

Statens plantepatologiske Forsøg (H. Ingv. Petersen)

Virologisk afdeling (H. Rønde Kristensen)

Hortensie-ringmosaik-virus i hortensie (*Hydrangea macrophylla* Ser.). Diagnostik, kortlægning, termoterapi og meristemkultur

Hydrangea ringspot virus: Dianostics, survey of the virus, thermotherapy and meristem-tip culture

Niels Paludan og Mogens Christensen

Resumé

Hortensie-ringmosaik-virus (HRV) er blevet på vist i 62 af 68 (91 pct.) undersøgte hortensiesorter. I sorten 'Immaculata' blev HRV kun påvist i 10 pct. af de undersøgte gruppeprøver i modsætning til 80-100 pct.'s infektion hos 9 andre sorter.

Virusagtige bladsymptomer i form af en klorotisk spætning og klorotiske ringe er kun blevet registreret i 28 af samme 68 (41 pct.) hortensiesorter. Virussyntomerne har gennemgående været svage og varierede med hensyn til vækstbetingelser og årstid. Viruslignende symptomer i blomsterne (bægerbladene) er ikke blevet iagttaget i nogen af sorterne.

HRV er blevet nærmere bestemt ved hjælp af indikatorplanter samt ved fysiske, serologiske og elektronmikroskopiske undersøgelser.

Infektionsforsøg med HRV har vist, at *Chenopodium amaranticolor* (Costé & Reyn) og *Gomphrena globosa* L. har været lige velegnede som indikatorplanter med hensyn til følsomhed og reaktionstid. Anvendelse af afplukkede blade har ikke kunnet stå mål med intakte indikatorplanter.

Serologisk diagnostisering af HRV (præcipitation) har været mindre følsom end anvendelsen af *Gomphrena globosa*-planter.

Hortensieplanter har tålt en varmebehandling på 30 og 34° C i henholdsvis 240 og 120 døgn, men ikke 36° C i 30 døgn.

Virusfrie hortensier er blevet etableret fra HRV-inficerede planter ved en varmebehandling i 30 døgn ved 30° C med stigende effekt ved øget behandlingstid.

Endvidere er virusfrie hortensier blevet etableret fra HVR-inficerede planter ved anvendelse af meristemkultur.

Indledning

Sortsforsøg med hortensie, der skulle gennemføres ved Statens Væksthusforsøg i årene 1970-71, gav anledning til, at der ved den virologiske afdeling på Statens plantepatologiske Forsøg i 1969 blev startet orienterende virusundersøgelser i hortensie omfattende diagnostik, kortlægning, termoterapi og meristemkultur.

Udenlandske undersøgelser

Flere forskellige vira er igennem de sidste årtier blevet påvist i hortensie, hvor de fleste

undersøgelser specielt har omfattet arten *Hydrangea macrophylla*.

Der er her først og fremmest tale om angreb af det meget udbredte hortensie-ringmosaik-virus, der er blevet beskrevet og nærmere undersøgt af forskellige forskere. HRV, der har stavformede viruspartikler, hører til kartoffel virus X-gruppen (3. Potexvirus) og er serologisk beslægtet med *Cymbidium*-mosaik-virus, hvidkløver-mosaik-virus, kaktus-virus-X, kartoffel virus X samt kløver-gulmosaik-virus (Brierly 1952, Brierly og Lorentz 1957, Sisler

et al. 1957, Bercks 1969). Partikelstørrelsen har ifølge litteraturen varieret væsentligt og opgivet som henholdsvis $16 \times 870 - 1400$ nm (Hollings 1958), $12,5 \times 650$ (Dunez 1963) samt 16×493 nm (Bercks og Brandes 1961).

Viruset kan overføres med inficeret plante-saft, hvor *Chenopodium amaranticolor* og *Gomphrena globosa* har vist sig at være de følsomste indikatorplanter, der reagerer med lokale læsioner. Systemisk virusinfektion er kun opnået i 2 testplanter, nemlig *Vigna sinensis* Savi. og *Primula malacoides* Franch., hvor viruskoncentrationen i sidstnævnte planteart har været meget høj.

HRV er blevet beskrevet fra England, Frankrig, Italien, New Zealand, Sverige, Tyskland samt U.S.A. Størstedelen af de undersøgte sorter har været inficeret med HRV, og inden for de enkelte sorter er der i flere tilfælde blevet påvist 100 pct. virusinfektion (Thomson 1961, Dunez 1963, Belli & Belli 1968, Nilsson 1969 og Koenig 1970).

Virusfrie hortensieplanter er blevet etableret ved topstiklinger fra HRV-inficerede planter efter en varmebehandling ved 35° C i 12 til 14 uger (Brierley 1957).

Foruden hortensie-ringmosaik-virus er følgende vira eller mykoplasma blevet påvist i *Hydrangea macrophylla*:

Agurk-mosaik-virus (Taneura & Kondero 1967)

Aster-gulsot (Miller 1955)

'Grønne Blomster' (Pape 1951)

Lucerne-mosaik-virus (Belli 1968)

Tobak-ringplet-virus (Brierley 1956)

Agurk-mosaik-virus har forårsaget en typisk mosaik i hortensiebladene, der tillige blev misformede. Viruset er blevet overført til andre hortensieplanter ved hjælp af følgende bladlusarter: *Macrosiphum rosae* L., *Myzus persicae* Sulz. og *Toxoptera odinae*.

