



SVERIGES
LANTBRUKSUNIVERSITET

VÄXTSKYDDS- NOTISER

Nr 2 1995, Årgång 59



Tema: Virusforskning i Norden

Program

Växtskyddsnotiser vill stimulera kunskapsuppbyggnad, idéutbyte och debatt kring växtskyddsfrågor i vid bemärkelse.

Den vänder sig till en bred läsekrets med intresse för nordiskt växtskydd och med behov av att följa utvecklingen inom den tillämpade forskningen och försöksverksamheten.

Växtskyddsnotiser presenterar översiktsartiklar om aktuella ämnen på växtskyddsområdet liksom originaluppsatser med resultat från forskning och försök. Den förmedlar inblickar i pågående forskning och iakttagelser från odling, rådgivning och växtinspektion. Den refererar också doktorsavhandlingar, examensarbeten, konferenser, internationell publicering och ny litteratur.

Växtskyddsnotiser publicerar artiklar på de skandinaviska språken och på engelska. Vi vill gärna öka informationsutbytet över gränserna och välkomnar därför särskilt artiklar från våra grannländer.

Tidskriften utkommer med 4 nummer per år.

VÄXTSKYDDSNOTISER

Utgivna av Sveriges lantbruksuniversitet, SLU Info/Växter

Ansvarig utgivare: Snorre Rufelt

Redaktör: Eva Sandnes Ronquist (t.j.), Erik Köpmans och Nora Adelsköld (vik.)

Redaktionens adress: SLU Info/Växter, Box 7044, 750 07 Uppsala

Telefon: 018 - 67 23 69, Telefax: 018 - 67 28 90, Datorpostadress: Erik.Kopmans@info.slu.se

Prenumerationsavgift för 1995: 200 kronor exkl. moms, totalt 250 kronor.

Även lösnummer kan beställas à 55 kronor exkl. moms och porto.

Prenumerationsärenden: SLU Info/Försäljning, Box 7075, 750 07 Uppsala

Telefon: 018 - 67 11 00, Telefax: 018 - 67 28 54

Omslagsbild: Målning av den nederländske konstnären Ambrosius Bosschaert d.ä. 1573–1621. Observera de strimmiga tulpanerna. Se vidare artikeln "Vad är virus? -en historia byggd på växtvirologins utveckling".

Förord

Tema för detta nummer av Växtskyddsnotiser är "Virusforskning i Norden". Virusjukdomar, dess spridning och bekämpning är ett stort område inom växtskyddet, och virusforskningen ett viktigt ämnesområde som vi på detta sätt vill lyfta fram och belysa. Vi har artiklar som beskriver såväl virusforskningens utveckling och historia, som glimtar av det som är aktuellt på de olika institutionerna runt om i Norden.

Vi är mycket glada över det goda gensvar vi fått från nordiska forskare, och jag vill framföra vårt hjärtliga tack till samtliga författare som bidragit med artiklar. Det är vår förhoppning att författarna känner att de får något tillbaka i kontakten med läsarna av Växtskyddsnotiser.

Jag vill också passa på att hälsa Erik Köpmans välkommen som vikarierande redaktör för Växtskyddsnotiser under ordinarie redaktörens tjänstledighet återstoden av 1995.

Snorre Rufelt

Virus på hagebruksvekster i Norge

Dag-Ragnar Blystad

Hagebruksvekstene utgjør en stor gruppe av forskjellige planter og tilhørende virusproblemer. På Planteforsk, Plantevernet i Ås, Norge, har det de siste årene pågått flere prosjekter angående virus i blomster, bær, grønnsaker og grøntanleggsplanter.

Mye av arbeidet har dreid seg om tilpassing/utvikling av diagnosemetoder og testing for virus i forbindelse med fremavl av friskt plantemateriale og testing i forbindelse med forekomst av farlige skadegjørere. De siste fem årene har det blitt arbeidet med flere forskjellige virus/vekstkombinasjoner.

Pelargonium

Pelargonium er med i fremavlssystemet. Undersøkelser viste at pelargonium-blomsterspetning-virus (pelargonium flower-break virus) var vanlig forekommende. Vi har fremstilt et antiserum mot dette viruset og optimalisert immunosorbent elektronmikroskopi for å teste for dette viruset i pelargonium (Blystad 1993a).

Julebegonia

Julebegonia (*Begonia x cheimantha*) er en avholdt juleblomst i Norge. Det har blitt arbeidet med å identifisere/karakterisere noen virusisolater som har blitt isolert fra enkeltplanter med viruslignende symptomer. Det har blitt isolert et potyvirus og et kuleforma virus som foreløpig ikke har kunnet identifiseres som noe som er beskrevet tidligere (Blystad 1995b).

Stjerneklukke

Stjerneklukke (*Campanula porscharskyana*) har blitt tatt opp i fremavl. Det viste seg imidlertid at den blå sorten var infisert av tomatsvartringvirus (tomato black ring virus) og den kvite sorten var infisert av et kuleformet virus og et carlavirus



Mosaikk i julebegonia (*Begonia x cheimantha*), sannsynligvis forårsaket av et potyvirus. - *Mosaic in Begonia x cheimantha, probably caused by a potyvirus.*

(Blystad 1993c). Den blå sorten har blitt rensert ved hjelp av meristemskjæring og utvalg. I den kvite sorten var det mulig å finne virusfrie planter ved utvalg uten forutgående meristemskjæring. Carlaviruset har blitt nærmere beskrevet av Bracklo (1994).

Bringebær

Virussyntomer er svært fremtredende på bringebær i enkelte viktige dyrkingsområder. For å finne ut mer om forekomsten av det pollenoverførte viruset bringebær-dvergbuskvirus (raspberry bushy dwarf virus) i Norge, gjorde en hovedoppgavestudent en kartlegging ved å samle inn prøver fra hele landet og teste disse ved hjelp av ELISA. Det ble påvist virus i en rekke fylker og sorter. Størst var forekomsten i Sogn og Fjordane i sorten 'Veten' (Mittet 1994).

Melon-nekroseflekkvirus

Dette viruset har i flere år gjort skade i veksthus-agurk i et gartneri. Det har blitt utført en hovedoppgave på identifisering, vektoroverføring, smitteveier, etc (Nes 1993).

Grøntanleggsplanter

Plantevernet har vært engasjert i arbeid med å undersøke hva slags skadegjørere som følger med importerte og norskproduserte grøntanleggsplanter. Vi har i den sammenheng arbeidet

spesielt med å kartlegge virusforekomst i Clematis og stauder (Blystad 1993b, Borgeraas 1991, Netland et al 1995)).

Tomatbronsetoppvirus

Vi har arbeidet med påvisning av tomatbronsetoppvirus (tomato spotted wilt virus) i Dahlia og andre vekster der en har hatt mistanke om infeksjon av dette viruset. Det har heldigvis ikke vært noen spredning av dette viruset i handelsgartnerier ennå.

Immunosorbent elektronmikroskopi (ISEM)

Plantevernet hadde et forskningsrådprosjekt i perioden 1991–94 på utvikling og tilpassing av denne ISEM-teknikken. Vi har arbeidet med å optimalisere testen til testing av pelargonium for pelargonium-blomsterspetningvirus og ellers andre virus/vertplantekombinasjoner der denne teknikken er fordelaktig (Blystad 1995a, Blystad et al 1995, Næss et al. 1995).

Litteratur

- Blystad, D. -R. 1993a. Fremavlssystemet for pelargonium - forbedret virustesting. *SFFL, Faginno nr. 3*, 237–239.
- Blystad, D. -R. 1993b. Internasjonal handel med grøntanleggsplanter – orientering om virusundersøkelsen. *SFFL, Faginno nr. 3*, 240–243.
- Blystad, D. -R. 1993c. Virus i stjerneklukke. *SFFL, Faginno nr. 3*, 244–245.
- Blystad, D. -R. 1995a. Elektronmikroskopi for identifisering av plantevirus. *SFFL, Faginno nr. 3*, 90–98.
- Blystad, D. -R. 1995b. Potyvirus i julebegonia – et nytt virus? *SFFL, Faginno nr. 3*, 263–264.
- Blystad, D. -R., Næss, V. & Haugslie, S. 1995. Optimising immunosorbent electron microscopy for the detection of pelargonium flower-break virus in pelargonium. (Innsendt til *EPPO Bulletin*).
- Borgeraas, M. 1991. *Jordboende plantepatogener på vedaktige grøntanleggsplanter importert med klump/kar*. Hovedoppgave ved Norges Landbrukshøgskole/Statens Plantevern. 79 ss.
- Bracklo, K. -U. 1994. *Karakterisering, identifisering og epidemiologiske studier av et carlavirus isolert fra hvit stjerneklukke (Campanula porscharskyana Degen)*. Hovedoppgave ved Norges Landbrukshøgskole/Statens Plantevern. 83 ss.
- Mittet, M. 1994. *Utbredelse av bringebær-dvergbuskvirus i Norge*. Hovedoppgave ved Norges Landbrukshøgskole/Statens Plantevern. 85 ss.

- Nes, B. 1993. *Melon-nekroseflekkvirus på agurk (Cucumis sativus L.)*. Hovedoppgave ved Norges Landbruks-høgskole/Statens Plantevern. 74 ss.
- Netland, J., Blystad, D.-R., Semb, L., Hofsvang, T. & Knudsen, R. 1995. *Internasjonal handel med grøntanleggplanter og spredning av skadegjørere*. Rapport. Planteforsk, Plantevernet. 66 s.
- Næss, V., Truve, E., Blystad, D.-R., Mækinen, K., Järvekölg, L., Tamm, T. & Munthe, T. 1995. Detection of cocksfoot mottle virus particles and RNA in artificially infected oat plants by various immunological, genetical and electron-microscopical techniques using poly- and monoclonal antibodies and virus specific cDNA probes. (sendt til *Journal of Phytopathology*).

