

*Statens plantepatologiske Forsøg (H. Ingv. Petersen)*

*Virologisk afdeling (H. Rønde Kristensen)*

## **Virusfrie chrysanthemumplanter af anerkendte sorter etableret ved varmebehandling og meristemkultur**

*Virus-free plants of chrysanthemum from approved varieties established by mean of heat treatment and meristem-tip culture*

**N. Paludan**

### **Resumé**

Virusinfektion er blevet påvist i 14 af de 15 anerkendte frilandschrysanthemum, som indgik i sorts-forsøget på Statens Væksthusforsøg i årene 1968-70.

Bedømt på symptombasis og reaktioner i de anvendte indikatorplanter er tomat-aspermi-virus (TAV) og chrysanthemum virus B (CVB) blevet påvist hver i 7 sorter. Resultatet medførte ønsket om en hurtig etablering af virusfrie planter inden den officielle anerkendelse fandt sted.

TAV og CVB er i løbet af et år blevet elimineret i henholdsvis 74 og 98 pct. af de etablerede meristemplanter.

Varmebehandling forud for meristemkulturen har kun haft en positiv virkning med hensyn til eliminering af TAV.

136 virusfrie chrysanthemumplanter er i løbet af et år blevet udleveret til Fællesudvalget for Fremavl og Sundhedskontrol med Havebrugsplanter (FSH) beregnet til videre opformering under isole-rede forhold.

Kontroltestninger et år efter udleveringen har vist, at der ikke er forekommet nogen reinfektion af plantematerialet i det etablerede elitehus. Planterne var desuden fri for følgende chrysanthemum-vira: D, dværgsyge, E, klorotisk spætning, latent virose, Q, nervemosaik og mosaik.

### **1. Indledning**

Sortsforsøg med frilandschrysanthemum er i årene 1968-70 blevet udført på Statens Væksthusforsøg i Virum. For at få kendskab til plantematerialets sundhedstilstand med hensyn til evt. forekommende virussygdomme, blev virologisk afdeling anmodet om at undersøge dette nærmere, bl.a. ved jævnlige symptomregistreringer i forsøgsperioden.

Ved de udførte symptomregistreringer og testing af stikprøver fra forekommende virøse planter, viste det sig, at plantematerialet bl.a. var inficeret med tomat-aspermi-virus (TAV). Da dette virus må anses som meget skadeligt for chrysan-

themum, idet det forårsager spætning og deformation af blomsternes kronblade (fig. 1), blev samtlige anerkendte sorter senere testet for evt. virusinfektion. Virus blev påvist i 14 af i alt 15 sorter, af hvilke 7 var inficeret med TAV.

De opnåede resultater medførte, at man fra Statens Væksthusforsøg ønskede om muligt at få etableret virusfrie planter af nævnte sortiment, inden den officielle godkendelse af sorterne fandt sted. Da muligheden for at gennemføre dette projekt ifølge litteraturen var til stede ved hjælp af varmebehandling og meristemkultur, blev man enige om at forsøge at gennemføre opgaven så hurtigt som muligt. Formålet var at kunne udle-

vere virusfrie planter fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur som elitemateriale for et kommende fremavlsarbejde. Resultaterne fra dette arbejde er omtalt i denne beretning.

### Tidligere forsøg

TAV er blevet elimineret både ved hjælp af varmebehandling og meristemkultur. I 1954 lykkedes det således *Kassanis* ved varmebehandling at inaktivere TAV i inficerede tobak- og tomatplanter. 2 år senere blev viruset på tilsvarende måde inaktiveret i chrysanthemumsorten 'Nightingale' (Holmes 1956). Danske undersøgelser har vist, at det har været muligt at inaktivere TAV allerede efter 14 døgn varmebehandling, og at positive resultater kunne opnås inden for temperaturområdet 32 til 38 °C. TAV blev totalt inaktiveret i småplanter, mens det kun blev partielt inaktiveret (yngste skud) i større planter (Kristensen og Thomsen 1958). TAV er ved hjælp af meristemkultur blevet inaktiveret i 79 pct. af de etablerede planter (Paludan 1971).

