

Statens plantepatologiske Forsøg (H. Ingv. Petersen)

Virologisk afdeling (H. Rønde Kristensen)

Metodik ved elektronmikroskopiske undersøgelser af plantevira

Elektronmicroscopic examination of plant viruses

Jens Begtrup

Nogle fysikere, *Broglie*, *Davidson-Gerner* og *Busch*, grundlagde i 20'erne teorierne om at elektronstrålers udbredelse i vacuum kunne beskrives som ultrakorte elektromagnetiske svingninger. De fandt ud af, at passende udformede magnetfelter kunne bruges som linsesystemer, der kunne frembringe billeder ved hjælp af elektronstråler. Disse opdagelser blev begyndelsen til og grundlaget for de nye »Supermikroskoper«, som kom frem i løbet af 30'erne. De to tyske forskere *Knoll* og *Ruska*, var de første som frembragte brugbare billeder efter disse teorier. De første kommercielle elektronmikroskoper nåede frem på markedet i 1939, men 2. verdenskrig satte imidlertid en brat afslutning for denne spændende udvikling.

Man forsøgte sig med elektrostatiske og elektromagnetiske elektronmikroskoper, ja endog en sammenbygning af de to systemer. Forskellen på de to typer er, at de elektrostatiske mikroskoper anvender kondensatorer, det elektromagnetiske elektronmagneter til at afbøje elektronstrålen på dens vej gennem mikroskopsøjlen. Idag er praktisk talt alle elektronmikroskoper opbygget som elektromagnetiske mikroskoper. Rigtig gang i den europæiske produktion af elektronmikroskoper efter krigen kom der først i Holland i 1947, hvor en fysiker fra Delf, *Le Pool* indledte et samarbejde med Philips fabrikerne. Hans arbejde bevirkede, at man kunne anvende kontinuerlige forstørrelser, hvor man tidligere måtte udskifte polsko manuelt for at ændre forstørrelserne. Resultatet af dette arbejde blev Philips model 100, der be-

gyndte at finde frem til laboratorier rundt omkring i hele verden. Det kan som et kuriosum nævnes, at den første model EM 100 blev leveret til Statens Seruminstitut i København i 1949. Det elektronmikroskop som forsøgsvirksomheden anvender, er en forbedret model af dette Philips EM 100 med betegnelsen B (for ombygning, indsat mellemlinsesystem).

Den væsentlige forskel på elektronmikroskoper og almindelige lysmikroskoper er elektronmikroskopernes meget store opløsningsevne, som er betinget af elektronstrålers meget korte bølgelængde. Et lysmikroskop har en opløsningsevne på ca. 2000 Å, medens forsøgsvirksomhedens elektronmikroskop har en opløsningsevne på 15-20 Å. Dette muliggør praktiske anvendelige forstørrelser på 100.000-200.000 gange, mod lysmikroskopets 1-2000 gange. Opfindelsen og anvendelsen af elektronmikroskoperne har på mange områder revolutioneret bl.a. den virologiske forskning, der ved hjælp af dette apparatur har opnået endog meget væsentlige fremskridt.

Det er imidlertid nødvendigt at fremhæve, at også dette apparatur har sin begrænsning, at forkert brug, forkerte præparationsmetoder, fejlagtige tydinge af resultaterne o.m.a. kan føre til forkerte slutninger. Det er derfor nødvendigt at støtte sig til oplysninger fremkommet ad andre veje. Serologi og aflæsning af symptomer på testplanter er indenfor det virologiske område stadig de grundlæggende discipliner. De er med elektronmikroskopet blevet forøget med endnu en, som i samarbejde med de andre kan

give mere sikre resultater. En isoleret elektronmikroskopisk oplysning må derfor altid tages med forbehold.

På Statens plantepatologiske Forsøg i Lyngby blev forsøgsvirksomhedens elektronmikroskop opstillet i 1966, og især virologerne har i de forløbne år gjort brug heraf, hvilket er rimeligt, idet elektronmikroskopet på mange måder er særdeles velegnet til virologiske undersøgelser. Uanset årstiden har der altid været rigeligt virologisk materiale til rådighed, og opgaverne har været så forskellige, at de mest anvendte præparationsmetoder har kunnet indlæres og afprøves. Det har drejet sig om metoder indenfor suspensionspræparationsteknikken og indenfor snitpræparatteknikken.

Suspensionspræparaterne fremstilles af:

- a) renfremstillet virus, som i fortyndingsrækker danner udgangsmateriale for præparaterne.
- b) hurtigpræparaterne fremstilles af råsaften fra virusinficerede planter.

Der har især været arbejdet med hurtigpræparater i de første år med den motivering, at elektronmikroskopet på denne måde ville få den største praktiske anvendelse indenfor forsøgsvirksomhedens arbejdsområde. Dette har givet erfaringer med præparatfremstilling, som sammen med de øvrige metoder nu begynder at stå til rådighed for en større kreds indenfor forsøgsvirksomheden. I det sidste årstid, er vi begyndt at indarbejde snitteteknikken, således at denne præparationsmetode også kan stå til rådighed for vort elektronmikroskopiske arbejde.

Den teknik, som her omtales, og de illustrationer som bringes, er nogle eksempler på opgaver løst ved hjælp af elektronmikroskopet. Denne beretning tager sigte på at vise de muligheder, som elektronmikroskopisk teknik har indenfor plantevirologien, og illustrationerne omhandler kun dette område.

Metoder og materialer

Skemaet viser de 2 hovedgrupper suspensionsmetoder og vævspræparationsmetoder, som præparationsteknikken indenfor plantevirologien

kan inddeles i. Suspensionspræparaterne (opslemninger) er forholdsvis hurtige at arbejde med. Snitteknikken er betydelig mere tidskrævende, og kan strække sig over 1-2 uger (dehydrering, indlejring, polymerisering, snitning m.m.), medens hurtigpræparaterne for eksempel, hvis man er heldig, giver svar efter 5-10 min.

Suspensionspræparaterne:

- a) *præparater af renfremstillet materiale.*
- b) *hurtigpræparater fremstillet direkte af råsaft.*

a) *efter renfremstillingerne* foreligger udgangsmaterialet oftest i et centrifugeglas som en bundklat, klar eller farvet alt efter renhedsgraden. Da elektronmikroskopet forstørrer alle dele i præparatet op i samme størrelsesorden, ønskede såvel som uønskede partikler, er renhed et elementært problem, som løses ved gennemført brug af de rene analysekemikalier, glasdestilleret vand, specielle rengøringsmetoder af glasvarer m.m.

Biologisk materiale, i dette tilfælde virus, har ikke i sig selv kontrast nok til direkte at kunne fremtræde på en fotografisk optagelse. Det er derfor nødvendigt, at kontrastforstærke præparaterne. Efter en passende fortyndingsrække af udgangsmaterialet, fordeles materialet på en grid (præparatnet). En grid er et elektrolytisk fremstillet lille kobbernet med en diameter på 0,3 cm inddelt i ca. 400 kvadrater. Denne grid overtrækkes med en ultratynd hinde af plastik (formvar). Denne hinde forstærkes for nogle præparaters vedkommende med en kulhinde for at stabilisere præparatet. Fordelingen af materialet på denne grid kan for alle suspensionspræparaters vedkommende ske enten ved drop, spray eller loop metoden. Ved dropmetoden sker fordelingen med en dråbe direkte på en grid. Ved spray-metoden ved hjælp af en forstøver i form af mikrodråber på bærehinden. Med loop-metoden med et platinøje i en podenål. Der kan kontrastforstærkes efter 2 principielt forskellige retningslinier. Skygning anvendes ved undersøgelser af overfladestruktur

