitetu i jasnosti između neočišćenog i očišćenog antiseruma virusa od plodova. (Tabl. III, red. br. 2, 8).

Tabl. III — PRECIPITINSKE REAKCIJE RAZNIH

Redni broj	Antiserumi	Šarka šljive					
		lišće požegače	plodovi požegače	lišće trnošljive	plodovi trnošlj.	lišće belošljive	plodovi belošlj.
1	bolesnog lišća požegače	+	-+	-+	-+	-+	-
2	bolesnih plodova požegače	+	+	-+	+	-+	-+
3	očišć. virusa lišća trnošljive (sok + alum. hidroks.)	-+	+	-+	+	-+	-
4	očišćenog virusa plodova trnošljive (sok + alum. hidroks.)	+	++	-+	++	-+	-
5	lišće norm. biljke (požegače)	-+	-	-	-	-	-
6	plodova norm. biljke (požegače)	-	-	-	-	-	-
7	očišć. virusa lišća požegače (sok + antiserum norm. lišća)	-+	++	-+	++	-+	-
8	očišć. virusa plodova požegače (sok + antiserum norm. plodova)	+	+++	+	+++	-+	+
9	očišć. virusa lišća belošljive (sok + alum. hidroks.)	-+	++	-+	+	-+	-
10	bolesn. plodova požegače (superimun. br. 2 Tabl. I i II)	-+	++	+	++	++	+
11	očišć. virusa lišća požegače (superimun. br. 7 Tabl. I i II)	-+	++	-+	++	-+	-+
12	očišć. virusa plodova požegače (superimun. br. 8 Tabl. I i II)	+	+++	+	+++	+	-+

8. Mada superimunizacija povećava titar seruma, ipak nema velike razlike u intenzitetu precipitinskih reakcija između antiseruma dobijenog bez superimunizacije i sa superimunizacijom.

9. Prema precipitinskoj reakciji virus uskoprugaste šarke (*Prunus virus 7a* po *Hristovu*) bio bi na osnovu ispitivanja istovetan virusu obične šarke (širokoprugaste šarke, *Prunus virus 7*). U svakom slu-

## ANTISERUMA SA BILJNIM SOKOVIMA

lišće džanarike	lišće kajsije	Uskoprug. šarka		M o z a i k					Normal. požegača	
		lišće požegače	lišće breskve	lišće trešnje	marmor. mozaik požegače	nekrot. mozaik talijanke	nezarazna hloroza šljive	lišće	plodovi	
-	-	- +	-	-	-	- +	-	- +	-	
- +	- +	- +	-	-	-	+	-	-	-	
-	-	- +	-	-	-	-	-	- +	-	
- +	- +	+	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	+	- +	
-	-	-	-	-	-	-	-	- +	+	
-	-	- +	-	-	-	- +	-	-	-	
- +	- +	+	-	-	-	+	-	-	-	
-	-	+	-	-	-	- +	-	-	-	
- +	- +	- +	-	-	-	+	-	-	-	
-	- +	+	-	-	-	+	-	-	-	
- +	+	+	-	-	-	+	-	-	-	

čaju on bi mogao da bude samo jedan soj (strain) virusa šarke. Ovu konstataciju iznosimo sa rezervom, pošto je po opisu i slikama koje daje A. Hristov teško doneti tačan zaključak da li se u našem slučaju radilo sa pravom uskoprugastom šarkom ili ne. Nismo mogli da nađemo plodove bolesne od uskoprugaste šarke, koji su, prema opisu i slici A. Hristova, veoma karakteristični za ovu bolest.

10. Lišće džanarike i kajsije sa znacima šarke daje precipitinske reakcije sa antiserumom šarke koji ima jači titar. Pada u oči da su precipitinske reakcije više puta bile negativne ili sumnjive kod belošljive, džanarike i kajsije (Tabl. III, 1, 3, 7 i 9). Ova pojava mogla bi se objasniti slabom koncentracijom virusa u ovim biljkama. Verovatno se ovim može objasniti i manja štetnost šarke kod ovih voćaka.

11. Lišće breskve, trešnje i višnje sa mozaičnim pegama ne daje reakciju na virus šarke.

12. Lišće sa raznim znacima mozaika šljive (marmorasti mozaik, prema opisu u objašnjenju k tablicama) ne daje precipitinske reakcije na virus šarke. Isto tako ne daje reakciju ni tipična hlороza šljive (nezarazna žutica). Nekrotični mozaik kod talijanke daje precipitinsku reakciju sa antiserumom bolesne požegače.

