

Frugttræ-vira inaktiveret ved termoterapi

Ved Arne Thomsen

811. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning omhandler undersøgelser og forsøg, der siden 1954 har været udført med henblik på inaktivering af forskellige frugttrævira. Arbejdet er planlagt og udført af den virologiske afdeling på Statens plantepatologiske Forsøg.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
I. Indledning	141
II. Forsøgsmateriale og metodik	142
III. Resultater	143
1. Inaktivering af gummived-virus hos æbletræer	143
2. Inaktivering af mosaik-virus hos æbletræer	144
3. Inaktivering af grubet ved-virus hos æbletræer	145
4. Inaktivering af klorotisk bladplet-virus hos æbletræer	146
5. Inaktivering af epinasti-virus hos æbletræer	147
6. Inaktivering af nerveklorose-virus hos pæretræer	148
7. Inaktivering af ringmosaik-virus hos pæretræer	149
IV. Diskussion	150
V. Resumé	150
VI. Summary	151
VII. Litteratur	152

I. Indledning

Varmebehandlinger af virusangrebne frugttræer har været kendt siden Kunkel i 1935 og 1936 berettede om heldigt udførte amerikanske forsøg (10-11) med ferskentræer angrebet af virus-sygdommen fersken-gulsot. Ved disse forsøg blev pottede ferskentræer med angreb af den pågældende sygdom anbragt ved en temperatur som varierede mellem 34,4 og 36,3°C og helbredelse blev opnået efter 2 ugers forløb. Ferskentræer i hvileperioden angrebet af fersken-gulsot – samt pødekviste fra sådanne planter – kunne ligeledes helbredes ved 10 min. ned-sænkning i 50°C varmt vand. Desuden viste resultaterne fra de tidligere amerikanske forsøg, at varmebehandlinger kunne helbrede fersken-

træer angrebet af viroserne »småferskner« (Little peach), »rød fure« (Red suture) og »ferskenroset« (Peach rosette).

Skønt Kunkel opnåede særdeles gunstige resultater, gik der adskillige år, før termoterapien fik praktisk betydning ved bekæmpelse af frugt-træernes virussygdomme. Den almindelige op-fattelse var, at virussygdomme hos planter var uhelbredelige. Varmebehandlinger af virusan-grebne sukkerrørssstiklinger fandt dog sted, men blev betragtet som undtagelsestilfælde.

Ved amerikanske forsøg lykkedes det senere at befri *Vinca* sp. og *Nicotiana rustica* for As-ter-gulsot-virus samt *Vinca* sp. og kartoffel-knolde for heksekost-virus (Potato witches broom virus).

Efter adskillige år uden egentlig aktivitet på det termoterapeutiske område lykkedes det *Kassanis* (1949) på Rothamsted forsøgsstation i England at inaktivere kartoffel-bladrulle-virus ved anvendelse af varmluftbehandlinger (37,5°C i 25 døgn) (4). *Kassanis* m. fl. viste snart efter, at andre vira kunne inaktiveres (5) ved tilsvarende behandlinger.

Den anvendte teknik – varmluftbehandling af virusangrebne planter i længere tid – er senere taget i brug verden over, og talrige vellykkede varmebehandlinger er gennemført med en lang række vira hos mange forskellige plantearter. I Danmark er der ved Statens plantepatologiske Forsøg i årene 1954, 1955 og 1956 således foretaget omfattende termoterapeutiske forsøg med aspermi-virus hos *chrysanthemum*, og resultaterne derfra viste (9), at den bedste årstid for behandling var april-maj, og den mest hensigtsmæssige temperatur 37-38°C, uagtet helbredelse var opnået ved 32°. I nogle tilfælde blev det pågældende virus inaktiveret efter kun 14 døgn behandling, men sikrere resultater opnåedes ved behandlinger med en varighed på 32 døgn og derover.

Det konkluderedes, at små planter var lettere at helbrede end store planter, hos hvilke der ofte kun har været tale om partiel helbredelse. Hos sådanne partielt helbredte planter har afskærne topstiklinger i de fleste tilfælde været virusfrie.

Hos virusangrebne planter, hvor termoterapi ikke virker, er det i adskillige tilfælde lykkedes at fremskaffe virusfrie planter ved anvendelse af meristemkulturer. *Morel* og *Martin* viste i 1952, at det apikale meristem fra virusinficerede *Dahlia* var virusfrit, og at der ved dyrkning af det afskærne meristem under aseptiske forhold kunne fremskaffes en virusfri plante (12). Hidtil har meristemkulturer dog ikke været anvendt i større omfang ved fremskaffelse af virusfrie frugttræer. De bedste resultater er hidtil opnået ved, at man fra varmebehandlede træer har udtaget små urteagtige skudspidser, som er podet og opformeret på virusfrie grundstammer (tipkulturer).

Termoterapeutiske forsøg med virusangrebne

frugttræer har siden 1954 været udført ved Statens plantepatologiske Forsøg, og positive resultater er opnået med følgende vira hos æbletræer: gummived, mosaik, grubet ved, klotriske bladpletter og epinasti samt endvidere med pæreviroserne: nerveklorose og ringmosaik.

II. Forsøgsmateriale og metodik

Plantematerialet, som er anvendt ved de termoterapeutiske forsøg, hidhører fra æble- og pæretræer med kendte virusangreb.

De enkelte planter er inden behandlingernes påbegyndelse rodfæstet i store pletter med god og næringsrig jord. Der er både før og under behandlingerne sørget for rigelig næringstilførsel. Alle behandlinger er gennemført i et varmerum med 16 m³ rumvolumen og et gulvareal på 6 m².

For at sikre uafhængighed af sollys og dets indflydelse på rumtemperaturen, er der udelukkende anvendt kunstige lyskilder. Ved konstant belysning med 24 stk. 60 watt lysstofrør er der givet planterne tilstrækkeligt lys til god vækst. Lysintensiteten (40 cm over gulvplanet) har ifølge udførte målinger været mellem 3550 og 5250 lux. Ventilationen er foretaget ved hjælp af gennemstrømmende varm luft.

Temperaturen er reguleret ved hjælp af kontakttermometre i forbindelse med varmetrædsrelæer til 37°C ± 1°C.

Før, under og efter behandlingen er der af forsøgsplanterne udtaget formeringsmateriale, som er podet på virusfrie grundstammer.

