

Statens plantepatologiske Forsøg (H. Ingv. Petersen)

Virologisk afdeling (H. Rønde Kristensen)

Forbedret ultrasektionering af sikarsområder i orkideer med vakuuminfiltrering

Improved ultrasectioning of phloem tissues of orchids by vacuumfiltration

Jens Regtrup

I forbindelse med elektronmikroskopiske vævsundersøgelser er der opnået en betydelig forbedring af indlejringen af vanskeligt gennemtrængelige sivævsregioner med vakuum under infiltreringen med Spurr's Epon. Ved undersøgelserne af et ukendt virus i virusangrebne *Phalaenopsis*-planter (10 og 18) er denne metode anvendt, og der er herved påvist et bacilleformet virus, som tidligere kun er fundet i *Dendrobium*. Viruspartiklerne er fundet intranucleært samt i cytoplasma som enkelt- eller dobbeltpartikler eller som „spokewheel“ inclusioner.

Vakuumindelejringsmetoden gør snitteknikken mere velegnet til at undersøge planter for virus, som ikke lader sig påvise ved rutine-suspensionsanalyser.

I. Introduktion

Ved anvendelse af elektronmikroskopet i det diagnostiske arbejde med virussygdomme hos planter, anvendes i betydeligt omfang „hurtigpræparater“, fremstillet som suspensionspræparater, med andre ord viruspartikler i en væske, f. eks. plantesaft. Som omtalt i en tidligere beretning (2), kan virus med sfærisk partikelform ofte være vanskeligt at udpege på grund af deres fysiske/kemiske egenskaber og den ringe koncentration hvori de forekommer. Det kan ved sådanne vanskelige opgaver være en hjælp at anvende snitteknik, som nok er betydelig

mere arbejdskrævende, men som mange gange giver de ønskede oplysninger.

Viruspartikler kan forekomme samlet i inklusioner eller geometrisk opbyggede viruskrystaller i cellerne. Under sådanne omstændigheder er opgaven som regel ret hurtig løst. Findes viruspartiklerne derimod som enkeltpartikler, jævnt fordelt i cytoplasma og måske kun i enkelte celler af bestemte vævstyper, kan opgaven ofte være vanskelig og langvarig. Hvis det drejer sig om sfæriske vira, som ofte er vanskelig identificerbare, da de let forveksles med ribosomer, kan man benytte sig af en indlejningsmetode med farvning under fixering (7). Står man over for et virus af ukendt struktur, hvor man kun har symptomer i blade eller blomster at gå efter, og hvor suspensionspræparaterne gang på gang giver negative resultater, er problemstillingen en anden.

Beslutter man sig til at anvende snitteknik for at komme problemets løsning nærmere, er en forudsætning en god indlejring i alle dele af den undersøgte plante, også hvor vævsstrukturen modarbejder dette. Cellevægstrukturen i sikarregionen består af cellulosemikrofibriller og ligninstoffer i en vandfattig amorf masse, som er vanskelig gennemtrængelig for indlejningsmaterialet. Det er kendt, at vakuum kan benyttes for at fremme indtrængningen under andre forhold. Denne teknik er anvendt på plantevæv for eventuelt at afhjælpe de vanskeligheder, som forekommer f. eks. ved indlej-

ring af sikarområderne af nogle planter (bl.a. *Phalaenopsis*). Resultaterne er ledsaget af elektronmikroskopiske optagelser af vakuumindlejret materiale, som viser god indtrængning, af indlejringmaterialet og god bevaring af cellens indhold. Ved hjælp af denne metode er det ved ultratynde snit lykkedes at påvise et ukendt virus i *Phalaenopsis* (orkide), her omtalt som „Phalaenopsis virus“ da det endnu ikke er navngivet, et virus som ikke kunne påvises i suspensionspræparater, og hvis struktur i øvrigt var ukendt.

Den elektronmikroskopiske afbildning (den praktiske opløsningsevne) af små detaljer af biologisk materiale i et snitpræparat er bl. a. afhængig af de anvendte snits tykkelse og de strukturelle detaljers kontrast. Desto tykkere snit, desto flere lag afbildes samtidig og desto mere mindskes skarpheden. Biologisk materiale har sædvanligvis ikke kontrast nok i sig selv, til at kunne afbildes tydeligt på den fotografiske film eller plade i elektronmikroskopet. Det er derfor nødvendigt at øge kontrasten ad kemisk vej, ofte på en for materialet drastisk måde. Snittykkelsen er med de moderne pålidelige ultramikrotomer i det store hele kun et spørgsmål om mikrotomens rette betjening, men en alt afgørende forudsætning er en vel gennemført indlejningsproces, udført fornuftigt med de rigtige materialer. Arbejdsprocessen ser således ud: Udvælgelse, fixering, dehydrering, infiltrering, polymerisering, ultramikrotomer, kontratering og endelig elektronmikroskopi af de fremstillede tyndsnit.