De cikadebårne sygdomme Aster-gulsot og 'Grønne Blomster' har begge forårsaget dannelse af unormale blomster. Ved angreb af Aster Yellows er støvvejene blevet omdannet til skud, mens 'Grønne Blomster' medførte en udvikling af grønne, deforme blomster.

Tomat-ringplet-virus har fremkaldt speci-

fikke symptomer i form af en gullig klorose med udflydende mørkegrønne pletter i buklede og deforme blade. Væksten har været hæmmet og blomsterudviklingen uregelmæssig med dels grønne og dels normalt farvede blomster. Virusfrie planter har ikke kunnet etableres ved varmebehandling af inficeret plantemateriale.

I *Hydrangea arborescens* L. er der yderligere blevet beskrevet angreb af arabis-mosaik-virus, tobak-rattle-virus samt tomat-sortring-virus (Schmeltzer 1970). Tobak-rattle-virus er blevet påvist i planter med grøngul mosaik i buklede, deforme blade, mens de øvrige vira kun er fundet i forbindelse med rattle-viruset.

Tidligere danske undersøgelser

Mosaiksyge i hortensie (*Hydrangea macrophylla*) er første gang blevet beskrevet i 1935 (Gram & Weber 1940), hvor en tydelig mosaik blev iagttaget i planter, kultiveret i drivhus. I 1948 omtales sygdommen igen, idet den tilsyneladende har fået en vis udbredelse. Specielt nævnes sorten 'Holstein', som kraftigt angreb med bulede, rillede blade samt korte, forvredne skud. Kraftige angreb blev året efter yderligere registreret i *Hydrangea macrophylla* *Mariesii* (Wils.) dyrket på friland.

I 1959 lykkedes det at påvise virusinfektion i syge hortensieplanter med mosaik og klorotiske ringformede pletter i bladene. Virusarten blev ikke nærmere bestemt, men bedømt på symptomudviklingen i de anvendte indikatorplanter, har der sandsynligvis været tale om hortensie-ringmosaik-virus (Kristensen 1949, 1959).

Etablering af meristemplanter er lykkedes med 2 pct. af de skårne meristemer ved anvendelse af *Murashige* og *Skoog's* næringsmedium (Paludan 1971).

Af andre forekommende virussygdomme er der kun omtalt angreb af tobak-nekrose-virus i *Hydrangea* sp. (Kristensen 1962).

Metodik

Påvisning af virus i inficerede hortensieplanter er bl. a. blevet udført ved hjælp af forskellige indikatorplanter og afplukkede blade, hvor

alm.-saftinokulation tilsat stødpude (Marrou 1967) er blevet anvendt.

De fysiske undersøgelser har omfattet fortyndings-, opvarmnings- og holdbarhedsforsøg med inficeret plantesaft fra *Tetragonia expansa* Murr.

Opformering af HRV, beregnet til serumfremstilling, er ligeledes foregået i *Tetragonia expansa*, hvor blade med lokale læsioner blev anvendt 10 døgn efter inokulationen. Renfremstillingen blev udført efter metoden, beskrevet af Wetter 1960. Ved de udførte serologiske undersøgelser blev dråbe-præcipitationsmetoden anvendt.

Elektronmikroskopiske undersøgelser er blevet foretaget af HRV-inficerede planter, omfattende dels hortensie og dels *Tetragonia expansa*, hvor suspensionspræparater (cut-squeeze-metoden) blev anvendt (Cathro, mundtlig orientering).

Termoterapi er blevet udført i termostatregulerede varmerum ($\pm 1^\circ \text{C}$) med en belysning på 5.500 lux. Enkeltheder vedrørende indretning af termostatrummene samt den anvendte arbejdsmetode er nærmere beskrevet af Kristensen og Thomsen (1970).

Meristemkultur er blevet udført efter retningslinier beskrevet af Paludan (1971).

Resultater

Infektionsforsøg

Infektionsforsøg er blevet gennemført med hortensie-ringmosaik-virus, hvor en virusinficeret

hortensieplante af sorten 'Hørnli' blev anvendt som infektor. Saftinokulation blev anvendt til forskellige indikatorplanter samt til afplukkede blade. De opnåede resultater fremgår af tabel 1.

Systemiske symptomer udvikledes ikke i nogen af de anvendte indikatorplanter.

For at finde frem til den følsomste indikatorplante blev der foretaget adskillige inokulationer til *Chenopodium amaranticolor* og *Gomphrena globosa*. Af 96 udførte inokulationer var der overensstemmelse mellem resultaterne fra 94. Det gennemsnitlige antal lokale læsioner pr. indikatorplante var 13 for *Gomphrena globosa* og 11 for *Chenopodium amaranticolor*.

Muligheden for at anvende afplukkede blade contra planter af *Gomphrena globosa* er blevet undersøgt. Resultaterne, bedømt på 18 udførte inokulationer og opgjort som det gennemsnitlige antal lokale læsioner pr. inokulation, blev for afplukkede blade 5 og for planter 18 (fig. 1).