VIRUSINFICERET PLANTEMATERIALE

SUSPENSIONER

SNIT

RÛNFREMSTILLINGER

HURTIGPRÆPARATER

VÆVSBLOK

FIXERING

GLUTARALDEHYD

OSMIUM

DEHYDRERING

INDLEJRING

POLYMERISERING

SNITNING

GRADIENT-CENTRIFUGERING
GELDIFFUSION
ULTRA-CENTRIFUGERING

DROP - SPRAY - LOOP

CUT SQUEEZE - EPIDERMIS STRIP

OVERSICHTSSKIVER

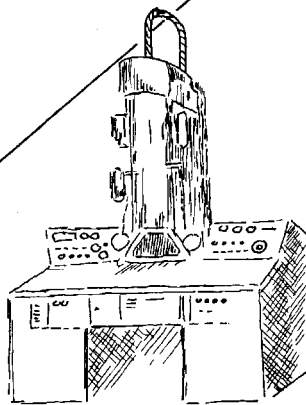
SKYGNING

FARVNING

P_t
P_f
C
C_r
A_u
U

PTA
STA
AM
VM
UF
UA
MUA
P_b

TYNDSNIT



elektronmikroskop

lysmikroskop

FOTOGRAFISK OPTAGELSE (forstørrelse 1)
FREMKADELSE
UDVÆLGELSE

forstørrelse ca. 2000 x
opløsning optimalt ca. 2000 Å
tydning

MØRKEKAMMER (forstørrelse 2) — forstørrelse 1+2= totalforstørrelse —



forstørrelse (EM100B) ca 40000
opløsning optimalt ca 3-6 Å
(EM 100 B ca 15-20 Å)

tydning

rer og er velegnet til opmåling af partikel-længder. Skygning udføres i et skyggeapparat under højvacuum med kul og/eller ædle metaller (guld, platin, uranium, cronium m.fl.) (fig. 3, 4 og 5). Farvning kan anvendes ved almindeligt diagnostisk arbejde, hvor det drejer sig om partiklernes form og antal. Man benytter fortrinsvis tunge metalsalte i opløsninger og tilstræber en ensartet fordeling af farvematerialet. Denne er afhængig af indholdet af proteiner i den undersøgte opløsning. Proteinindholdet kan forøges, hvis det er for ringe, med f.eks. oksealbumin el. lignende. Både negativ og positiv farvning kan anvendes, negativ farvning er dog den mest benyttede. Andre faktorer, som øver indflydelse på de færdige præparater, er fysiske kræfter, overfladespændinger under indtørring, surhedsgrad m.v.

Mest anvendt til negativ farvning er fosforwolframsyrer (P.T.A. = phosphor tungstic acid). Mere skånsom er ammonium molybdat (A.M.). Rutineundersøgelser bør derfor starte med A.M.-præparater, da delikate vira kan »udeblive« helt ved anvendelse af »stærkere« farvestoffer på grund af sprængning eller opløsning. Her i laboratoriet anvendes vanadatomolybdat (V.M.) (fig. 14) på linie med A.M.-farvning. Vanadatomolybdate (*Callahan* og *Horne*) fremstilles ved at blande 1 pct. vanadium sulfat og 1 pct. ammoniumhepta molybdat i forholdet 1:4. Ved sammenblandingen fremkommer en kulsort vædske, som ved gennembobling med luft i en halv time slår over til en klar gul vædske. PH kan indstilles ved hjælp af ammoniumacetat, hvorved den gule farve ved pH 7,0 forsvinder, og man får en klar vædske som stadig er anvendelig som kontrastfarvestof.

b) *hurtigpræparater* er præparater som fremstilles direkte af råsaft fra virusinficerede planter. Metoden er udviklet i 1957 (*Brandes*) under navnet Tauch-metoden (oftest betegnet som dipmetoden). I princippet fortyndes råsaften 2-300 gange direkte i kontrastfarvestoffet (1-4 pct.) eller i destilleret vand og efterfølgende efterfarvning. Det bliver på denne måde mu-

ligt at gennemlyse præparatet, som ellers ville være så massivt, at elektronstrålerne ikke kunne trænge igennem, og varmen ville sprænge bærehinden.

1) *Dip-metoden* (*Brandes*) tager sit udgangspunkt i små bladkvadrater fra virusinficerede blade. I områder eller i umiddelbar nærhed af symptomer, nekrotiske pletter, mosaikspætning etc., udskæres små bladkvadrater på ca. 0,3 cm². De friske snitflader holdes direkte hen til en dråbe destilleret vand på en grid, celleindholdet diffunderer derved oven i dråben.

2) *Epidermis strip-metoden* (*Hichborn* og *Hill*) bygger på aftrukket epidermis (bl.a. for at undgå for meget uønsket celleindhold) som trækkes af et inficeret blads underside. Disse strimler af epidermis udblødes i vand eller kontrastfarve, og man har her udgangsmateriale til sin præparatfremstilling.

3) *Cut-squeeze-metoden* (*Cathro*) henter sit udgangsmateriale fra tynde bladstrimler (3-4 cm × 1 cm). Disse rulles sammen og snittes og mases imellem to objektglas. En enkelt dråbe heraf i 1-1,5 cm³ kontrastfarvestof er tilstrækkeligt materiale til frugtbare præparater med god viruskoncentration og som regel tilpas proteinindhold. Indholdet af andre stoffer er ret stort, men hjælper med til en jævn fordeling af farvestoffet. De fleste viruspartikler kommer herved til at ligge jævnt fordelt, hvorved man undgår en tildækning. Der anvendes til hurtigpræparaterne 1 og 2 pct. opløsninger, til efterfarvninger 2 pct. P.T.A.-A.M.-V.M. m.fl.

Der har været foretaget en sammenligning imellem de her nævnte hurtigmetoder. En statistisk opgørelse kan ikke danne grundlag for en udvælgelse af en af disse metoder, da deres udgangspunkter ikke er direkte sammenlignelige (forskellige udtagningsmetoder, bladarealer m.v.). Det har derfor været nødvendigt at drage andre faktorer ind i undersøgelserne, for at kunne træffe en retfærdig afgørelse. På grundlag af en direkte koncentrationsbestemmelse (*Breese* og *Trautman*), har dip-metoden hurtigt skilt sig ud fra de andre metoder på grund af for lav koncentration. Koncentrationen er afgørende for metodernes anvendelighed. Epider-

mis-strip og cut-squeeze metoderne, har kunnet sammenlignes med lige store bladarealer som udgangsmateriale. Ved beregning af koncentrationerne har flere metoder været overvejet (se litteraturlisten). Ved anvendelse af Breese-Trautman metoden (spray-droplet-metoden) optælles antallet af viruspartikler i forhold til antallet af polystyrene latexpartikler. På grundlag af tørvægtbestemmelsen af disse latexpartikler, kan antallet af disse pr. ml. beregnes, og ved at tælle antallet af latexpartikler pr. mikrodråbe, kan rumfanget af dråberne beregnes. Tælles herefter viruspartiklerne i de samme dråber, kan koncentrationen af viruspartiklerne i opløsningen beregnes. Resultaterne af undersøgelsen og koncentrationen i de to metoder anføres i nedenstående skema. Præparaterne er fremstillet med spray-metoden på kulforsærkede grids og egnede mikrodråber er udsøgt efter farvning med ammonium molybdat. Materialet har været Samsun-tobak inficeret med tomat-sort-ring-virus.

Resultater

Ved optælling af antal viruspartikler i forhold til latexpartikler, har det vist sig, at koncentrationer større end $2-3 \times 10^9$ giver så store sammenklumpninger, at optællingen bliver unøjagtig. Ligeledes har det vist sig, at koncentrationer lavere end ca. 2×10^7 giver så få partikler, at heller ikke dette giver sikre resultater. Koncentrationsbestemmelsen udregnes efter følgende formel (*Pinteric and Taylor*):

$$\frac{\text{antal viruspartikler på et givet areal}}{\text{antal latexpartikler på samme areal}} \times$$

I skemaet er anført antal latexpartikler i forhold til antal viruspartikler, antal prøver udført og optalt, gens. antal partikler optalt på lige store arealer.

Afgørende for udvælgelsen af cut-squeeze

Metode	Antal prøver	Forhold latex/virus	Gens. antal viruspartikl. pr. prøve
Dip-metoden	10	1: 6	115
Epidermis-strip	10	1:15	175
Cut-squeeze	10	1:21	240

metoden, fremfor epidermis-strip metoden, har foruden den større koncentration (fig. 1 og 2) været følgende forhold:

cut-squeeze	epidermis-strip
1) metoden kan udføres på alle planter	volder vanskeligheder med store grupper
2) kan udføres af alle, på kortest tid	er mere tidskrævende
3) giver den bedste fordeling af kontrastfarve	farvefordelingen ofte meget uensartet

Cut-squeeze metoden er, som følge af disse resultater, indgået som standard undersøgelsesmetode i vort laboratorium.