II. Materialer og metoder

1. Udvælgelse og udpræparering

Erfaringsmæssigt lettes arbejdet med påvisning af virus ved at lægge snit i de områder af bladet, som viser farveændringer. Det kan være gul/grønne områder eller misfarvede dele i eller i nærheden af nekrotiske pletter på et blad (lokale nekroser), eller det kan være marmorerede eller spættede bladarealer ved systemiske infektioner.

Her i laboratoriet udpræpareres tynde strim-

ler for at mindske diffusionsafstanden under fixeringen, og for at kunne placere materialet hensigtsmæssigt i indlejringkapslen. Bladstrimlerne gøres i reglen ca. 10–15 mm lange og 0,5 mm brede. Udpræpareringen bør finde sted under væske (den først anvendte fixeringsvæske, se senere) for at hindre uønskede kemiske omdannelsesprocesser i de nyblottede snitflader.

2. Fixering

Det er nødvendigt at stabilisere den labile strukturelle opbygning i vævene, da de senere udsættes for stærke fysiske/kemiske påvirkninger. Det er også nødvendigt at „dræbe“ (fixere) vævene hurtigt for derved at standse enzymatisk aktivitet, som kan sætte ind med autolytisk nedbrydning af vævscellerne straks efter udpræpareringen. Glutaraldehyd (1) er i dag det mest almindelige fixeringsmiddel, medens formaldehyd, brugt alene som fixeringsmiddel, anvendes mindre hyppigt. Inden for human- og veterinærområdet anvendes permanganat (11) på grund af sin hurtige gennemtrængningsevne og sine gode evner til selektivt at bevare membransystemerne. Det bruges også en del til plantemateriale, selv om permanganatfixering ofte virker ret ødelæggende på visse celleorganeller og tillige ekstraherende på cytoplasmaet især i forbindelse med meristematisk væv. Acreolin foretrakkes kun af ganske få, da det er meget ubehageligt at arbejde med. Samme gode effekt opnås med fixeringsmidler, der væsentlig består af glutaraldehyd og formalin. Blandinger af enkelte eller flere fixeringsmidler kan fremme løsningen af specielle opgaver. Karnowskys fixeringsvæske (9) er netop en blanding af paraformaldehyd og glutaraldehyd. Denne blanding anvendes som standardfixeringsmiddel her i laboratoriet. Alle hidtil omtalte fixeringsmidler er at betragte som prefixeringsmidler og følges almindeligvis op af en postfixering. Her er osmiumtetroxid (16) det mest anvendte middel. En tilsætning af sukrose kort tid inden brugen giver tilsyneladende en bedre fixering end ved anvendelse af osmium i ren stødpudeopløsning (3). Valg af stødpude,

som er en del af de fleste fixeringsmidler, er afgørende og har stor indflydelse på bevaring af cellens enkeltkomponenter og deres fremtræden. Problemerne med stødpude og valg af disse er nært knyttet til et stabilt pH under indlejningsprocessen. Ved denne undersøgelse af vakuumindelejring er der også anvendt vakuum under pre-fixeringen.

3. Dehydrering

kan betragtes som en forlænget postfixering; proteinerne er stadig opløselige, hvilket betyder, at man fortsat let kan ødelægge, hvad man ønsker bevaret. Dehydrering kan foregå med alkohol, hvilket er mest almindeligt for animalsk og humant væv. Acetone er en del benyttet inden for planteindelejring. Ved hurtig dehydrering risikerer man sammentrængninger i og omkring vævene, mens en langsom dehydrering øger risikoen for ekstrahering. Derfor foretages dehydreringen gradvis over en periode af godt 3 timer. En vellykket dehydrering tilsigter bibeholdelsen af cellekomponenternes placering, samt en total fjernelse af alt vand og luft uden skrumpning af cellen, med en efterfølgende opfyldning af indlejningsmaterialet. De almindeligst anvendte indlejningsmidler er blandbare med vand.

