

## **Indflydelsen af termo- og meristemterapi på nellikenervemosaik virus i meristemer bedømt ved elektronmikroskopi og symptomregistrering**

*Influence of thermo- and meristemtherapy on carnation vein mottle virus in meristem-tips determined by electronmicroscopy and by symptoms*

N. Paludan og J. Begtrup

### **Resumé**

Nærværende forsøg blev udført for at undersøge, hvorvidt man ved elektronmikroskopi kan bestemme virusets placering og koncentration i meristemer, for at undersøge varmebehandlings indflydelse på disse forhold, samt for at få kendskab til, om forlænget meristemkultur har samme inaktiverende virkning på et stavformet virus som på sfæriske vira.

Nellikenervemosaik virus (NNV) blev i enkelte tilfælde påvist ved EM-suspensionsmetoden i meristemer < 1 mm, mens viruspartikler ikke kunne iagttages i varmebehandlet materiale nærmere end 4 mm fra skudspidsen. Viruskoncentrationen, bedømt ved suspensionspræparater, steg med stigende afstand til skudspidsen.

Diagnostisk set var EM-suspensionsmetoden mindre følsom end symptomregistrering af fuldt udviklede planter, og metoden vil ikke kunne anvendes til endelig testning af varmebehandlet materiale, men derimod nok til en foreløbig sortering.

EM-snitteknik kunne ikke anvendes på grund af for lav viruskoncentration i plantevævet.

Bedømt på symptombasis blev NNV inaktiveret i 13 pct. af planterne etableret ved meristemkultur alene, mod 57 pct. ved en varmebehandling forud for meristemkulturen.

Forlænget meristemkultur i op til 60 døgn ved 22°C har ikke haft nogen inaktiverende virkning på NNV.

NNV-infektionsprocenten har været lavere i topskudmeristemer end i sideskudmeristemer.

### **Summary**

The purpose of these experiments primarily was to investigate, how efficient electronmicroscopic methods would be in demonstrating the presence and the concentration of virus in infected meristematic tissue, and secondly to investigate the effect of heat treatment. Finally we also wanted to see the inactivating effect of cultured meristem-tips on rotshaped viruses, as previous found for spherical viruses.

Using *Dianthus barbatus* as host plant, the heat treatment was carried out at 37°C, ± 1°C with 5.500 lux illumination. 1 mm meristem-tips, consisting of the meristematic dome and two or more leaf primordia, were grown at M.S. 1962 nutrient solution added 170 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mg Adenine and 1 mg Gibberellic acid, the meristem-tips being cultured at 22°C. The plant material was either tested using EM-suspension leaf dip method or evaluated by recording of virus symptoms. The EM-sectioning preparation method used as described by Esau (1970).

To improve the infiltration in the sieve tubes area, vacuum was used both at fixation and at the infiltration (*Begtrup 1972*). The embedding material used was *Spurr (1969)*.

The presence of carnation vein mottle virus (CVMV) was demonstrated by the EM-suspension method in meristem-tips less than 1 mm in very few cases. At the other hand virus particles were not demonstrated in heat treated meristem-tips shorter than 4 mm. The virus concentration did increase with increasing distance from the tip of the shoot. As a diagnostic method the EM-suspension method was not sufficiently reliable, being much less sensitive than registration of symptoms in mature plants.

EM-sectioning was not accomplished because of the very low virus concentration in the tissue.

Based on symptoms CVMV was inactivated in 13 per cent of the established meristem plants, but heat treatment at 37°C for 60 days prior to the cutting of meristem improved this figure to 57 per cent.

There was no inactivating effect on CVMV by culturing meristem-tips 60 days at 22°C.

The CVMV infection per cent in top shoot meristems was found to be lower than in meristems taken from the lateral shoots.

### Indledning

Elektronmikroskopiske (EM) undersøgelser af virusinficerede planter er igennem de senere år blevet anvendt i stigende omfang, dels som suspensionspræparater af udpresset plantesaft, dels som snitpræparater af plantevæv. Ved virologisk afdeling på Statens plantepatologiske Forsøg har man igennem længere tid gjort brug af suspensionspræparater. Disse har vist sig overordentlig velegnede til adskillige virologiske undersøgelser, herunder påvisning af viruspartiklers form og størrelse.