Snitteknikken, skal ikke beskrives i enkeltheder her, da den først er påbegyndt i vores laboratorium for et årstid siden. Som det ses af præparationsskemaet går processerne igennem fiksering, dehydrering, indlejring i plastik, hærkning (polymerisation) og snitning (snittykkelse ca. $1/60.000$ mm = $0,00006$ mm), kontrastfarvning og undersøgelse i elektronmikroskopet. På grund af denne omfattende proces må opgaverne være veldefinerede, og materialet altid følges af sundt kontrolmateriale. Der er der dog her taget enkelte eksempler i billedmaterialet med for at illustrere forskellige forekomster af virus i planteceller (fig. 15 og 16).

Problemerne med indlejring af botanisk ma-

konc. af latexpartikler (anslået v. tørv. best.)

teriale er væsentlig større end tilsvarende væv af dyrisk oprindelse på grund af store forekomster af hulrum og vacuoler. Ved snitteknik er det nødvendigt at få erstattet vædskefasen i hulrum med plastic for at kunne gennemføre en tilfredsstillende snitning på en ultramikrotom. Indlejringsmaterialerne og deres viskositet spiller her en væsentlig rolle, og der har i det forløbne år været arbejdet med disse problemer, og i særdeleshed samler interessen sig omkring nye indlejringsmaterialer f.eks.

Spurr-Epon, en kunstharpiks som synes velegnet for plantemateriale. De viste eksempler er indlejret i denne Spurr-harpiks.

Jeg vil gerne rette en tak til afdelingsforstander A. Birck-Andersen, Statens Seruminstitut for gode råd og gennemlæsning af manuskript. Også tak til fru Bente Skeel Christensen for teknisk bistand især ved snitarbejdet.

Summary

The following »quick leaf« preparation methods for electron microscopy, that are compared: Dip-method, epidermis-strip and cut squeeze. Beside particle count experiments, according to *Breese* and *Trautman*, the methods are compared in regard to distribution of stain on the grid, time required to make series of samples etc. The dip-method showed the lowest concentration followed by epidermis-strip and the cut-squeeze method. The cut-squeeze method is used as a standard method in this laboratory. Vanadium molybdate, neutralized with ammonium acetate, which brings the pH as high as to 7,0 (colourless) is used together with ammonium molybdate as a stain for delicate viruses or when the viruses are difficult to recover. The series of electron micrographs is a demonstration of the results obtained including ordinary purified preparations stained with phosphotungstic acid and uranyl formate. The technique is presented in a diagram showing the present possibilities.

The report is an introduction to electron microscopy in the field of plant virus research.

Litteratur

1. *Backus, R. C. and Williams, R. C.* (1950). The use of spraying methods. and volalite suspending media in the preparation of specimens for electron microscopy. *J. Appl. Phys.* 21, 11-15.
2. *Brandes, J.* (1964). Identifizierung von gestrecten Pflanzenpathogene Viren auf morphologischer Grundlage. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Heft 10.
3. *Breese, J. S. S. and Trautman, R.* (1960). Examination of spray droplet particle counting as a measure of virus concentration. *Virology* 10, 57-72.
4. *Callahan, W. P. and Horner, J. A.* (1964). The use of vanadium as a stain for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 20, 350-56.
5. *Crocker, T. T. and Benneth, B. M.* (1952). Electron

microscopic counting of elementary bodies of the virus of meningo-pneumonitis. *J. Immunol.* 69, 183-96.

6. *Hitchborn, J. H. and Thompson, A. D.* (1960). The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude sap extracts. *Virology* 27, 528-40.
7. *Horn, R. W. and Brenner, S. A.* (1958). Negative staining technique for high resolution of viruses. IN: *Proc. 4th Int. Conf. Electron Microsc.*, Berlin 1-9, 2, 625-27.
8. *Kellenberger, E. and Arber, W.* (1957). Electron microscopical studies of phage multiplication. I. Method for quantitative analysis of particle suspensions. *Virology* 3, 245-55.
9. *Nixon, H. L.* (1956). An estimate of the number of tobacco mosaic virus particles in a single hair cell. *Virology* 2, 126-28.
10. *Nixon, H. L. and Fisher, H. L.* (1958). An improved spray droplet technique for quantitative electron microscopy. *Britt. J. Appl. Phys. Lancaster* 9, 68-70.
11. *Pinteric, L. and Taylor, J.* (1962). The lower drop method for the preparation of specimens and purified virus, lysates for quantitative electron micrographic analysis. *Virology* 18, 359-71.
12. *Sharp, D. G.* (1949). Enumeration of virus particles by electron micrography. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 70, 54-59.
13. *Sharp, D. G. and Beard, J.* (1952). Counts of virus particles by sedimentation on agar and electron microscopy. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 81, 75-79.
14. *Spurr, A. R.* (1968). A low-viscosity Epoxy-resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Resh.* 26, 31-43.
15. *Steere, R. L.* (1950). Increment curves based on count of virus particles in plant juices, prepared by a new and simplified procedure for electron microscopy. Doctoral diss. University of Mich.
16. *Steere, R. L.* (1960). Plant viruses. Quantitative assay methods and fine structure of the characteristic particles. In: *Proc. 4th Int. Conf. Electron Microsc.* Berlin, 1958, 2, 628-35.
17. *Watson, D. H.* (1962). Electron microscopic particle counts of phosphotungstate-sprayed viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 321-31.

Manuskript modtaget i redaktionen
den 12/1 71 fra
Statens plantepatologiske Forsøg

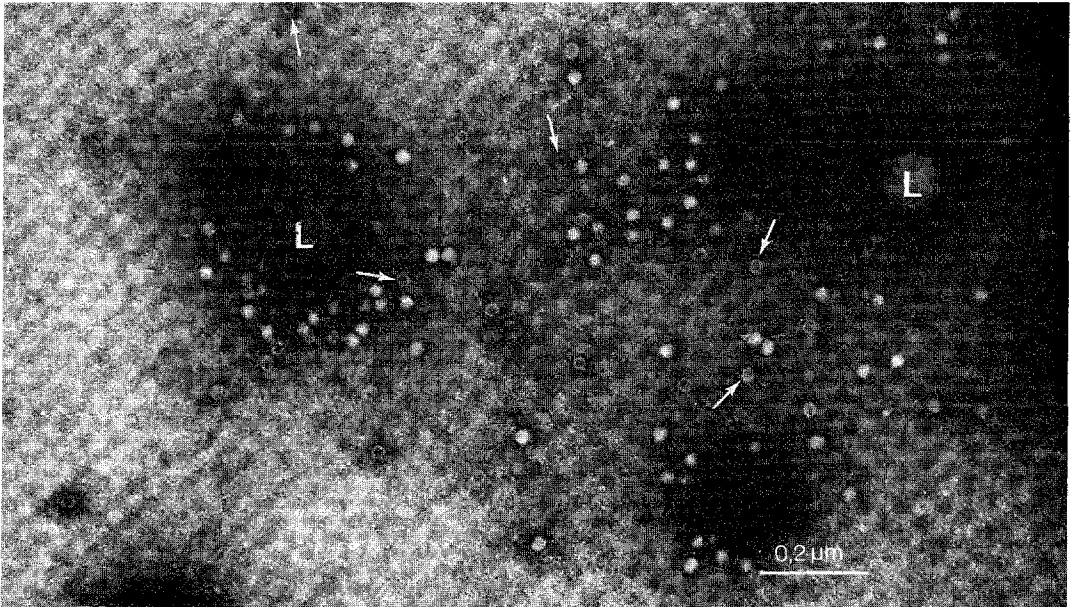


Fig. 1. Cut-squeeze metoden. Koncentrationsbestemmelse af *tomatsortering-virus* (Tomato black ring virus) i »Samsun« tobak (*Nic. tabacum* L.). Sfæriske partikler 25-30 nm Spray-droplet-metoden, neg. farvet med A. M. Koncentrationen er større i dette præparat end i præparater af epidermis-strip-metoden (se fig. 2). De 2 store sfæriske partikler mærket L er latexkugler med en diameter på 126 nm. Disse anvendes til beregning af den væskemængde som den pågældende mikrodråbe repræsenterer. Pilene peger på tomme viruspartikler (ghostparticles). $\times 80.000$.