4. Indfiltrering

I overgangsperioden fra ren alkohol, (som anvendes her), som er slutfasen for dehydrering, til indlejningsmaterialet, kan der være tale om en „overgangsopløsning“, for at lette blandingen med indlejningsmidlet. Propylenoxid (12) er blandbart med absolut alkohol og de fleste indlejningsmidler. Det er meget let fordampeligt og derfor let at fjerne inden hærdeningen af de anvendte indlejningsmidler. Af disse anvendes oftest Epon (12) eller Araldit (8). Til denne undersøgelse er anvendt Spurr's Epon (21), som synes at være særlig velegnet til botanisk materiale. Af andre indlejningsmidler skal nævnes Westopal (20) og Maraglas (5). Indfiltrering af plantematerialet vanskeliggøres, som tidligere omtalt, af cellevægsstruktur, men også af den store mængde luftfyldte hulrum

og store vacuoler. En anden vanskelighed er det turgortryk, som findes i de fleste planter, hvilket kan vanskeliggøre selve indfiltreringen, også af fixeringsmidlerne. Der findes metoder, som imidlertid ikke anvendes, som ophæver dette turgortryk ved at forbehandle vævet med 0,2 M glukose i vandig opløsning (14). De nyeste indlejningsmidler, som nævnt især Spurr's Epon, som har så lav viscositet, at indlejringen ikke er helt det samme problem som tidligere. Kombineret med vakuumbehandling under indfiltreringen synes det for mange vævstyper yderligere at lette imprægneringen selv med denne tyndtflydende plastic.

5. Polymeriseringen

Denne proces, der omfatter hærdeningen af de flydende kunstharpikskomponenter, skal helst foregå ensartet, både indeni og udenfor cellerne for at disse og deres organeller kan bevare deres strukturelle arrangement og samtidig resultere i en blok med en hårdhed og elasticitet, der er passende til at fremstille tilfredsstillende snit i en ultramikrotom. Hovedkravene til indlejningsmidlerne og deres polymerisering er følgende:

- a) – at strukturen i vævene ikke ødelægges under imprægneringen og polymeriseringen,
- b) – at snittene er stabile over for elektronbestrålingen ved undersøgelse i elektronmikroskopet, c) – at den hærdede plastic har gode snitegenskaber og d) – at de færdige snit viser modtagelighed for kontrastfarvestoffer.

6. Ultramikrotomering

Plasticblokke med væv i, fremstillet ved udstøbning i geletinekapsler eller små specialkapsler af ret blød plastic, indsættes i termostatovn ved 60° C i 48 timer, og heri foregår de afsluttende polymeriseringsprocesser. Efter udtagningen fra termostatovnen bør blokkene inden ultramikrotomering henstå 1–2 døgn ved stuetemperatur. Snittene der skal fremstilles skal helst have en tykkelse af 1/50–1/60 000 millimeter. Blokken forberedes til snitning ved „trimning“ i pyramidefacon omkring det område, som skal undersøges. Der skæres over-

sigtskiver af 1–2 μm 's tykkelse, som efter farvning med Toulidinblåt undersøges i lysmikroskop. Uønsket materiale bortskæres, således at man ender med en ganske lille pyramide, som helst skal fremtræde i parallelogramfacon set i tværsnit (under 1 mm^2). Hvis indlejningsprocessen er forløbet godt, kan ultramikrotomen nu levere tynde snit i de områder, som man ønsker at studere i elektronmikroskopet. Hvis arbejdet med tynde snit volder vanskeligheder, må man begynde at ændre på enkeltprocesserne, en ad gangen. Man kunne tænke sig, at fixeringen skulle forlænges eller nedsættes til halv styrke, at varmen skulle ændres i termostatovnen eller at blandingsforholdet i indlejningsmidlet skulle ændres med henblik på større eller mindre hårdhed af den færdige blok m.m. Da forandringen ofte er vanskelig at konstatere, må man gå trinvis frem, samtidig med at man må registrere de mindste ændringer. Denne beretning beskriver ændringer foretaget i indlejningsprocessen under indfiltreringen. Indfiltreringen lettes ved anvendelse af vakuum efter fyldning af indlejningskapslerne, umiddelbart inden disse sættes i termostatovnen til polymeriseringen.

7. Kontrastering

Cellestrukturen i de færdige snit skal som tidligere nævnt have tilstrækkelig kontrast. Inden for elektronmikroskopien anvendes fortrinsvis tunge metalsalte som kontrasteringsmidler. Uranylacetatfarvning (22) efterfølges som regel af en blyfarvning, f. eks. blyfarvning efter Reynold (19). Der er også udarbejdet en lang række specialfarvemethoder, som anvendes til særlige formål.

8 Undersøgelse

Sidste fase af det omfattende arbejde er undersøgelsen ved hjælp af selve elektronmikroskopet, og den lange proces afsluttes så endeligt med den fotografiske efterforstørrelse af de negativer, som er resultatet af de elektronmikroskopiske optagelser.