13. Ispitali smo primenu kapljicastog metoda analize virusa (shodno ranije opisanom, prema Duninu i Póповој, 19). Na predmetno staklo istiskivale su se kapljice razblaženog 1:10 antiseruma (takav razblaženi antiserum daje bolju precipitinsku reakciju). Bilo je primećeno veće замуćivanje i krupniji talog kod soka bolesnih plodova šljive. Sa sokom bolesnog lišća reakcija je bila jedva primetna, ali ipak se mogla uočiti razlika između reakcije antiseruma sa sokom bolesnog lišća i sokom zdravog lišća. Ali, uopšte uzev, i u prvom i u drugom slučaju razlika nije bila toliko jasna da bi ovaj način zasada mogao imati neki praktični značaj za diagnostiku viroze na terenu. U svakom slučaju kapljicasti metod potrebno je još detaljnije ispitati.

14. Da se odredi vreme u toku kojeg antiserumi čuvaju sposobnost precipitinskih reakcija, s vremena na vreme ispitivali smo precipitinsko dejstvo antiseruma na soku bolesnih plodova koje smo čuvali u svežem stanju u toku 3 meseca u hladnjači na temperaturi od  $+0,5^{\circ}$  do  $-1,0^{\circ}$  C; docnije su bolesne šljive čuvane kao suve. Precipitinska moć počela je da primetno opada posle 5 meseci čuvanja. Kod većine seruma ona je trajala 8 meseci. Samo kod tri uzorka seruma (konserviranih sa 0,5% fenola) trajanje je bilo nešto duže, do 10 meseci. Ovaj zaključak traži proveravanje, pošto je čuvanje antiseruma bilo veoma nepovoljno i pod rđavim laboratorijskim prilikama. Iz prednje tačke bi se mogao izvesti zaključak da se u plodovima virus čuva svakako najmanje tri meseca. Ovaj zaključak ne mora da bude tačan, pošto, shodno ranije rečenom, i derivati odnosno raspadnuti virusi mogu da čuvaju antigenske osobine, a prema tome i moć precipitinskih reakcija.

## VII — Zaključak

Viroze voćaka malo su poznate, jer je njihovo eksperimentalno proučavanje dugotrajno. Celokupni rad na virozama voćaka je komplikovan i skup. Međutim, značaj viroza voćaka pri upoređenju sa značajem viroza drugih kulturnih biljaka povećava se time što su voćke skupe višegodišnje biljke, duže vremena podležu opasnosti zaražavanja i virus u njima može duže vremena da ostane prikriven, pridajući bolestima karakter podmuklosti.



Virusno oboljenje — šarka šljive ima velik ekonomski značaj za voćarstvo Jugoslavije. Najvažnija eksportna sorta šljive — požegača naročito strada od te bolesti. Usled toga ona može da postane potpuno nerentabilna. Uzročnik bolesti je **Prunus virus 7 A. Chr.** U članku se daje kratak opis šarke šljive.

Otkad je prvi put ustanovljeno (pre 15—20 god.) da su neki virusi hemijske supstance (nukleoproteidi), više od desetka virusa je izdvojeno u hemijski čistom stanju. Verovatno će se i za druge fitopatogene viruse isto ustanoviti. Važna je odlika ovih virusa mala specifičnost, koja ih odvaja od drugih uzročnika bolesti bilja. Ovo otežava njihovu klasifikaciju. Poznavanje osobina virusa je važno ne samo sa naučne, nego i sa praktične tačke gledišta.



Sl. 4 — Šarka šljive (**Prunus virus 7**) kod sorte dinjka. (Foto I. Pobegajlo)

Serološki način ispitivanja virusa pruža velike mogućnosti. On nalazi sve veću primenu, jer se pomoću njega mogu brzo i lako rešavati mnoga pitanja biljne virologije.

S obzirom na pomenuti značaj seroloških ispitivanja ne samo u fitopatologiji, nego i u agronomiji uopšte, u zasebnom poglavlju (IV. Serološka ispitivanja virusa) daju se opšti pojmovi iz serologije, terminologije i kratak istorijat seroloških ispitivanja fitopatogenih virusa. Sadržaj ovog poglavlja važan je ne samo za buduće radnike u poljoprivrednoj serologiji, nego i za razumevanje daljih izlaganja i rezultata seroloških ispitivanja šarke šljive.