Et omfattende registrerings- og testningsarbejde er udført, og alle træerne er så vidt muligt undersøgt flere gange ved testning til indikatorplanter, hvilket har medført et meget stort forbrug af plantemateriale.

Selve testningsarbejdet er foretaget efter internationalt anerkendte metoder; disse går i princippet ud på at overføre smitstof fra planter, som skal undersøges (ved podning eller okulation) til følsomme indikatorplanter, som i tilfælde af virusinfektion reagerer med karakteristiske symptomer.

Til nærværende arbejde er anvendt følgende indikatorer:

Værtplante og sygdom	Virus indikator
<i>Æble</i>	
Gummived	Lord Lambourne
Mosaik	Jonathan
Grubet ved	Virginia Crab K.6.
Klorotisk bladplet	Russisk æbleklon R.12740-7A, Spy 227
Epinasti	Spy 227.
<i>Pære</i>	
Nerveklorose	Comice, Beurré Hardy
Ringmosaik	Spy 227, Beurré Hardy

III. Resultater

1. Inaktivering af gummived-virus hos æbletræer

Et 6 år gammelt Lord Lambourne-træ angrebet af gummived blev i 1963 med klump anbragt i en potte med henblik på termoterapeutisk

37°C og tipkulturer etableredes efter 35, 36, 73 og 82 døgn forløb.

Efter varmebehandlingens afslutning blev både kontroltræer og tipkulturer udplantet på friland i maj måned 1964. Kontroltræerne målte ved udplantningen 10-15 cm og tipkulturerne var 0,5 til 1,5 cm lange.

Tabel 1 viser varmebehandlingens indflydelse på symptomer og vækst. I sommeren 1964 fandt der praktisk taget ingen vækst sted hos tipkulturerne, og disse målte gennemsnitlig under 5 cm i efteråret 1964. Den registrerede vækst har således i overvejende grad fundet sted i sommeren 1965.

Ved 37°C i 82 døgn er der, som det fremgår af tabellen, opnået en kraftig vækststimulering.

Tabel 2 viser resultater fra en undersøgelse udført i april 1966, hvor de pågældende træer

Tabel 1. Varmebehandling af gummived-angrebne Lord Lambourne (Symptomer og vækst)

Behandling	Antal podninger udført		Gummived symptomer 1965	Træhøjde i cm målt i nov. 1965		
	1964	levende 1965		højeste	laveste	gens.
Ingen (kontrol).....	20	20	kraftige	77	20	57
35 døgn ved 37°C	12	10	kraftige	84	25	57
36 døgn ved 37°C	9	7	kraftige	56	37	54
73 døgn ved 37°C	9	8	svage	107	22	62
82 døgn ved 37°C	10	5	ingen	127	60	89

forsøg. Af træets krone blev der den 30. januar 1964 afskåret podekviste, hvoraf der blev tiltrukket 20 træer på vildstamme. Modertræet blev den 3. februar indsat i termorum ved

er undersøgt dels ved bøjningsmetoden (udført på friland) og dels ved floroglucinsaltsyre-metoden (udført i laboratoriet).

De to metoder viser god overensstemmelse,

Tabel 2. Varmebehandlingens indflydelse på gummived-viruset hos Lord Lambourne (Symptomregistrering og floroglucinprøve)

Behandling	Antal planter undersøgt 1966	Gummived-symptomer hos antal planter			Antal reaktioner ved floroglucinprøve				
		kraftige	svage	ingen	1	2	3	4	5
Ingen (kontrol).....	20	20							
35 døgn ved 37°C	8		2	6	1			1	6
36 døgn ved 37°C	7		2	5				2	5
73 døgn ved 37°C	8			8					8
82 døgn ved 37°C	5			5					5

1, 2, 3, 4 og 5 angiver farvestyrken fremkaldt af floroglucinsaltsyre.

Floroglucinsaltsyre farver lignin rødt. Lignin-fattige områder (gummived) farves ikke. Den mørkeste farve er anført som 5.

og der er fremskaffet planter uden gummived ved alle behandlinger.

De bedste resultater er dog opnået efter 82 døgn i varmerum, hvor alle tiltrukne planter blev helbredt for sygdommen.

Ved gennemgang af de behandlede træer i oktober 1967 (d.v.s. fire vækstsæsoner efter behandlingen) var disse stadig uden gummived-symptomer.

2. Inaktivering af mosaik-virus hos æbletræer

Forsøg med varmebehandling af mosaik-virus hos æbletræer blev indledt i august 1954, hvor okulationskviste fra et angreb Cox's Orange-træ blev opvarmet i vandbad til 50°C. Behandlingstiden varierede fra 30 sek. til 30 min.

Forsatte forsøg med varmtvandsbehandling af mosaikangrebne æbletræer, som blev påbegyndt i 1955 og 1956 gav ligeledes negative resultater.

I april 1955 påbegyndte man på Statens plantepatologiske Forsøg varmluftbehandling af etårige mosaikangrebne æbletræer af sorten Cox's Orange.

Disse blev placeret i varmerum med lufttemperaturer på 37° og 39°C, hvorfra de blev taget ud i hold på 5 planter efter henholdsvis 15, 25 og 50 døgn forløb. De pågældende træer var tiltrukket og rodfæstet i 6"-potter.

Efter varmebehandlingens afslutning blev de 24 overlevende træer udplantet på friland, hvor alle viste mosaiksymptomer i 1956 og 1957.

Tabel 3. Varmtvandsbehandling af okulationskviste inficeret med æble-mosaik-virus.

Behandlingstid (ved 50°C)	Tilvækst af okulanter 1955-56					Æble-mosaik-symptomer på	
	1	2	3	4	5	okulant nr.	grundstamme nr.
						1955-56	1955-56
30 sek.	+	—	+	—	—	1—3	1—3—4—5
1 min.	+	—	+	—	+	1—3—5	1—2—3—4—5
2 min.	—	—	—	+	—	4	1—3—4—5
2½ min.	+	—	+	+	—	1—3—4	1—2—3—4—5
3 min.	—	—	—	—	—		1—2—3—5
5 min.	—	—	—	—	—		1—2
10 min.	—	—	—	—	—		
15 min.	—	—	—	—	—		
20 min.	—	—	—	—	—		
25 min.	—	—	—	—	—		
30 min.	—	—	—	—	—		
Ubehandlet.	+	+	+	+	+	1—2—3—4—5	1—2—3—4—5

+ = okulationen slået an.

Fra hvert forsøgsled blev der af de behandlede kviste okuleret 5 øjne på virusfrie æblegrundstammer.