Nærværende forsøg udførtes i årene 1971-73, først og fremmest for at undersøge EM-suspensionspræparaters mulige anvendelse som diagnosemetode ved etablering af virusfrie planter. Etablering af virusfrie planter er forsøgt med en kombination af varmebehandling, meristemkultur og forlænget meristemkultur.

Forsøgene har også omfattet anvendelsen af EM-snitpræparater for at undersøge, dels i hvilken form og i hvilket plantevæv virus optræder, dels om præparaterne kunne anvendes i diagnostisk øjemed. EM-snitpræparaterne stammede fra skudspidser fra NNV-inficerede, varmebehandlede planter, hvor viruspartikler ikke kunne iagttages i suspensionspræparater.

Forsøgene er blevet udført med nellikenervemosaik virus, der har stavformede partikler (fig. 2). Begrundelsen for dette har været, dels

af rent teknisk karakter, fordi stavformede viruspartikler var sikrere at registrere end sfæriske med et ældre elektronmikroskop, der var til rådighed, dels at lovende engelske forsøg med forlænget meristemkultur udelukkende omfattede sfæriske vira.

### Tidligere forsøg

Nellikernervemosaik virus (NNV) har flexible, stavformede partikler i størrelsen  $790 \times 12$  nm og hører til kartoffel virus Y gruppen (*Hollings og Stone 1971*). Karakteristisk for denne gruppe sygdomme er, dels at de overføres med saft og bladlus, og dels at de enkelte vira har et særligt tilhørsforhold til bladenes assimilationsvæv. Systemisk virusinfektion omfatter ikke selve meristemet (*Hansen 1970*). Nellikenervemosaik virus er efter *Hollings og Stone (1971)* til stede i svag koncentration i alle dele af planten inkluderet noget af det meristematiske væv.

Varmebehandlingens inaktiverende egenskaber på virus har længe været kendt og anvendt (*Kristensen & Thomsen 1958, Brierly 1964, Paludan 1964, 1965, Hakkaart & Jordanova 1968*). Skæring af meristemer, ofte i forbindelse med en forudgående varmebehandling, har ligeledes været anvendt i en årrække for at fremskaffe virusfrie planter. Udførte forsøg viser således, at der ved meristemkultur af

*Dianthus barbatus*, inficeret med nellikenerve-mosaik virus, var 36 pct. af de overlevende planter, der var blevet befriet for viruset (Holling & Stone 1964, 1967, Paludan 1970, 1971). Som den nyeste udvikling har kultur af meristemer i præparatglas (forlænget meristemkultur) vist sig at åbne nye muligheder for etablering af sunde planter. Metoden har særlig været anvendt ved sfæriske vira, hvor virus kan påvises i selve meristemet. Kirsebærbladruille virus blev således elimineret i stigende grad med behandlingsperioden stigende fra 16 til 105 døgn ved 22°C (Walkey & Woolfitt 1968, Walkey & Cooper 1972).

I forbindelse med NNV fandt Weintraub & Ragetli (1970) virusagtige partikler i cytoplasmaet i nær kontakt med membransystemerne i cellen, navnlig i de cytoplasmatiske strenge tværs over centralvakuolen.

#### Metodik

Kortlægning af virusets placering i en skudspids er udført ved hjælp af EM-suspensionsmetoden (Begtrup 1971). Indlejringsmetoden har været som angivet af Esau (1970) med vacuumindlejring (Begtrup 1972) og indlejring i Spurr Resin (Spurr 1969). Skudspidserne blev opdelt i følgende størrelser: Under 1/2 mm, 1/2–3 mm, 3–5 mm, 5–7 mm, 7–10 mm og over 10 mm. Materialet blev inddelt i virusinficeret ikke varmebehandlet, varmebehandlet i 30 og i 60 dage samt sundt kontrolmateriale til alle behandlinger. Materialet er snittet på LKB-ultramikrotom og undersøgt på et Philips 100 B elektronmikroskop. De elektronmikroskopiske billeder er taget ved en primær forstørrelse af 1200 eller 8200 X på Kodak fine grain safety positive film og fotografisk forstørret efter behov.