Pre izlaganja sopstvenih ispitivanja, u članku je opisana metodika i tehnika serodijagnostike fitopatogenih virusa. Za dobijanje antise-

ruma uzeti su kunići. Detaljno se opisuje praksa imunizacije, uzimanje krvi, obrada antiseruma, ocena precipitinskih reakcija, čišćenje virusnog soka i superimunizacija.

Dosada u literaturi nema (koliko je autoru poznato, osim jednog slučaja) nikakvih podataka o antigenim svojstvima virusa drvenastog bilja (voćaka).

Serološka ispitivanja šarke imala su sledeće zadatke: 1) utvrditi antigenost virusa šarke (**Prunus virus 7**), 2) proizvesti antiserum šarke pomoću očišćenog soka bolesnog lišća i plodova (aluminium-hidroksidom i antiserumom normalne biljke) i 3) ustanoviti titar antiseruma šarke. Po dobijanju antiseruma u zadatku je bilo izvršiti precipitinske reakcije sa raznovrsnim bolesnim i normalnim biljkama.

U ovim ispitivanjima vršena je imunizacija 9 kunića i to: sokom bolesnog lišća i plodova požegače (**Prunus domestica**), očišćenim virusom (sokom) bolesnog lišća i plodova trnošljive (**Prunus insititia**), sokom normalnog lišća i plodova požegače, očišćenim virusom (pomoću antiseruma norm. biljke) lišća i plodova požegače i virusom belošljive (**Pr. domestica**) očišćenim pomoću aluminium-hidroksida. Imunizacija pretstavljena je na Tabl. I, u koju je unesen i titar antiseruma. Radi dobijanja višeg titra vršena je superimunizacija 3 kunića, koja je pretstavljena na Tabl. II. Precipitinske reakcije dobijenih antiseruma sa biljnim sokovima požegače, trnošljive, belošljive, džanarike, kajsije, breskve i trešnje pretstavljene su na Tabl. III. Na istoj tablici date su i precipitinske reakcije sa mozaičnim oboljenjima požegače i talijanke. K pomenutim tablicama data su kratka objašnjenja na str. 70.

Precipitinske reakcije raznih antiseruma šarke šljive sa antigenima raznih osetljivih biljaka dale su sledeće rezultate:

1. Virus šarke (**Prunus virus 7, A. Chr.**) ima antigenska svojstva. Prema precipitinskim reakcijama izgleda da je virus uskoprugaste šarke (**Pr. virus 7a, A. Chr.**) istovetan virusu Pr. virusu 7 ili je samo njegov soj.

2. Titar dobijenih antiseruma nije velik: od 1:500 do 1:900 i retko 1:1000, 1:1200. Superimunizacija ne povećava mnogo titar (do 1:1500). Antiserum bolesnih plodova ima veći titar, nego antiserum bolesnog lišća.

3. Antigenske osobine virusa u soku lišća u mnogim su slučajevima bile neodređene (— +), ali, uopšte uzev, precipitinske reakcije postoje i kod soka lišća. Jače precipitinske reakcije daju: antiserum bolesnih plodova i sok bolesnih plodova sa homolognim ili heterolognim antigenom odnosno antiserumom.

4. Čišćenje antigena soka bolesnog lišća aluminium-hidroksidom pre imunizacije ne povećava mnogo precipitinske reakcije, nasuprot čišćenju antigena bolesn. plodova, koje ima za posledicu povećanje intenziteta i jasnosti precipitinskih reakcija kod odgovarajućih antiseruma.

5. Lišće džanarike i kajsije sa znacima šarke daje precipitinske reakcije sa antiserumom šarke, koji ima jači titar. Ipak kod manjih titrova precipitacije sa sokom ovih biljaka bile su više puta negativne. Isti je slučaj bio i sa belošljivom. Ovo bi se moglo objasniti slabom

koncentracijom virusa u ovim biljkama. Verovatno je usled ovog i štetnost bolesti kod njih manja.

6. Sok lišća sa mozaičnim pegama breskve, trešnje i višnje ne reaguje sa antiserumom šarke. Isto tako ne daje precipitinske reakcije ni lišće požegače sa znacima marmorastog mozaika. Ali lišće talijanke sa nekrotičnim mozaikom daje precipitinske reakcije.