Da den ene proces er afhængig af den næste, er alle af den største betydning for et vellykket

resultat. Vakuumbehandling under indlejring synes at udgøre en væsentlig forbedring af et af disse led. Dette arbejde er ledsaget af illustrationer for at anskueliggøre det.

Materiale af *Phalaenopsis ludemanni* L samt *Dendrobium antennatum* Ldl. er indlejret efter den beskrevne metode. Materialerne er indlejret med og uden vakuum under indfiltreringen. Indlejringmaterialet har været Spurr's Epon (21). Materialet af *Phalaenopsis* var inden arbejdets påbegyndelse mistænkt for at indeholde et ikke tidligere kendt virus, som ikke kunne påvises efter talrige forsøg med suspensionspræparater. Snitteknikken voldte meget store vanskeligheder, da sikarregioner ikke kunne infiltreres, og snitningen derfor umuliggjordes. Det skulle senere vise sig, at netop disse celler, eller celler i umiddelbar nærhed af disse, indeholdt et bacilleformet virus, som kort forinden for første gang var blevet fundet i *Denbrobium* (18). Dette virus blev her først påvist i *Phalaenopsis* (10). Dette arbejde blev lettet betydeligt ved den forbedrede indlejringsteknik, d.v.s. indlejring ved hjælp af vakuum.

Undersøgelserne er udført med *Philips EM 100B* elektronmikroskop. Snit er fremstillet på *LKB* ultramikrotom, optagelserne ved en primær forstørrelse på 3.900–5.800 på Kodak *fine grain safety* positiv film og er efterforstørret efter behov.

Reagenser

- 1) *cacodylate stødpude* 0,1 M (0,2 M med hensyn til succrose pH 7,2).
- 2) *cacodylate stødpude* 0,1 M pH 7,2.
- 3) Karnowsky fixering (paraformaldehyd/glutaraldehyd) i *cacodylate stødpude* (0,01 M med hensyn til CaCl_2) pH 7,2.
- 4) Michaelis stødpude 0,1 M (veronal/acetat) med 2 % Osmiumtetroxide (fremstillet senest 24 timer inden brugen) og tilberedt $\frac{1}{2}$ time inden brugen som 0,2 M med hensyn til succrose pH 7,2.
- 5) Uranylacetat mættet opløsning.
- 6) Magnesiumuranylacetat 7,5 %.
- 7) Spurr's Epon.

Tidsplan

1. dag

- a) Små (10–15 mm lange og 0,5 mm brede) bladstrimler fixeres i *Karnowsky fixering* (8) fuld styrke, 2 timer ved et vakuum på 150 mm Hg. Efter 1 time afbrydes vakuum og ved atm. tryk omrystes for at frigøre luftbobler. Atter 1 times vakuum.
- b) Materialet overføres til cacodylate stødpude m. succrose i 30 min. ved stuetemperatur. Dette gentages 2 gange.
- c) Materialet overføres til 2 % Osmiumtetroxid i Michaelis eller cacodylate stødpude tilsat succrose 30 min. før brugen (0,045 g i 100 ml). Placeres i køleskab ved 4° C 16 timer.

2. dag

- d) Materialet udtages af køleskabet og skylles et par gange i destilleret vand (eller *Michaelis* stødpude).
- e) Prøven anbringes i mættet uranylacetat i 1 time.
- f) Dehydreringsplanen gennemføres med alkohol.
 - 25 % i 10 min.
 - 50 % i 15 min.
 - 75 % i 20 min.
 - 90 % i 20 min.
 - 96 % i 20 min.
 - 100 % i 20 min.
- g) Overføres til propylenoxid i 3 skift à 10 min. med skift til ny propylenoxid hver gang.
- h) Overføres til sidst til 50 % propylenoxid/50 % Spurr's Epon og anbringes natten over ved 28° C i åbne glas.

3. dag

- i) Skift til ren Spurr's Epon, henstand natten over som h).

4. dag

- j) Atter skift til ren Spurr, henstand natten over som h).

5. dag

- k) Gelatinekapsler (Park and Davis no 3) fyldes halvt op med Spurr's Epon, og vævet anbringes i bunden i den ønskede stilling

til snitning. Kapslerne indsættes ved 150 mm Hg vakuum i nøjagtig 2 min. Kapslerne udtages og fyldes helt op. Kapslerne indsættes i thermostatovn ved 62° C.

6. og 7. dag

- l) Ophold i thermostatovn.

8. dag

- m) Kapslerne udtages af thermostatovnen og bør efterlades ved alm. stuetemperatur i mindst 24 timer for at „sætte sig“.