*Dianthus barbatus* L. er blevet anvendt som værtplante, idet den er nem at opformere og er en sikker indikatorplante for det anvendte nellikenerve-mosaik virus (Hollings & Stone 1971). Viruset blev overført ved saftinokulation

til forsøgsplanterne, i hvilke der efter 14 døgn forløb udvikledes en karakteristisk nerve-lysning i hjertebladene (fig. 3).

Varmebehandling af planterne blev udført ved 37°C i termostatregulerede varmerum  $\pm$  1°C med en belysning på 5.500 lux. Enkelt-heder vedrørende indretning af termostatrume-nerne samt den anvendte arbejdsmetode er nærmere beskrevet af Kristensen & Thomsen 1970.

Meristemkultur blev udført efter retningslinier beskrevet af Paludan (1971), hvor Mura-shige & Skoogs 1962 medium blev anvendt som basismedium modificeret ved tilsætning af 170 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mg adeninsulfat og 1 mg gibberellinsyre pr. liter. Meristemerne blev skåret i en størrelse på ca. 1 mm og omfattede selve meristemet samt to eller flere bladanlæg.

Forlænget meristemkultur blev gennemført i 15, 30 og 60 døgn ved 22°C efter retningslinier beskrevet af Walkey Woolfitt (1968).

Forsøgsmaterialet, omfattende de skårne meristemer og meristemplanter, blev dels testet ved anvendelse af elektronmikroskopisk suspensionsteknik, dels vurderet visuelt på symptom-basis.

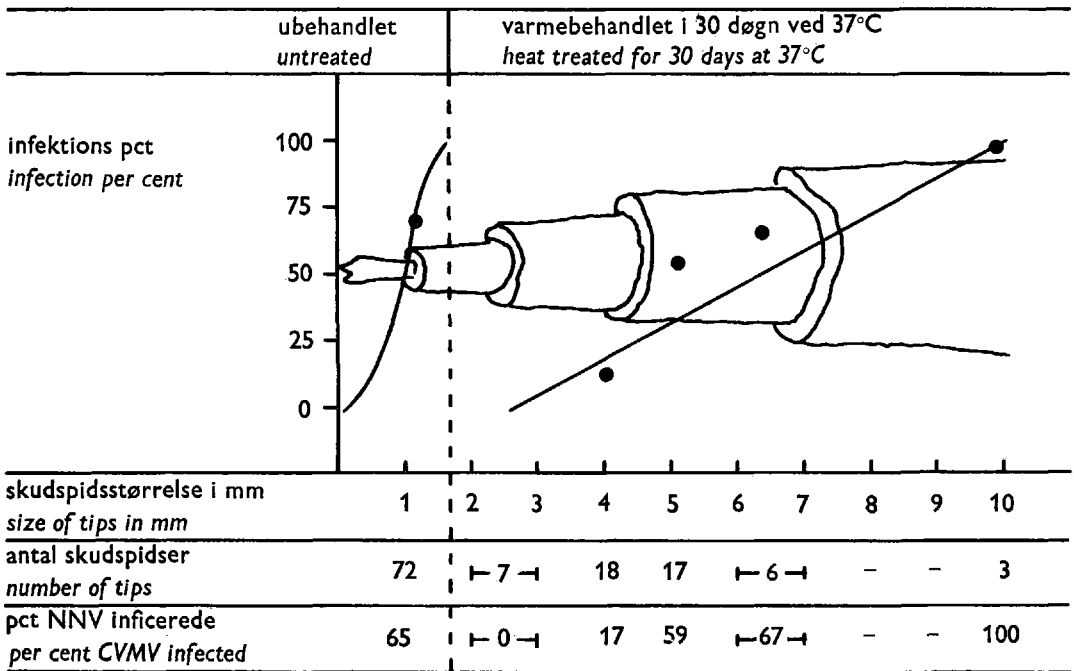
#### Resultater

##### *Indflydelsen af varmebehandling på NNV's placering og koncentration bedømt ved EM-suspensionsteknik*

For at få kendskab til, hvor i de inficerede meristemer og skudspidser viruspartiklerne kunne iagttages, blev der udført orienterende EM-undersøgelser (suspensionspræparater) med henholdsvis ubehandlet og varmebehandlet plantemateriale inficeret med NNV.

