

# Virusinfektioner hos *Ligustrum* spp

Ved Arne Thomsen

## 896. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning omhandler undersøgelser og forsøg vedrørende virusforekomster hos liguster, der siden 1965 har været udført ved den virologiske afdeling på Statens plantepatologiske Forsøg.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

### INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
I. Indledning . . . . .	234
II. Diagnostik . . . . .	234
III. Udbredelse . . . . .	235
IV. Diskussion . . . . .	240
V. Resumé . . . . .	241
VI. Summary . . . . .	241
VII. Litteratur . . . . .	241

#### I. Indledning

Allerede i 1906 meddelte E. Baur (1,2) at der hos *Ligustrum vulgare foliis aureovariegatis hort*, forekom en virussygdom som kunne overføres ved podning. Siden er der fra forskellige forfattere meddelt om virusforekomster hos liguster. A. g. Plakidas (8) berettede i 1959, at klorotiske pletter hos liguster skyldtes en sygdom, som kunne overføres ved podning. I 1956 gjorde M. Hollings (5) opmærksom på *Chenopodium amaranticolor* som indikatorplante for liguster-mosaik, hvis der blev anvendt en såkaldt tør-inokulationsmetode. Han fandt dog ikke *Chenopodium amaranticolor* fuldt tilfredsstillende til diagnostisk arbejde, idet denne efter infektion viste for få læsioner.

C. A. Cadman meddelte i 1961 (4), at *Ligustrum* spp. ofte var angrebet af arabis-mosaik-virus eller andre jordbårne vira. K. Schmelzer publicerede i 1962 (9) resultater fra en undersøgelse over to sygdomme hos *Ligustrum vulgare*, af hvilke den ene blev betegnet som »gule pletter« og den anden som »krøllemosaik«. Den førstnævnte kunne overføres ved podning fra liguster til liguster, og kun i et tilfælde var det muligt, at isolere et virus fra disse planter. I alle forsøg med udpresset saft af planter med krøllemosaik, kunne der isoleres et

virus hørende til en linie af arabis-mosaik-virus. K. Schmelzer (10) berettede endvidere i 1964 om forekomster af agurk-mosaik-virus, tomat-sorting-virus og rattle-virus hos ligusterplanter.

På den virologiske afdeling ved Statens plantepatologiske Forsøg, blev der i 1965 isoleret et virus fra en plante af *Ligustrum vulgare* med bånd-mosaik-symptomer (7). Det pågældende virus blev ved inokulation overført fra vævet i træagtige grene hos liguster til *Chenopodium quinoa*, som viste lokale læsioner efter 5 døgn forløb. I samme år blev virusinfektionen påvist hos symptomløse planter af *Ligustrum atrovirens*, *L. ovalifolium* og *Ligustrum vulgare*.

#### II. Diagnostik

Ved de danske undersøgelser er der brugt en modificeret form af Th. Bergs inokulationsmetode fra Lisse (3), udført på den måde, at der i afskårne grene af plantematerialet til undersøgelse er skåret lange snitflader i barken (fig. 3), hvorefter sårfladen forsigtigt er gnedet over testplanternes blade (fig. 6). Med et stykke nylon-svamp er testplanternes blade i forvejen fugtet med 0,01 M fosfatstødpude (fig. 4) og pudret med carborundum pulver (fig. 5). Ved undersø-

Tabel 1. Fysiske egenskaber hos to virusisolater fra *Ligustrum vulgare*

	Isolat I	Isolat II
Termostabilitet .....	68° C i 10 min.	60° C i 10 min.
Fortyndingsgrænse .....	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
Holdbarhed ved stuetemp. ....	3 uger	6 måneder
» i køleskab (+ 2° C) .....	2 måneder	6 »
» i fryseboks (÷ 15° C) .....	6 måneder	1 år
Symptomer hos <i>Chenopodium quinoa</i> .....	små lokale læsioner eft. 5 døgn topnek. efter 7 døgn	store lokale læsioner 1-2 mm efter 8 døgn ingen topnekrose
Reaktion med hindbær-ringplet antiserum .....	+	÷
Reaktion med tobak-mosaik-antiserum .....	÷	+

gelses af virusforekomster hos ligusterplanter har metoden vist sig meget hensigtsmæssig, idet prøverne har kunne testes i vinterhalvåret, som er den årstid hvor testplanterne (*Chenopodium*) efter infektion udvikler særdeles karakteristiske virus-symptomer.