9. dag

- n) Kapslerne er snitklare.
- o) Efterkonstrastering af de fremstillede ultratynde snit ved farvning med 7,5 % Magnesiumuranylacetat i 30 min. efterfulgt af blycitratfarvning efter Reynolds (18) i 2–4 min.

III. Resultater

Anvendelsen af vakuum ved infiltreringen af vanskeligt gennemtrængeligt plantemateriale har vist sig at være en forbedring af de almindelig anvendte indlejningsmetoder. Der er god bevaring af membransystemerne og af nucleus med indhold. Cytoplasmaet er lejret tæt til cellevæggen, og såvel cytoplasmaorganellerne som deres placering tyder på en naturlig og vellykket indlejring. Der har været god udfyldning af vacuoler, store såvel som små. Snitegenskaberne har været særdeles gode også hos det vanskelige gennemtrængelige plantevæv i sikarregionerne. Kontrasten i snittene har ikke været helt så god som ellers, men dette er helt eller delvis afhjulpel ved at forøge blyfarvningen tidsmæssigt med 25–30 %. Det ville nok være ønskeligt, om også uranylfarvningen kunne forøges tilsvarende (imprægneringsprocessen forøges til 2 el. 3 timer), da den forøgede blyfarvning øger risikoen for udfældninger og giver en lovlig hård kontrast (kornet) med tab af detaljer. Udfældningerne kan delvis afhjælpes ved farvning i petriskål ved tilstedeværelsen af natriumhydroxyd. Forøgelse af

uranylfarvningen tidsmæssigt har ikke været forsøgt i denne undersøgelse.

De opnåede resultater med et bacilleformet virus i *Phalaenopsis* og senere i *Dendrobium* kunne vanskeligt have været gennemført uden vakuumindelejrning (især for *Phalaenopsis*' vedkommende). I snit kunne der påvises viruspartikler (110×30 nm) i parenchymceller i sivævsregionen. Der har ikke kunnet påvises nogen forbedring af indlejrningen i de øvrige væv.

IV. Diskussion

Ved undersøgelsen af et ukendt virus, som ikke kunne påvises ved suspensionspræparater, har den her beskrevne indlejrningsteknik været en værdifuld hjælp og en forudsætning for anvendelsen af en god snitteknik.

Ledningsbanerne i sikarsregionen, der ofte fungerer som transportveje for virusinfektioner, er et naturligt udgangspunkt for snitundersøgelser.

En indlejrning af et sediment fra en centrifugering af infektiøs plantesaft som anført af *Düvel* og *Peters* (17) er en anden metode at finde frem til det ukendte virus. Dette indebærer imidlertid den risiko, at man ved valg af metoder og hastigheder mister viruset undervejs, og at man ikke vil være i stand til at påvise det hverken i sediment eller supernatant. Dette medfører en dobbelt arbejdsgang, som nok giver andre oplysninger om det pågældende virus, men som i første omgang synes unødvendige for at påvise det. Det bacilleformede virus, der er beskrevet i dette arbejde, har vist sig ret let at påvise, fordi viruspartiklerne danner karakteristiske „spokewheel“ formationer i cytoplasmaet. Desuden er dette virus et af få, som kan påvises intranucleært, se fig. 1. Det kan fortrinsvis påvises tæt ved den indre side af kernemembranen. Partiklerne i nucleus er tilsyneladende uden proteinkappe, medens man i cytoplasmaet også finder intakte partikler samt de omtalte „spokewheel“ formationer indlejret i dobbelt membransystemer (fig. 2). Som det ses på fig. 3 og 4 er der en vis sammenhæng imellem partiklerne og de om-

råder, hvor endoplasmatisk retikulum er åbnet (6). Her findes der meget ofte intakte partikler.

V. Konklusion

Vakuumindelejrningen har gjort det muligt at påvise et ukendt virus i *Phalaenopsis* (og *Dendrobium*). Indtrængningen af indlejringsmidlet er væsentlig forbedret. Kontrasteringen måtte forbedres ved at øge blyfarvningen tidsmæssigt 25–30 %. Den øgede arbejdsbyrde har været minimal, og resultaterne tilfredsstillende. Snit egenskaberne i de vanskelige områder har været særdeles gode, og det har været medvirkende til at finde et virus, som har været meget vanskeligt at påvise med suspensionsteknik og almindelig indlejringsmetoder. For en plante som *Phalaenopsis* har den omtalte metode været helt afgørende for en tilfredsstillende indlejrning. Illustrationerne viser de opnåede resultater med vakuumindelejrning.