Blystad, D. -R. 1995. Virus on garden plants in Norway. *Växtskyddsnotiser* 59: 2, 32–34.

Abstract

Garden plants consists of numerous species with appurtenant virus diseases. Several studies on e.g. pot plants, raspberries, cucumbers and tomatoes are carried out at the Plant Protection Centre of the Norwegian Crop Research Institute at Ås, Norway.

Melon-nekroseflekkvirus i agurk

Dag-Ragnar Blystad & Bjørg Nes

Bladnekroser i veksthusagurk viste seg å være forårsaket av et kuleformet virus som bare infiserte planter i gresskarfamilien (*Cucurbitaceae*). På grunnlag av partikkelform, serologisk slektskap (immunosorbent elektronmikroskopi), spredningsmåte (jordboende) og vertplantekrets, er viruset identifisert som melon-nekroseflekkvirus (melon necrotic spot virus).

Melon-nekroseflekkvirus (melon necrotic spot virus), MNFV, har forårsaket skade på agurk dyrket i steinull eller jord i Nederland og England (Bos et al. 1984, Tomlinson & Thomas 1986). Blant de nordiske landene er viruset påvist i Sverige der det har gjort skade i melon (Rydén & Persson 1986).

Dette viruset spres av soppen *Olpidium radicale* og infiserer nye planter gjennom røttene. En kan imidlertid ikke utelukke at det kan skje noe smitting fra plante til plante ved stell av kulturen.

I en agurk-kultur på Østlandet oppstod det på slutten av 80-tallet nekrotiske symptomer i bladene. Dyrkeren hadde sett symptomer i flere år før vi påviste virus. Denne virussjukdommen har blitt nærmere undersøkt i et hovedoppgavearbeid (Nes 1993).

Materiale og metoder

Det ble hentet bladprøver, veksttorv og rotmasse fra gartneriet hos dyrkeren. Bladprøver ble inokulert til *Chenopodium quinoa* og agurk (*Cucumis sativus* 'Farbiola') i første omgang. Senere ble virusisolatet inokulert til en videre krets av testplanter.

Elektronmikroskopi og immunosorbent elektronmikroskopi (Milne & Luisoni 1977) ble benyttet for å undersøke viruspartiklens form og serologisk slektskap. Rotvev ble undersøkt for sporer av *Olpidium radicale* ved hjelp av lysmikroskopi.

D. Maat ved IPO (Wageningen, Nederland) var velvillig og forsynte oss med antiserum mot tobaknekresevirus (tobacco necrosis virus), TNV ('soil') og MNFV.

Resultater

Sjukdomsbeskrivelse

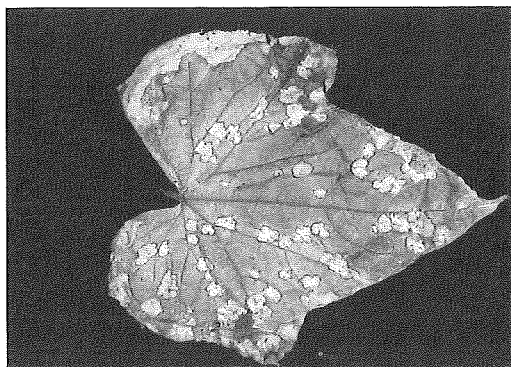
MNFV har bare blitt påvist i ett gartneri. I dette gartneriet dyrkes det agurk i flere veksthus, men angrep med tydelige bladsymptomer er mest utpreget i ett av husene der det dyrkes agurk fra februar til november med en omplanting i månedsskiftet juni–juli.

Plantene dyrkes i torvbedd på betong-underlag. Torva skiftes etter hver sesong og huset vaskes og desinfiseres med formalin. Vanningsvannet kommer fra egen dam omlag 100 meter fra veksthusene.

Det opptrer først og fremst symptomer på høstholdet. Symptomene starter gjerne med små, lysegrønne flekker som senere blir nekrotiske. De nekrotiske flekkene vokser slik at til slutt hele bladet visner. Forekomsten av infiserte planter varierte i huset. Det kunne forekomme spredte planter i rekkene som var infisert. Ofte to, tre infiserte, deretter friske før neste gruppe med infiserte planter.

Jordsmitte

Torv med rotmasse fra områder i torvbeddet der det stod smitta planter ble blandet inn i pottjord. Når vi sådde agurk i disse pottene med smitte, utviklet agurkplantene typiske MNFV-symptomer.



Nekroser i agurk forårsaket av melon-nekroseflekkvirus. - *Melon necrotic spot virus in cucumber.*

Saftinokulering og testplanter

Saftinokulering av infisert bladmateriale til agurk (*Cucumis sativus*) førte til at agurkplanta ble infisert lokalt i inokulerte frøblad og senere systemisk og utviklet lignende symptomer som de orginalverten hadde. Følgende sorter av agurk ble inokulert og viste symptomer: 'Levo', 'Rhinsk Drue', 'Farbiola', 'Crispy Salad', og 'True French'.

Følgende arter og sorter ble bare infisert lokalt: *Citrullus vulgaris* 'Sugar Baby' og *Cucumis melo* 'Minnesota Midget'.

Følgende arter og sorter ble ikke infisert i det hele tatt: *Brassica campestris*, *Chenopodium quinoa*, *Cucurbita pepo* 'President', 'Pyntegresskar', 'Vegetable Marrow' og 'Cream of the crop', *C. maxima* 'Kjempemelon', *Cucurbita ficifolia*, *Lactuca sativa* 'Patty', *Nicandra physalodes*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis* -37B, *N. megalosiphon*, *N. tabacum* 'Xanthi', *Pisum sativum* 'Kelvedon Wonder', *Tetragonia expansa* og *Vicia faba* 'Pirhonen'.

Elektronmikroskopi

Negativ farging av viruspreparater viste at viruset hadde kuleformede partikler ca 30 nm i diameter. Virusisolatet reagerte positivt med antiserumet mot MNFV fra Nederland, men ikke med antiserum mot TNV.

Vektor

Ved undersøkelse av røttene fant vi sporer som lignet sporene som *O. radiale* danner, både kvilesporer, zoosporangier og zoosporer.

Diskusjon

Testplantereksjonene er lik de som er beskrevet for MNFV hos Bos et al (1984). Partikkelform og størrelse er også lik det som er beskrevet for dette viruset. Når vi også finner en positiv reaksjon med antiserumet mot MNFV som er lagd i Nederland, tyder det på at det er MNFV vi har isolert fra de nekrotiske agurkplantene.

Det er ukjent hvordan smitten kan ha etablert seg i det gartneriet der den finnes. Vi kjenner ikke til alternative vertplanter for dette viruset. Det er kjent at *O. radiale* kan infisere mange slags plantearter (Lange & Insunza 1977). Det kan derfor være at det finnes en ukjent, alternativ vertplante også for MNFV blant ville vekster eller ugras. Det kan også være at smitten kan ha kommet inn i gartneriet lang tid tilbake ved smittede planter eller frø, og at smittenivået har bygd seg opp over år til det nå forårsaker økonomisk skade.

Litteratur

- Bos, L., van Dorst, H. J. M., Huttinga, H. & Maat, D. Z. 1984. Further characterization of melon necrotic spot virus causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Netherlands journal of plant pathology* 90, 55–69.
- Lange, L. & Insunza, V. 1977. Root-inhabiting *Ospidium* species: the *O. radiale* complex. *Trans. Br. mycol. Soc.* 69, 377–384.
- Milne, R. G. & Luisoni, E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in virology* 6, 265–281.

- Nes, B. 1993. *Melon-nekroseflekkvirus på agurk (Cucumis sativus L.)*. Hovedoppgave ved Norges Landbruks-høgskole/Statens Plantevern. 74 ss.
- Rydén, K. & Persson, P. 1986. Nekrosfläcksjuka hos melon – en ny virusjukdom i Sverige. *Växtskyddsnotiser* 50, 130–132.
- Tomlinson, J. A. & Thomas, B. J. 1986. Studies on melon necrotic spot virus disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Ospidium radiale*). *Annals of applied biology* 108, 71–80.

Författare

Dag Ragnar Blystad er hagebrukskandidat (hortonom) og tok dr. scient-graden i 1988 i plantepatologi med hovedvekt på plantevirologi. Bjørg Nes er hagebrukskandidat. Hun arbeidet med melon-nekroseflekkvirus i sitt hovedoppgavearbeid.

Planteforsk, Plantevernet
Fellesbygget, 1432 Ås
NORGE
Telefon: +47 64 94 9400

Blystad, D. -R. & Nes, B. 1995. Melon necrotic spot virus in cucumber. *Växtskyddsnotiser* 59: 2, 35–37.

Abstract

Leaf necroses in greenhouse cucumber was shown to be caused by a spherical virus only infecting species in the *Cucurbitaceae* family.

After studies of particle shape, serological relationships (immunosorbent electron microscopy; ISEM), virus transmission and the range of host plants the virus was identified as the melon necrotic spot virus, MNSV.

Virus Research at the Danish Institute of Plant and Soil Science

Merete Albrechtsen, Elisabeth Johansen, Gorm Palmgren,
Karen Bech, Karen Husted & Steen Lykke Nielsen

The major part of the plant virus research in Denmark is carried out at the Danish Institute of Plant and Soil Science, partly in Department of Plant Pathology and Pest Management, and partly in the Biotechnology Group. These two departments share buildings and facilities in Lyngby and collaborate closely.