Diagnostiske undersøgelser med virus hidrørende fra liguster blev udført i 1966, og det blev herved vist, at der forekom mere end eet virus (tabel 1). Således viste to isolater af virusholdig plantesaft stor forskel med hensyn til temperaturresistens.

Isolat I tålte opvarmning til 66-68° C i 10 min. uden at miste smitteevnen, mens Isolat II kun tålte 60° C.

Holdbarhedsforsøg udført med virusholdig plantesaft opbevaret ved stuetemperatur (+18° C), i køleskab (+2° C) og i fryseboks (÷15° C) peger ligeledes på forekomst af mere end et virus, idet holdbarheden hos de to isolater har vist signifikante forskelle.

Fortyndingsgrænsen for saft fra isolat I har været 10<sup>-3</sup> og for saft fra isolat II 10<sup>-6</sup>.

Viruset fra isolat I reagerer imod hindbær-ringplet antiserum, hvilket ikke er tilfældet med viruset fra isolat II. Elektronmikroskopiske undersøgelser har endvidere vist, at isolat I indeholder sfæriske viruspartikler som måler ca. 30 m $\mu$  (fig. 1) og isolat II indeholder stavformede viruspartikler på 300 m $\mu$  (fig. 2).

Viruspartikler fra *Ligustrum* har været undersøgt ved en modificeret »dip«metode (cut

squeeze). En dråbe rå saft udpresset mellem 2 objektglas af blad udtaget i nærheden af kraftige symptomer, tilsat 1,5 ml. 1,1% fosforwolframsyre pH 6,8 med 0,05% Bovin serum Albumin, har været udgangsmaterialet for dråbepræparater. En dråbe af denne blanding på formvar/carbonforstærkede grid, bestrålet med ultraviolet lys (Simpson og Hauser 1966) er lufttørret og undersøgt i et Phillips E M. 100. B. i arbejde ved 60 kW og med en objektiv apertur på 25  $\mu$ .

De elektronmikroskopiske undersøgelser er udført af Jens Begtrup.

### III. Udbredelse

For at undersøge udbredelsen af eventuelle virusinfektioner hos Liguster, blev der i 1965 via Fællesudvalget for fremavl og sundhedskontrol med havebrugsplanter indsamlet planter til undersøgelse fra 26 danske planteskoler. Materialet bestod af 76 prøver, som hver omfattede 5 planter. Det egentlige undersøgelsesarbejde blev udført i 1966 ved hjælp af den tidligere omtalte inokulationsteknik, og til hver enkelt testning anvendtes mindst 5 *Chenopodium quinoa* som indikatorplanter.

I tilknytning til de udførte rutine-testninger, blev der desuden flere gange foretaget verificeringer ved hjælp af testninger til specielle indikatorplanter, deriblandt *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tab.* 'Samsun' og *Tetragonia expansa*.