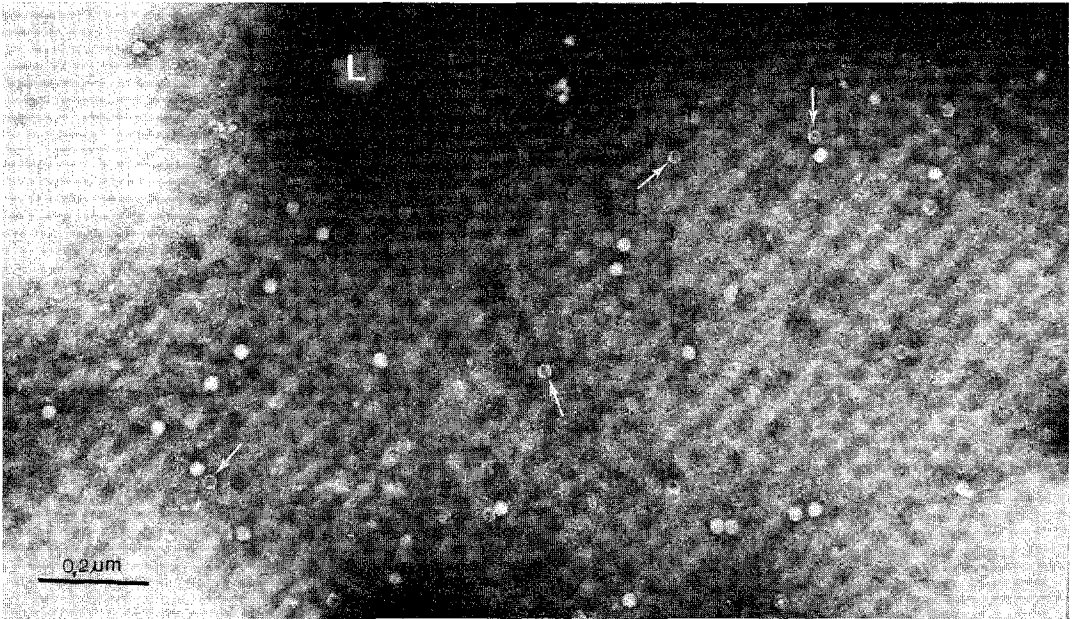


Fig. 2. Epidermis-strip-metoden. Koncentrationsbestemmelse af *tomat-sortring-virus*. (Tomato black ring virus) i »Samsun tobak (*Nic. tabacum* L.). Sfæriske partikler 25-30 nm. Spray-droplet-metoden, neg. farvet med A. M. På billedet ses, som på fig. 1 »tomme« partikler og udfyldte partikler samt en med L. mærket latexpartikel. Koncentrationen ses at være noget mindre end ved Cut-squeeze-metoden. $\times 80.000$.

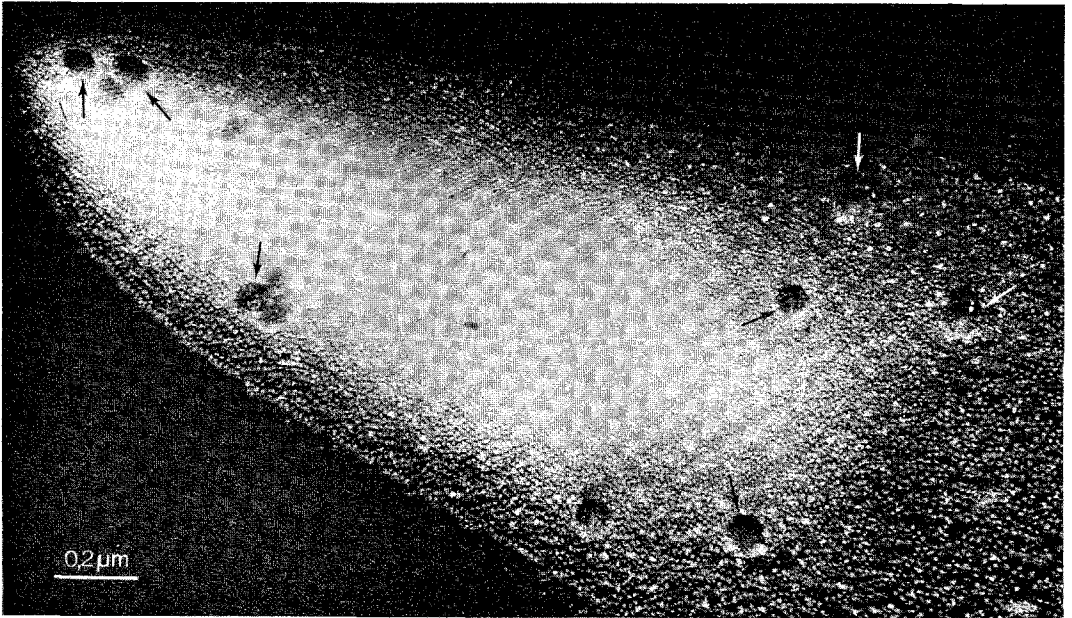


Fig. 3. *Turnips-gulmosaik-virus* (Turnip yellow mosaic virus) i kincsisk kål (*Brassica perennis* L.). Sfæriske partikler ca. 25 nm. Renfremstilling, skygget med platin/paladium. Præparatet er udført som spray-præparat, »Fingeren« er en del af en mikrodråbe. I den tætte masse af viruspartikler ses enkelte latexpartikler (pile) 126 nm store. $\times 63.000$.

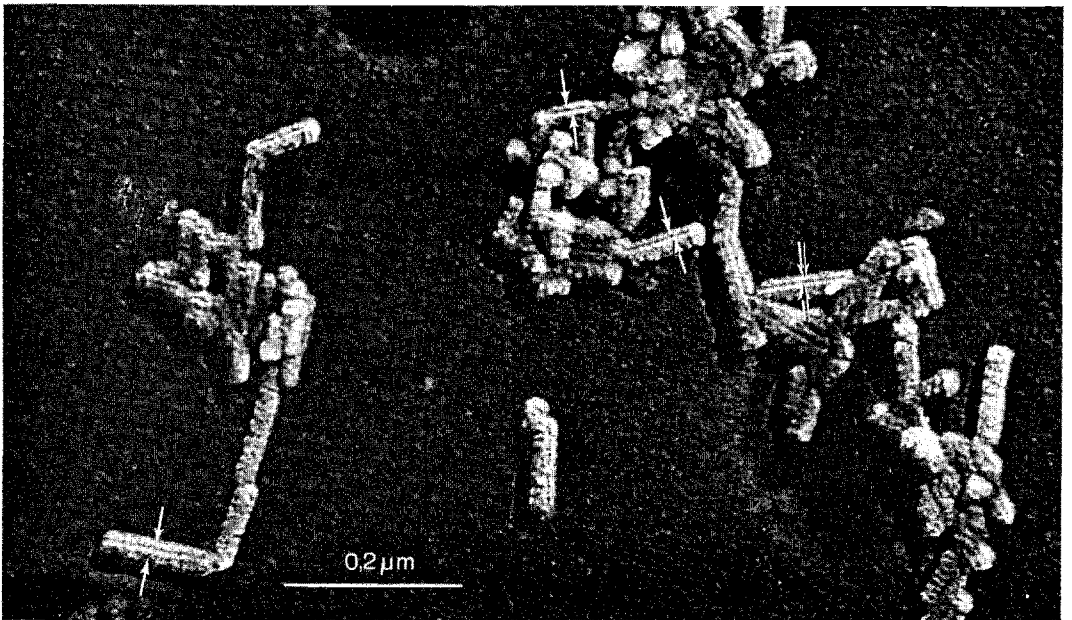


Fig. 4. *Byg-stribemosaik-virus* (Barley stripe mosaic virus) i byg (*Hordeum vulgare* L.). Korte stavformede partikler 125×19 nm. Renfremstilling, skygget med platin/kul. Den rækkeformede opbygning af stavene ses tydeligt på en del af partiklerne (pile). Denne præparationsteknik er velegnet til opmåling af partikellængde og til studie af overfladestruktur. $\times 133.000$.