The virus research at the Department of Plant Pathology and Pest Management is oriented both towards horticultural and agricultural virus diseases.

Ornamental plants and vegetables

The research comprises viruses in pot plants, bedding plants, herbaceous perennials and vegetables grown in the greenhouse and outdoors. Research projects are initiated according to demand; at the moment especially *Kalanchoë* and *Euphorbia* are investigated.

Production of nuclear stock plants

The Danish Institute of Plant and Soil Science has through many years built up a testing system for production of nuclear stock plants free from specified pathogens: from comparative trials the best clone, genetically stable and true to type, is chosen and from this plant a cutting is established

under strict hygienic conditions often in a specialized firm selling certified cuttings to growers. Stem and leaf material just below the established cutting is tested according to the official rules given by the Plant Directorate. Testing demands might include specified viruses, bacteria, fungi and pests, depending on the actual plant species. The candidate material is repeatedly tested at several time intervals to ensure there are no latent infections before the material is approved as a nuclear stock plant. Nuclear stock plants are renewed after a certain schedule, and every time retested for pathogens. The stock plants are regularly inspected for symptoms and randomly taken samples are tested.

Virus tests are performed as inoculation to indicator plants or serological tests, ELISA or ISEM. Often a combination of the methods is used. If a variety turns out to be totally infected with a virus meristem tip-culture, often in combination with heat treatment, is used to eliminate the virus.

Diagnosis of virus diseases

Plants with virus-like symptoms are received from the advisory service, the Plant Directorate and growers and tested by the abovementioned methods to establish the cause of symptoms.

Associations of growers who make comparative trials to find new plant varieties send material to be tested for tomato spotted wilt virus (TSWV/INSV) before establishing the cuttings. Denmark has been a protected zone in EU for this virus since 1993 which means that TSWV/INSV are not found in Denmark.

Antiserum is produced and new and more sensitive methods are introduced, e.g. a PCR testing system for TSWV/INSV is being investigated.

Euphorbia pulcherrima

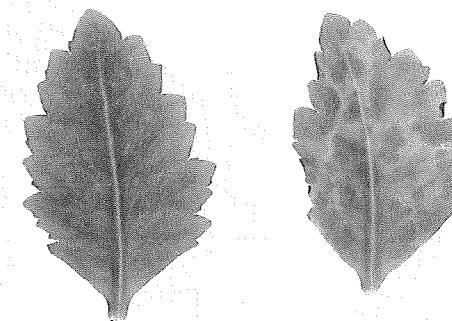
In the variety 'Freedom' Poinsettia mosaic virus (PnMV) was eliminated by meristem-tip culture. An antiserum has been raised against PnMV. Further research on the branching factor as well as the influence of PnMV infection on plant growth is carried out.

Kalanchoë blossfeldiana

A growth reduction and systemic mosaic is registered in many varieties showing characteristic 'green islands'. A new virus, Kalanchoë mosaic potyvirus (KMV), has been isolated as the causing agent (Husted et al. 1994).

All varieties of *Kalanchoë blossfeldiana* are susceptible to KMV but latent infections are seen especially in varieties with thick-skinned dark green leaves. Symptom expression varies with season being most distinct in periods of vigorous growth and in young plants. After mechanical inoculation several *Kalanchoë spp.* were latently infected with KMV, but comprehensive screening for natural infection in these species has not been carried out.

Antiserum has been raised against the virus and ELISA is recommended for routine testing.



Kalanchoë blossfeldiana 'Attraction'. Left: Healthy leaf. Right: leaf systemically infected with Kalanchoë mosaic potyvirus (KMV).

In collaboration with the Danish Kalanchoë growers, a project is running with the aim to establish KMV free stock material.

KMV is spread by aphids and in cuttings from infected motherplants. Another potential, but as yet unproved, source is recirculating water systems. The importance of the different ways of spread is now under investigation.

Agricultural crops

The main activity is research on viruses in potato while for other agricultural crops the department will perform tests as required with special attention towards quarantine viruses, as for example beet necrotic yellowing vein virus and barley yellow mosaic virus. The last one was in fact, along with barley mild mosaic virus, recorded for the first and only time in Denmark in 1992.

The research projects on potato viruses comprise spraing in tubers, potato virus Y and The Danish Potato Nuclear Stock Collection.

Spraing in tubers

Spraing caused by tobacco rattle virus (TRV) and potato mop-top virus (PMTV) is a big problem in Danish potato growing. In recent years the research has been focused on PMTV. Polyclonal antiserum has been produced and a test of soil samples using bait plants has been established.

Danish isolates of PMTV have been characterized biologically, the distribution of spraing caused by PMTV in Denmark has been mapped and the influence of physiological age of tubers, the temperature during wound healing and storage period on development of spraing have been investigated (paper in preparation).

The susceptibility of different potato cultivars to spraing caused by TRV and PMTV has been characterized for years in field trials (Nielsen & Engsbro 1992). Work will be started this year to develop a semifield test comprising a method to multiply the two virus infected vectors.

Detection of TRV and PMTV by polymerase chain reaction (PCR) should be started this year.

Potato virus Y (PVY)

The Department takes part in an EU-project: 'The direct detection of virus by means of a polymerase chain reaction based method in dormant tubers of *Solanum tuberosum* to improve the quality of the crop'. The main objective of the project is accordingly to develop a system to detect the most important viruses directly in dormant potato tubers. At the moment most tests are made on shoots after artificial breaking of dormancy. It is a labour intensive and expensive method and along with this, the sensitivity is not always that high. Six different laboratories take part in the EU-project and each laboratory works on one or two viruses. We are dealing with one of the most important potato viruses, namely PVY. We have designed primers specific for PVY and are now testing them on different kinds of material. Since the PCR procedure has to be standardized and adapted for routine testing, much of the effort will be concentrated on this aspect.

The tuber necrosis ringspot strain of potato virus Y (PVY) has become an increasing problem in Denmark in recent years. Danish isolates have been collected and compared with foreign isolates with respect to their symptom expression in indicator plants. Some differences have been recorded. We have not yet succeeded in producing

necrotic ringspots in tubers of healthy potato plants inoculated with isolates of PVY, NTN but a new attempt will be made in 1995.

The Danish Potato Nuclear Stock Collection

The collection is situated at the department. The programme consists of three parts:

1. Establishment of meristem tip cultures of new potato cultivars entering the collection and testing them for viruses and viroids.
2. Maintenance of a collection of about 70 potato varieties as in vitro plants.
3. Production of in vitro plants to be used in production of first generation of pathogen free seed tubers.

Further work will concentrate on establishment of serological tests of South American quarantine viruses.

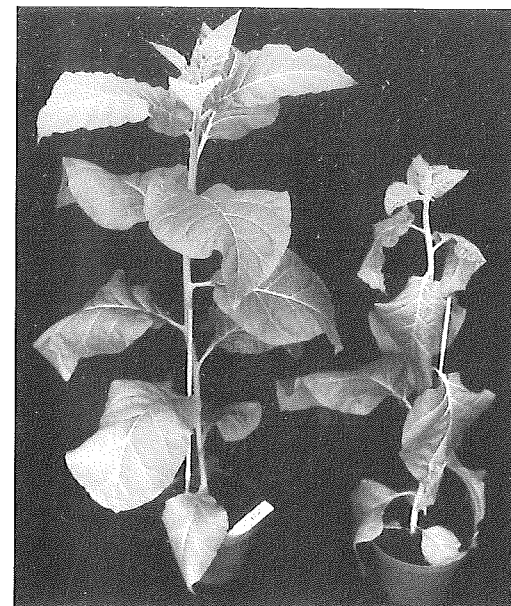
Genetic engineering

Most of the work in the Biotechnology Group deals with molecular plant breeding (genetic engineering). Some of our projects are directly aimed at producing transgenic plants with improved characteristics, while other projects start at a more basic level by trying to identify the genes and gene products responsible for certain traits.

About 40% of our resources are spent on virus research. At present we are concentrating on two potyviruses, potato virus Y (PVY) and pea seedborne mosaic virus (PSbMV).

Genetically engineered virus resistance

A significant part of our virus work is aimed at developing and testing new strategies for genetically engineered virus resistance. The starting point for this work is the observation, that transgenic plants expressing a virus gene often show resistance against the virus from which the gene is derived.



Tobacco plant transformed with the PVY coat protein gene (left) or normal control plant (right), 4 weeks after inoculation with PVY. The transgenic plant shows no virus symptoms.

We have introduced the coat protein gene from PVY strain N into the Danish potato cultivar 'Folva' and have obtained at least four independent transgenic lines with a high degree of resistance against all PVY isolates tested.