Resultaterne fra dette forsøg fremgår af tabel 3, som viser, at okulationskvistene har tålt opvarmning på 50°C i 2½ min. og været i stand til at vokse derefter, endvidere at smitteoverføring har fundet sted fra okulationskviste, som er behandlet i kortere eller længere tid ved samme temperatur, også i tilfælde, hvor knopperne ikke overlevede behandlingen. 5 min. opvarmning ved 50°C har således ikke været i stand til at inaktivere æblemosaik-virus.

Tilsvarende varmebehandlinger af mosaikangrebne æbletræer er siden gennemført, og selv om nyvæksten, som fremkom under og umiddelbart efter varmebehandling, altid var

Tabel 4. Antal levende æbletræer efter varmebehandling

(5 mosaikangrebne Cox's Orange pr. forsøgsled)			
Temperatur	Behandlingens varighed		
	i døgn		
	15	25	50
37°C	5	5	4
39°C	5	5	0

symptomløs, var resultaterne stadig negative, idet ingen varig inaktivering af mosaik-viruset blev opnået.

For at undersøge muligheden for inaktivering af mosaik-virus i okulationsøjne fra langtidsvarmebehandlede æbletræer, blev 10 angrebne etårige træer af sorten Laxtons Superb behandlet ved 37°C i 45 døgn. Behandlingerne fandt sted i 1955, og umiddelbart efter behandlingens afslutning den 15. juli, blev materiale fra 9 overlevende træer okuleret på æblevildstammer.

Resultaterne fra dette forsøg fremgår af tabel 5, som bl.a. viser, at der i 1955 blev foretaget 39 okulationer, hvoraf 16 okulanter levede i 1956 og udviklede sig som symptomløse planter. I 1957 var kun 7 af de samme planter uden mosaik-symptomer.

Verificering ved testning til indikatorsorten Jonathan i 1958 og 1959 viste, at de 7 planter var sunde, hvilket sandsynliggør, at mosaik-viruset er inaktiveret ved varmebehandlingen i 1955.

Tabel 5. Inaktivering af mosaik-virus i okulationsøjne

Laxtons Superb træ nr.	Antal okulanter		Planter med mosaik	
	okuleret 1955	levende 1956	1956	1957
1	1	1	0/1	0/1
2	4	4	0/4	1/4
3	5	2	0/2	2/2
4	8	0		
5	8	1	0/1	0/1
6	5	3	0/3	3/3
7	2	2	0/2	0/2
8	4	3	0/3	3/3
9	2	0		
10	0	0		

Tæller = antal planter med mosaik-symptomer

Nævner = " " undersøgt

De hidtil bedste resultater med inaktivering af æble-mosaik-virus er opnået ved en kombination af varmebehandling og anvendelse af tipkulturer.

I tabel 6 vises resultater fra behandlinger udført ved 37°C. i foråret 1964 med 10 mosaik-angrebne Ingrid Marie-træer.

De pågældende træer blev alle tiltrukket i 10 liter plasticspande med næringsrig jord, og ved okulation blev træerne som etårige i august 1962 smittet med æble-mosaik-virus. Alle træer viste i sommeren 1963 tydelige mosaik-symptomer.

Fra hvert træ blev der den 15. februar 1964 udført kontrolpodninger, og varmebehandlingen af de 10 træer blev herefter indledt. Tipkulturer blev etableret efter 20, 30 og 40 døgn varmebehandlinger.

Tabel 6. Varmebehandling af mosaik-angrebne æbletræer (Ingrid Marie)

Materiale hidrørende fra forsøg påbegyndt i 1964	Antal planter m. mosaik- virus ifølge testning 1965-67
Kontrolpodninger af de ubehandlede moderplanter	10/10
Varmebehandlede moderplanter	10/10
Tipkulturer tiltrukket efter 20 døgn ved 37°C	5/30
Tipkulturer tiltrukket efter 30 døgn ved 37°C	0/27
Tipkulturer tiltrukket efter 40 døgn ved 37°C	1/15
Tæller = antal planter med mosaik	
Nævner = antal planter undersøgt	

Alle 92 planter, som er omtalt i tabel 6, er undersøgt ved testning til indikatorsorten Jonathan, hvorved der blev fundet mosaik hos alle kontrol- og moderplanter, mens der kun blev konstateret mosaik-forekomster hos 6 af 72 undersøgte tipkulturer.

Endnu ikke afsluttede forsøg tyder stærkt på, at moderplanternes vækstkraft under varmebehandlingen er af overordentlig stor betydning for opnåelse af et gunstigt resultat. Der bør utvivlsomt ved fremtidige behandlinger tilstræbes så god en forbehandling af planterne som muligt.

3. Inaktivering af grubet ved-virus hos æbletræer

Den 9. februar 1963 blev 5 æbletræer med infektion af grubet ved-virus anbragt i varmerum ved 37°C. Fra de pågældende træer var der i

forvejen skåret podekviste til tiltrækning af ubehandlede kontroltræer.

Varmebehandlingen fandt sted på sædvanlig måde, idet der efter visse intervaller blev udtaget formeringsmateriale til fremstilling af tipkulturer.

I juni måned 1963 – efter behandlingernes afslutning – blev såvel kontrolplanter som tipkulturer udplantet på friland, hvor førstnævnte straks kom i vækst, hvorimod tipkulturerne ikke voksede nævneværdigt i udplantningsåret. Væksten var god hos begge kategorier i de følgende år.

For at undersøge varmebehandlingens indflydelse på sygdommen, blev der i august 1965 af samtlige forsøgsplanter udtaget materiale

som inokuleredes til planter af indikatorsorten Virginia Crab K6.

Resultaterne fra dette testningsarbejde fremgår af tabel 7, som viser, at alle kontrolplanterne var angrebet af sygdommen, og at der er opnået positive resultater hos træer af fire æblesorter. Ved varmebehandling i 33 døgn er der hos sorterne Bodil Neergaard og Ingrid Marie opnået henholdsvis 1 og 2 sunde planter. Efter behandlinger af længere varighed er alle planter sunde hos sorterne Bodil Neergaard, Bramley Seedling og Guldborg, mens der efter 66 og 79 døgn's behandlingstid af Ingrid Marie forekom både sunde og syge planter.

Hos Graasten er der ikke opnået inaktivering af viruset, idet alle behandlede planter stadig var inficeret.