Fysiske undersøgelser

HRV-inficerede *Tetragonia expansa* (lokale læsioner) er blevet anvendt ved undersøgelserne 12 døgn efter inokulationen. Resultaterne fremgår af følgende oversigt:

Virusinficeret saft:

HRV tålte opvarmning i 10 min. til 50°C , men ikke 60°C

Tabel 1. Infektionsforsøg med HRV til diverse indikatorplanter og -blade med inokulat fra hortensie

(Infection trials with HRV to different indicator plants and detached leaves with inoculum from *Hydrangea*)

Indikator	døgn	Lokale symptomer efter antal døgn i	
		planter	afplukkede blade
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	3	klorotiske 2 mm	6 brune 3 mm
» quinoa Willd.	10	klorotiske 2 mm	8 0
<i>Cucumis sativus</i> L.	20	0	8 0
<i>Gomphrena globosa</i>	3	hvide 2 mm	6 hvide 3 mm
<i>Nicotiana</i> t. L. 'Samsun'	20	0	8 0
» t. L. 'Xanthi'	10	0	8 0
<i>Tetragonia expansa</i>	10	klorotiske 3 mm	10 0

0 = ingen symptomer.

HRV tålte fortyndingen 1:1024, men ikke 1:8000

HRV tålte opbevaring ved $+20^{\circ}\text{C}$ i 21 døgn, men ikke i 28 døgn

HRV tålte opbevaring ved $+20^{\circ}\text{C}$ i 9 måneder (længste tid)

Virusinficerede blade:

HRV tålte opbevaring ved $+20^{\circ}\text{C}$ i op til 6 måneder.

Ved opbevaringsforsøgene udført ved $+20^{\circ}\text{C}$ blev viruset svækket efter 3 måneders forløb.

Elektronmikroskopi

Stavformede viruspartikler er blevet iagttaget i suspensionspræparater fra hortensie og *Tetragonia expansa* med en størrelse på $16 \times 480 - 520$ nm. En meget kraftig aggregering af viruspartikler er blevet iagttaget i renfremstillet viruspræparat, negativ farvet med fosforwolframsyre (fig. 2). Partikler med nævnte »normal-længder« er afmærket med pile.

Viruskoncentration

Viruskoncentrationen er blevet undersøgt i inokulerede planter af *Tetragonia expansa* ved hjælp af elektronmikroskopi. I ensartede prøver, der blev udtaget 7, 10, 14 og 16 døgn efter inokulationen, blev der registreret henholdsvis 14, 60, 27 og 22 partikler pr. 10 undersøgte masker pr. præparatnet (grid).

Fremstilling af antiserum og serologiske undersøgelser

Hortensie-ringmosaik-virus isoleret fra hortensie blev opformeret i *Tetragonia expansa*, og en delvis renfremstilling af viruset blev foretaget efter Wetters metode (1960), dog således at tyngdegradientcentrifugering blev udeladt. De færdige viruspræparater indeholdt store mængder delvis aggregerede ca. 500 nm lange partikler (fig. 2).

Ved immunisering af en kanin blev der med

2 ugers mellemrum givet 2 intramuskulære injektioner, idet viruspræparaterne blev emulgeret med Freund's adjuvant. 2 uger efter sidste injektion fandt første åreladning sted, og i løbet af en 2 ugers periode foretoges 4 åreladninger, hvorved opnåedes i alt 90 ml antiserum.

Ved præcipitationsprøven i reagensglas ved 37°C var antiserum-titeret 1:128 med antigen ex *Tetragonia expansa* (den udpresede saft blev opvarmet til 50°C , og de derved fremkomne koagulerer blev fjernet ved centrifugering). Præcipitaterne, som var store og voluminøse, dannedes i løbet af 10 min. Med antigen ex hortensie (saft klaret som nævnt for *Tetragonia*) fremkom efter 60 min. uspecifikke fintkornede præcipitater. Den klarede bladsaft fra hortensie var tyktflydende (olieagtig) og blandedes kun meget vanskeligt med antiserum, selv ved fortynding 1:4. De hortensier, der var til rådighed, var afdrevne planter med udvoksede ældre blade, hvilket sandsynligvis giver forklaringen på de uspecifikke reaktioner og vanskelighederne ved at fremstille tilfredsstillende antigener.

Ved agglutinationsprøver opnåedes gode specifikke reaktioner med ubehandlet (rå bladsaft) fra HRV-inficerede *Tetragonia expansa*, mens rå bladsaft fra ældre hortensier gav uspecifikke reaktioner.

Foranlediget af vanskelighederne med fra hortensie at opnå antigener, der kunne anvendes til serologiske undersøgelser, blev det forsøgt at klare bladsaft fra unge hortensier i god vækst på følgende måder:

1. Saft fra friske blade, klaret ved centrifugering.
2. Saft fra friske blade, klaret ved opvarmning + centrifugering.
3. Saft fra friske blade, frosset 2 døgn ved $+25^{\circ}\text{C}$ og derefter klaret ved opvarmning og centrifugering.
4. Saft fra frosne blade (2 døgn ved $+25^{\circ}\text{C}$) klaret ved opvarmning + centrifugering.

Opvarmning foretoges til 40°, 50°, 60° og 70° C i 10 og 30 min. Centrifugeringen foregik i 30 min. ved ca. 6000×g.