Chrysanthemum virus B (CVB) er ligeledes blevet inaktiveret ved hjælp af meristemkultur både med og uden forudgående varmebehandling af plantematerialet. Afhængig af sorten blev de bedste resultater opnået efter 20 til 40 døgn varmebehandling ved 37 °C (Hakkaart 1964).

## 2. Metode

Chrysanthemumplanterne i sortsforsøget blev registreret for evt. forekommende virussympotomer i blade og blomster. De udtagne stikprøver fra chrysanthemumplanter med virussympotomer blev testet ved saftinokulation (stødpude tilsat) til indikatorplanterne *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' og *Petunia hybrida* Vilm. 'Himmelröschen'. Diagnosen blev stillet ud fra de symptomer, der fremkom i indikatorplanterne (Noordam 1952, Hollings 1957). En tydelig systemisk spætning i tobak- og petuniaplanterne indicerede således TAV (fig. 2), mens lokale pletter (klorotiske, gulklorotiske og nekrotiske) i petunia, uden efterfølgende systemisk infektion, blev vurderet som angreb af CVB (fig. 3). Da der ikke yderligere blev gjort forsøg på nærmere at diagnosticere de enkelte virusangreb kan sidstnævnte gruppe udover chrysan-

themum virus B også omfatte nervemosaik-virus og latent virose (Hollings 1957).

De indsamlede chrysanthemum-moderplanter, omfattende de 15 anerkendte sorter, blev inden den påbegyndte varmebehandling testet til ovennævnte indikatorplanter. Desuden blev enkelte af sorterne podet til den følsomme chrysanthemum-indikatorsort 'Mistletoe'.

Varmebehandling af de indsamlede chrysanthemum-moderplanter blev udført i termostatregulerede varmerum ( $\pm 1^\circ \text{C}$ ) med en belysning på 5.500 lux (fig. 4). Enkeltheder vedrørende indretning af termostattrummene samt den anvendte arbejdsmetode er nærmere beskrevet af Kristensen og Thomsen 1970.

Meristemkultur blev udført efter retningslinier beskrevet af Paludan 1971, hvor *Murashige* og *Skoogs* 1962 medium blev anvendt som basemedium modificeret ved tilsætning af 170 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mg adeninsulfat og 1 mg gibberellin pr. liter (fig. 5-6).

De udleverede virusfrie meristemplanter blev senere via FSH placeret i et drivhus ved Statens Arbejdshus i Sdr. Ommø. Denne placering blev valgt p. gr. af, at der ikke var andre chrysanthemumkulturer, samtidig med at der var tilstrækkelig drivhuskapacitet til oprettelsen af et elitehus og et fremavlshus. Den enkelte chrysanthemum-sort blev holdt i to kloner, hver bestående af tre planter. Isolation fra de øvrige sorter blev gennemført med plasticskillerum. Smittespredning blev imødegået, dels ved forebyggende sprøjtninger mod bladlus og dels ved gennemførelse af strenge hygiejniske krav som anvendelse af kittel, hyppig sæbevask af hænder samt flambering af anvendte knive.

Efter etablering af elitehuset er chrysanthemumplanterne blevet kontroltestet, dels ved saftinokulation til petunia for saftoverførbare vira og dels ved podning til chrysanthemum-indikatorerne 'Mistletoe', 'Fanfare' og 'Deep Ridge' for evt. andre forekommende vira.

## 3. Resultater

### 3:1. Kortlægning

Ved kortlægningen i 1968 blev der i sortsforsøget registreret 3 sorter med spættede blomster og 4

sorter med ikke helt normalt formede blomster. Tomat-aspermi-virus blev senere påvist i sorterne med de spættede blomster, mens virus ikke kunne påvises i de øvrige.

I 1969 blev sortimentet symptomregistreret i august og oktober måned. Spætning og rynkning af kronbladene blev registreret i blomsterne fra 13 af i alt 110 sorter. TAV blev senere påvist i 10 af de 13 testede sorter med blomstersymptomer.