De opnåede resultater må tages med et vist forbehold, idet kun 2 år er hengået siden testningens påbegyndelse.

Forsøgene indikerer imidlertid, at varmebehandling ved 37°C har indflydelse på sygdommen »grubet ved« og at det forårsagende virus formentlig er inaktiveret.

4. Inaktivering af klorotisk bladplet-virus hos æbletræer

Malus Platycarpa er følsom over for klorotisk bladplet-virus og viser i tilfælde af infektion typiske virussyntomer på bladene, og inficerede planter af denne art blev derfor anvendt til de indledende termoterapeutiske forsøg med det pågældende virus.

Den 8. januar 1963 blev 8 toårige planter (inficeret med klorotisk bladplet-virus) indsat i termorum ved 37°C lufttemperatur.

Efter henholdsvis 3 og 6 ugers behandling, blev der udtaget formeringsmateriale til fremstilling af tipkulturer. Disse blev sammen med deres respektive moderplanter udplantet i maj måned på friland til observation for symptomforekomster.

Ved symptomregistreringerne, som blev foretaget i perioden 1963-65, viste det sig, at samtlige behandlede moderplanter havde virussyntomer, hvorimod der blandt tipkulturerne, der blev etableret efter 3 og 6 ugers varmebehand-

Tabel 7. Termoterapeutiske forsøg med forskellige æblesorter, inficeret med grubet ved-virus

Materiale fra forsøg påbegyndt 1963		Resultat fra testning 1965-
Sort	Behandling	67
Bodil Neergaard	K ingen	4/4
	T 35 døgn ved 37°C	5/7
	T 79 " " 37°C	0/3
Bramley Seedling	T 108 " " 37°C	0/1
	K ingen	4/4
	T 33 døgn ved 37°C	1/1
Guldborg	T 66 " " 37°C	0/1
	T 79 " " 37°C	0/3
	T 118 " " 37°C	0/4
Graasten	K ingen	4/4
	T 33 døgn ved 37°C	1/1
	T 66 " " 37°C	0/1
Ingrid Marie	T 79 " " 37°C	0/3
	T 118 " " 37°C	0/4
	K ingen	4/4
	T 33 døgn ved 37°C	2/2
	T 66 " " 37°C	2/2
	T 79 " " 37°C	1/1
	K ingen	4/4
	T 33 døgn ved 37°C	1/2
	T 66 " " 37°C	2/3
	T 79 " " 37°C	1/5
	T 117 " " 37°C	0/1

K = kontrolplanter tiltrukket på æblevildstammer

T = tipkulturer tiltrukket på æblevildstammer

Tæller = antal planter med grubet ved

Nævner = antal planter undersøgt

ling, var henholdsvis 36 og 74 pct. symptomløse planter.

Der er ikke – efter forsøgets afslutning – foretaget nogen egentlig testning af de symptomløse planter, men resultaterne fra de nævnte symptomregistreringer peger på, at der hos angrebne *Malus Platycarpa* er opnået positive resultater med termoterapi, når denne blev kombineret med tipkulturer.

I 1963 blev der påbegyndt termoterapeutiske forsøg med æblegrundstammen A2, inficeret med klorotisk bladplet-virus. Fra 10 planter af nævnte grundstamme blev der før, under og efter behandlingen udtaget formeringsmateriale. Endvidere blev de udtagne tipkulturer undersøgt for virusinfektion. Ved disse testninger er to indikatorer anvendt, nemlig Spy 227 og R 12740-7A (2 × 3 planter pr. prøve).

Resultaterne fra disse forsøg er vist i tabel 8. Det ses her, at moderplanterne var inficeret før behandlingen, og en varig helbredelse ikke har fundet sted. Derimod er de fleste tipkulturer sunde, idet der blandt dem, som er tiltrukket efter 34 og 86 døgn ved 37°C, kun er henholdsvis 3 og 1 af 15 planter med angreb af klorotisk bladplet-virus.

Tabel 8. Termoterapeutiske forsøg med æblestammen A2 med klorotiske bladplet-virus

Materiale fra forsøg påbegyndt i 1963	Resultat fra testning 1967
Kontrolpodninger af de ubehandlede moderplanter	10/10
Varmebehandlede moderplanter	10/10
Tipkulturer tiltrukket efter 34 døgn ved 37°C.....	3/15
Tipkulturer tiltrukket efter 86 døgn ved 37°C.....	1/15
Tæller = antal planter m. klorotisk bladplet-virus	
Nævner = antal planter	

I 1964 påbegyndtes en ny serie termoterapeutiske forsøg omfattende 11 angrebne sorter. Fra disse blev der udtaget formeringsmateriale før, under og efter behandlingen.

Resultaterne fra disse forsøg er anført i tabel 9. Det fremgår, at moderplanterne var inficeret før behandlingen, og at en varig helbredelse

af disse kun har fundet sted i få tilfælde. Derimod var de fleste tipkulturer sunde. De bedste resultater er opnået efter mindst 20 døgn behandlingstid.

Det fremgår iøvrigt, at selv langvarige varmebehandlinger ikke altid sikrer totalt virusfrie planter, hvorfor testninger er nødvendige i hvert tilfælde.

Ved nævnte forsøg er klorotisk bladplet-virus inaktiveret hos følgende æblesorter: Belle de Boskoop, Cortland, Cox's Orange, Golden Delicious, James Grieve, Jonathan, McIntosh, Schneiderapfel, Spartan, Stark Earliest og Transparente blanche.

Tabel 9. Termoterapeutiske forsøg med forskellige æbletræer, inficeret med klorotisk bladplet-virus (Spy 227 som indikator)

Materiale fra forsøg påbegyndt i 1964	Resultat fra testning 1967
Kontrolplanter fra ubehandlede moderplanter	54/54
Varmebehandlede moderplanter	18/22
T 14 døgn ved 37°C	6/27
T 20 " " "	2/18
T 29 " " "	2/18
T 30 " " "	1/8
T 64 " " "	0/3
T 65 " " "	0/17
T 71 " " "	0/7
T 72 " " "	0/6
T 83 " " "	1/13
T 84 " " "	1/15
T 85 " " "	0/12
T 86 " " "	0/2
T 92 " " "	0/18
T 93 " " "	0/13
T 106 " " "	0/15
T 108 " " "	1/18
T 117 " " "	0/13

T = tipkulturer tiltrukket på vildstammer

Tæller = antal planter med klorotiske bladpletter

Nævner = antal undersøgte planter

5. Inaktivering af epinasti-virus hos æbtetræer

Ved danske undersøgelser er det hidtil ikke lykkedes at finde planter med infektion af epinasti-virus, uden at disse træer samtidig var inficeret med klorotisk bladplet-virus.