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

Summary

Vakuum used during infiltration of Spurr's Epon embedding material has improved the results in sections of *Phalaenopsis* ploem and sieve tube areas, by experience causing difficulties. A bacilleformed virus not yet named and here spoken of as "Phalaenopsis virus" is found in the sieve tube areas, in nucleus and in cytoplasm as single and double particles and spokewheel inclusions. When endoplasmatic reticulum is broken, virusparticles are often seen. This could lead to the hypothesis that internuclear particles are closely related with this membran system. The staining with lead citrate in accordance with Reynold is increased 30 % in time, to obtain a good contrast.

Litteratur

1. Barnett, R. J., D. D. Sabatini and K. Bench (1963): Cytochemistry and electron micro-

- scopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19.
2. *Begtrup, J.* (1971): Elektronmikroskopiske undersøgelser af plantevira. *Tidsskr. f. Planteavl* 75, 4, 563-76.
 3. *Caulfield, J. B.* (1957): Effects of varying the vehicle for O_3O_4 in tissue fixation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 827-30.
 4. Commonwealth Mycological Institute and Association of applied Biologists Descriptions of Plant Viruses.
 5. *Freemann, B. O.* and *B. O. Spurlock* (1962): A new Epoxy embedding for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 13, 462.
 6. *Herald, F.* and *K. Munz* (1965): Electron microscopic demonstration of viruslike particles in *Penegrinus maidii* following acquisition of maize mosaic virus. *Virology* 25, 412-17.
 7. *Hills, G. J.* and *A. Plaskitt* (1968): A protein stain for electron microscope of small isometric plant viruses particles. *J. Ultrastruct. Resch.* 25, 323-29.
 8. *Glauert, A. M., E. Rogers* and *R. H. Glauert* (1956): A new embedding medium for electron microscopy. *Nature* 178, 803. (Se også *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 191-94, 1958).
 9. *Karnowsky, M. J.* (1965): A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27, 137.
 10. *Lesemann, D.* and *J. Begtrup* (1971): Elektronmikroskopische Nachweis eines bacilliformen Virus i *Phalaenopsis*. *Phytopath. Z* 71, 257-69.
 11. *Luft, J. H.* (1956): Permanganate fixation for electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 799-802.
 12. *Luft, J. H.* (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *Journ. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-14.
 13. *Luft, J. H.* (1959): The use of Acreolin as a fixative for light and electron microscope. *Anat. Record* 133, 305.
 14. *Mc. Lean, J. D.* (1958): Fixation of plant tissues. 4th. intern. Conf. Electron microscope. Berlin 2, 27.
 15. *Newmann, S. B., E. Borysko* and *M. Swerdlow* (1949): Butylmethacrylate as embedding material for electron microscopy. *J. Research Nat. Bur. Standards* 43, 183.
 16. *Palade, G. E.* (1962): A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95, 285-98.
 17. *Peters, R. K.* and *D. Düvel* (1971): Virus-ähnliche Partiklen in *Dendrobium antennatum* Ltd. *Gartenwelt* 52-54.
 18. *Petzold, H.* (1971): Der elektronmikroskopische Nachweis eines bacilliformen Virus an blattfelckenkranken *Dendrobium*. *Phytopath. Z.* 70, 43-52.
 19. *Reynolds, E.* (1963): The use of lead citrate at high pH, as electron opadque stain in electron micropopy. *J. Cell. Biol.* 17, 208-12.
 20. *Ryter, A.* and *E. Kellenberger* (1958): L'inclusion an polyester pour l'ultramicrolaire. *J. Ultrastr. Res.* 2, 200-214.
 21. *Spurr, A. R.* (1969): A low-viscosity epoxy-resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastra. Res.* 26, 31-43.
 22. *Watson, M. L.* (1958): Staining of tissues sections for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475.

Manuskript modtaget den 13. april 1972.