7. Kapljicaški metod ispitivanja virusa (prema Duninu i Popovoj) ne daje dobro uočljivu precipitaciju.

8. Izgleda da antiserum virusa šarke šljive ne čuva dugo sposobnosti precipitinskih reakcija (svoga je čuva oko 8—10 meseci). Ova konstatacija ne mora da bude tačna, zbog toga što su uslovi ispitivanja bili nepovoljni.

## SUMMARY

### THE SEROLOGICAL INVESTIGATIONS OF PLUM POX — »SHARKA« DISEASE

In Yugoslavia before the Second World War there appeared (1953) a dangerous virus disease on plum-trees (*Prunus domestica*, *Prunus insititia*), apricot-trees (*Pr. armeniaca*) and greengage (*Pr. mirabolana* — *Pr. cerasifera*). Some millions of plum-trees are diseased or threatened to become so which is of very great economic importance for the national economy of Yugoslavia. The disease is caused by Prunus virus 7 A. Chr. — The Yugoslav popular name for the disease is »sharka«, the English plum-pox.

Serological study of phytopathogenic viruses and virus diseases has developed in recent years. Serological methods have been successfully applied for a large number of plant viruses (about 15). All these viruses are from herbaceous plants. It is of great interest to investigate the serological properties of the sharka virus — the virus of woody plants the antigenic properties of which had to be detected.

To obtain the antiserum of Prunus virus 7 rabbits were used. The infections were intravenous (into marginal vein). The quantity of antigen, used for each injection, was from 1 c. c. to 3 c. c. From 10 to 13 injections were made at one to two day intervals. Ten days after the last injection all rabbits we have used were bled and the sera were collected. A number of injections were made with the antigen (infective sap of plum-leaves and plum-fruits) purified by normal antisera or by aluminium-hydroxide. The superimmunization also was made to ensure a better titre of antisera.

The serological investigation of sharka gave the following results:

1. The virus of sharka-Prunus virus 7 A. Chr. (the broad striped variation) has antigenic properties. The virus of the narrow striped variation — Pr. virus 7a A. Chr. (18) gives precipitin reactions with sharka-antisera. Therefore probably it is the same virus or one of the strains of Pr. virus 7.

2. In many cases the antigenity of the diseased leaves was doubtful (— +), but comparing the reactions of antisera + normal sap with those of antisera + diseased sap, the antigenity is undoubted. The precipitin reactions to the sap of diseased fruits are always stronger than those effected by the sap of diseased leaves.

3. The titres of antisera are: by immunizations 1:500, 1:900 and seldom 1:1200, 1:1300; by superimmunizations — 1:1500.

4. The purified sap of diseased leaves (the purification before the immunization) does not produce any better precipitin reaction, but the purified sap of diseased fruits does improve it.

5. Leaves of diseased greengage (*Prunus mirabolana* — *Pr. cerasifera*) and apricots, (*Prunus armeniaca*) give precipitin reactions with antisera to sharka virus (*Pr. virus 7*). But these reactions are doubtful or not present with antisera which have small titres. It is possible that this absence of precipitin reactions is due to insufficient concentration of virus in these plants.

6. Leaves of peach, cherry and sour cherry with mosaic signs do not give precipitin reactions with sharka-antisera. The same is the case with the necrotic mosaic on Italian plum.

7. The antisera remain active during 8—10 months. This statement may prove untrue, since the test conditions in experiments were bad.

The results of serological tests are presented in 3 Tables: Table I. — Immunization of rabbits with saps of diseased plum-trees (*Prunus virus 7 A. Chr.*); Table II. — Superimmunization of rabbits with *Pr. virus 7*; and Table III. — Precipitin reaction of *Prunus virus 7* antisera with saps from different plants (diseased and non diseased).