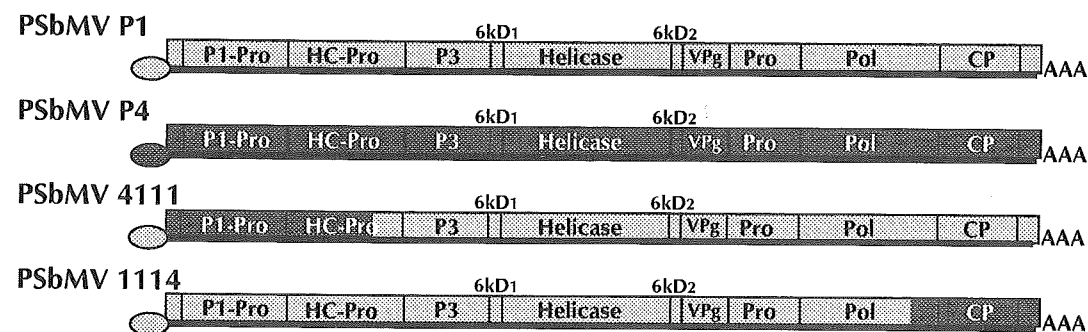
It is still not clear why the expression of a virus gene in a plant can make the plant virus resistant, but it seems that different mechanisms may be operating in the case of different viruses. Several studies suggest that for potyviruses and a few

other virus groups, the resistance is caused by the RNA transcript of the inserted gene, which somehow induces a virus-specific RNA-degrading mechanism, rather than by the protein product of the transgene. Examples of virus resistance caused by untranslatable virus genes (which carry a mutation that prevents the protein from being produced) have been reported. This is interesting for two reasons: First, transgenic plants that only produce a foreign RNA but no foreign protein, might be more acceptable to consumers and might more easily be approved by the authorities for practical use. Second, the postulated RNA-degrading mechanism is interesting as a biological phenomenon and could be relevant to some of the unexpected results seen with transgenic plants (the so-called co-suppression effect, where an inserted gene may stop being expressed when plants are made homozygous or when several gene copies are inserted at once).

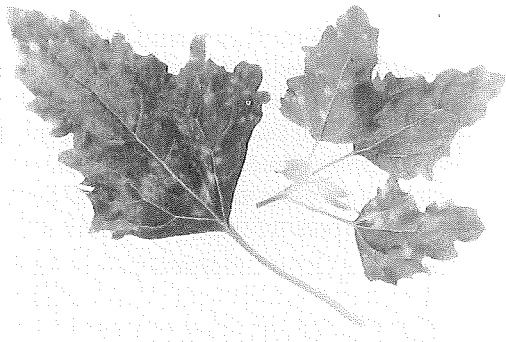
We are now studying these phenomena by introducing translatable and untranslatable versions of several genes from PSbMV into *Nicotiana benthamiana* and, as part of an EU collaboration, into pea. Furthermore, we are experimenting with the effect of producing modified coat proteins in transgenic plants, the idea being to interfere with either the coating or uncoating of the infecting virus.

Plant/pathogen interactions

Using PSbMV as a model system, we are studying seed transmission, systemic transport, and specific



Genome map of PSbMV P1 (light gray), P4 (dark grey), hybrid 4111 and hybrid 1114. PSbMV P1 and hybrid 4111 infect *Chenopodium quinoa* systemically. P4 and hybrid 1114 cause only local infection of the inoculated leaf.



Symptoms induced by PSbMV P1 on uninoculated systemically infected leaves of *C. quinoa*.

resistance as well as non-host resistance. Our main approach is to use gene technology to produce hybrids between PSbMV isolates, which differ in their ability to be seed transmitted, to systemically infect certain host plants, etc. By analysing the phenotype of the hybrids, we can identify the virus genes that govern these characteristics.

So far, we have identified the virus genes that determine the seed transmission rate in pea, and the gene that interacts with the specific PSbMV resistance gene *sbm1* in pea. Our next goal will be to identify the plant proteins and genes that interact with the virus genes and gene products. Eventually, this knowledge should make it possible to design new strategies for creating virus resistance based on manipulating or mimicking the natural resistance mechanisms of the plants.

Diagnostica

We also produce reagents for antibody-based or DNA-based assays for viruses and viroids and carry out such tests as required (e.g. screening for potato spindle tuber viroid), though these activities are increasingly being transferred to our colleagues in Department of Plant Pathology and Pest Management.

Litterature

- Husted, K., Bech, K., Albrechtsen, M., and Borkhardt, B. 1994. Identification, partial sequencing, and detection of a potyvirus from *Kalanchoë blossfeldiana*. *Phytopathology* 84, 161-166.
- Nielsen, S.L. & Engsbro, B. 1992. Susceptibility of potato cultivars to spraing caused by primary infection of Tobacco Rattle Virus and Potato Mop-Top Virus. *Danish Journal of Plant and Soil Science*, 96, 507-516.

Address

Statens Planteavlfsforskning
Lottenborgvej 2
2800 Lyngby, DENMARK
Tel. +45 45 87 2510

The Biotechnology Group:
Merete Albrechtsen
Elisabeth Johansen
Gorm Palmgren

Department of Plant Pathology and Pest Management:
Karen Bech
Karen Husted
Steen Lykke Nielsen

Plant viruses at the University of Helsinki, Finland

Jari Valkonen

Several lines of research on plant viruses have been developed at the University of Helsinki since 1990, mainly at the Department of Plant Production (Institutionen för växtproduktion) and the Institute of Biotechnology. Most of the studies are concentrated on potato viruses.

Studies at the Department of Plant Production

The two main programs on plant viruses are molecular biology of potato virus Y (PVY) and engineered resistance to PVY in potato (Tuula Pehu, Tuula Mäki-Valkama and professor Eija Pehu), and natural genes and mechanisms for resistance to viruses in potato (Jaana Hämäläinen, Ulla Malkamäki and Dr. Jari Valkonen). PVY has been chosen for studies due to its intrinsic importance in domestic and global potato production.

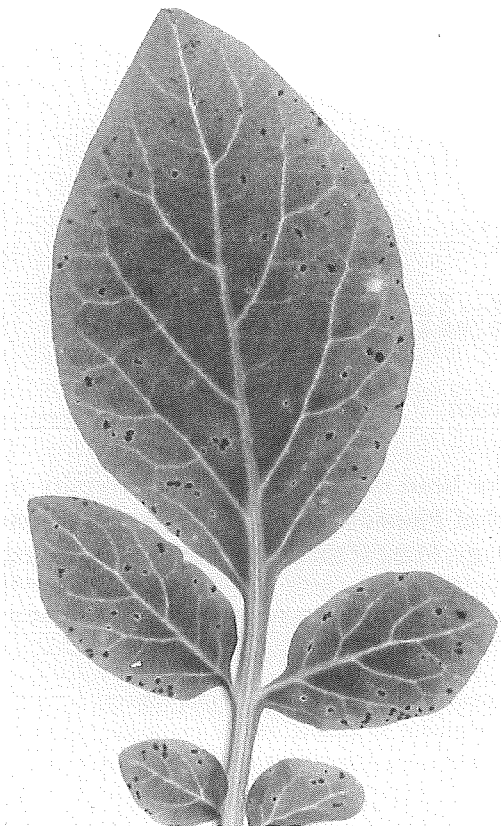
Molecular studies on PVY have been focused on the viral gene P1 coding for a non-structural protein and its functions during the virus life cycle in plants. P1 has also been used to engineer a novel type of virus resistance in potato plants. Transgenic potatoes carrying the gene P1 are extremely resistant to the strain of PVY, from which P1 was isolated. Studies are in progress to modify the P1 gene in order to obtain resistance functional against a broader range of viruses.

The natural mechanism of resistance to viruses in the wild potato species *Solanum brevidens* is likely to be associated with restricted cell-to-cell

spread. Therefore, fundamental aspects of virus movement in plants are of particular interest. *Solanum brevidens* is extremely resistant to many viruses with global importance, such as PVY, potato virus A (PVA) and potato leaf roll virus (PLRV). Transfer of virus resistance from *S. brevidens* to cultivated potato has been achieved using somatic fusion and tissue culture techniques, which are carried out in collaboration with Plant Breeding Research, Finnish Agricultural Research Center, whereas sexual hybrids have also been obtained in a collaborative project with the International Potato Center (CIP). New natural sources of comprehensive virus resistance in cultivated and wild potato species are investigated in collaboration with Boreal Plant Breeding. Recently, molecular mapping and isolation of genes for virus resistance was initiated as a joint project with Cornell University, USA.

Studies at the Institute of Biotechnology

An active group of plant virologists is working at the Institute of Biotechnology under the supervision of professor Mart Saarma. The entire genome of PVA (Ülo Puurand) and cocksfoot mottle virus (CfMV) (Kristiina Mäkinen) have



Expression of hypersensitive resistance to PVY results in the development of necrotic lesions on potato leaves. Photo: Jari Valkonen.

been sequenced. An infectious cDNA of PVA has been obtained, which will permit direct examination of specific functions of the PVA genes. This is important, because PVA is closely related to PVY and a member of the largest and most important group of plant viruses, namely potyviruses. Gene-for-gene interactions between the products of PVA genes and potato resistance genes are studied in collaboration with the Department of Plant Production (J. Valkonen). Studies on CfMV have revealed that CfMV (a sobemovirus) utilizes a-1 ribosomal frameshifting strategy, resembling the one previously described for luteoviruses such as PLRV, in the production of replicase. Studies on CfMV have been carried out in collaboration with the Norwegian Plant Protection Institute (Dr. Vigfried Naess).

Molecular mechanisms of resistance to PVY and PLRV are investigated in transgenic tobacco plants expressing viral coat proteins (Kristiina Mäkinen). A novel type of engineered virus resistance with potentially broad effectiveness has been developed by transferring a mammalian virus resistance mechanism to plants (Dr. Erkki Truve and M. Saarma). This resistance is achieved by expressing in plants a 2-5A synthetase gene, which in mammals, and most probably also in plants, activates a mechanism which results in rapid degradation of the viral double-stranded RNA. Production of transgenic plants with resistance to viruses has been carried out in collaboration with Kemira AGRO Oy and the Estonian Academy of Sciences.

Recently, studies have been initiated with the Department of Plant Production (J. Valkonen) to reveal biochemical processes, which result in cell death following activation of plant genes for hypersensitive resistance to viruses (Outi Sorri and Tero Kuittinen).