Desuagtet er der ved termoterapeutiske forsøg, som blev iværksat i februar 1964, opnået værdifulde oplysninger om mulighederne for inaktivering af førstnævnte virus. Tabel 10 og 11 viser resultater, som er opnået ved varmebehandling og etablering af tipkulturer fra forskellige æbletræer inficeret med klorotisk bladplet-virus og i nogle tilfælde tillige med epinasti-virus.

I tabel 10, hvor resultater fra forsøg med æblesorten Belle de Boskoop er vist, ses, at træerne nr. 1, 2, 4 og 5 før behandlingen var inficeret med klorotisk bladplet-virus, og at træerne nr. 1 og 2 tillige var inficeret med epinasti-virus. Testningsresultater fra træ nr. 3 før behandlingen foreligger ikke, men sandsynligvis har dette træ ligesom de øvrige indeholdt klorotisk bladplet-virus udover epinasti-virus.

Hos langt de fleste tipkulturer er der opnået inaktivering af klorotisk bladplet-virus – både

Tabel 10. Termoterapeutiske forsøg med Belle de Boskoop, inficeret med klorotisk bladplet-virus og epinasti-virus

træ nr. (klon)	Materiale fra forsøg påbegyndt 1964 behandling	Virusinfektion iflg. testning 1967	
		klorotiske bladpletter	epinasti
1	K ingen	1/1	1/1
	T 14 døgn ved 37°C	1/8	4/8
	T 65 " " "	0/5	2/5
2	K ingen	3/3	3/3
	T 14 døgn ved 37°C	0/4	4/4
	T 65 " " "	0/2	0/2
3	K ingen	?	?
	T 14 døgn ved 37°C	0/3	3/3
	T 65 " " "	0/3	1/3
4	K ingen	1/1	0/1
	T 14 døgn ved 37°C	0/1	0/1
	T 65 " " "	0/1	0/1
5	K ingen	3/3	0/3
	T 14 døgn ved 37°C	1/2	0/2
	T 65 " " "	0/3	0/3

K = kontrolplanter tiltrukket på æblevildstammer
T = tipkulturer

Tæller = antal planter med virusinfektion

Nævner = " " undersøgt

? = kontrolplanter døde 1967 (ingen unders.)

Tabel 11. Termoterapeutiske forsøg m. James Grieve, inficeret med klorotisk bladplet-virus og epinasti-virus

træ nr. (klon)	Materiale fra forsøg påbegyndt 1964 behandling	Virusinfektion iflg. testning 1967	
		klorotiske bladpletter	epinasti
1	K ingen	1/1	1/1
	T 14 døgn ved 37°C	0/3	3/3
	T 28 " " "	0/3	1/3
	T 32 " " "	0/4	0/4
2	K ingen	2/2	2/2
	T 14 døgn ved 37°C	1/4	4/4
	T 28 " " "	1/6	4/6
	T 32 " " "	0/3	2/3
3	K ingen	4/4	0/4
	T 14 døgn ved 37°C	2/7	0/7
	T 28 " " "	1/5	0/5
	T 32 " " "	0/2	0/2
4	K ingen	3/3	0/3
	T 14 døgn ved 37°C	0/3	0/3
	T 28 " " "	0/3	0/3
	T 32 " " "	0/3	0/3

K = kontrolplanter tiltrukket på æblevildstammer

T = tipkulturer

Tæller = antal planter med virusinfektion

Nævner = antal planter undersøgt

hvor dette virus har optrådt alene, og hvor det har optrådt sammen med epinasti-virus.

Det fremgår, at epinasti-virus inaktiveres vanskeligere end klorotisk bladplet-virus, idet positive resultater først opnås efter længere tids varmebehandling.

Tabel 11 omhandler resultater fra varmebehandling af klorotisk bladplet-virus og epinasti-virus hos forskellige træer af sorten James Grieve og bekræfter resultaterne (tabel 10), der er opnået ved behandling af Belle de Boskoop.

6. Inaktivering af nerveklorose-virus hos pæretræer
Ved termoterapeutiske forsøg er det lykkedes at helbrede flere pæresorter, angrebet af nerveklorose-virus.

De første forsøg blev påbegyndt i 1959, hvor materiale af sorten Clara Frijs blev helbredt. Okulationsøjne som hidhørte fra langtidsvarmebehandlede træer blev okuleret på sunde pærevildstammer. Af 30 okulationsøjne,

Fig. 1. Skudspidser af varmebe-
handlet æbletræ.

Terminal growths from heattreated
appletree.

Foto J. B.



Fig. 2. T. v.: Etårig tippodning.
T. h.: Nyetableret tippodning.
Left: One year old tipgraft. Right:
Newly established tip graft.

Foto J. B.

Fig. 3. Virginia Crab K. 6. med infektion af grubet ved-virus — blottægning af ved.

Virginia Crab K. 6. infected with stem pitting virus — exposure of wood.

Foto J. B.

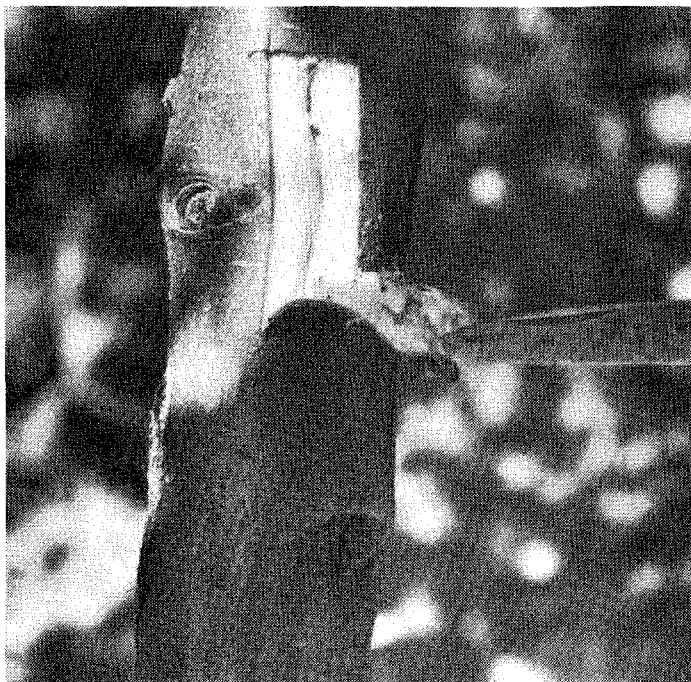


Fig. 4. Testning af Gråsten for epinasti-virus. Bemærk kraftig reaktion hos Spy 227.