De serologiske prøver udførtes som dråbepræcipitation med antiserum i fortyndingerne 1:8, 1:16, 1:32 og 1:64.

Ved inokulation af antigenerne til *Gomphrena globosa* blev infektiviteten sammenlignet med den serologiske aktivitet.

Både infektiviteten og den serologiske aktivitet var i behold efter opvarmning til 60° C, men var gået tabt efter opvarmning til 70° C.

Alle de 4 nævnte metoder til klaring af blad-saft fra hortensie gav gode klare antigener, som var velegnede til dråbepræcipitationsprøver. Antigenet klarer ved metode 4 var dog ikke serologisk aktivt.

Følsomheden og sikkerheden ved en serologisk diagnostisering er blevet sammenlignet med resultaterne opnået ved anvendelse af indikatorplanter. Det anvendte materiale stammede fra 10 hortensiesorter, hvor unge blade

fra 5 planter blev samlet i gruppeprøver. Hver prøve blev delt i to, hvor den ene del blev inokuleret (saftinokulation) til *Gomphrena globosa*, mens den anden del blev undersøgt serologisk ved dråbepræcipitation; bladsaften hertil blev klarer ved opvarmning til 52° C i 10 min. + centrifugering 6000×g i 30 min. De serologiske prøver blev udført med de samme antigener to på hinanden følgende dage (fornyset centrifugering andendagen). Resultaterne er anført i tabel 2.

Resultaterne af denne undersøgelse viser, at den benyttede serologiske teknik ikke egner sig som rutinemetode til bestemmelse af HRV i hortensie, dels fordi et for stort antal inficerede planter gav negativ serologisk reaktion, og dels fordi uspecifikke reaktioner forekom for hyppigt.

Kortlægning

I 1969 blev der under drivningstiden indsamlet bladprøver fra 3 gartnerier fra hortensie-

Tabel 2. Infektionspct. og overensstemmelse mellem serologiske prøver og infektionsforsøg samt mellem 2 serologiske undersøgelser af 10 hortensiesorter

(The infection per cent and correlation between serological samples and infection trials and further more between 2 serological investigations from 10 *Hydrangea* varieties)

Sort	Infektionspct. ved inok. til <i>Gomphrena</i>	Overensstemmelse mellem		
		infektionsforsøg og 1. serologiske prøve	2. serologiske prøve	de 2 serologiske prøver
Adolf Paasch	90	7/8 *)	5/8	3/7
Alpenglühchen	100	7/7	7/7	6/6
Blauwe Diamant	100	4/10		
Bodensee	80	2/10	2/7	7/7
Drap's Supreme	100	4/5	1/4	2/3
Hildegard	100	4/4	4/7	2/3
Immaculata	10	5/7		
King George V	100	3/6	2/9	3/6
Rot Spoon	100	8/10		
Sibilla	100	4/9	1/6	3/5

*) Nævneren angiver det antal prøver, der kunne sammenlignes, idet de prøver, der gav reaktion (uspecifik) med normalserum, ikke er medregnet.

Tælleren angiver antal overensstemmende prøver.

sorterne 'Bodensee', 'Hørnli' og 'Sibilla'. Prøverne omfattede blade dels fra planter i dårlig vækst (klorotiske, deforme blade), dels fra planter med virusagtige symptomer (klorotiske 2 mm pletter og ringe) (fig. 3) samt fra sundt udseende planter. Der blev ikke iagttaget virusagtige symptomer i sorten 'Sibilla'. Resultaterne fra virusbestningen, hvor der blev anvendt saftinokulation til *Gomphrena globosa*, fremgår af tabel 3.

Symptomregistrering er blevet udført i hortensie-sortsforsøget ved Statens Væksthusforsøg, Virum i 1969 og 1970 samt i et udstationeret forsøg i Åsum i 1970.

Materialet omfattede 68 sorter, af hvilke enkelte forekom med flere gentagelser fra forskellige lokaliteter, således at det samlede antal prøver kom op på 75.

Forekommende virusagtige symptomer i planterne, bestående af enten en klorotisk spætning, klorotiske ringe eller nervelysning, blev jævnligt registreret gennem drivningstiden i marts og april måned.

Foruden symptomregistrering blev sorterne i 1969 testet for HVR-infektion, hvor en gruppeprøve fra hver sort, omfattende bladprøver fra 5 planter, blev inokuleret (saftinokulation) til *Chenopodium amaranticolor* og *Gomphrena globosa*. Ved negativ reaktion blev planterne inden for vedkommende sort testet enkeltvis.

De udførte undersøgelser viste, at der ikke forekom virusagtige symptomer i blomsterne (bægerbladene) i nogen af sorterne, og at blad-symptomerne næsten uden undtagelse var svage og lidet iøjnefaldende. De øvrige resultater fremgår af tabel 4.

Symptomudviklingen i relation til årstid og sted fremgår af tabel 5.

Tabel 5. Symptomudvikling i blade i relation til årstid og sted.

(Development of leaf symptoms in relation to time of the year and growing place)

År	Sted	Pct. sorter med virusagtige bladsymptomer den:		
		10/3	2-10/4	18-28/4
1969	Virum	—	—	4
1970	»	—	22	32
»	Åsum	42	10	—

— = ikke bedømt på grund af mikronæringsmangel.