Symptomregistrering i 1970 og 71 omfattede udelukkende de 15 anerkendte sorter. Resultaterne herfra, omfattende blad- og blomstersymptomer, symptomer i indikatorplanter, formodet forekommende virus samt antal udleverede, virusfrie meristemplanter, fremgår af tabel 1.

Tabel 1. Symptomregistrering, testningsresultater og antal udleverede, virusfrie meristemplanter af 15 anerkendte chrysanthemumsorter.

*Recording of symptoms, results of testing and number of delivered, virus-free meristem plants of 15 approved chrysanthemum varieties*

Sort <i>varieties</i>	Symptomer i <i>symptoms in</i>					Formodt virus-infektion <i>expected virus infection</i>	Antal udleverede virusfrie meristemplanter <i>number of delivered virus-free meristem plants</i>
	chrysanthemum blade <i>leaves</i>	blomster <i>flowers</i>	indikatorplanter petunia lokale	<i>test plants</i> chrys. systemis.	'Mistletoe'		
Fridjof Heise . . . . .	nl.	0	gule	0	0	CVB*)	11
Elite . . . . .	0	spæt.	klor.	spæt.	0	TAV	7
Jessamine Williams . . .	0	0	0	0	0	0	8
Freudenberg . . . . .	nl.	0	klor.	0	spæt.	CVB	16
Duchess of Edinburg . .	0	0	gule	spæt.	—	TAV	7
White Bouquet . . . . .	spæt.	0	gule	0	nb.	CVB	12
Eugene A. Wander . . . .	0	spæt.	klor.	0	0	CVB	8
Lee Powell . . . . .	0	0	gule	0	nb.	CVB	8
Purple Waters . . . . .	0	0	gule	spæt.	—	TAV	8
Red Headliner . . . . .	spæt.	0	gule	spæt.	—	TAV	3
Sparkling Burgundy . .	spæt.	0	klor.	spæt.	—	TAV	3
Trail Boss . . . . .	spæt.	spæt.	gule	spæt.	—	TAV	6
Chrystal . . . . .	spæt.	0	0	0	nb.	CVB	15
Sunset Pom . . . . .	nl.	0	gule	spæt.	—	TAV	6
Lilla Juweltje . . . . .	0	0	gule	0	nb.	CVB	18
I alt . . . . .							136

—: ikke testet  
*not tested*

0: ingen symptomer  
*no symptoms*

spæt.: spætning  
*mottling*

nl.: nervelysning  
*vein clearing*

klor.: klorotiske  
*chlorotic*

nb.: nervebånd  
*vein band*

CVB: Chrysanthemum virus B

TAV: Tomat-aspermi-virus

\*) CVB kan også omfatte chrys.-nervemo-  
saik-virus og latent virose  
*CVB may possibly include chrys. vein  
mottle virus and latent virus*