Testing of Gravenstein for epinasty virus using Spy 227 as indicator. Note severe reaction in Spy 227.

Foto J. B.

Fig. 5. Til venstre: Blad af *Malus Platycarpa* med infektion af klorotisk bladplet-virus. Til højre: Den samme sort inficeret med æble mosaik virus. Det øverste blad sundt. Left:: Leaf of *Malus Platycarpa* infected with chlorotich leaf spot virus. Right: Leaf infected with apple mosaic virus. The upper leaf healty control.

Foto J. B.

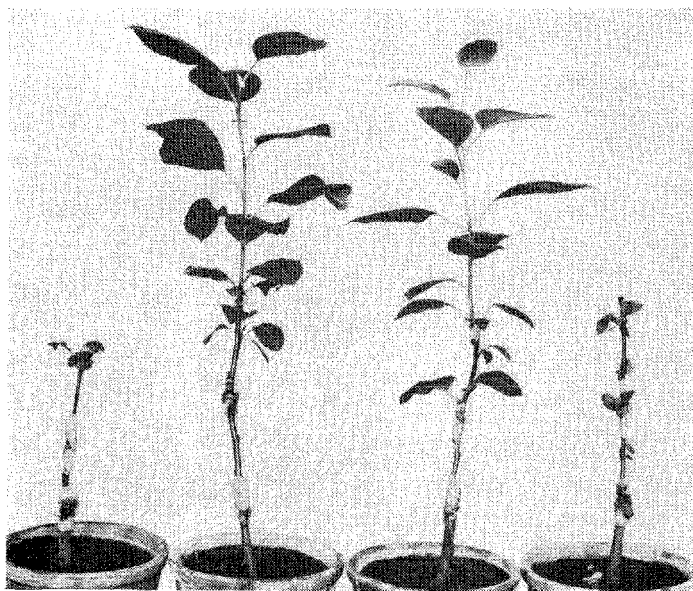
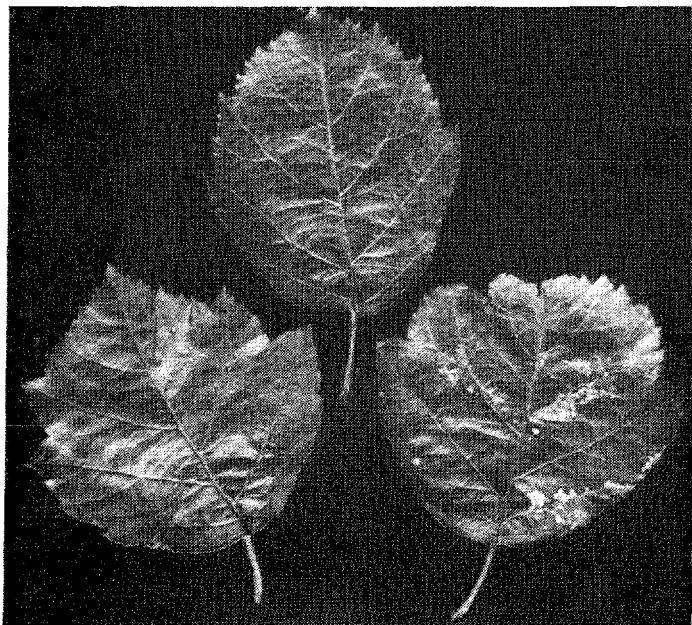


Fig. 6. Testning for klorotisk bladplet-virus ved anvendelse af russisk frøplante R. 12740-7A som indikator.

(Plantenumre fra venstre til højre).

1 og 4. Testning af moderplanter før og efter varmebehandling.

2 og 3. Testning af tipkulturer fra varmebehandlede moderplanter.

Testing for chlorotic leaf spot virus using russian seedling R. 12740-7A as indicator

(number of plants from left to right).

1 and 4. Testing of motherplant before and after heattreatment.

2 and 3. Testing of tipculture from heattreated motherplant.

Foot J. B.

Tabel 12. Termoterapeutiske forsøg med forskellige pæresorter, inficeret med nerveklorose-virus (Beurré Hardy som indikator)

Materiale fra forsøg påbegyndt i 1965		Resultat af
sort	behandling	testning 1966-67
Clapps Favorite	K ingen	3/3
" "	T 31 døgn ved 37° C	0/6
Coloree de Juillet . . .	K ingen	3/3
" " "	T 31 døgn ved 37° C	4/4
Herrepære	K ingen	3/3
" "	T 31 døgn ved 37° C	0/4
Beurré Giffard	K ingen	3/3
" "	T 31 døgn ved 37° C	2/5

K = kontrolplanter tiltrukket på pærevildstammer

T = tipkulturer tiltrukket på pærevildstammer

Tæller = antal planter med nerveklorose-virus

Nævner = antal planter undersøgt

som stammede fra træer, der var behandlet ved 37°C i 30 døgn, blev der tiltrukket i alt 21 sunde træer.

Behandlinger ved nedsænkning af okulationskviste i 50°C varmt vand fra ½ min. til 20 min. er forsøgt, men med negativt resultat.

Positive resultater er siden opnået i forsøg, hvor der blev anvendt en kombination af langtidsvarmebehandling (37°C) og etablering af tipkulturer.

Således blev fire inficerede pæretræer anbragt i termorum i februar 1965. Efter 31

døgns forløb blev der fra de varmebehandlede træer tiltrukket tipkulturer.

Kontrolplanter, som var tiltrukket før behandlings påbegyndelse, blev sammen med tipkulturerne udplantet på friland i juni 1965.

Resultater fra dette forsøg fremgår af tabel 12. Det ses, at alle kontrolplanter var inficeret før behandlingen, og at der blev opnået positive resultater ved varmebehandling i 31 døgn hos sorterne Clapps Favorite, Herrepære og Beurré Giffard.

Tipkulturerne fra sorten Coloree de Juillet var derimod stadig inficeret, og det samme gjaldt 2 af 5 tipkulturer hos sorten Beurré Giffard.