I 1971 blev 10 udvalgte hortensiesorter undersøgt for evt. HRV-infektion. Inden for hver sort blev der testet 50 planter ved anvendelse af gruppeprøver, hver omfattende blade fra 5 planter. Gruppeprøverne blev inokuleret (saftinokulation) til *Gomphrena globosa*. Resultaterne, der fremgår af tabel 2, kolonne 1 (side 9) viste, at samtlige sorter var inficeret med HRV, men at infektionsprocenten varierede inden for sorterne. I sorten 'Immaculata' var således kun 10 pct. af gruppeprøverne inficeret, mod mindst 80 pct. hos de øvrige 9 sorter.

Termoterapi

Muligheden for ved varmebehandling at kunne etablere virusfrie hortensieplanter fra HRV-inficerede er blevet nærmere undersøgt.

Indledende orienterende undersøgelser, vedrørende planternes følsomhed over for en varmebehandling, blev foretaget med veletablerede hortensieplanter af sorten 'Sibilla', der blev anbragt ved temperaturerne 30, 32, 34 og 36° C med en belysning på ca. 5500 lux (fig. 5). Resultaterne fremgår af tabel 6.

Tabel 3. HRV-forekomst i relation til bladsymptomer (Presence of HRV in relation to leaf symptoms)

Symptomer i undersøgte blade	HRV påvist i antal prøver af i alt testede i sorterne			i alt
	'Bodensee'	'Hørnli'	'Sibilla'	
Ingen	2/2	2/2	4/4	8/8
Klorose, rynkning, deformation	1/1	5/5	2/3	8/9
Klorotiske 2 mm virusringe	3/3	3/3	0/0	6/6

Tabel 6. Varmebehandlings indflydelse på hortensiesorten 'Sibilla'
(The influence of the heat treatment on the *Hydrangea* variety 'Sibilla')

Varme- behandling i døgn	Symptomregistrering ved følgende temperaturer		
	30 °C	32-34 °C	36 °C
30	ingen symptomer	brune bladrande	døde
60			visne blade
90		klorotiske hjerteblade	
120	grønne sideskud		
150		tiltagende klorose	
180	kraftig gul klorose		
210			
240			

Varmebehandlingsforsøget blev, på basis af de opnåede resultater, udført ved 30 og 33 °C med sorterne 'Bodensee', 'Hørnli' og 'Sibilla', der alle var totalt inficeret med HRV. Stiklingerne, der blev taget første gang efter 30 døgn og derefter med 30 døgners intervaller, bestod dels af topskud og dels af sideskud, der udvikledes i stort antal langs stænglerne og ved basis af planten. Sideskuddene var langt de talrigeste og særdeles velegnede til at skære i en størrelsesorden fra 6 til 30 mm. Stiklingerne blev stukket i „kronmuld“ og placeret under tåge og kunne pottes efter ca. 1 måneds forløb. De etablerede planter blev senere testet til *Gomphrena globosa* ad 2 gange. De opnåede resultater fremgår af tabel 7.

Meristemkultur

Tidligere forsøg på etablering af meristemplanter har været generet af forurening med bakterier. Desinfektion med 0,5 til 1 pct. oxysprit i henholdsvis 60 og 30 min. har ganske vist været effektivt, men meristemerne tålte ikke denne behandling (Paludan 1970). Orienterende undersøgelser er derfor blevet udført med streptomycin for at se, om et antibiotisk middel var mere anvendeligt. Hortensieskud, taget fra en HRV-inficeret plante på friland, blev afbladet og dyppet i streptomycinopløsninger med forskellige koncentrationer i 10-15 min. Efter behandlingen blev skuddene skyllet i sterilt vand. Resultaterne fremgår af tabel 8.

Tabel 7. Varmebehandlingsforsøg med 3 HRV-inficerede hortensiesorter ved 2 temperaturer med en behandlingstid fra 30 til 240 døgn

(Experiments with heat treatment including 3 HRV infected *Hydrangea* varieties and 2 temperatures during 30 to 240 days)

Varmebehandling i antal døgn	30°C		Sibilla				Hørnli 33°C				Bodensee 33°C			Alle sorter 30-33°C			
	Stiklingestørrelse mm	Antal stiklinger	Ant. etabl. planter	Antal uden HRV	Stiklingestørrelse mm	Antal stiklinger	Ant. etabl. planter	Antal uden HRV	Stiklingestørrelse mm	Antal stiklinger	Ant. etabl. planter	Antal uden HRV	Pct. uden HRV				
30	15-30	58	54	25	15-30	39	35	3	8-10	24	9	0	10-15	35	32	8	28
60	10-15	106	34	18	8-15	47	16	2	6-15	13	4	2	10-20	50	38	22	48
90	8-10	74	41	13	8-10	24	16	11					15-30	29	22	11	42
120	8-15	35	22	11	8-15	10	0						10-20	30	18	10	50
180	10-20	60	26	12									10-20	17	4	3	50
210	10-20	62	13	8													62
240	10-20	9	0														