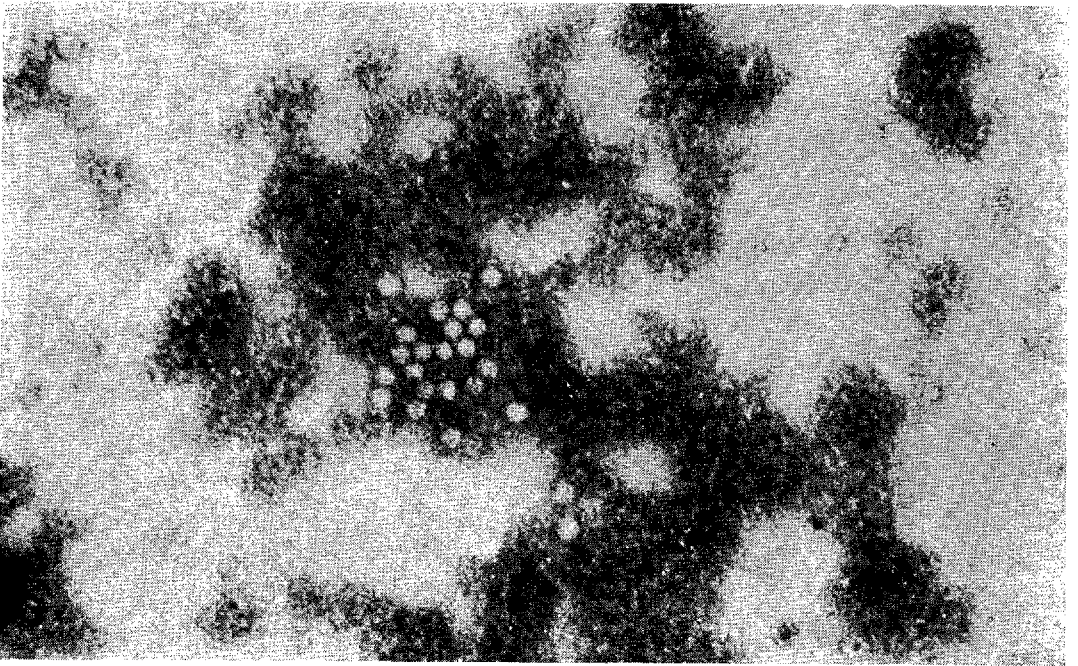


Fig. 1. Hindbær-ringplet-virus (isolat I) isoleret fra liguster  
(Raspberry ringspot virus (isolate I) isolated from *Ligustrum*  $\times 82.000$ )

(Foto: J.B.)

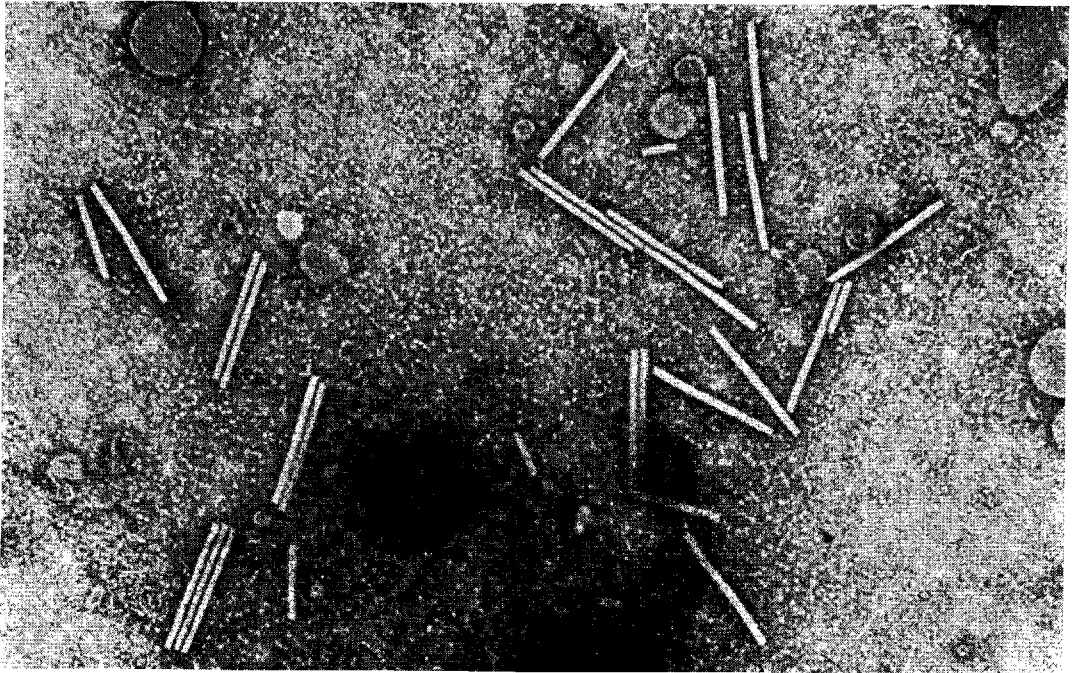


Fig. 2. Tobak-mosaik-virus (isolat II) isoleret fra liguster  
(Tobacco mosaic virus (isolate II) isolated from *Ligustrum*.  $\times 53.000$ )

(Foto: J.B.)