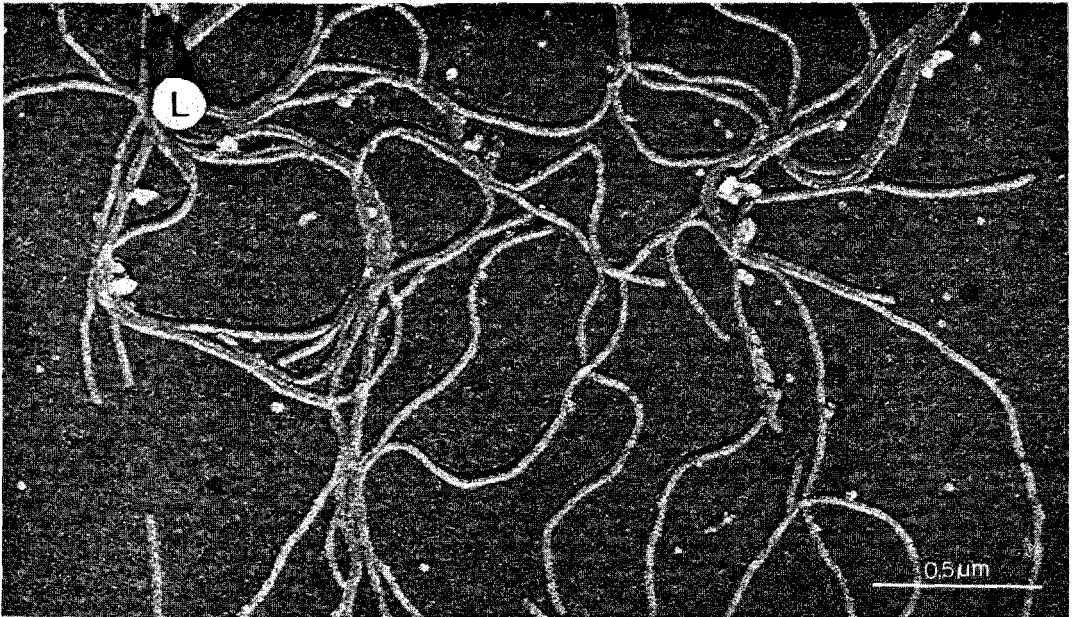


Fig. 5. *Hortensia-ringplet-virus*, (*Hydranga ringspot virus*) i *Tetragonia expansa*. Trådformede, lange, fleksible partikler 493×13 nm. Renfremstilling skygget med platin/kul. Mange partikler er aggregerede og danner lange sammenhængende kæder. Dette er pH betinget, jo højere pH desto flere aggregeringer. En latexpartikel 126 nm er afmærket med L. $\times 50.000$.

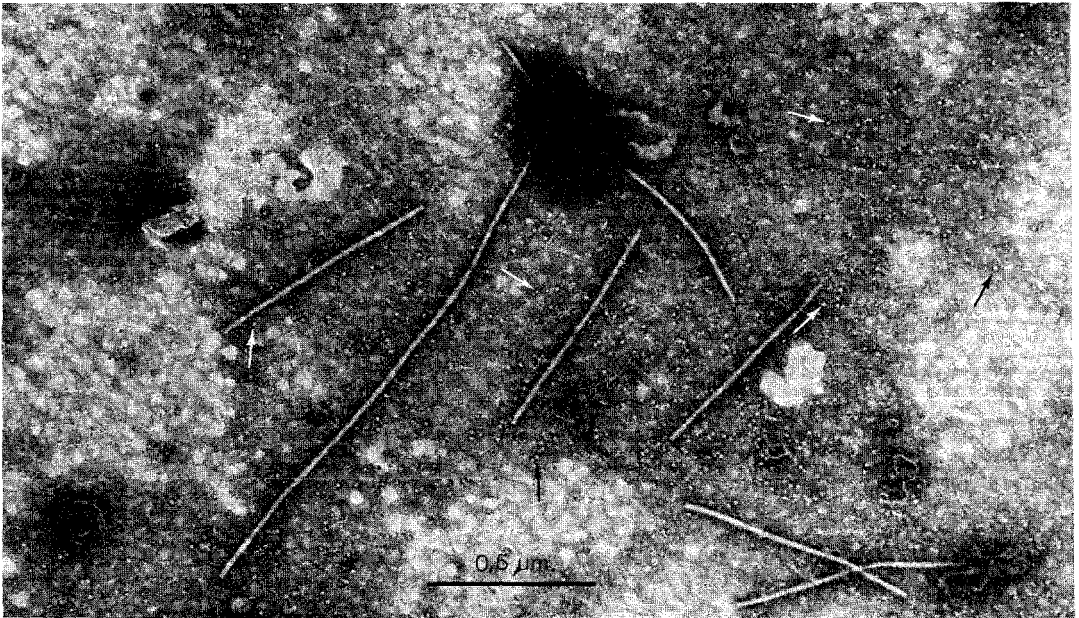


Fig. 6. *Løg-mosaik-virus* (*Onion yellow dwarf virus*) i skalotteløg (*Allium ascalonicum* L.). Stavformede, ret stive partikler 772×16 nm. Hurtigpræparat (cut, squeeze), neg. farvet med P. T. A. De hvide prikker angivet med pile på bærehinden er sandsynligvis ribosomer fra værtcellens cytoplasma. Fra løg uden symptomer (latent virus). $\times 50.000$.

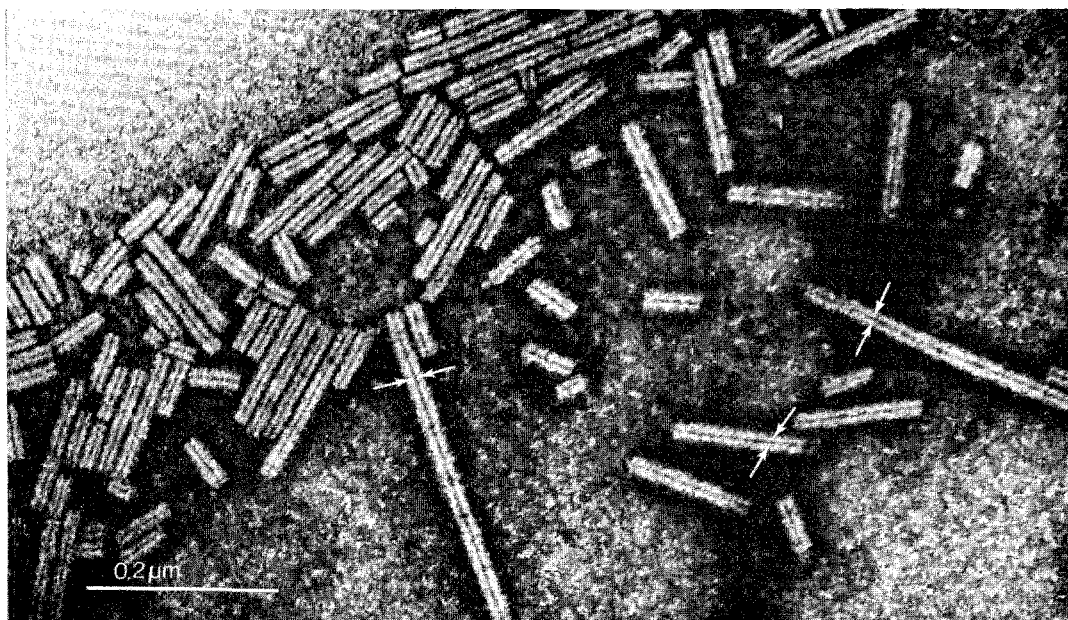


Fig. 7. *Rattle-virus* (Rattle virus) i kartoffel (*Solanum tuberosum* L.). Korte, stive, stavformede partikler i 3 længder, 90, 170 og 210-20 nm. Renfremstillet præparat, neg. farvet med P. T. A. Den gennemfarvede centerkanal ses i alle partikler (pile). Man regner kun med, at den mellemste partikelstørrelse er infektiøs. $\times 142.000$.