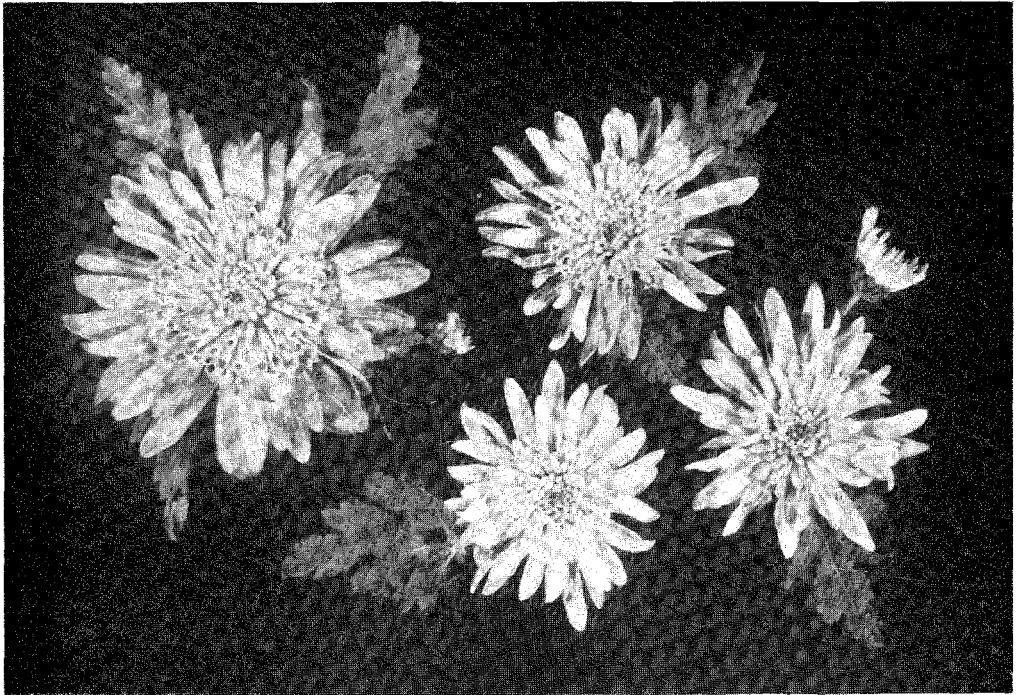


Fig. 1. Chrysanthemumblomster misdannet af tomat-aspermi-virus. Sund blomst tv.  
*Chrysanthemum flowers deformed by tomato aspermy virus. Healthy flower left.*

Foto: F. Hejndorf.

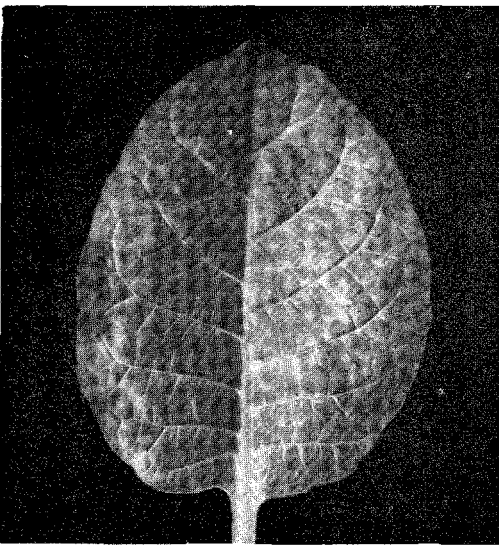


Fig. 2. *Nicotiana t. 'Samsun'* inficeret med tomat-aspermi-virus.  
*Nicotiana t. 'Samsun' infected with tomato aspermy virus.*

Foto: J. Begtrup.

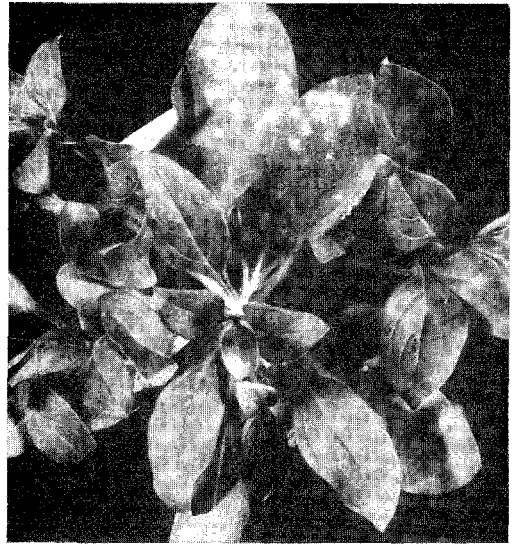


Fig. 3. *Petunia hybrida* inficeret med chrysanthemum virus B.  
*Petunia hybrida infected with chrysanthemum virus B.*

Foto: F. Hejndorf.