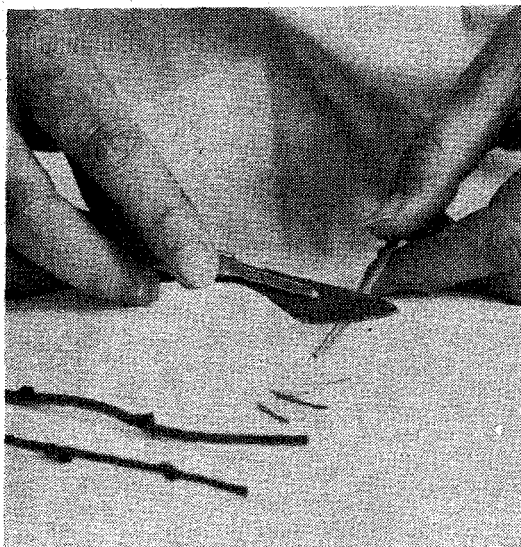


Fig. 3. Ligusterkvisten tilskæres før inokulationen  
(Exposure of Ligustrum wood before inoculation)  
(Foto: J.B.)



Fig. 4. Testplanternes blade fugtes med fosfatstøpude  
(Moisting the leaves of the test plants with phosphate buffer before inoculation)  
(Foto: J.B.)



Fig. 5. Testplanternes blade pudres med carborundum pulver  
(Dusting of the test plants with carborundum powder)  
(Foto: J.B.)



Fig. 6. Inokulation af Chenopodium quinoa  
(Inoculation of Chenopodium quinoa)  
(Foto: J.B.)

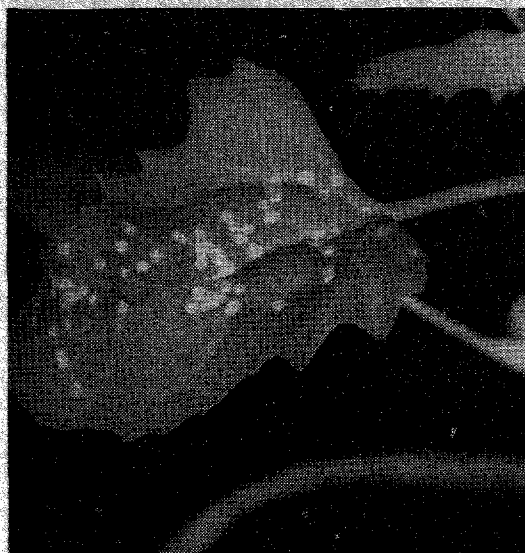


Fig. 7. Hindbær-ringplet-virus fra liguster. *Chenopodium quinoa* med lokale læsioner 5 døgn efter inokulation

(Raspberry ringspot virus. *Chenopodium quinoa* with local lesions 5 days after inoculation)

(Foto: J.B.)

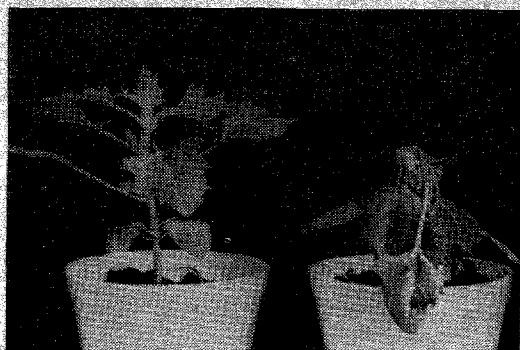


Fig. 8. Hindbær-ringplet-virus fra liguster. *Chenopodium quinoa* med topnekrose 8 døgn efter inokulation. T.v. ubehandlet plante

Raspberry ringspot virus. *Chenopodium quinoa* with top necrosis 8 days after inoculation. Left: Control plant

(Foto: J.B.)



Fig. 9. Hindbær-ringplet-virus fra liguster. *Chenopodium amaranticolor* 14 døgn efter inokulation

(Raspberry ringspot virus in *Chenopodium amaranticolor* 14 days after inoculation)

(Foto: J.B.)



Fig. 10. Hindbær-ringplet-virus fra liguster. *Nicotiana* tab. 'Samsun', 18 døgn efter inokulation

(Raspberry ringspot virus in *Nicotiana* tab. 'Samsun' 18 days after inoculation)

(Foto: J.B.)