### VIII — LITERATURA

1. Atanasov D.: Šarka po slivite. Sofija, 1932.
2. ————— Bolesti na kulturnite rastenija. Sofija, 1934.
3. ————— Šarka po slivite. Sofija, 1938.
4. Atanasoff D.: Mosaic of Stone Fruits. *Phytop. Zeitsch.* Bd. VIII. Berlin, 1935.
5. ————— Bitter pit of apples: a virus disease? Sofia, 1933.
6. ————— Bitter pit of some fruit is a virus disease. Yearbook of the Univer. Sofia, 1934—1935.
7. ————— Mosaic disease of drupaceous fruit trees. Sofia, 1934.
8. Bawden F. C.: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham, 1950.
9. Bercks R.: Serologische Untersuchungen über das X-Virus in Kartoffelpflanzen. *Phytopath. Zeitschr.* Bd. 16, 1950.
10. Breed R., Murray E., Hitchens A.: *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology.* London, 1948.
11. Calmette A., Boquet A., Nègre L.: *Manuel technique de microbiologie et de sérologie.* Paris, 1948.
12. Chester Ken.: Specific quantitative neutralization of the viruses of tobacco ring-spot and cucumber mosaic by immune sera. *Phytopathology.* Vol. 24, Numb. 11, 1934.
13. ————— Serological evidence in plant virus classification. *ibid.* Vol. 25, 7, 1935.
14. ————— The antigenicity of plant viruses. *ibid.* Vol. 25, 7, 1935.
15. ————— Serological studies of plant viruses. *Phytopath.* Vol. 27. 1937.
16. Christoff Al.: Mosaikkrankheit oder Virus-Chlorose bei Aepfeln. — *Phytopath. Zeitschr.* Bd. VII. Berlin, 1934.
17. ————— Mosaikfleckigkeit, Chlorose und Stippenfleckigkeit bei Aepfeln, Birnen und Quitten. *ibid.* Bd. VIII (3). Berlin, 1935.

18. ———— Virus diseases of the genus *Prunus* in Bulgaria. *Ibid.* Bd. XI. Berlin, 1938.
19. Dunin M. i Popova N.: Kapeljnyj metod analiza virusov v rastenijevodstvu. Moskva, 1937.
20. Hristov Al.: Virusnite bolesti po ovošcnite drveta. Sofija, 1938.
21. ———— Šarkata po slivite. *Izvestija Na Kamarata na Narodnata Kultura.* Sofija, 1947.
22. Jermoljev E. i Hruška L.: Serologická metoda určování virových chorob u bramborů. Praha, 1947.
23. Josifović M.: Mozaik na šljivi. Jedna virusna bolest šljive. — *Arhiv Ministarstva poljoprivrede.* Sv. 7. Beograd, 1937.
24. Kovačevski Iv. Hr.: Šarka po slivite. Sofija, 1934.
25. Kunkel L. O.: Immunological studies on the three peach diseases. Yellows, Rosette, and Little Peach. *Phytopathology.* Numb. 26. 1936.
26. Melhus I. and Kent G.: *Elements of Plant Pathology.* New York, 1948.
27. Mulvania M.: Studies on the nature of the virus of tobacco mosaic. *Phytopathology.* Vol. 16 p. 853. 1926.
28. Nikolić V.: Viroze kulturnih biljaka. Beograd, 1949.
29. ———— Nove viroze koštičavog voća u FNRJ. — *Zaštita bilja.* Sv. 3. Beograd, 1951.
30. Pobegajlo I.: Šarka šljive. Beograd, 1939.
31. ———— Šarka šljive. Poučno uputstvo za voćare. Beograd, 1940.
32. ———— Šarka šljive — opasna bolest šljiva. Sarajevo, 1948.
33. ———— Šarka šljive, njena pojava u Bosni i Hercegovini i ogledi sa njenim suzbijanjem pomoću agrotehničkih mera. — *Godišnjak Biološkog Instituta.* IV sv. 1. Sarajevo, 1951.
34. Rižkov V. L.: Imunitet rastenij k boleznjam, vyzyvajemym filtrujuščim-sja virusom, Imunitet s.-h. rastenij k boleznjam i vrediteljam. Leningrad, 1937.
35. Salle A. J.: *Fundamental Principles of Bacteriology.* New York, 1948.
36. Smith Ken.: Recent advances in the study of plant viruses. London, 1951.
37. ———— A textbook of plant virus diseases. London, 1937.
38. ———— *Plant viruses.* London, 1948.
39. Stanley W. M.: Isolation of a Crystalline Protein possessing the Properties of Tobacco Mosaic Virus. *Science (N. S.)* № 81, 1935.
40. Stapp C.: Die serologische Virusdiagnose und ihre Bedeutung für den Kartoffelbau. *Mitteil. aus d. Biolog. Reichsanst. f. Land- und Forstwirtschaft.* № 67. Berlin, 1943.