Viruspartikler kunne påvises indtil mindre end 1 mm fra meristemets toppunkt i ubehandlet materiale, medens tilsvarende afstand var ca. 4 mm i varmebehandlet materiale. Videre nedefter steg viruskoncentrationen med afstanden fra skudspidsen. Resultaterne fremgår af fremgår af figur 1.

Figur 1. Placering af nellikenervmosaik virus i skudspids af ubehandlet og varmebehandlet *Dianthus barbatus*.  
*The localization of carnation vein mottle virus in heat treated tips of Dianthus barbatus compared to untreated material.*



Indflydelsen af varmebehandling og meristemkultur på NNV-infektionsprocenten bedømt ved EM-suspensionsteknik og symptomregistrering

Varmebehandlings indflydelse på inaktivering af NNV i forbindelse med meristemkultur og på EM-suspensionsmetodens anvendelighed ved diagnosticering blev nærmere undersøgt. NNV-inficerede *Dianthus barbatus* blev først

varmebehandlet ved 37°C i henholdsvis 30 og 60 døgn. Meristemer blev skåret i en størrelse fra 0,8 mm til 1 mm omfattende selve meristemmet samt to eller flere bladanlæg. Forsøgs materialet blev herefter bedømt, dels ved anvendelse af EM-suspensionspræparater af de skårne meristemer, dels ved symptomregistrering af de tiltrukne meristemplanter. Resultaterne fremgår af tabel 1.

Tabel 1. Varmebehandlings indflydelse på inaktivering af nellikenervmosaik virus i *Dianthus barbatus* i forbindelse med meristemkultur.

*Inactivation of carnation vein mottle virus in Dianthus barbatus by means of heat treatment and meristem-tip culture.*

Døgn ved 37°C Days at 37°C	Antal meristemer Number of meristem-tips	NNV-infektionsprocent Per cent CVMV-infected
EM-suspensionsmetoden Diagnosed by EM suspension method		
0	72	65
30	25	0
Symptombasis Diagnosed by virus symptoms		
0	15	87
30	35	86
60	30	43

Gennemsnitstal fra 1971 og 1972. Average from 1971 and 1972.

Tabel 2. Indflydelse af forlænget meristemkultur på inaktivering af nellikenervemosaik virus i *Dianthus barbatus*.

*Inactivation of carnation vein mottle virus in Dianthus barbatus by means of cultured meristem-tips.*

Forlænget meristemkultur i døgn ved 22°C <i>Cultured meristem-tips in days at 22°C</i>	Antal meristemer <i>Number of meristem-tips</i>	NNV-infektionsprocent <i>Per cent CVMV-infected</i>
<i>EM-suspensionsmetoden</i>		
<i>Diagnosed by EM-suspension method</i>		
0	25	64
15	25	56
30	22	77
<i>Symptombasis</i>		
<i>Diagnosed by virus symptoms</i>		
60	15	87

Sammenlignes EM-suspensionsmetoden med symptomregistrering ser vi, at infektionsprocenten i ubehandlet materiale er henholdsvis 65 og 87, mens de tilsvarende procenter fra 30 døgn varmebehandlet materiale er 0 og 86.

Bedømt på symptombasis har 30 døgn varmebehandling ikke haft nogen indflydelse på infektionsprocenten. Derimod er denne blevet halveret efter 60 døgn varmebehandling.

*Indflydelsen af forlænget meristemkultur på NNV-infektionsprocenten bedømt ved EM-suspensionsteknik og symptomregistrering*

Meristemer i størrelsen ca. 0,8 til 1 mm blev skåret fra NNV-inficerede planter og placeret ved 22° C i 0, 15, 30 og 60 døgn som forlænget meristemkultur.

Meristemerne blev herefter undersøgt for indhold af viruspartikler ved anvendelse af EM-suspensionspræparater. Sidstnævnte hold meristemer blev dog vurderet på symptombasis efter potning og tilvækst. De opnåede resultater

fremgår af tabel 2.