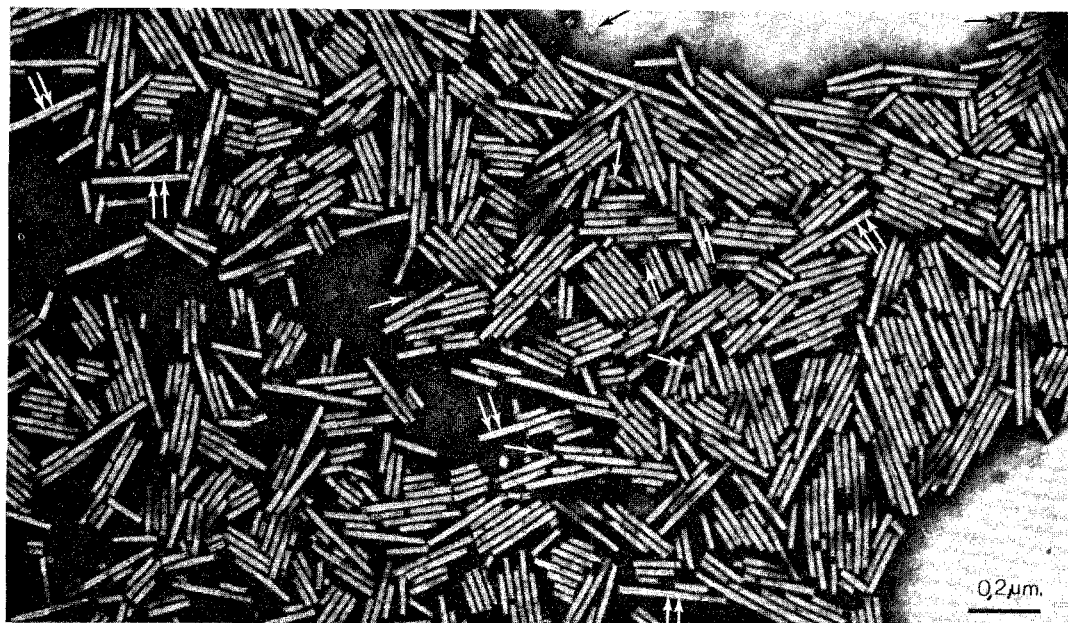


Fig. 8. *Byg-stribemosaik-virus* (Barley stripe mosaic virus) i byg (*Hordeum vulgare* L.). Korte, stavformede partikler 125×19 nm. Renfremstilling, neg. farvet med P. T. A. De med pile mærket små cirkler med mørkt center er korte stave (på højkant) set fra enden. På disse ses centerkanalen tydeligt, men den kan også anes på flere af de lange stave (dobbelte pile). $\times 53.000$.

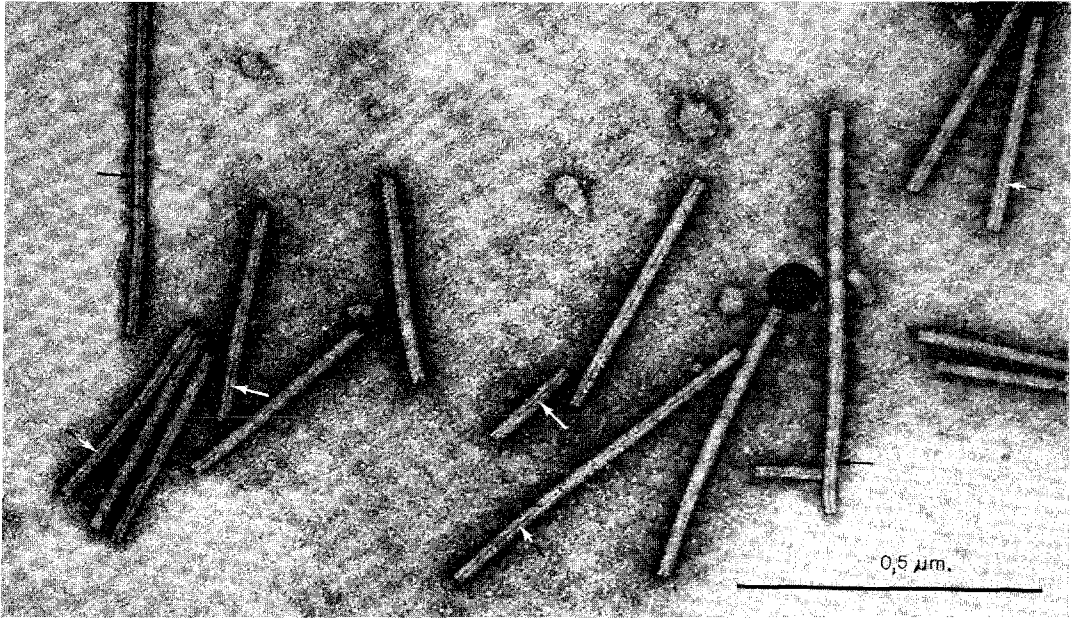


Fig. 9. *Kartoffel-virus M.* (Potato virus M.), i kartoffel (*Solanum tuberosum* L.). Stavformede, stive partikler 651×15 nm. Renfremstilling neg. farvet med P. T. A. Der ses aggregerede og brudte partikler. Centerkanalen ses i alle partikler (pile). Dette er ret usædvanligt i så lange partikler som her afbilledet. $\times 90.000$.

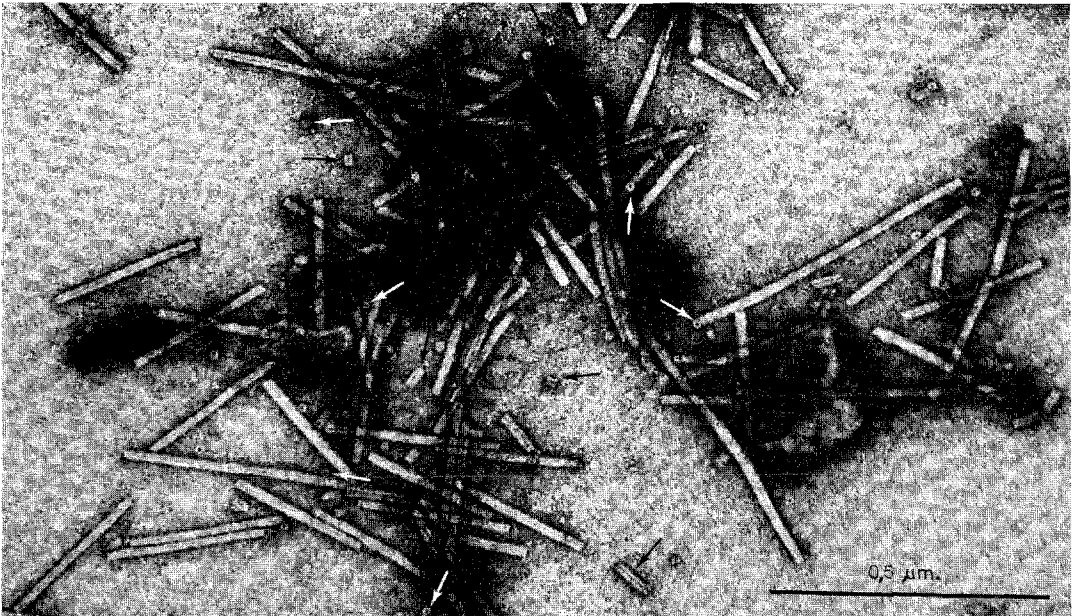


Fig. 10. *Tobak-mosaik-virus* (Tobacco mosaic virus) i *Tetragonia expansa*. De korte stavformede partikler er 300×18 nm, neg. farvet P. T. A. De lange aggregerede kæder vanskeliggør identifikationen. De mørke områder er farvestof i for stærk koncentration. Der ses brudstykker (sorte pile) og partikler set fra enden (hvide pile). $\times 82.000$.