Educational objectives

Educational aspects are highly emphasized in the studies on plant virology and virus resistance at both institutes. Most of the researchers involved are preparing a doctoral thesis or have recently graduated with a doctoral degree. Additionally, several theses for a lower graduation degree are being prepared or have been completed under the above described research programs, which are also members in the Biocentrum Helsinki initiative forming an umbrella organization composed of top expertise in molecular biology in Helsinki. Both institutes have organized several courses in plant and viral molecular biology.

Good connections to several European and American institutes enable the students to carry out their studies partially in foreign countries. Participation in international conferences and presentation of the research results in English also serve for educational purposes. The results of research are published exclusively in international scientific journals.

The reason why potato and viruses have been chosen for studies in Helsinki is that the applied and molecular studies on viral and plant genes and their function, genetic transformation of plants and analysis of transgene expression, and molecular mapping for resistance genes in potato are examples of research areas which can be applied to many agronomically important traits and to most, if not all crop species and organisms. They are, therefore, excellent objectives of studies from an agricultural and educational point of view. Specialists with good knowledge in these fields of science are expected to be strong candidates also in the international labour market.

Literature

- Mäkinen, K., Naess, V., Tamm, T., Truve, E., Aaspõllu, A. & Saarma, M. 1995. The putative replicase of cocksfoot mottle sobemovirus is produced by -1 ribosomal frameshift. *Virology* 207, 566-571.
- Pehu, T.M., Mäki-Valkama, T.K., Valkonen, J.P.T., Koivu, K., Lehto, K.M. & Pehu, E. 1995. Potato plants transformed with a potato virus Y P1 gene sequence are resistant to PVY^o. *American Potato Journal*, accepted.

- Puurand, Ü., Mäkinen, K., Paulin, L. & Saarma, M. 1994. The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses. *Journal of General Virology* 75, 457-461.
- Truve, E., Aaspõllu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Teeri, T., Kelve, M., Seppänen, P. & Saarma, M. 1994. Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5'-oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *BioTechnology* 11, 1048-1052.
- Valkonen, J. P. T., Pehu, E., Jones, M. G. K. & Gibson, R. W. 1991. Resistance in *Solanum brevidens* to both potato virus Y and potato virus X may be associated with slow cell-to-cell spread. *Journal of General Virology* 72, 231-236.
- Valkonen, J., Vestberg, M. & Bremer, K. 1992. Engelsk-finsk och engelsk-svensk ordlista för växtvirus och molekylärbioologi. Kasvinsuojeluseura, Helsingfors. 77 s.
- Valkonen, J. P. T., Xu, Y.-S., Rokka, V.-M., Pulli, S. & Pehu, E. 1994. Transfer of resistance to potato leaf roll virus, potato virus Y and potato virus X from *Solanum brevidens* to *S. tuberosum* through symmetric and designed asymmetric somatic hybridization. *Annals of Applied Biology* 124, 351-362.

Addresses:

Please contact the persons below for further information.

Department of Plant Production
P.O.Box 27, Viikki
FIN-00014 University of Helsinki, Finland

Electronic mail:
Tuula Mäki-Valkama: Tuula.Maki-Valkama@Helsinki.Fi
Eija Pehu: Eija.Pehu@Helsinki.Fi
Tuula Pehu: Tuula.Pehu@Helsinki.fi
Jari Valkonen: Jari.Valkonen@Helsinki.Fi

Institute of Biotechnology
P.O.Box 45 (Karvaamokuja 3)
FIN-00014 University of Helsinki, Finland

Electronic mail:
Kristiina Mäkinen: MAKINEN@Operoni.Helsinki.Fi
Ülo Puurand: PUURAND@Operoni.Helsinki.Fi
Mart Saarma: SAARMA@Operoni.Helsinki.Fi

Växtvirusforskning vid Lantbrukets forskningscentral

Anja Kuusela & Anne Lemmetty

Den växtvirologiska forskningen vid Lantbrukets forskningscentral i Jokioinen, Finland, är i huvudsak inriktad på bärväxternas virussjukdomar samt virus på potatis. Flera av projekten görs i samarbete med olika universitet i Finland.

Lantbrukets forskningscentral i Jokioinen grundades år 1898 och fungerar som ett expertämbetsverk underställt jord- och skogsbruksministeriet. Lantbrukets forskningscentral befrämjar livsmedelsnäringarnas konkurrensförmåga, landsbygdens livskraft och bevarandet av en trivsamt livsmiljö genom att producera forsknings- och utvecklingstjänster. Forskningsprojekten rör livsmedelsproduktion, djurproduktion, åkerväxtproduktion, trädgårdsproduktion, lantbruksteknologi och miljöforskning.

Forskningsanstalten för växtskydd arbetar inom tre forskningsområden: växtsjukdomar, ogräs och skadedjur. Vid avdelningen för växtskydd finns tio forskare, varav två är virologer, specialiserade på trädgårdsväxternas virus-sjukdomar respektive åkerväxternas viroser.

Virus på bärväxter

Då det gäller trädgårdsväxternas viroser har forskningen under de senaste åren koncentrerats till bärväxternas virussjukdomar. Ett projekt behandlar virusgulrot på hallon, orsakat av hallondvärgbuskvirus (RBDV). Projektet genomförs i samarbete med universitetet i Kuopio och behandlar testmetoder för viruset samt hur viruset påverkar olika *Rubus*-arter.

Ett annat projekt rör reversion på svarta vinbär. Arbetet sker i samarbete med universitetet i Åbo. Förutom att undersöka orsakssambanden arbetar man med diagnostiseringsmetoder för sjukdomen.

På Forskningsanstalten för växtskydd görs även virusdiagnostisering av plantmaterial som

skickas in till anstalten. Vid diagnosticeringen används testplantor, elektronmikroskopering och immunologiska metoder. Dessutom utförs virus-testning av plantmaterial i elitplantproduktion.

Rostringar på potatis

På lantbrukssidan har forskning kring potatisvirussjukdomar ökat i betydelse under senare år, särskilt potatismopptoppvirus (PMTV). Viruset är en av de vanligaste orsakerna till rostringar på potatis och förekommer ganska allmänt, särskilt i områden där potatis odlas för stärkelseindustrin. Under senare år har man undersökt mottagligheten

för potatismopptoppvirus för de mest odlade potatissorterna i Finland men även för nya sorter. Vid testning av om PMTV finns i jordprov används rutinmässigt ELISA-test. Antiserum för testet produceras vid avdelningen. Nya och bättre diagnostiseringsmetoder är under utarbetande.

Adress

Lantbrukets forskningscentral
Forskningsanstalten för växtskydd
FIN-31600 JOKIOINEN
FINLAND
Tel. +358 16 41 881

Kuusela, A. & Lemmetty, A. 1995. Plant virus research at the Agricultural Research Centre, Jokioinen, Finland. *Växtskyddsnotiser* 59:2, 46–47.

Abstract

The research on plant viruses at the Agricultural Research Centre in Finland is focused on viruses in berry-plants and potatoes. One project studies the raspberry bushy dwarf virus (RBDV) on raspberries and another the black currant reversion disease.

On potatoes the potato mop-top virus (PMTV) is studied. During the last years susceptibility for PMTV has been tested in the most common potato cultivars in Finland.

Växtvirologisk forskning vid Institutionen för växtpatologi

Maria Sandgren, Anna-Karin Widmark, Klas Lindsten,
Bengt Eriksson & Per Oxelfelt

Virusforskningen vid Institutionen för växtpatologi är i huvudsak inriktad på virus som angriper jordbruksgrödor. Stråsädesvirosor och potatisvirosor är ett par huvudteman. Under senare år har mycket av arbetet varit koncentrerat på jordburna virus på framför allt potatis och sockerbeter. En viktig verksamhetsgren är att utveckla och anpassa modern diagnostik för landets och Nordens behov. Växtvirus används också som verktyg i projekt som syftar till att besvara mera grundläggande virologiska frågeställningar på molekylär nivå.

Sedan länge har stråsädesvirosor varit av stor betydelse, framför allt det bladlusöverförda rödsotviruset (barley yellow dwarf virus, BYDV) samt de stritöverförda dvärgskottsjukevirus och bestockningssjukevirus jämte under senare år vetedvärgssjukevirus (wheat dwarf virus, WDV). Ett antal isolat av BYDV har insamlats och karakteriserats och deras släktskap med amerikanska isolat har undersökts. Antisera och komplementär DNA, (cDNA), har framställts som avsevärt underlättar deras identifikation och diagnos.

De båda förstnämnda stritöverförda virusens etiologi och spridningsbiologi klarades redan i början av 1960-talet och på denna kunskapsgrund utarbetades rekommendationer om odlings-

tekniska åtgärder, som ledde till att dessa virus upphörde att vara ett problem. I synnerhet dvärgskottsjukan gav tidigare i vissa delar av landet upphov till mycket stora skördeföruster.

Det tredje av de stritöverförda virusen, WDV, är speciellt intressant eftersom det visade sig vara ett s.k. geminivirus. Namnet kommer av att partiklarna ser ut som "siamesiska tvillingar", två runda partiklar som sitter ihop parvis. Arvsmassan i detta virus består av cirkulär, enkelsträngig DNA. Viruset i sig är inte av stor betydelse i Sverige men förekommer på kontinenten och har genom sina speciella egenskaper kommit att intressera forskare i andra länder, som därför sökt samarbete med oss.