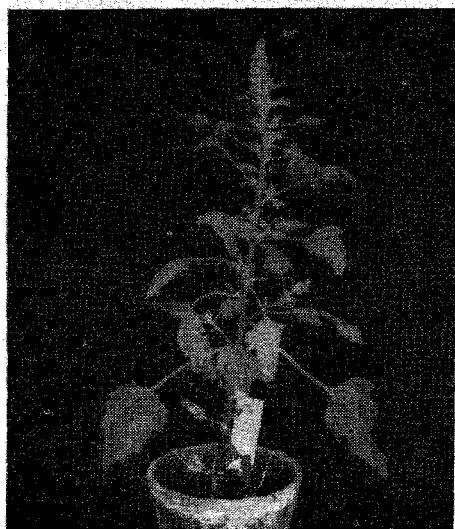


Fig. 11. Tobak-mosaik-virus fra liguster. *Chenopodium quinoa* 14 dage efter inokulation (Tobacco mosaic virus in *Chenopodium quinoa* 14 days after inoculation) (Foto: J.B.)



Fig. 12. *Ligustrum vulg.* 'Atrovirens' med infektion af hindbær-ringplet-virus. T.v. sund plante *Ligustrum vulg.* 'Atrovirens' with infection of Raspberry ring-spot virus. Left: Control plant (Foto: J.B.)

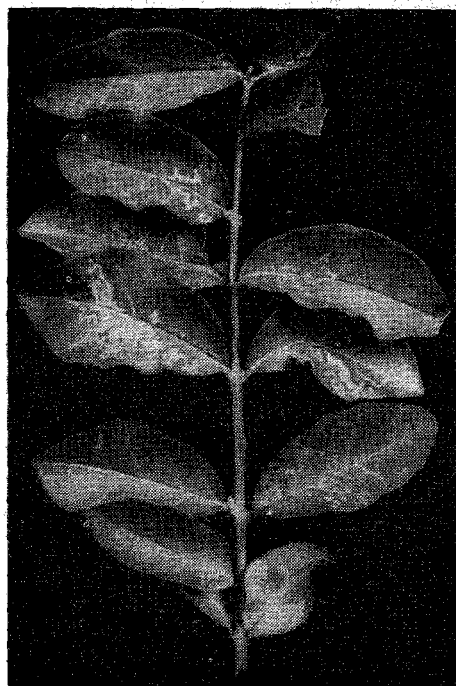


Fig. 13. *Ligustrum obtusifolium v. regilianum* med viruslignende bladsymptomer. Virusnaturen er ikke påvist (*Ligustrum obtusifolium v. regilianum* showing oak leaf symptoms. The virus nature is not demonstrated) (Foto: J.B.)



Fig. 14. Brogetbladhed hos liguster af genetisk natur (Genetic variegation of *Ligustrum* leaves) (Foto: J.B.)

Tabel 2. Virusinfektioner hos ligusterprøver fra 26 danske planteskoler ifølge undersøgelse i 1966

Art	Antal prøver							
	undersøgt ialt	uden virus	med virus hos					ialt
			1 pl.	2 pl.	3 pl.	4 pl.	5 pl.	
<i>L. vulgare</i> .....	15	3	3	2	1	1	5	12 (80 pct.)
<i>L. v. 'Atrovirens'</i> .....	26	9	3	2	3	3	6	17 (65 pct.)
<i>L. ovalifolium</i> .....	16	6	1	2	4	2	1	10 (63 pct.)
<i>L. v. 'Lodense'</i> .....	6	6						0 ( 0 pct.)
<i>L. obt. v. regelianum</i> .....	13	10	3					3 (23 pct.)

Resultatet af denne undersøgelse fremgår af tabel 2, som viser at der af 76 undersøgte prøver blev fundet virus hos de 42 (55%). 12 prøver var totalt inficeret, mens 30 prøver var delvis inficeret d.v.s. med virusangreb hos 1 til 4 planter pr. prøve, og hos 34 prøver blev der ikke påvist virusinfektion.