Forlænget meristemkultur i op til 60 døgn har tilsyneladende ikke haft nogen sikker indflydelse på NNV-infektionsprocenten. Resultaterne efter 60 døgn bedømt på symptombasis kan imidlertid ikke sammenlignes med dem vurderet ved EM-suspensionsmetoden, idet denne er mindre følsom ifølge tabel 1 (infektionsprocenten vurderet ved EM-suspensionsmetoden og ved symptomregistrering er henholdsvis 65 og 87).

*NNV-infektionsprocenten i top- og sidemeristemer bedømt ved EM-suspensionsteknik*

Meristemerne blev skåret i størrelsen 0,75 til 1 mm fra topskud (topmeristem) og fra blad-hjørnernes sideskud (sidemeristem). Af sidstnævnte findes ofte op til flere meget tæt under topmeristemmet, idet internodierne er meget korte. Meristemoprindelsens indflydelse på infektionsprocenten fremgår af tabel 3.

Tabel 3. Meristemoprindelsens indflydelse på inaktivering af nellikenervemosaik virus i *Dianthus barbatus*.

*Inactivation of carnation vein mottle virus as related to the original position of the meristem-tips.*

Meristem-materiale <i>Meristem-tip origin</i>	Antal meristemer <i>Number of meristem-tips</i>	NNV-infektionsprocent <i>Per cent CVMV-infected</i>
topmeristemer <i>apical meristems</i>	40	50
sidemeristemer <i>lateral meristems</i>	72	78