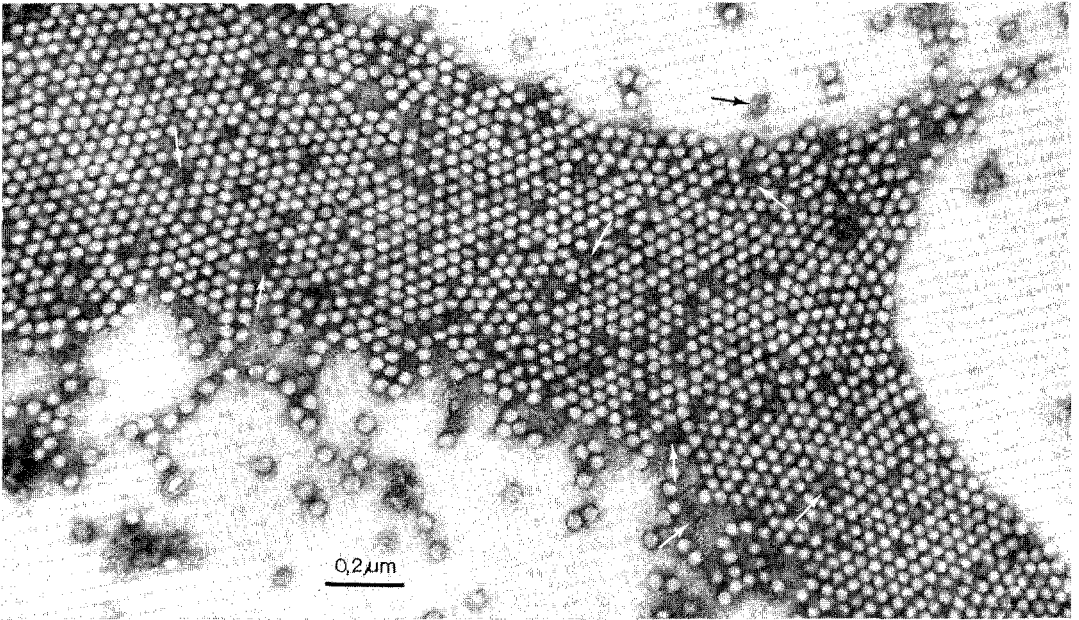


Fig. 11. *Turnips-gulmosaik-virus* (Turnip yellow virus) i kinesisk kål (*Brassica perensis* L.). Sfæriske partikler 26 nm. Renfremstilling, neg. farvet med P. T. A. De mørke ringe (pile) mellem de intakte partikler, er tomme »ghostparticles«, som ikke indeholder RNA. Den 6-kantede form partiklerne har, er årsag til at de ved sammenpakning lægger sig i et hexagonalt mønster, som cellerne i en bitavle. $\times 82.000$.

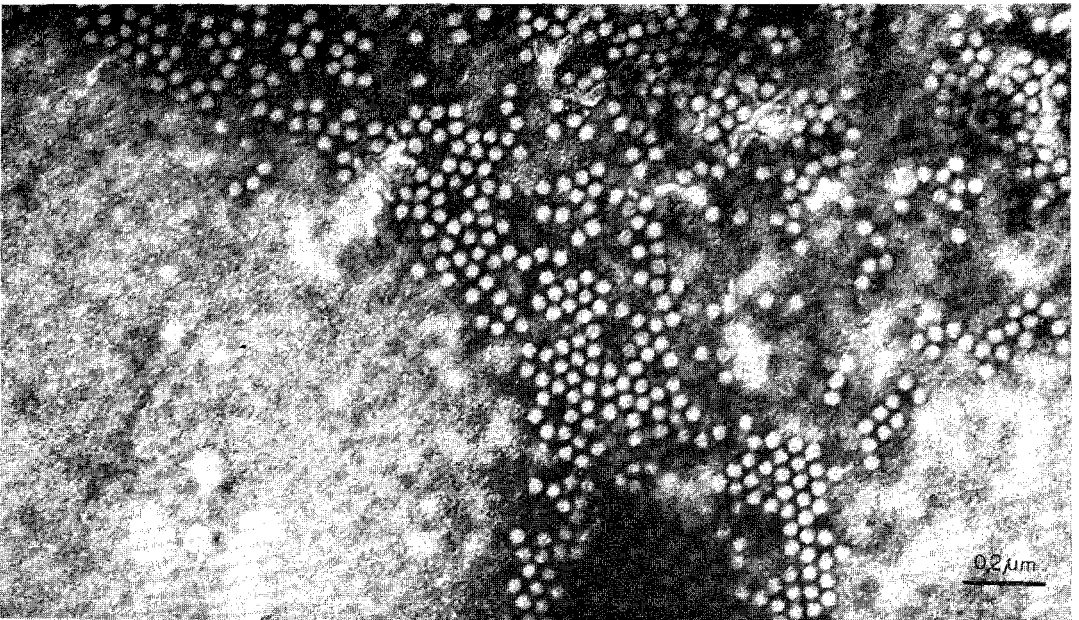


Fig. 12. *Agurk-mosaik* (Cucumber virus 1) i tulipan (*Tulipa*) »Brilliant Star«. Sfæriske partikler ca. 30 nm. Hurtigpræparat (cut squeeze), neg. farvet med P. T. A. Så stor koncentration af virus i et hurtigpræparat som her, ses kun sjældent. $\times 60.000$.

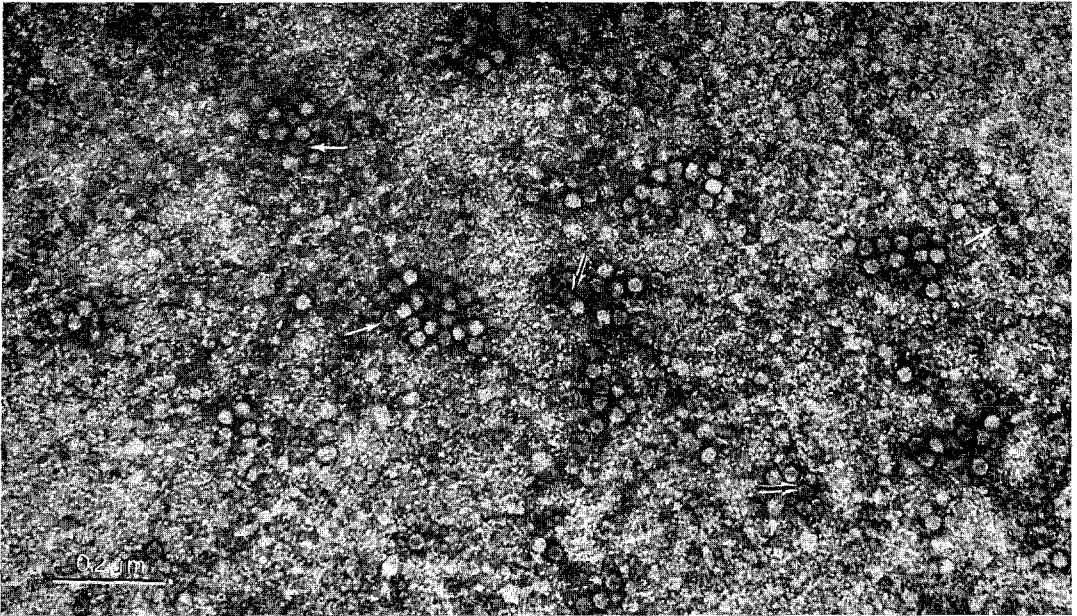


Fig. 13. *Tobak-nekrose-virus*. (Tobacco necrosis virus) i bederoe (*Beta vulgaris* L.). Sfæriske partikler 26-30 nm. Hurtigpræparat (cut squeeze), neg. farvet med U. F. (Uranyl format). Partiklerne ser næsten alle ud til at være intakte, enkelte »ghostparticles« er markeret med hvide pile. $\times 82.000$.