Jordburna virus

Sedan senare delen av 1980-talet har ett samnordiskt projekt rörande jordburna virus bedrivits i NKJ:s regi (Nordiskt kontaktorgan för jordbruksforskning) och koordinerat av professor Bengt Eriksson. Samtliga nordiska länder utom Island har medverkat. Delprojekt har varit virus överförda av svampar inom släktet *Polymyxa*, som angriper stråsäd respektive sockerbeter, och rostringssyndromet i potatis där två virus är inblandade. De senare är det nematodöverförda tobaksrattelvirus (TRV) och potatismopptoppvirus (PMTV), som överförs av pulverskorvsvampen, *Spongospora subterranea*. För Sveriges del har huvuduppgifterna varit *Polymyxa*-överförda virus i sockerbeter samt de båda virus som orsakar rostringar i potatisknölar. Slutrapportering av projektet pågår.

Polymyxa-överförda virus i betor är dels det virus, BNYVV, som orsakar "rhizomania" och som är mycket fruktat på kontinenten, dels beet soilborne virus, BSBV, som har mycket likartade egenskaper men orsakar inga eller obetydliga symtom i betor. BSBV är mycket allmänt utbrett i betodlingar både i Sverige och andra länder, medan BNYVV hittills inte påträffats i Sverige. Säkra diagnosmetoder för båda dessa virus har utarbetats.

Rostringar i potatisknölar ansågs till mitten av 1980-talet alltid vara orsakade av det nematodöverförda viruset TRV. Det visades då att även det svampöverförda PMTV förekom i landet och det har sedan framkommit att det dominerar i vissa områden.

Inom TRV förekommer mycket stor variation i olika egenskaper mellan olika isolat. Samtliga överförs av nematoder inom familjen *Trichodoridae*, stubbrotsnematoder, men olika isolat överförs av olika nematodararter, varje isolat endast av ett fåtal eller ibland t.o.m. en enda art; d.v.s. utpräglad vektorspecificitet föreligger. Det är också stor variation i serologiska egenskaper. Detta försvarar diagnosen eftersom ett antiserum framställt mot ett isolat ofta inte alls eller mycket svagt reagerar med andra isolat. Dessutom upp-



Rostringar i potatis. - *Spraying in potato tubers*. Foto: SLU Info/Växter.

står ofta s.k. NM-isolat av TRV. Detta innebär att virusnukleinsyran replikeras i växten och ger upphov till symtom men utan bildning av viruspartiklar, och i sådana fall ger serologiska metoder inte något utslag. Sedan några år finns dock cDNA tillgänglig som är framställd från en del av virusnukleinsyran där variationen mellan isolat är liten, och som därför kan användas för att detektera alla hittills kända isolat av TRV, även av NM-typ.

Det är avsevärd variation i olika potatissorters reaktion på TRV-infektion. Vissa sorter är resistent (i varje fall mot de flesta isolat) medan andra reagerar med svåra symtom. På senare tid har det visat sig att det finns sorter som är toleranta, d.v.s. blir fullständigt infekterade utan att visa symtom. Sådana sorter kan bidra till att sprida TRV till lokaler där det inte tidigare förekommer. Tidigare har TRV inte ansetts vara ett utsädesproblem; den synen måste nu omvärderas. En EU-ansökan, koordinerad av kolleger vid Scottish Crop Research Institute (SCRI) och där vi deltar, syftar till att kartlägga dessa förhållanden liksom att bringa mera klarhet i vektorrelationerna.

PMTV är mycket instabilt och det är förenat med stora svårigheter att rena viruset. Det lyckades dock att få fram tillräckligt rent virus för att producera ett väl fungerande kaninantiserum. Det föreligger inte någon markant uppdelning i olika serotyper av PMTV i motsats till TRV. Med monoklonala antikroppar från SCRI har dock

vissa skillnader kunnat påvisas mellan svenska, finska och danska isolat. PCR-tekniken (polymerase chain reaction) har på senare tid använts för att fånga upp olika isolat och bestämma och jämföra nukleotidsekvensen hos dem. Detta görs i samarbete med kolleger vid SCRI och Institutionen för molekylärgenetik vid SLU.

Vid SCRI har kapsidproteingenen (den gen som kodar för virusets proteinhölje) från ett skotskt PMTV-isolat satts in i *Nicotiana benthamiana*, en släkting till tobak. De transgena plantorna visade sig vara höggradigt resistent mot PMTV. Försök pågår att även föra in genen i några potatissorter. Det är av synnerligen stort intresse att på ett tidigt stadium undersöka om plantorna även är skyddade mot nordiska isolat av PMTV. En EU-ansökan är under utarbetande där förutom SCRI och vår institution flera institutioner i de nordiska länderna och även potatisindustrin ingår som partners.

Diagnosmetoder

Utveckling av diagnosmetoder har en lång tradition vid institutionen. Serologiska metoder har och har haft stor betydelse. När ELISA-tekniken kom fram under senare delen av 1970-talet utvecklades den för våra ändamål och har varit ett viktigt hjälpmedel såväl i olika forskningsprojekt som för rena diagnosändamål. Komplementärt DNA (cDNA) har producerats från ett antal virus av betydelse i landet. Omfattande studier har gjorts för att förfina tekniken. Proverberedningen och andra delmoment har standardiserats för att optimera känsligheten. Särskild vikt har lagts vid att få fram metoder för icke-radioaktiv detektion.

Den s.k. PCR-tekniken har kommit att bli ett mycket användbart hjälpmedel inom virologin. Dels används PCR som ett forskningsverktyg som nämnts tidigare, dels är tekniken användbar som en utomordentligt känslig diagnosmetod som kompletterar eller i vissa fall kan ersätta de tidigare nämnda metoderna.

Särskilt för de jordburna virusen på potatis, TRV och PMTV, har PCR-tekniken förutsättningar att kunna höja känsligheten och minska

tidsåtgången för den tidigare mycket arbetskrävande diagnosen. Vi bedriver utveckling av PCR-tekniken för dessa båda virus i samband med de projekt som beskrivits ovan.

Grundläggande virusforskning

En väsentlig frågeställning inom virologin är att få klarhet i interaktionerna mellan virus och värdväxt. Med hjälp av modern molekylärbioologisk teknik, såsom framställning av cDNA-kloner av virusnukleinsyror och sekvensbestämning, har det blivit möjligt att studera detta på ett mera direkt sätt än tidigare. I ett samarbete med brittiska forskare har vi använt två stammar av rödklövermosaikvirus (RCMV), som skiljer sig åt i symtombild och värdkrets. Detta virus har sin RNA uppdelad i två separata molekyler av olika storlek, som kan separeras från varandra. RNA-komponenterna från de två stammarna kan kombineras korsvis så att man får ett slags "hybrider". De fyra RNA-komponenterna (de båda från vardera stammen) kan identifieras med hjälp av specifika cDNA-prober. Det kunde på detta sätt visas att det är den ena RNA-komponenten (den längre) som bestämmer värdkrets, medan symtombilden påverkas av båda RNA-komponenterna.

I ett flertal fall har det lyckats att producera cDNA-kloner av hela genom av växtvirus och även få dessa kloner infektiösa, d.v.s. växter kan infekteras med klonen och viruspartiklar bildas. Detta innebär att det är möjligt att med genteknologi göra ändringar i klonen, t.ex. i genen för virusets proteinhölje, och få fram viruspartiklar som på sin yta bär delar av främmande proteiner. I samarbete med forskare vid Uppsala universitet och i USA undersöker vi möjligheten att på ytan av tomato bushy stunt virus (TBSV) uttrycka främmande peptidsekvenser. En tillämpning härav är att rena detta rekombinantvirus och använda det för att producera antikroppar mot det främmande protein som det bär på sin yta. Detta är ett sätt att få fram antikroppar mot proteiner som i sig är olösliga eller av andra skäl svåra att få fram i en lämplig form för immunisering. Dessa rekombinanta växtvirus är ofarliga att handskas med

och är lätta att producera i stora kvantiteter. Vi har hittills lyckats visa att rekombinanta TBSV-partiklar ger upphov till antikroppar mot några olika peptider som är av farmakologiskt intresse.

Litteratur

- Joelson, T., Åkerblom, L., Oxelfelt, P., Strandberg, B., Tomenius, K. & Morris, T. J. Expression of foreign peptides on the surface of Tomato Bushy Stunt Virus (Manuscript in preparation).
- Lindsten, K. 1993. Rhizomania – are both Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) and Beet Soil-borne Virus (BSBV) involved? *Proc. 2nd Symposium of the Internatl. Working Group of Plant Viruses with Fungal Vectors, Montreal, Canada, July 25–27, 1993*, 67–70.
- Lindsten, K. & Vacke, J. 1991. A possible barley adapted strain of wheat dwarf virus (WDV). *Acta Phytopath. et Entomol. Hungaricae* 26, 175–180.
- Lövgren, L. & Eriksson, K. B. 1989. Cultivation factors influencing spraing in potato – a statistical analysis. *EPPO Bull.* 19, 599–604.
- Oxelfelt, P. & Eweida, M. 1991. Nucleic acid hybridization studies with Swedish BYDV isolates. *Acta Phytopath. et Entomol. Hungaricae* 26, 9–13.

- Oxelfelt, P., Shanks, M., Widmark, A. K. & Lomonosoff, G. P. 1992. Identification and characterization of pseudo-recombinants of red clover mottle comovirus. *J. gen. Virol.* 73, 2121–2124.
- Rydén, K., Eriksson, K. B. & Isunza, V. 1986. Rostringar hos potatis orsakade av potatismopptoppvirus (PMTV). *Växtskyddsnotiser* 50, 97–102.
- Sandgren, M. 1993. Nordic isolates of potato mop-top virus: comparison of reactions with monoclonal antibodies and observations on spraing symptoms in potato cultivars. *Proc. 2nd Symposium of the Internatl. Working Group of Viruses with Fungal Vectors, Montreal, Canada, July 25–27, 1993*.
- Sandgren, M. 1995. Potato mop-top virus (PMTV); distribution in Sweden, development of symptoms during storage, and variety trials in field and glasshouse. *Potato Research* (Accepted).
- Widmark, A. K. & Oxelfelt, P. 1994. Detection of Barley Yellow Dwarf Virus and its RNA by filter hybridization: A study of factors affecting sensitivity. *Swedish J. Agr. Res.* 24, 101–108.