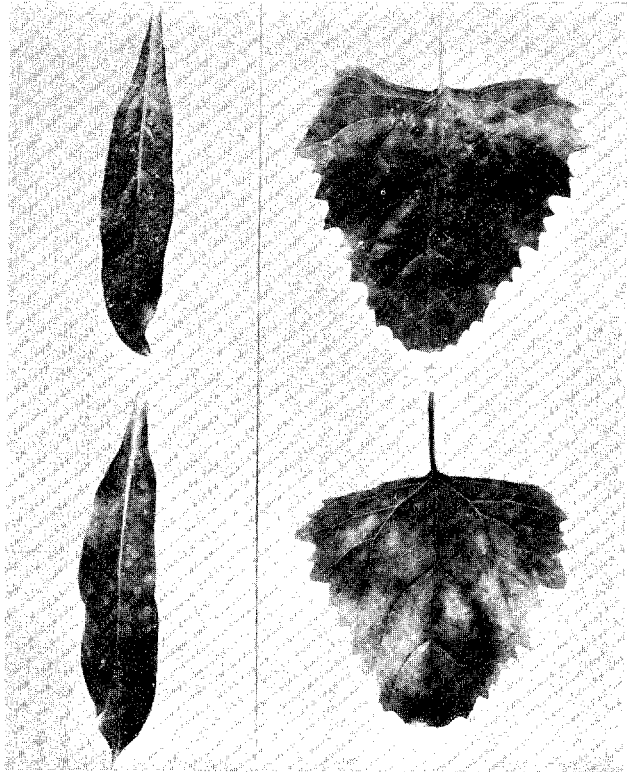


Fig. 1. *Gomphrena globosa* og *Chenopodium amaranticolor* 7 døgn efter inokulation med HRV. Øverste række blade fra planter i drivhus, nederste række afplukkede blade i fugtigt kammer. (*Gomphrena globosa* and *Chenopodium amaranticolor* seven days after inoculation with HRV. Upper row leaves from plants in green house, lower row detached leaves in moist chamber.

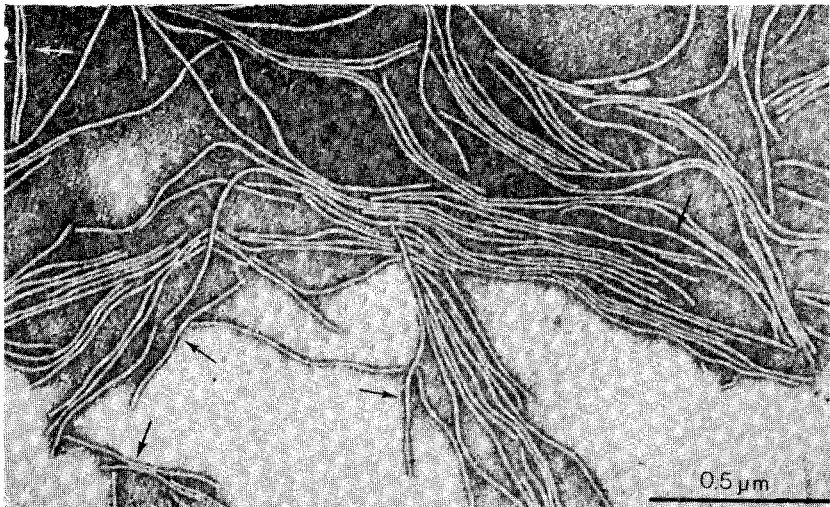


Fig. 2. HRV-partikler i renfremstillet præparat. Ikke aggregerede partikler afmærket med pile.
(*HRV*-particles in purified preparation. Non aggregated particles markt with arrows).

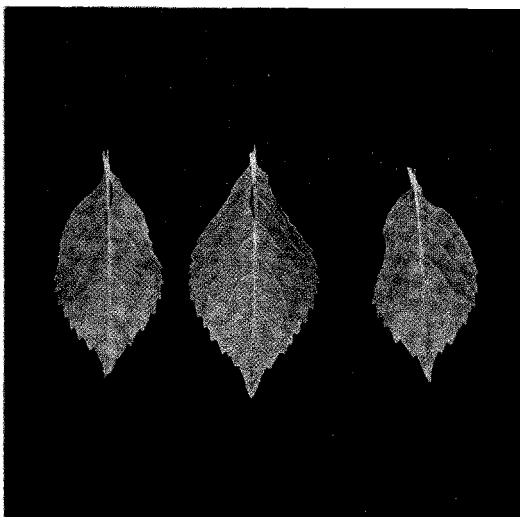


Fig. 3. Hortensiesorten 'Hørnli' inficeret med HRV.
(The *Hydrangea* variety 'Hørnli' infected with HRV).

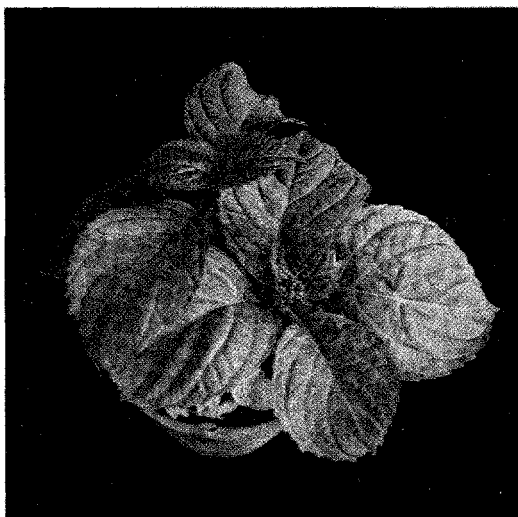


Fig. 4. Hortensiesorten 'Bodensee' inficeret med HRV.
(The *Hydrangea* variety 'Bodensee' infected with HRV).