Materialet omfattede ialt 5 ligusterarter, og virusinfektion blev fundet hos 4 arter, idet *Ligustrum vulgare* 'Lodense' blev fundet virusfri. Virusangreb forekom i prøver fra 23 af ialt 26 planteskoler.

Prøver af enkelte arter var fra nogle planteskoler totalt virusinficeret, mens prøver af andre arter fra samme planteskoler var virusfrie.

De fundne virusinfektioner var i 87 pct. af tilfældene hindbær-ringplet-virus eller dermed serologisk beslægtede vira (f.eks. isolat I) og de resterende 13 pct. virusinfektion af anden herkomst (f.eks. isolat II).

De fleste ligusterplanter med klorotiske bladpletter reagerede positivt ved testning, men de påviste infektioner er i langt de fleste tilfælde

fundet som latent infektion hos symptomløse ligusterplanter.

Højdemålinger (skudtilvækst) af sunde og virusinficerede planter viser imidlertid at angrebne planter er lavere end sunde af samme alder. Moderplanterne fra det undersøgte materiale blev i foråret 1966 udplantet til observation på friland, og i efteråret samme år blev højden af alle planter målt. Disse målinger blev gentaget i efteråret 1967 og resultaterne heraf fremgår af tabel 3.

De sunde planter var både i 1966 og 1967 højere end de tilsvarende syge. Tilvæksten målt i cm fra 1966 til 1967 var praktisk taget ens hos de to kategorier.

#### IV. Diskussion

Udenlandske undersøgelser har vist, at Liguster ofte inficeres med arabis-mosaik-virus og andre jordbårne vira. Ved de danske undersøgelser er der fundet omfattende infektioner af hindbær-ringplet-virus, som ligeledes hører til de jordbårne vira. Orienterende undersøgelser tyder på at virusinfektionerne hovedsagelig stammer fra stiklingematerialet i planteskolerne - vegetativ formering af angrebne planter - og ikke fra jordsmitte i de pågældende planteskoler.

Ved flere danske undersøgelser er der foretaget overføringsforsøg - ved side-podning - med materiale af brogetbladede liguster til normalt bladede liguster uden at brogetbladedeheden er overført, og denne er derfor konkluderet at være af genetisk natur.

I andre forsøg med brogetbladede liguster er der i lighed med undersøgelser af symptomløse liguster og liguster med klorotiske bladpletter

Tabel 3. Højdemåling af sunde og virusinficerede liguster

Art	Gens. højde i cm			
	1966		1967	
	sun- de	virus- inf.	sun- de	virus- inf.
<i>L. vulgare</i> .....	65	61	105	102
<i>L. vulg. 'Atrovirens'</i> ..	55	31	117	99
<i>L. ovalifolium</i> .....	40	30	100	88
<i>L. obt. v. regelianum</i> ..	36	30	49	42

fundet hindbær-ringplet-virus eller ukendte virus-infektioner.

Virusfrie liguster kan således ikke udvælges på symptombasis, og virustestede planter danner da også grundlag for en fremavl af sunde liguster her i landet.

## V. Resume

Undersøgelser vedrørende virusinfektion hos liguster har været udført på Statens plantepatologiske Forsøg i perioden 1965-67, og det har her ved været muligt at isolere to viroser ved inokulation direkte til testplanter (Th. M. Berg, metode).

Inokulationsstykker på ca. 20 cm's længde blev skåret ud af ligustergrene i vintertilstand. Nogle få dråber 0,01 M fosfatstødpude på pH 6,8, blev anbragt på overfladen af testplanternes blade, som i forvejen var pudret med carborundumpulver. I de fleste tilfælde tjente *Chenopodium quinoa* som indikatorplante, men også andre plantearter blev anvendt.

Virusisolaterne no I og no II er identificeret som henholdsvis hindbær-ringplet-virus og tobakmosaik-virus (tabel 1).

Tabel nr. 2 viser resultater som er opnået ved undersøgelse af 76 prøver, hver repræsenteret med materiale fra 5 ligusterplanter. 42 af prøverne (55 pct.) blev fundet mere eller mindre inficerede.

130 (34 pct.) af de ialt 380 planter var inficeret.