7. Inaktivering af ringmosaik-virus hos pæretræer
Talrige undersøgelser har vist, at klorotisk bladplet-virus hos æbletræer er identisk med viruset, som fremkalder ringmosaik-virus hos pæretræer.

Det vil derfor være nærliggende at antage, at ringmosaikvirus hos pære relativt let kunne inaktiveres ved varmebehandlinger (sml. resultater fra forsøgene med klorotisk bladplet-virus). Dette har også her gennem udførte forsøg vist sig at være tilfældet. I tabel 13, hvor resultaterne fra disse forsøg er anført, ses, at det pågældende virus gennem varmebehandlinger er inaktiveret i pæresorterne: Beurré Har-

Tabel 13. Termoterapeutiske forsøg med forskellige pæresorter, inficeret med ringmosaik-virus (Beurré Hardy som indikator)

Materiale fra forsøg påbegyndt i 1965		Resultat af	
sort	behandling	sympt. 1967	testning 1966-67
Beurré Hardy	K ingen	ringmosaik	1/1
" "	T 30 døgn ved 37° C	ingen	0/5
Charneu	K ingen	"	1/1
" "	T 30 døgn ved 37° C	"	2/5
Graapære	K ingen	"	1/1
" "	T 30 døgn ved 37° C	"	1/23
Williams	K ingen	"	1/1
" "	T 30 døgn ved 37° C	"	3/10

K = kontrolplanter tiltrukket på pærevildstammer

T = tipkulturer tiltrukket på pærevildstammer

Tæller = antal planter med ringmosaik-virus

Nævner = antal planter undersøgt

dy, Charneu, Graapære og Williams, og ved etablering af tipkulturer er virusfrie træer af de nævnte sorter tiltrukket.

Af tabellen fremgår endvidere, at Beurré Hardy er den eneste af de anvendte sorter, som har vist symptomer på ringmosaik-virus, men ved udførte testninger er det forårsagende virus påvist i alle kontroltræer, såvel som i enkelte tipkulturer (6 af 43) hidhørende fra varmebehandlede træer.

IV. Diskussion

Det har tidligere været vanskeligt at fremskaffe virusfrit plantemateriale af adskillige æble- og pæresorter.

Resultaterne fra forsøgene beskrevet i nærværende beretning viser imidlertid, at dette i mange tilfælde vil være muligt ved hjælp af varmebehandlinger, der udført på passende måde er i stand til at inaktivere adskillige vira.

Resultaternes afhængighed af varmebehandlings varighed er ikke klarlagt i alle tilfælde, men ved forsøg med f.eks. gummived, er der opnået bedre resultater efter 73 døgn end efter 36 døgn behandling (tabel 1 og 2). Imidlertid fremgår det af de udførte forsøg, at man ved varmebehandlinger kun sjældent er i stand til at inaktivere alt virus i de direkte behandlede planter. Det vil derfor i de fleste tilfælde være hensigtsmæssigt, at man fra de varmebehandlede planter udtager små skudspidser (altså fra nyvækst, dannet mens planterne står i varmerummet) og indpoder disse på virusfrie grundstammer. De frugttræer, der tiltrækkes ved hjælp af disse såkaldte tipkulturer, vil i mange tilfælde være virusfrie, men før der kan være nogenlunde sikkerhed herfor, må grundige testninger udføres. Disse testninger bør i flere tilfælde gentages, idet man ikke – uagtet kun små skudspidser af det oprindelige virusinficerede træ er anvendt – kan se bort fra forekomst af partiel infektion, der måske ikke har kunnet påvises ved de første testninger.

Tipkulturer fra æbletræer der er helbredt for gummived er dog stadig sunde fire vækstsæsoner efter varmebehandlingens udførelse (tabel 2). Der er derfor næppe tvivl om, at godt ud-

førte varmebehandlinger med efterfølgende testninger af det behandlede plantemateriale vil være af stor betydning for praksis, og disse behandlinger har da også allerede fået en temmelig omfattende anvendelse i forbindelse med fremavlsarbejdet – ikke mindst inden for frugtavl.

V. Resume

Termoterapeutiske forsøg med vira hos frugttræer er udført ved den virologiske afdeling på Statens plantepatologiske Forsøg siden 1954, og positive resultater er opnået ved varmebehandling af æbletræer angrebet af viraerne gummived, mosaik, grubet ved, klorotiske bladpletter og epinasti samt med ringmosaik og nerveklorose hos pæretræer.

Fra frugttræer med angreb af de nævnte vira opnås der relativt let virusfrie planter gennem varmebehandling (37°C lufttemperatur) af en varighed fra 14 til 82 døgn når behandlingen efterfølges af etablering af tipkulturer.

Korttidsbehandling ved nedsenkning af mosaik-angrebne okulationskviste i 50°C varmt vand (Tabel 3) har i de udførte forsøg ikke medført virusinaktivering, hvorimod sunde træer er tiltrukket ved anvendelse af okulationsøjne fra langtidsbehandlede træer med angreb af samme sygdom (tabel 5). Inaktivering af mosaik-virus sker dog lettest ved en langtidsvarmebehandling ved 37°C, som kombineres med etablering af tipkulturer (tabel 6).

Grubet ved hos træer af æblesorterne Bodil Neergaard, Bramley Seedling, Guldborg og Ingrid Marie er tilsyneladende elimineret ved varmebehandling, hvorimod der ved tilsvarende behandling ikke er opnået helbredelse hos sorten Graasten (tabel 7).

Klorotisk bladplet-virus, der forekommer latent hos mange æbletræer og -grundstammer inaktiveres relativt let. Allerede efter 14 døgn varmebehandling ved 37°C er der opnået positive resultater, men behandlinger af 20 døgn varighed og derover giver flere virusfrie planter (tabel 9).

Det er muligt at inaktivere komponenterne fra et viruskompleks bestående af klorotisk

bladplet-virus og epinasti-virus, men sidstnævnte inaktiveres vanskeligere end førstnævnte (tabel 10 og 11).

I 1959 lykkedes det i termoterapeutiske forsøg at inaktivere nerveklorose-virus hos træer af pæresorten Clara Frijs. Af 30 okulationsøjne som stammede fra angrebne træer, der var behandlet ved 37°C i 30 døgn, blev der tiltrukket 21 sunde træer. Desuden har forsøget vist, at det pågældende virus kan elimineres ved langtids varmebehandling kombineret med tipkultur.