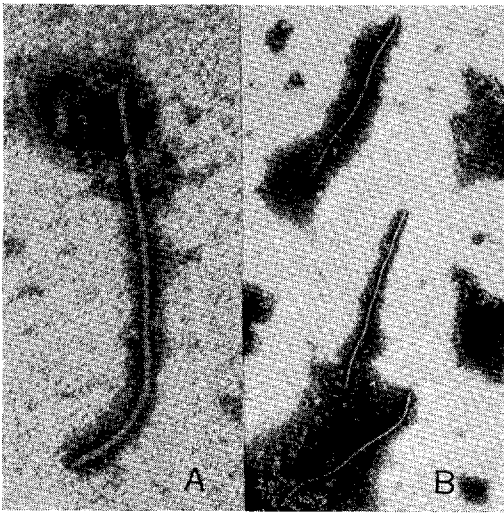


Fig. 2

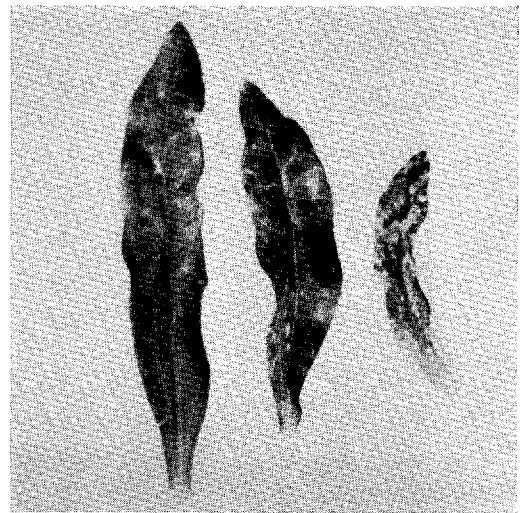


Fig. 3

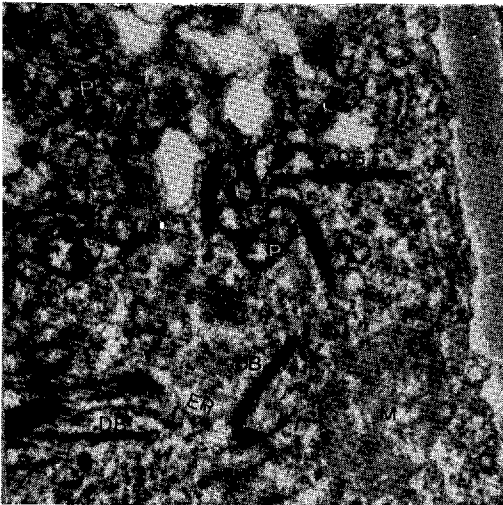


Fig. 4

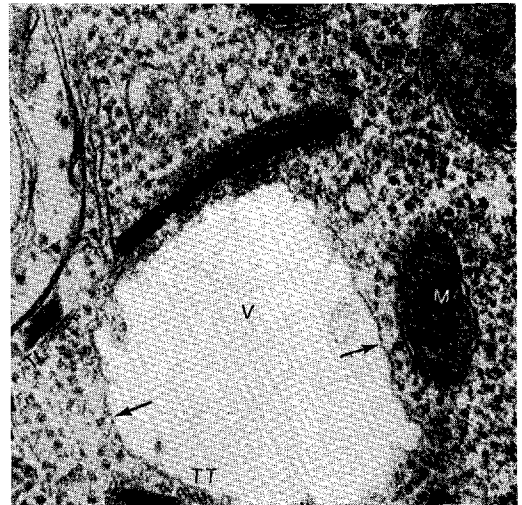


Fig. 5

Fig. 2. Stavformede, fleksible viruspartikler af NNV, negativ farvet med fosforwolframsyre (PTA). A  $\times 70.000$ , B  $\times 35.000$ .

Rodshaped, flexible virusparticles of CVMV negative stained with PTA. A  $\times 70.000$ , B  $\times 35.000$ .

Fig. 3. *Dianthus barbatus* inficeret med nellikeneremosaik virus (NNV).

*Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus (CVMV).

Fig. 4. Snit gennem parenchymatisk sivæv med »Pinwheel« formationer (P), cellevæg (CW), mitochondria (M), »dense bands« (DB) og endoplasmatisk retikulum (ER).  $\times 35.000$ .

Section of parenchymatic sieve elements with »Pinwheel« formation (P) and dense bands (DB), cell wall (CW), mitochondria (M) and endoplasmatic reticulum (ER).  $\times 35.000$ .

Fig. 5. »Dense bands« laminerede aggregater med tubulære filamenter i længdesnit (TL) og i tværsnit (TT), vakuole (V), tonoplast (pile), mitochondria (M). De mørke pletter i cytoplasmaet er ribosomer.  $\times 63.700$ .

Dense bands laminated aggregates with tubular filaments in longitudinal cut (TL) and crosscut (TT), vacuol (V), tonoplast (arrows) and mitochondria (M).  $\times 63.700$ .

Foto: J. Begtrup.

## Orienterende undersøgelser over virusets placering og diagnosemuligheder bedømt ved anvendelse af EM-snitteknik

I NNV-inficerede blade af *Dianthus barbatus* er der i overensstemmelse med *Weintraub & Ragetli* (1970) fundet såkaldte »Pinwheel« inklusioner (fig. 4) og lange laminerede aggregater (fig. 5). Tilstedeværelsen af disse legemer i plantevævet er karakteristisk ved infektion med stavformede vira tilhørende kartoffel virus Y-gruppen. Inklusionerne er alle fundet i parenchymatisk væv i sikarregionerne.

Indtrængning af indlejringsmaterialet i skudspidserne og fixeringen af disse har været dårlig på grund af de stærkt cellulose- og ligninholdige cellevægge. Der er derfor gennemført en række forsøg med indlejring under vakuum såvel under fixering som ved indtrængning af indlejringsmaterialet. Ved at anvende et vakuum på 150 mm Hg i 2×1 time under fixeringen og i 2 min. under selve indtrængningen i indstøbningskapslerne, har det været muligt at konstatere tilstedeværelsen af nellikenervemosaik virus i skudspidserne.

Ved undersøgelse af flere hundrede indlejringer i de områder, hvor man måtte forvente at finde aktivitet i forbindelse med virusdannelsen i meristemafsnittet (0–5 mm), er det kun lykkedes at finde NNV-viruspartikler og pinwheel-dannelser i området 3–5 mm. Der er fundet en del cytoplasmatiske forekomster (»skyer«) i områderne fra 3 mm og længere ned i skudspidserne.

### Diskussion

Adskillige sfæriske vira er i de senere år blevet påvist i det meristematiske væv, der normalt anvendes ved meristemkultur, omfattende selve meristemet og et eller flere bladanlæg (*Hollings & Stone* 1964, *Walkey & Woolfitt* 1968, *Walkey & Cooper* 1972).