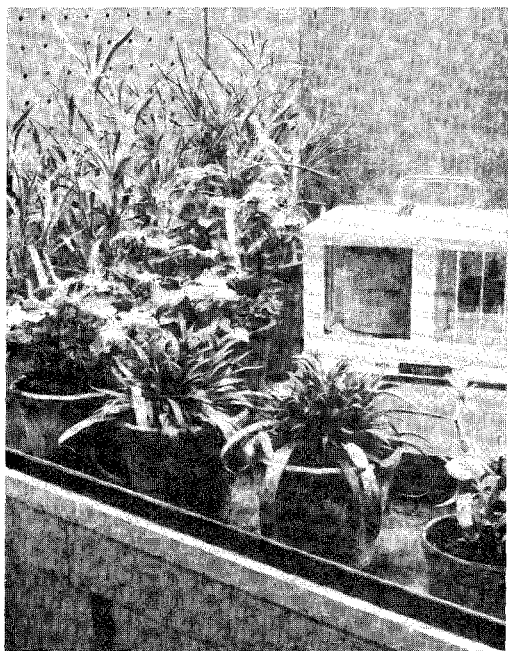


Fig. 4. Termostatreguleret varmerum.  
*Heat controlled room for heat treatment.*

Foto: J. Begtrup.

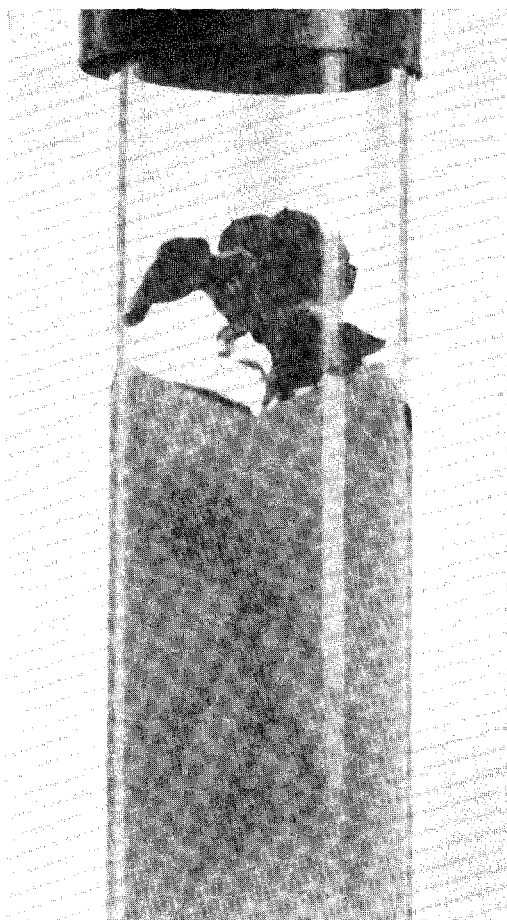


Fig. 6. Chrysanthemum-meristemplante 80 døgn  
efter skæring.

*Chrysanthemum meristem plant after 80 days.*

Foto: J. Begtrup.

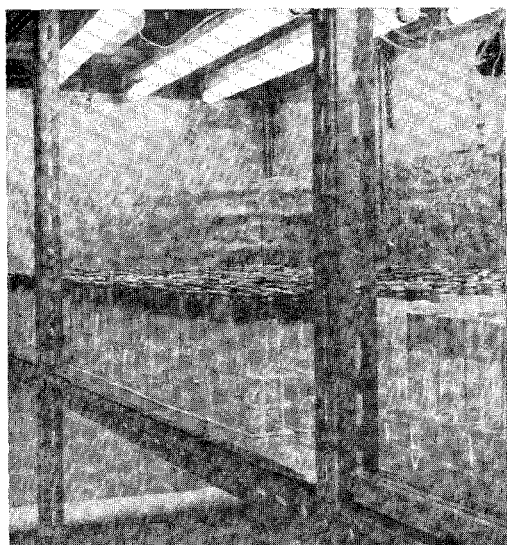


Fig. 5. Termostatreguleret dyrkningsrum for  
meristemer.

*Heat controlled growing room for meristem-tips.*

Foto: J. Begtrup.

### 3:2. Varmebehandling og meristemkultur

Meristemer blev skåret i størrelsen 0,5 til 0,75 mm bestående af selve meristemet og et eller to blad-anlæg. Meristemerne blev dyrket i *Murashige* og *Skoogs* næringsopløsning, henholdsvis i fast (agar tilsat) eller flydende (filterpapirvæge) medium.

Mediets og varmebehandlingens indflydelse på antal etablerede meristemplanter fremgår af tab. 2.