Fig. 5. Hortensiesorten 'Sibilla' efter 40 døgns varmebehandling ved henholdsvis 30°C (t.v.) og 33°C (t.h.).
(The *Hydrangea* variety 'Sibilla' after 40 days heat treatment at respectively 30°C (left) and 33°C (right)).

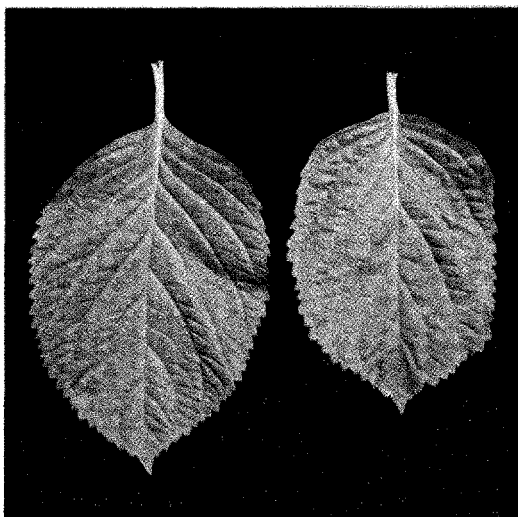


Fig. 6. Blade fra hortensiesorten 'Bodensee' fra henholdsvis varmebehandlet virusfri plante (t.v.) samt fra HRV-inficeret plante (t.h.).
(Leaves from the *Hydrangea* variety 'Bodensee' respectively from heat treated, virusfree plant (left) and from HRV-infected plant (right)).

Foto: J. Begtrup

Tabel 8. Hortensieskud desinficeret med streptomycin i 10-15 min.
(*Shoot of Hydrangea disinfected with streptomycin in 10--15 min.*)

Streptomycin-koncentration ppm	skåret	Antal meristemer		i vækst
		forurenset (bakterier)	(pct)	
50	10	6	(60)	3
100	20	18	(90)	3
200	20	13	(65)	2
400	10	8	(80)	1

Virusfrie hortensieplanter er ved meristemkultur blevet etableret fra HRV-inficeret materiale, idet viruset ikke har kunnet påvises ved gentagne testninger i 2 af 2 tiltrukne meristemplanter.

Diskussion og konklusion

De opnåede resultater viser, at det påviste virus er identisk med det fra udlandet beskrevne hortensie-ringmosaik-virus, bedømt dels på indikatorplanter, hvor tobaksplanter har reageret negativt og *Chenopodium*arterne kun med lokale læsioner, dels ved de fysiske undersøgelser, der stort set stemmer overens med amerikanske og engelske bortset fra en lavere termoresistens, og endelig på de elektronmikroskopiske præparater.

HRV er alm. udbredt i hortensiesortimentet, men optræder mere eller mindre latent i planterne. De almindeligst forekommende virus-symptomer har vist sig som en moderat klorotisk spætning eller som klorotiske ringpletter i normalt udviklede blade. Sidstnævnte stemmer ikke helt overens med flere udenlandske undersøgelser, hvor deformede til stærkt deformede blade er nævnt i forbindelse med HRV-angreb.

Kraftige spætningssymptomer i bladene har specielt været iagttaget i sorten 'Bodensee'; virusinfektion er imidlertid også påvist hos symptomløse planter af denne sort.

Infektionsprocenten i sorten 'Immaculata' har i modsætning til andre sorter været meget lav, hvilket kunne tyde på en delvis resistens over for HRV. Resultatet stemmer nøje overens med svenske iagttagelser.

Etablering af virusfrie hortensieplanter ved varmebehandling er lykkedes allerede efter 30 døgn ved 30° C og bekræfter således Brierly's resultater fra 1957. Viruselimineringen har imidlertid fundet sted dels på en kortere tid og dels ved en lavere temperatur, hvilket er af stor betydning, da hortensieplanterne meget dårligt tåler den høje temperatur på 36° C.

Etablering af virusfrie meristemplanter er ligeledes lykkedes, men hidtil kun i enkelte tilfælde, idet problemet først og fremmest er af forureningsmæssig karakter. Ved en hensigtsmæssig forkultur, under beskyttede drivhusforhold og med høj hygiejne, burde der imidlertid være mulighed for at løse dette problem.

De opnåede resultater viser, at der foreligger en sikker testningsmetode for HRV ved anvendelse af indikatorplanter samt effektive metoder til etablering af virusfrie hortensieplanter.

Summary

The presence of *Hydrangea ringspot virus* (HRV) has been shown in 62 of 68 (91 per cent) *Hydrangea* varieties. In the variety 'Immaculata' the virus was only recorded in 10 per cent of the tested group samples in contrast with 80-100 per cent infection at 9 other varieties.

Virus like leaf symptoms, such as chlorotic mottle and chlorotic rings, have been recorded only in 28 of the same 68 (41 per cent) *Hydrangea* varieties. The virus symptoms have generally been weak and varied according to the growth conditions and time of the year. Virus-like symptoms have not been recorded in the flowers (petals) from any of the varieties.