Virus symptomer er observeret i mange tilfælde - hovedsagelig som klorotiske bladpletter -, men også mange symptomløse planter er ved testning fundet virusinficeret.

Hidtil er der ikke fundet nogen klar sammenhæng mellem symptomer og virusinfektion hos liguster.

Virusfrie liguster kan ikke udvælges på symptombasis, og virustestede planter danner nu grundlag for en iværksat fremavl af sunde liguster her i landet.

## VI. Summary

Investigation concerning virus infection of *Ligustrum* have been performed at The State Plant Pathology Institute in Lyngby during the years 1965-67, and it

has hereby been possible to isolate two viruses by a direct inoculation method (Th. M. Berg, method).

Inoculation pieces, about 20 cm long, were cut out of dormant *Ligustrum* branches. A few drops of 0,01 M Phosphate buffer pH 6,8 were placed on the upper surface of leaves of the test plants which previously had been dusted with carborundum powder. In most cases *Chenopodium quinoa* served as the test plant but other species have been used with success.

Isolate no I is identified as *Raspberry ringspot virus* with a dilution end point usually  $10^{-3}$ , and thermal death point between 66-68°C (10 minutes heating) when assayed in *Chenopodium sap*. When sap was stored at room temperature (20°C), the infectivity was lost on 21 days. The virus reacted against *Raspberry ringspot virus* antiserum.

Virus from isolate no II is identified as *Tobacco mosaic virus* with dilution end point about  $1:10^{-8}$  and the thermal death point 60°C. The virus reacted against *Tobacco mosaic virus* antiserum but not against *Raspberry ringspot virus* antiserum.

Virus particle from *Ligustrum* were examined by the »cut squeeze« method in negativ staining. One drop sap in 1,5 ml. 1,1 % P.T.A. pH 6,8 with 0,05 % B.S.A. Formvar/carbon coated grid exposed to ultraviolet light (Simpson and Hauser 1966) and examined in Phillips E.M. 100 B. at 60 kW and a objective aperture of 25  $\mu$ .

Table no 2 show results obtained by testing of 76 *Ligustrum* samples - each sample represented with material from 5 *Ligustrum* plants. 42 of the samples (55 pct.) were found to be more or less infected.

130 (34 pct.) out of 380 plants were infected.

Virus symptoms in infected privets are observed in several cases, but also many plants without symptoms are by testing found to be infected.

So far - no correlation is found between symptoms and virus infections in privets.

## VII. Litteratur

1. Baur, E.: Weitere Mitteilungen über die infektiöse Chlorose der Malvaceen und über einige analoge Erscheinungen bei *Ligustrum* und *Laburnum*. Ber.dtsch.bot. Ges. 24 (1906): 416-428.
2. Baur, E.: Über infektiöse Chlorosen bei *Ligustrum*, *Laburnum*, *Fraxinus*, *Sorbus* und *Ptelea*. Ber.dtsch.bot. Ges. 25 (1907): 410-413.
3. Berg, Th. M.: A quick and efficient inoculation method for sap transmission of viruses from woody to herbaceous hosts. Tijdschrift over Plantziekten, Netherlands Journal of Plant Pathology 68 (1962): 231-234.



4. Cadman, C. A.: Soil-Borne viruses. The Scottish Hort. Res. Inst., Eighth Ann. Rep. 1960-61: 54-57.
5. Hollings, M.: *Chenopodium Amaranticolor* as a Test Plant For Plant Viruses. Plant Pathology 5:2 (1956): 57-60.
6. Kristensen, H. Rønde: Jordbårne Plantevira. Tidsskrift for Planteavl 66:1 (1962): 75-148.
7. Kristensen, H. Rønde: Plantesygdomme i Danmark 1965. Tidsskrift for Planteavl 70:3 (1966): 312-315.
8. Plakidas, A. G.: Chlorotic spot, a graft transmissible disease of Ligustrum. Plant Dic. Rept. 43 (1959): 688-689.
9. Schmelzer, K.: Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. Phytopathologische Zeitschrift 46:2 (1962): 105-138.
10. Schmelzer, K.: Viroser der Ziergehölze und ihre epidemiologische Bedeutung. Probleme Der Pflanzen Virusforschung. Band XIII:7 (1964): 45-59.