Varmebehandlingens og meristemkulturens indflydelse på etablering af virusfrie planter omfattende TAV og CVB fremgår af tabel 3.

Tabel 2. Etablering af chrysanthemum-meristemer i fast og flydende næringsmedium med og uden forudgående varmebehandling  
*Establishment of chrysanthemum meristem plants in solid and fluid medium with and without pre-heating*

Døgn ved 38 °C <i>days at 38 °C</i>	Antal etablerede planter af i alt skårne meristemer <i>no. of established plants of total meristem-tips</i>	Pct. etablerede meristem planter <i>per cent established meristem plants</i>
	agar	filterpapir
0	—	62/152
75	115/235*)	—
120	47/110	—

—: ikke udført  
not carried out

\*) Tæller: Antal etablerede planter  
*Numerator: Number of established plants*  
Nævner: Antal skårne meristemer  
*Denominator: Number of total meristem tips*

Tabel 3. Etablering af virusfrie chrysanthemumplanter ved varmebehandling og meristemkultur  
*Establishment of virus-free chrysanthemum plants by heat treatment and meristem-tip culture*

Døgn ved 38 °C <i>days at 38 °C</i>	Antal (pct.) virusfrie meristemplanter af i alt testede fra chrysanthemum oprindelig inficeret med <i>no. (per cent) of virus-free meristem plants of tested plants originally infected with</i>	TAV	CVB
0	25/40*) (63)	6/6 (100)	45/46 (98)
75	21/22 (95)	—	39/40 (98)
120	—	—	—

\*) Tæller: Antal virusfrie planter  
*Numerator: Number of virus-free plants*  
Nævner: Antal testede planter  
*Denominator: Number of tested plants*

### 3:3. Kontroltestning af det udleverede meristemmateriale

Chrysanthemumplanterne fra elitehuset blev testet til petunia, henholdsvis i januar 1972 og i marts 1973. Samtlige planter blev testet, idet der blev udtaget gruppeprøver, hver omfattende en klon. Virusinfektion blev ikke påvist i nogen af de testede prøver.

Samme materiale, men kun omfattende en

plantepr. sort, blev i august 1972 yderligere podet til tre følsomme chrysanthemum-indikatorer. Heller ikke her kunne der påvises virusinfektion i nogen af de testede sorter.

### 4. Diskussion

Inden for Statens Forsøgsvirksomhed i Plante-kultur (SFP) har man ved dette forsøg for første gang benyttet sig af den mulighed at rense virus-

inficeret plantemateriale fra sortsforsøg inden den officielle anerkendelse fandt sted.

Denne arbejdsgang, omfattende sortsforsøg, foreløbig anerkendelse, vurdering af sundhedstilstanden og etablering af sundt materiale inden den officielle anerkendelse, har ofte været diskuteret og betragtet som en ideel og realistisk metode til etablering af sunde kvalitetsplanter. Her er der således tale om planter, dels med kendte, værdifulde genetiske egenskaber og dels befriet for bestemte, generende sygdomme. Da muligheden for at gennemføre et sådant projekt var til stede ved sortsforsøget med frilandschrysanthemum uden al for stor forsinkelse, kunne man hurtigt blive enige om, at dette måtte forsøges.

De opnåede resultater viser, at det er en realistisk fremgangsmåde, der er valgt. Ved udnyttelse af de rigtige faciliteter og ved et bredt samarbejde såvel inden for SFP som mellem SFP og FSH er det lykkedes fra februar 1972 til foråret 1973 at kunne tilbyde stiklinger af 15 anerkendte, virusfrie chrysanthemumsorter til salg.

På grund af projektets karakter, er der ikke ofret for megen tid på diagnosticering af de påviste virusinfektioner, idet hovedformålet var at etablere virusfrit materiale.