Chenopodium amaranticolor and *Gomphrena globosa* have, in infection trials, shown to be equal suitable as indicator plants regarding sensitivity and period of incubation.

Detached leaves have been less sensitive than intact indicator plants.

Serological precipitation tests have been less sensitive than indexing.

The HRV has been verified by the use of indicator plants together with investigations concerning physical, serological and elektronmicroscopic properties.

Hydrangea plants have successfully been heat treated at 30 and 34° C in respectively 240 and 120 days, but were killed after 30 days at 36° C.

Virusfree Hydrangea have been established from HRV infected plants by heat treatment after 30 days at 30° C stimulated by prolonged treatment.

Virusfree Hydrangea have further more been established from HRV infected plants by meristem tip culture.

Litteratur

Belli, G. (1968): On a vein clearing of Hydrangea. *Phytopath. Mediterr.* 7: 2-3: 70-71.

Belli, G. & G. G. Belli (1968): Researches on Hydrangea ring spot virus and verification of its presence in Italy. *Rev. appl. Mycol.* 47:4: 210.

Bercks, R. und J. Brandes (1961): Vergleichende serologische und elektronmikroskopische Untersuchungen des Weisskleemosaik Virus des Hydrangea Ringspot Virus und des Kartoffel X Virus. *Phytopath. Zeitschr.* 42:1: 45-56.

Bercks, R. (1969): Der derzeitige Stand der Kenntnisse über die Potato Virus X Gruppe 1) 2). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 123:3: 204-208.

Brierley, Philip and Floyd F. Smith (1952): A ringspot virus from Hydrangea infections to Herbaceous plants. *Pl. Dis. Repr.* 36:10: 382-383.

Brierley, Philip (1954): Symptoms in the Florists Hydrangea caused by tomato ringspot virus and an unidentified sap-transmissible virus. *Phytopathology* 44:12: 696-699.

Brierley, Philip (1956): Susceptibility of Gomphrena to tomato ringspot virus. *Pl. Dis. Repr.* 40:7: 667.

Brierley, Philips (1957): Virus-free Hydrangeas from tip cuttings of heattreated ringspot affected stock plants. *Pl. Dis. Repr.* 41:12: 1005.

Brierley, Philip and Paul Lorentz (1957): Hydrangea ringspot virus, the probable cause of "Running out" of the Florists Hydrangea. *Phytopathology* 47:1: 39-43.

Dunez, J. (1963): A virus disease recently encountered in France: Hydrangea ringspot. *Rev. appl. Mycol.* 42:12: 767.

Gram, E. & A. Weber (1940): *Plantesygdomme*. Emil Wienes Bogforlag, København. 2. oplag 1944, II: 422.

Hollings, M. (1958): Hydrangea ringspot in Britain. *The Journal of Horticultural Science* 33:4: 275-281.

Koenig, Renate (1970): Über das vorkommen von

Hydrangea Ringspot Virus in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 22:3: 34-37.

Koenig, Renate (1971): Virusuntersuchungen an Hortensien 1970. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 23:3: 41-42.

Kristensen, H. Rønede (1951): *Plantesygdomme i Danmark* 1949. *Tidsskr. f. Planteavl* 55: 35.

Kristensen, H. Rønede (1961): *Plantesygdomme i Danmark* 1959. *Tidsskr. f. Planteavl* 65:1: 41.

Kristensen, H. Rønede (1963): *Plantesygdomme i Danmark* 1962. *Tidsskr. f. Planteavl* 67:4: 596.

Kristensen, H. Rønede & A. Thomsen (1970): Varmebehandlings indflydelse på planter og plantevira. *Tidsskr. f. Planteavl* 74:2: 264-280.

Marrou, J. and C. M. Messiaen (1967): The Chenopodium quinoa test: A critical method for detecting seed transmission of lettuce mosaic virus. *Proc. Int. Seed Test. Ass.* 32:1: 49-57.

Miller, Paul R.: Plant Disease Situation in the United States. Aster Yellows on Ornamental plants. *FAO Plant Protection Bulletin*, 1V:2: 26-27. (1955).

Nilsson, Bengt (1969): Ringflecksjuka - en vanlig virussjukdom på hortensia. *Växtskydds Notiser* 33:1: 3-7.

Paludan, N. (1971): Etablering af virusfrie meristemkulturer af havebrugsplanter. *Tidsskr. f. Planteavl* 75:3: 387-410.

Pape, H. (1957): Viruskrankheiten auch bei Hortensien? *Gartenwelt* 57: 137-138.

Schmelzer, K. (1970): Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. *Phytopath. Zeitschrift* 67:4: 285-326.

Sisler, Hugh D. et al. (1957): Purification and properties of Hydrangea ringspot virus I. *Phytopathology* 47:8: 491-494.

Tamura, M. & Y. Komuro (1967): The mosaic disease of Hydrangea caused by cucumber mosaic virus disease. *Rev. appl. Mycol.* 46: 473.

Thomson, A. D. (1960): Hydrangea ringspot virus in New Zealand. *N. Z. J. Sci.* 3:4: 559-562. *Rev. appl. Mycol.* 40:9: 540.

Wetter, C. (1960): Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans. *Arch. Mikrobiol.* 37: 278-292.

Manuskript modtaget den 11. februar 1972.