Adress

Institutionen för växtpatologi, SLU
Box 7044
750 07 UPPSALA
018-67 10 00

Sandgren, M., Widmark, A. K., Lindsten, K., Eriksson, B. & Oxelfelt, P. 1995. Plant virus research at the Department of Plant Pathology, Uppsala, Sweden. *Växtskyddsnotiser* 59:2, 48–51.

Abstract

Virus research at the Department of Plant Pathology deals mainly with viruses infecting agricultural crops. Cereal viruses and potato viruses are two main topics. In recent years much effort has been centered around soil-borne viruses in potatoes and sugarbeets. An important task is to develop and adjust modern diagnostic techniques to the needs of Sweden and the other Nordic countries. Plant viruses are also used as tools in basic virological research at the molecular level.

Virus i äpple

Gunilla Åhman

Virussjukdomar i äpple ger hos de flesta sorter inga symtom alls. Att virustesta äppleplantor tar dessutom, med några få undantag, flera år. Genom att i tidigt stadium upptäcka symtom i vävnadskulturer från infekterade plantor skulle testtiden kunna förkortas åtskilligt. Om sedan samband mellan snabbtestade virus och sjukdomar med lång inkubationstid kan fastställas, blir testtiden ännu kortare.

Mot slutet av 1970-talet började man i äppleodlingar i Skåne se fläckar på frukter av sorten 'Lobo'. Fläckarna utgjordes av färgförändringar i skalet: på grönt skal var fläckarna mörkare gröna, på den röda delen oftast blåvioletter. Starkt fläckiga frukter blev lätt deformerade och nådde inte full storlek. Fruktafläckigheten fanns bara i vissa träd och var olika stark på olika äpplen i samma träd. Något år blev fläckigheten värre, och man fick intrycket att den spred sig i odlingarna.

Redan på 70-talet, men alltmer i början av 80-talet, kom rapporter om barksprickor på årsskott av framför allt 'Lobo', men även av den äldre sorten 'Åkerö'. Särskilt hos 'Lobo' började skadan åtminstone ibland så, att skottet svällde upp och böjde av i 90° vinkel från det uppsvällda stället. Sedan bildades stamsprickor i den mjuka delen och så småningom barksprickor.

Fruktafläckar och barksprickor fanns på olika träd och hade inget samband med varandra. Både till utseende och utbredning förde dessa båda skador tanken till virussjukdomar. Någon annan orsak kunde man inte heller hitta.

Äppleviroser i Sverige

År 1969–1975 undersöktes förekomsten av sjukdomar "av viruskaraktär" i svenska äpplen (Rydén 1977). 10 sjukdomar kunde påvisas genom virus-test, och ytterligare 3 iaktogs ute i odlingar. Av 108 undersökta träd var bara 7 helt virusfria. Av dem var 4 moderträd.

Virussjukdomarna i äpple har i hundratals år förts vidare från generation till generation med ympis och okulanter från smittade sorter och med sticklingar och avläggare från smittade grundstammar. Något annat spridningssätt har de inte



'Lobo', till vänster, med fruktafläckar ger upphov till stjärnsprickor i 'Golden Delicious', till höger. - 'Lobo', to the left, with fruit spots causes star cracks in 'Golden Delicious', to the right. Foto: Ingegerd Norin.

numera. Deras överlevnadsstrategi har varit att synas så lite som möjligt, så att de kunnat fortsätta förökas.

Nästan alla sjukdomar i äpple som orsakas av virus eller liknande patogener, t.ex. viroider, är helt osynliga i alla eller de flesta äpplesorter. För att få reda på vad ett träd är infekterat med, måste man ympa eller okulera kvistar respektive knoppar från trädet på en rad särskilda indikatorarter eller -sorter, var och en känslig för en eller några sjukdomar, som fått sitt namn efter just det symptom som sjukdomen ger upphov till hos arten eller sorten.

Virussjukdomar i 'Lobo'

Vi okulerade knoppar av 'Lobo' med fruktafläckar och med barksprickor på 5 olika indikatorer. Efter 6 år kunde följande sjukdomar påvisas:

Sort	Fruktafläckar	Barksprickor
<i>Malus platycarpa</i>	klorotisk-bladfläck	klorotisk-bladfläck
'Golden Delicious'	stjärnsprickor	—
'Gravenstein'	—	fårade grenar
'Lord Lambourne'	—	gummived
'Virginia crab'	gropig ved	gropig ved, räfflad ved Virginia "decline"

Vad säger nu detta? Inte mycket mer än att odlarna sannolikt hade sluppit en del problem om de hade frågat efter (och kunnat få tag i!) virusfritt material av 'Lobo' från början. Vilken eller vilka av de sjukdomar vi ser på indikatorträden är det egentligen som givit upphov till fruktafläckarna och till barksprickorna i 'Lobo'? Och vad orsakas i sin tur dessa sjukdomar av?

Sjukdomar kontra virus

Virologen undrar naturligtvis varför vi talar om sjukdomar "av viruskaraktär" i äpple och inte direkt om virus. Sanningen är den att ingen ännu hittat orsaken (orsakerna) till sjukdomarna stjärnsprickor, fårade grenar, gummived m.fl. Ingen har kunnat isolera något specifikt virus eller annan patogen ur träd med dessa sjukdomar. Miss-tanken att gummived skulle orsakas av mykoplasmaliknande organismer (Beakbane et al. 1971) har inte kunnat bekräftas. Detta är också anledningen till att äpple fortfarande måste virustestas genom ympning på indikatorer med väntan på resultat i flera år. Endast i några fall har man lyckats förkorta väntetiden till månader i stället för år genom att flytta in indikatorn i växthus.

I vedartade växter finns virus alltid i lägre koncentration än i örtartade. Förutsättningen för att man ska kunna isolera virus ur ett träd har visat sig vara att man först lyckas överföra det till en örtartad växt. Därur kan man sedan rena och karakterisera det, framställa antikroppar och komplementärt DNA. Möjligheter till snabb och exakt immunologisk och molekylär diagnos öppnar sig.

Virus i äpple

Det finns närmare 40 "virussjukdomar" i äpple (Németh 1986), men bara 4 kända virus av betydelse för äpple i Europa, nämligen:

1. apple chlorotic leaf spot trichovirus, ACLSV (Lister 1970 a)
2. apple mosaic ilarvirus, ApMV (Fulton 1972)
3. apple stem grooving capillovirus, ASGV (Lister 1970 b)
4. apple stem pitting virus, ASPV (Koganezawa & Yanase 1990)



Fårade grenar i 'Gravenstein' efter ympning med 'Lobo' med barksprickor. - Flat limb in 'Gravenstein' grafted with 'Lobo' with bark cracks. Foto: Ingegerd Norin.

För de första tre av dessa virus är örtartade värdväxter kända sedan länge, eftersom gurka, värd för ApMV, och *Chenopodium quinoa*, värd för ACLSV och ASGV, allmänt använts som virustestplantor under lång tid. Antikroppar finns att köpa, och alla tre testas med ELISA hos oss, en test vars resultat kan avläsas dagen efter det att den påbörjats.

Det fjärde viruset, ASPV, är så nyupptäckt att antiserum ännu inte finns kommersiellt tillgängligt. Inget slags virustestplanta hade reagerat för sjukdomen gropig ved, stem pitting, förrän man vid 1980-talets mitt prövade en ny art, *Nicotiana occidentalis* (van Dijk et al. 1987). Den visade sig bli systemiskt infekterad med ett virus via saft från träd med gropig ved, ett virus som det nu blev möjligt att studera, karakterisera och namnge.

ACLSV orsakar sjukdomen klorotisk bladfläck; ASGV räfflad ved (stem grooving) och Virginia "decline" (Waterworth & Uyemoto

1980). ELISA-tester har bekräftat förekomsten av ACLSV både i 'Lobo' med fruktfläckar och i 'Lobo' med barksprickor, samt av ASGV i 'Lobo' med barksprickor. Saftöverföring till *Nicotiana occidentalis* har visat att båda 'Lobo' också innehåller ASPV.

Virusverkan i olika sorter

Men vilket virus är det nu som orsakar fruktfläckar i 'Lobo' och stjärnsprickor i 'Golden Delicious'? Vilket eller vilka virus ger upphov till barksprickor i 'Lobo', gummived i 'Lord Lambourne' och fårade grenar i 'Gravenstein'? Vilken betydelse har kända virus för uppkomsten av oförklarade sjukdomar? Kan det vara så att samband finns men förblivit oupptäckta därför att testmetoderna i det förgångna varit alltför okänsliga?

Min avsikt är att undersöka inverkan av ACLSV, ASGV och ASPV på äpplesorterna 'Lobo', 'Golden Delicious', 'Lord Lambourne' och 'Gravenstein' genom att infektera dem med rena stammar av dessa virus i olika kombinationer. Därefter skulle jag vilja undersöka stammsymptomens uppkomst och utveckling i tidigt stadium i vävnadskulturer från infekterade plantor och efter mikroympning *in vitro*, så som man gjort i vin, ett annat växtslag där man har haft svårt att ställa en snabb och säker virusdiagnos (Tzeng et al. 1993; Tanne et al. 1993).