Diagnosticeringen af TAV har været entydig og symptomerne overbevisende i flere indikatorplanter. Derimod kan der være tvivl om diagnosticeringen af CVB, idet andre vira også giver lignende lokale symptomer i petuniaplanter. Her kan der være tale om chrysanthemum-latent virose og Ch-nervemosaik-virus. Da førstnævnte virus kun er fundet i et enkelt tilfælde i England (*Hollings* 1957) og ikke beskrevet fra anden side, er der imidlertid ikke stor sandsynlighed for, at dette virus skulle være alm. udbredt her i landet. Angående nervemosaik-virus forårsager dette som regel ret kraftige bladsymptomer i de fleste chrysanthemumsorter, men kan optræde latent i andre sorter. Viruset er alm. udbredt i England (*Hollings* 1957). Efter alt at dømme er der dog størst sandsynlighed for, at der er tale om en CVB-infektion, idet dette virus er langt det mest udbredte i chrysanthemum (*Noordam* 1952, *Hollings* 1957, *Oertel* 1969).

## 5. Konklusion

Tomat-aspermi-virus (TAV) og chrysanthemum virus B (CVB) er blevet påvist hver i 7 sorter af i alt 15 anerkendte frilandschrysanthemum.

TAV og CVB er blevet elimineret i henholdsvis 74 og 98 pct. af de etablerede meristemplanter.

Varmebehandling forud for meristemkulturen har kun haft en positiv virkning med hensyn til eliminering af TAV.

136 virusfrie chrysanthemumplanter, fordelt over 15 sorter, er blevet udleveret som elitemateriale for et kommende fremavlsarbejde. Reinfektion af plantematerialet er ikke forekommet i op til et år efter udleveringen. Kontroltestninger har vist, at materialet foruden TAV og CVB var fri for følgende chrysanthemum-vira: D, E, dværgsyge, klorotisk spætning, Q, nervemosaik, mosaik og latent virose.

## 6. Summary

Virus infection has been demonstrated in 14 out of 15 outdoors chrysanthemum varieties approved in variety trial at the Glasshouse Crops Institute in 1968-70.

Based on symptoms and reactions in the indicator plants used, tomato aspermy virus (TAV) and chrysanthemum virus B (CVB) were found in each of 7 varieties.

TAV and CVB have been eliminated in 74 and 98 per cent respectively of the meristem-tip plants established.

Heat treatment prior to the meristem-tip culture only had a positive reaction regarding elimination of TAV.

136 virus-free chrysanthemum plants have within one year been delivered to The National Committee for the Propagation and Sanitary Inspection of Horticultural plants for further propagation under isolated conditions.

Control tests up to one year after delivering proved, that no re-infection had occurred in plants from the established nuclear house. Neither was the following chrysanthemum viruses found: Chlorotic mottle virus, virus D, virus E, latent virus, mosaic virus, virus Q, stunt virus and vein mottle virus.

## 7. Litteratur

- Hakkaart, F. A. and F. Quak* (1964). Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemums from virus B by means of meristem culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 70: 5: 154-157.
- Hollings, M.* (1957). Investigation of chrysanthemum viruses. II. virus B and Chrysanthemum latent virus. *Ann. appl. Biol.* 75: 589-602.
- Holmes, F. O.* (1956). Elimination of aspermy virus from the Nightingale Chrysanthemum. *Phytopathology* 46: 559-600.
- Kassanis, B.* (1954). Heat-therapy of virus infected plants. *Ann. appl. Biol.* 41: 3: 470-474.
- Kristensen, H. Rønde og A. Thomsen* (1958). Chrysanthemum-viroser. *Tidsskr. f. Planteavl* 62: 4: 627-669.
- Kristensen, H. Rønde og A. Thomsen* (1970). Varmebehandlings indflydelse på planter og plantevira. *Tidsskr. f. Planteavl* 74: 2: 264-280.
- Noordam, D.* (1952). Virusziekten bij chrysanten in Nederland. *Tijdschr. Plantenz.* 58: 121-189.
- Oertel, Claus* (1969). Untersuchungen über die wirtschaftlich wichtigsten Viruskrankheiten am Chrysanthemum indicum L in der DDR und die Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. *Nova Acta Leopoldina* 34, 189.
- Paludan, N.* (1971). Etablering af virusfrie meristemkulturer af havebrugsplanter. *Tidsskr. f. Planteavl* 75: 3: 387-410.

Manuskript modtaget 27. juni 1973.