Nellikenervemosaik virus (NNV) har, ved de udførte forsøg, ligeledes vist sig at være til stede i det meristematiske væv. De stavformede viruspartikler er blevet iagttaget ved EM-suspensionsmetoden og tilstedeværelsen bekræftedes ved registrering af virussympotomer i udviklede planter. Disse resultater er i overensstemmelse med *Hollings & Stone* (1971).

EM-suspensionspræparater har diagnostisk set ikke været så sikker en metode til testning af det meristematiske væv som symptomregistrering af udviklede planter.

Ved testning af varmebehandlet, NNV-inficeret materiale har suspensionsmetoden slet ikke kunnet anvendes, idet viruspartikler ikke har kunnet iagttages inden for en afstand af 4 mm fra skudspidsen.

De oprindelige mål, at søge klarlagt, hvorledes viruset i NNV-inficeret plantemateriale (*Dianthus barbatus*) er placeret og koncentreret, er blevet gennemført med suspensionsteknik (ref. fig. 1).

Inaktiveringsforsøgene, omfattende meristemkultur med og uden forudgående varmebehandling, har givet resultater, der falder sammen med tidligere forsøg (*Stone & Hollings* 1969, *Paludan* 1971). Procenten af virusfrie planter er imidlertid en del lavere ved de udførte forsøg, men dette må sikkert tilskrives de relativt store meristemer på omkring 0,8 til 1 mm, der har været anvendt.

Forsøget viser tydeligt, at man ved en forudgående varmebehandling før meristemkulturen kan tillade sig at skære store meristemer og alligevel opnå en høj procent af virusfrie planter.

Der er ikke opnået et positivt resultat ved den udførte forlængede meristemkultur på op til 60 døgn ved 22°C. Årsagen hertil må sikkert findes i både en for lav behandlingstemperatur og en for kort behandlingstid.

For *Dianthus barbatus* meristemer går der normalt ca. 40 døgn fra skæring til potning, svarende til 40 døgn forlænget meristemkultur.

EM-snitteknik har ikke været anvendelig i diagnostisk øjemed, formodentlig på grund af den meget lave viruskoncentration i skudspidserne. De iagttagne »skyer« er svære at bedømme, og der kan på nuværende tidspunkt ikke føres bevis for, at »skyerne« har noget med virusaktiviteten at gøre. Dette ville i øvrigt være i modstrid med tidligere undersøgelser (*Crowley et al* 1969, *Frost & Harrison* 1967 m.fl.).

## Konklusion

Viruspartikler af nellikenervemosaik virus har kunnet påvises i *Dianthus barbatus* ved EM-suspensionsmetoden i meristemer under 1 mm's størrelse.

I tilsvarende, varmebehandlet materiale har viruspartikler først kunnet påvises i 4 mm's afstand fra skudspidsen.

EM-suspensionsmetoden har diagnostisk set været mindre følsom ved testning af meristemer end symptomregistrering af tilsvarende udviklede planter.

EM-suspensionsmetoden kan ikke anvendes til endelig diagnose og kontrol af varmebehandlet meristemmateriale.

Bedømt på symptombasis er følgende resultater opnået:

Meristemkultur har elimineret nellikenervemosaik virus i 13 pct. af de etablerede planter.

Varmebehandling i 60 døgn efterfulgt af meristemkultur har elimineret NNV i 57 pct. af de etablerede planter, mens 30 døgn var indifferent.

Forlænget meristemkultur fra 0 til 60 døgn ved 22°C efter meristemskæring har ikke øget den inaktiverende virkning på nellikenervemosaik virus.

NNV-infektionsprocenten har været lavere i topskudmeristemer end i sideskudmeristemer.

De oprindelige planlagte forsøg med anvendelse af EM-snitpræparater til undersøgelse af, i hvilken form og i hvilket væv viruset optræder, har ikke kunnet gennemføres på grund af for lav viruskoncentration i plantevævet.