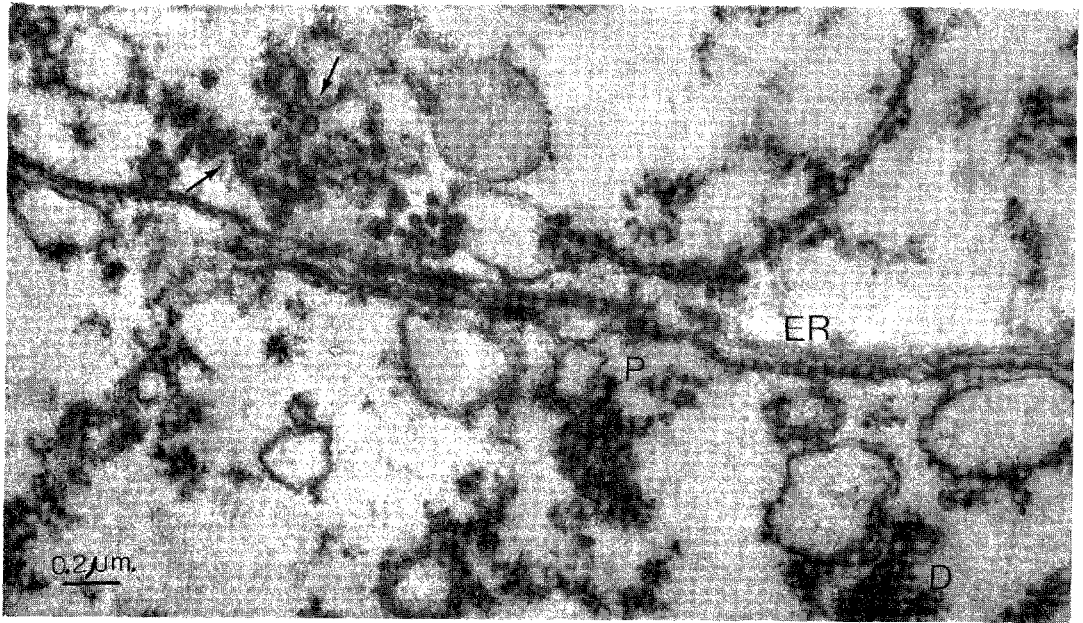


Fig. 3. Tværsnit af bacilleformede viruspartikler i cytoplasmaet i umiddelbar nærhed af »åbnet« endoplasmatisk reticulum (ER) P længdsnit af partikler. D. Dictyosom. Pilene viser de tværnittede partikler. Fra parenchymcelle i sivævsregionen fra *Phalaenopsis*. × 39.000.

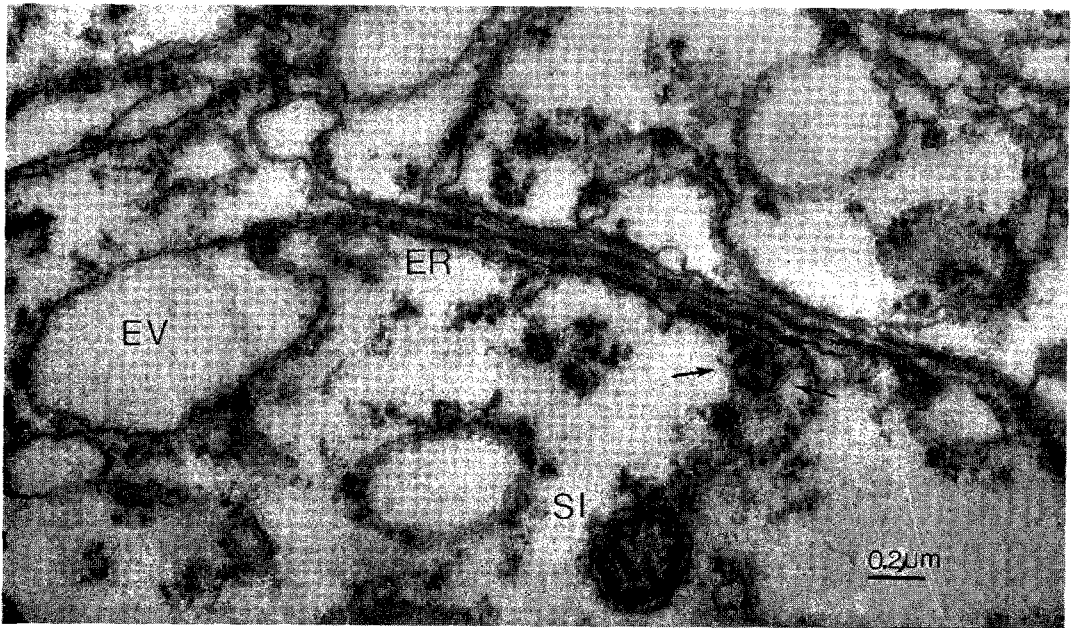


Fig. 4. Samme som fig. 5. Også her er viruspartiklerne mærket med pile ved det »åbne« endoplasmatiske reticulum (ER). Spokewheel inklusion (SI) og endoplasmatisk vesicle (EV). × 39.000.