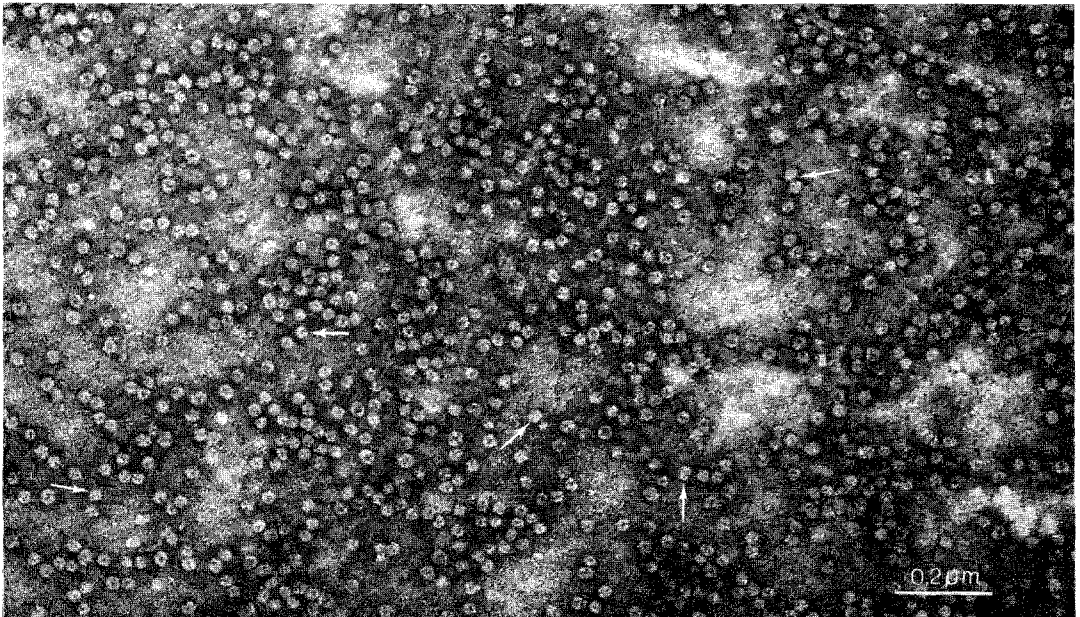


Fig. 14. *Asparges-dværgsyge-virus* (Asparagus dwarf virus) i renfremstilling (fra Petunia). Sfæriske partikler 30 nm. Neg., farvet med vanadiummolybdat. Dette virus hører til de meget vanskelige vira, som let ødelægges ved alm. farvemetoder som f.eks. P. T. A., U. F. o.l. Kontrasten er ikke så god som ved farvning med disse farvestoffer. Der ses kun enkelte intakte partikler (mærket med hvide pile), de øvrige partikler er tomme (»waterhole particles«, betegnelsen for denne type). $\times 70.000$.

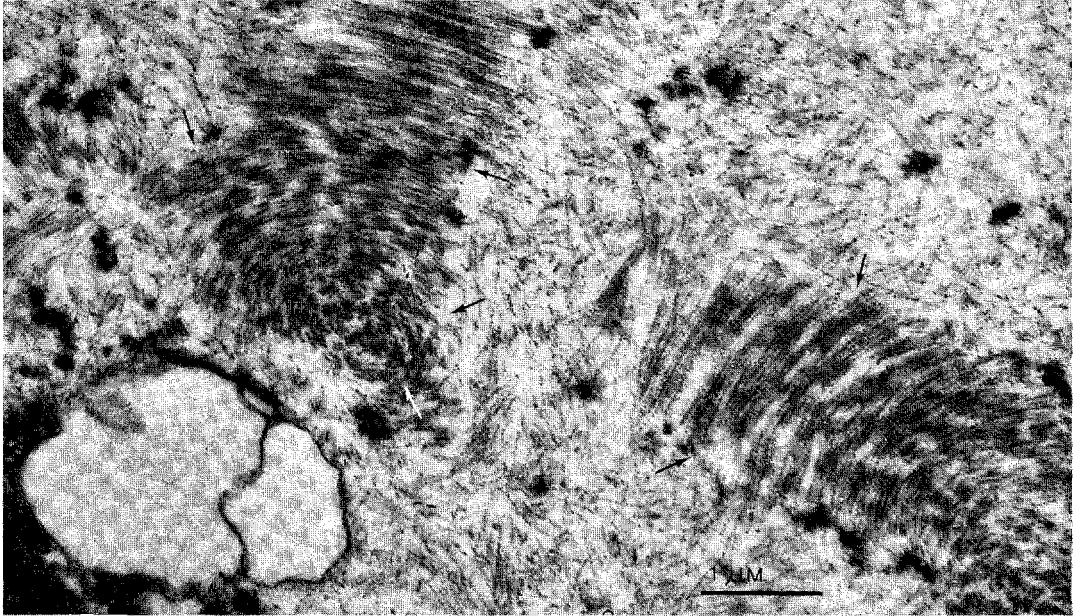


Fig. 15. *Tobak-mosaik-virus* (Tobacco mosaic virus) i »Samsun« tobak (*Nic. tabacum* L.). Snitpræparat. Cytoplasmatiske inklusioner med virusformationer i sælsomme mønstre (pile). Der ses også mange fritliggende partikler i længde- og tværsnit. Efterfarvet med Magnesium uranyl acetat og blycitrat. (Reynold). $\times 39,000$.

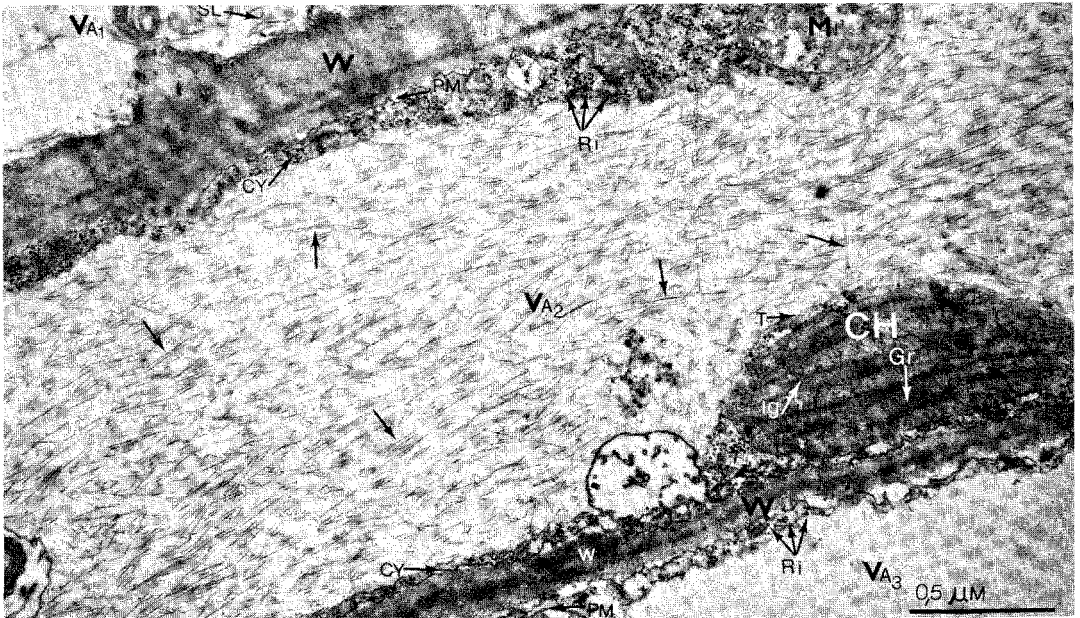


Fig. 16. Som ovenstående (fig. 15). Her ingen cytoplasmatiske inklusioner, men et udsnit af 3 celler, hvoraf kun den midterste indeholder virus. Viruspartiklerne (pile) ses fritliggende i centralvacuolen mærket Va 2. Pile viser også nogle af de andre anførte cellebestanddele (cytoplasma, plasmamembran tonoplast, slimtråde og ribosomer) Va 1 og Va 3 centralvacuoler i de tilstødende celler uden virus. $\times 22,000$.

- | | | |
|------------------------|--------------------------------|-------------------|
| CH chloroplast | Mi Mitochondria | T tonoplast |
| CY cytoplasma | PM plasmamembran (plasmalemma) | Va 1-2-3 vacuoler |
| Gr grana (Thylakoïder) | Ri ribosomer | W cellevæg |
| Ig Intergrana | SL slimtråde | |