## ERKENDTLIGHED

Vi vil gerne rette en tak for gennemlæsning af manuskriptet til afdelingsforstander *A. Birck Andersen*, Statens Seruminstitut, Amager, og for teknisk hjælp til fr. *Karin Munch-Lassen*, fr. *Bente Skeel-Christensen* og fr. *Hanne Frank*, alle Statens plantepatologiske Forsøg, Lyngby.

## Litteratur

*Begtrup, J.* (1971): Elektronmikroskopiske undersøgelser af plantevira. Tidsskr. f. Planteavl 75, 563-76.

*Begtrup, J.* (1972): Forbedret ultrasektionering af sikarområder i orkideer med vakuumfiltrering. Tidsskr. f. Planteavl 76, 588-96.

*Brierly, P.* (1964): Heat cure of carnation viruses. Plant Dis. Rep. 48, 143.

*Crowley, N. C.* et al (1969): Infection of bean root-meristems by tobacco ringspot virus. Virology 39, 322-30.

*Esau, K. & R. H. Gill* (1970): Observations on spiny vesicles and P-protein in *Nic. tabaccum*. Protoplasma 69: 373-88.

*Frost, R. R. & B. D. Harrison* (1967): Comparative effects of temperature on the multiplication in tobacco leaves of two tobacco rattle viruses. J. gen. Virol. 1, 455-64.

*Hakkaart, F. A. & J. Jordanova* (1968): Heat treatment experiments with carnations for the elimination of carnation mottle and etched ring virus. Neth. J. Pl. Path. 74, 146-49.

*Hansen, H. P.* (1970): The systematic plant virology. DSR forlag, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København, 25-27.

*Hollings, M. & O. M. Stone* (1964): Investigation of carnation viruses. Ann. appl. Biol. 53, 103-18.

*Hollings, M. & O. M. Stone* (1967): Heat-treatment, meristem-tip culture and the production of virus-tested carnation and chrysanthemum. Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report, 106-7.

*Hollings, M. & O. M. Stone* (1971): Carnation vein mottle virus. Descriptions of plant viruses 4, 78, Commonw. Mycol. Inst. and Assoc. of App. Biol.

*Kristensen, H. Rønne & A. Thomsen* (1958): Chrysanthemum-viroser. Tidsskr. f. Planteavl 62, 627-69.

*Kristensen, H. Rønne & A. Thomsen* (1970): Varmebehandlingens indflydelse på planter og plantevira. Tidsskr. f. Planteavl 74, 264-80.

*Paludan, N.* (1964): Inaktiveringsforsøg med virusinficeret nellikemateriale, Statens plantepatologiske Forsøg, Månedsoversigt 142, 83-88.

*Paludan, N.* (1965): Inaktiveringsforsøg med nellike spætning virus. Statens plantepatologiske Forsøg, Månedsoversigt 418, 65-68.

*Paludan, N.* (1970): Nellike ætsning virus, kortlægning, infektionsforsøg, termoterapi og meristemkultur. Tidsskr. f. Planteavl 74, 75-86.

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

*Ross, A. F. & H. W. Israel* (1970): Use of heat treatments in study of acquired resistance of



- tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology* 60, 753-70.
- Spurr, A. R.* (1969): A low viscosity Epoxy Resin embedding medium for Electron microscopy. *J. ultrastruct. Res.* 26, 31-43.
- Stone, O. M. & M. Hollings* (1965): Meristem-tip culture and the production of virus-free clones. *Glasshouse Crops Res. Inst. Annual Report* 1964: 95.
- Walkey, D. G. A. & M. G. Woolfitt* (1968): Virus elimination by apical tip culture. *Nat. Veg. Res. Sta., Annual Report*: 90-91.
- Walkey, D. G. A. & M. J. W. Webb* (1968): Virus in plant apical meristems. *J. gen. Virol.* 3, 311-13.
- Walkey, D. G. A. & V. C. Cooper* (1972): Some factors affecting the behaviour of plant viruses in tissue culture. *Physiol. Pl. Path.* 2, 259-64.
- Weintraub, M. & H. W. J. Ragetli* (1970): Distribution of virus like particles in leaf cells of *Dianthus barbatus*, infected with Carnation vein mottle virus. *Virology*: 40, 868-81.

Manuskript modtaget den 23. maj 1974