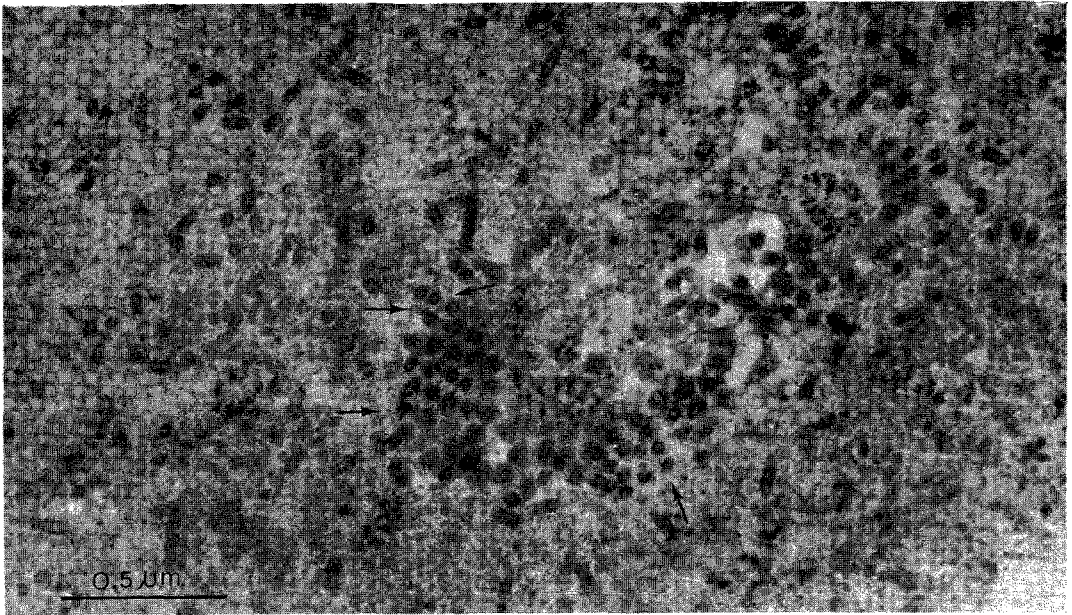
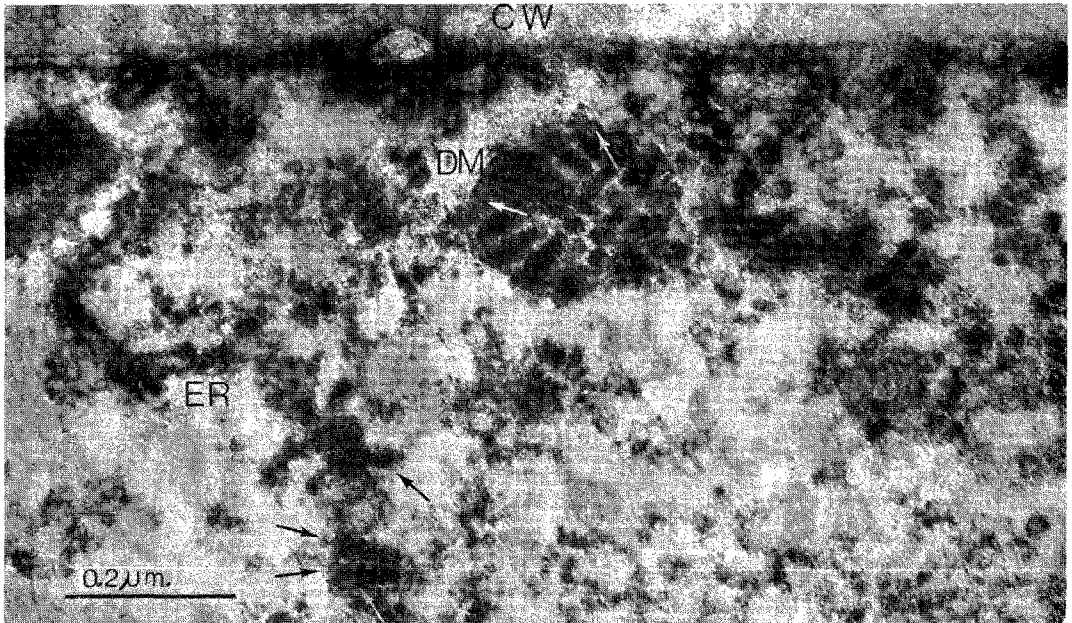


Fig. 1. »Phalaenopsis virus« i nucleus. Viruspartikler 110×30 nm ses som nøgne partikler spredt i nucleoplasmaet. Pilene viser tværsnit af partikler (fra Phalaenopsis). $\times 43.000$.



Figur 2. Spokewheel inklusion i nærheden af cellevæg (CW). Der ses endoplasmatisk reticulum (ER) med tilhæftede længdesnittede viruspartikler (pile) viruspartiklerne er opsvulmede i tilhæfningspunkterne (ydersiden). De hvide pile viser den dobb. membran (DM) som omslutter spokewheel inklusionen (fra Phalaenopsis). $\times 53.000$.