Endvidere er pære-ringmosaik-virus (= klorotisk bladplet-virus hos æble) ved varmebehandling (37°C i 14-30 døgn) inaktiveret hos flere pæresorter.

VI. Summary

Fruittree viruses inactivated by thermotherapy

Since 1954 thermaterapeutic investigations concerning fruit tree viruses have been carried out by the Virology section at the State Plant Pathology Institute, and positive results have been obtained with the treatment of fruit trees infected with the viruses causing rubbery wood (table 1 and 2), apple mosaic (table 5 and 6), stem pitting (table 7), chlorotic leaf spot (table 8 and 9) spy epinasty (table 10 and 11), pear vein yellows (table 12), and pear ring mosaic (table 13).

Virus-free plants were relatively easy produced, when heat treatment air temp. ca. 37°C, lasting from 14 to 82 days, was followed by establishment of tip cultures.

Treatment of budwood with hot water (50°C) ½-30 minutes did not inactivate apple mosaic virus (table 3) while it was possible to produce healthy trees when using buds from trees infected with the same virus after the trees had grown at 37°C (air temperature) in 45 days (table 5).

It is however, much more easy to provide fruit trees free of apple mosaic virus when heat treatments are combined with tip cultures (table 6).

By such methods, stem pitting virus was apparently eliminated from the apple varieties Bodil Neergaard, Bramley's Seedling, Guldborg, and Indrid Marie, while the same treatment did not

inactivate the virus in the variety Gravenstein (table 7).

Chlorotic leaf spot virus, which is extremely widespread in many apple varieties and apple rootstocks, is easily inactivated. Already after heat treatment in 14 days, several positive results were obtained but treatments of longer duration did provide even better results (table 9).

It has also been possible to inactivate the components in a virus complex consisting of chlorotic leaf spot virus and spy epinasty virus, the latter being the most difficult to eliminate (table 10 and 11).

In 1959 it was succeeded to inactivate vein yellows virus in the pear variety Clara Frijs. 21 of 30 buds from heat treated pear trees gave rise to healthy trees. But such trees can also be provided by heat treatment followed by tip cultures (table 12).

Using the same method, pear ring mosaic virus (chlorotic leaf spot virus) has been eliminated from several pear varieties (table 13).

Tables 1-13

Table 1. (page 143) Heat treatment of Lord Lambourne, infected with rubbery wood.

Table 2. (page 143) The influence of heat treatment on rubbery wood virus in Lord Lambourne.

Table 3. (page 144) Hot water treatment of budwood, infected with apple mosaic virus.

Table 4. (page 144) Number of survived apple trees after heat treatment.

Table 5. (page 145) Inactivation of apple mosaic virus in Budwood.

Table 6. (page 145) Heat treatment of apple trees infected with apple mosaic virus.

Table 7. (page 146) Thermotherapeutic experiment with different apple varieties, infected with stem pitting virus.

Table 8. (page 147) Thermotherapeutic experiment with the apple rootstock A 2, infected with chlorotic leaf spot virus.

Table 9. (page 147) Thermotherapeutic experiment with different apple trees, infected with chlorotic leaf spot virus.

Table 10. (page 148) Thermotherapeutic experiment with Belle de Boskoop, infected with chlorotic leaf spot and Spy epinasty viruses.

Table 11. (page 148) Thermotherapeutic experiment with James Grieve, infected with chlorotic leaf spot and Spy epinasty viruses.

Table 12. (page 149) Thermotheapeutic experiment with different pear varieties, infected with vein yellows virus.

Table 13. (page 149) Thermotheapeutic experiment with different pear varieties, infected with ring mosaic virus.

General definitions

Antal	=	Number
Behandling	=	Treatment
Døgn	=	Days
Grundstamme	=	Rootstock
Gummived	=	Rubbery wood
Ingen	=	None
Kraftig	=	Vigorous
Materiale	=	Material
Moderplante	=	Motherplant
Nævner	=	Denominator
Okulation	=	Budding
Podning	=	Grafting
Pære	=	Pear
Sort	=	Variety
Svag	=	Weak
Tipkultur	=	Tip culture
Tæller	=	Numerator
Undersøgelse	=	Investigation
Varighed	=	Duration
Varmebehandling	=	Heat treatment
Vildstamme	=	Seedling rootstock
Æble	=	Apple

VII. Litteratur

1. *Campbell, A. I.*: Techniques used in the inactivation of some apple viruses. Rep. Long Ashton Res. Sta. 1961 (1962): 73-76.
2. *Campbell, A. I.*: The growth of young pear trees after elimination of some viruses by heat treatment. Rep. Long Ashton Res. Sta. 1965 (1966): 111-116.
3. *Hunter, J. A., E.E. Chamberlain and J. D. Atkinson*: Note on modification in technique for inactivating apple mosaic virus in apple wood by heat treatment. New Zealand Journal of Agric. Res. 2 (1959): 945-946.
4. *Kassanis, B.*: Potato tubers freed from leaf-roll virus by heat. Nature 164 (1949): 881.
5. *Kassanis, B.*: Heat-therapy of virus-infected plants. Ann. appl. biol. 41:3 (1954): 470-474.
6. *Kristensen, H. Rønne*: Virussygdomme hos æbletræer. Erhvervsfrugtavlren 28:6 (1962): 199-210.
7. *Kristensen, H. Rønne*: Virussygdomme hos pæretreer. Erhvervsfrugtavlren 28:7 (1962): 236-245.
8. *Kristensen, H. Rønne*: Virussygdomme hos planter og termoterapi. Horticultura 20:12 (1966): 171-180.
9. *Kristensen, H. Rønne og A. Thomsen*: Chrysanthemum-viroser. Tidskr. f. Planteavl 62:4 (1958): 627-669.
10. *Kunkel, L. O.*: Heat treatment for the cure of yellows and rosette of peach. Phytopath. 25:1 (1935): 24.
11. *Kunkel, L. O.*: Heat treatment for the cure of yellows and other virus diseases of peach. Phytopath. 26:9 (1936): 809-830.
12. *Morel, G. et C. Martin*: Guérison des plantes atteintes de maladies à virus par cultures de meristemes apicaux. Proc. 14th inst. hort. Congr. 1 (1955): 303-310.
13. *Posnette, A. F. and R. Cropley*: Apple mosaic viruses. Host reactions and strain interference. Journ. Hort. Sci. 31:2 (1956): 119-133.
14. *Welsh, M. F. and G. Nyland*: Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. Can. J. Plant Sci. 45 (1965): 443-454.