Snabbare och säkrare virusdetektering i träd

Om vi lyckas upptäcka symptom redan i provröret efter infektion *in vitro*, skulle testtiden för sjukdomar med okänd patogen kunna förkortas från år till veckor. Skulle det dessutom visa sig att någon eller några av dessa oförklarade sjukdomar orsakas av vissa stammar av redan kända virus, kunde testtiden förkortas till två dagar. Närmare studier av virussympptomens tidigaste utveckling i äppleplantan skulle också öka vår kunskap om virus' beteende i vedartade växter generellt och vår förmåga att upptäcka dem även i andra slags träd, t.ex. i skogen, där virus och deras verkan än så länge är ett till allra största delen okänt fält.

Litteratur

- Beakbane, A. B., Mishra, M. D., Posnette, A. F. & Slater, C. H. W. 1971. Mycoplasma-like organisms associated with chat fruit and rubbery wood diseases of apple, *Malus domestica* Borkh., compared with those in strawberry with green petal disease. *Journal of General Microbiology* 66, 55-62.
- Fulton, R. W. 1972. Apple mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 83*.
- Koganezawa, H. & Yanase, H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74, 610-614.
- Lister, R. M. 1970 a. Apple chlorotic leaf spot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 30*.
- Lister, R. M. 1970 b. Apple stem grooving virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 31*.
- Németh, M. 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Martinus Nijhoff, Amsterdam.
- Rydén, K. 1977. Virus- och mykoplasmasjukdomar hos svenska äppleträd. *SLU, Växtskyddsrapporter, Trädgård 1*.

- Tanne, E., Shlamovitz, N. & Spiegel-Roy, P. 1993. Rapidly diagnosing grapevine corky-bark by *in vitro* micrografting. *HortScience* 28, 667-668.
- Tzeng, H. C., Tzeng, D. D. & Goheen, A. C. 1993. Anatomical and tissue culture studies of *Rupestis* stem pitting affected grapevines. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 34, 73-82.
- van Dijk, P., van der Meer, F. A. & Piron, P. G. M. 1987. Accessions of Australian *Nicotiana* species suitable as indicator hosts in the diagnosis of plant virus diseases. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 93, 73-85.
- Waterworth, H. E. & Uyemoto, J. K. 1980. Symptoms incited by apple Type II virus isolates in 'Virginia crab' apple trees. *Plant Disease* 64, 562-563.

Författaren

Gunilla Åhman är hortonom, försöksledare och doktorand i virologi vid Institutionen för växtskyddsvetenskap, SLU, Box 44, 230 53 Alnarp. Tel. 040-41 50 00

Åhman, G. 1995. Viruses in apple. *Växtskyddsnotiser* 59:2, 52-55.

Abstract

Trees of the apple cultivar 'Lobo' with fruit spots were found to contain apple chlorotic leaf spot virus, apple stem pitting virus and to cause star cracks on the fruit of 'Golden Delicious'. Some other 'Lobo' trees with bark cracks and swollen shoots bent at a 90° angle contained, in addition to the viruses mentioned, even apple stem grooving virus and the agents of flat limb and rubbery wood diseases. Work to find the connections between the viruses and the disease symptoms in different apple cultivars is in progress.

Vad är virus? -en historia byggd på växtvirologins utveckling

Gunilla Åhman

År 1899 skrev Martinus Beijerinck att tobakens mosaiksjuka måste orsakas av ett levande flytande smittämne som bara förökade sig i levande celler. År 1937 fastställdes det att detta ämne, virus, utgjordes av nukleinsyra och protein. Idag vet vi en hel del om virus' förökning i levande celler. Tiden har hunnit ifatt Martinus Beijerinck.

I begynnelsen var ordet. "Virus" är latin och betydde från början "slem" eller "slemmig vätska". Med tiden kom betydelsen att förskjutats till "gift". När den romerske encyklopedisten Aulus Cornelius Celsus omkring år 50 e. Kr. skrev om "virus" från en rabiessjuk hund, kunde han ha menat det på endera sättet [32, 63].

Hade Celsus levat drygt nittonhundra år senare, kunde han ha använt samma ord, i vår nutida betydelse. Rabies är nämligen en virussjukdom, den äldsta kända, undersökt och dokumenterad i

mer än 2000 år. Av beskrivningarna att döma har den inte förändrats nämnvärt under den tiden [63].

Strimmiga tulpaner

Rabies är en farlig och mycket obehaglig sjukdom. De först upptäckta och beskrivna växtviroserna, däremot, uppfattades som intressanta och vackra och sattes inte alls i samband med sjukdom. De beskrevs av poeter, växtförädlare och konsthistoriker. Den första kända växtförändringen, som man nu säkert vet orsakades av

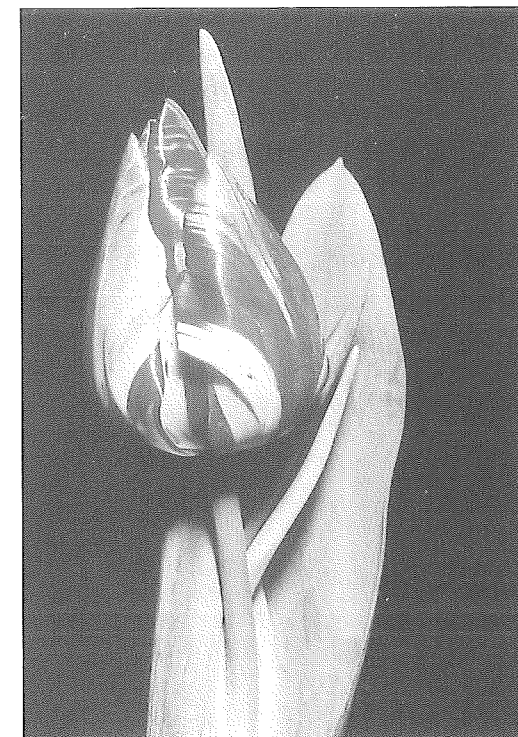
virus, kom med tulpanerna till Europa i mitten av 1500-talet. Strimmiga tulpanblommor beskrevs och illustrerades av den holländske botanisten Carolus Clusius och målades av flera konstnärer från den tiden, varför de kom att kallas "Rembrandt-tulpaner". De blev omåttligt populära, och lökarna från dem betingade ännu högre priser än normala tulpanlökarna [63].

Att även växter kan angripas av sjukdomar, som är egna för dem och inte smittar djur, visades för första gången av den italienske poeten och läkaren Girolamo Fracastoro år 1546 [63]. Vid den tiden visste man mycket litet om vad sjukdomar orsakas av. Man föreställde sig "smittämnen" i luften från träskmarker, ruttnande växtdelar och lik av djur och människor. Man trodde också att de minsta djur man kände till, fluglarver, små maskar etc. uppstod av sig själva ur smuts och förruttelse, *generatio spontanea* [27].

Mikroberna självständiga varelser

År 1625 uppfanns mikroskopet, och efter hand upptäcktes allt mindre organismer, ner till de encelliga s.k. mikroberna: urdjur (protozoer) och bakterier. Men det kom att dröja ytterligare drygt 200 år innan man började komma underfund med att dessa celler var självständiga varelser, inte produkter av sjuka växter, djur eller människor.

Den första sjukdomsalstrande organism som isolerades från sin värd och sedan visades kunna smitta friska individer av samma art och i dem framkalla samma sjukdom, var en svamp på silkesfjärilens larv, en gråmögelart som upptäcktes av Agostino Bassi i mitten av 1830-talet och sedan fick heta *Botrytis bassiana* [27]. Men det var främst genom den franske kemisten Louis Pasteur's arbeten med desinfektion och sterilisering och den tyske naturvetenskapsmannen och läkaren Robert Koch's bakteriostudier, som man så småningom vann insikt om att sjukdomsalstrande organismer, vare sig de är svampar, protozoer eller bakterier, inte uppkommer av sig själva i sjuka djur utan genom förökning. De har egna livscyklar och kan isoleras från och leva



Strimmiga tulpanblommor var den första kända växtförändringen som man vet orsakades av virus. Foto: SLU Info/Växter.

utanför sin värd på konstgjort substrat [11, 27]. Det avgörande beviset för denna s.k. mikrosteori (germ theory) anses ha kommit år 1876–1877, då orsakssammanhanget mellan *Bacillus anthracis* och sjukdomen mjältbrand säkerställdes [37, 47, 32].

Päronpestbakterien upptäcks

Ungefär samtidigt, år 1877, upptäckte den amerikanske växtpatologen Thomas Burrill att päronpest, en ödeläggande fruktträdssjukdom, orsakas av bakterier. Han isolerade visserligen inte bakterien själv, det gjorde J.C. Arthur 1885 [3], men upptäckten var viktig, eftersom den gängse uppfattningen vid den tiden var att sjukdomar på växter alltid orsakas av svampar [32].

Under 1880- och -90-talen utvecklades bakteriologin framför allt i Frankrike och i Tyskland, där Robert Koch utarbetade isolerings- och un-

dersökningsmetoder. I Frankrike utvecklades filtreringstekniken av Pasteur m.fl., eftersom bakterier innan de kan renodlas på konstgjort substrat först måste skiljas från övriga beståndsdelar i blod, vävnadsvätska eller växtsaft så fullständigt som möjligt [63].

Tobakens mosaiksjuka

I Holland, där tobaksodlingen i mitten av 1800-talet fått stor betydelse och utbredning, upptäcktes en sjukdom som äventyrade tobaksskörden och som verkade sprida sig snabbt. Den rapporterades år 1857 av en feriearbetande student, men var då redan känd sedan några år bland tobaksodlare. Problemet växte, skadorna ökade och 1879 slog de holländska tobaksodlarna larm. De sökte hjälp av myndigheterna, som vände sig till direktören för lantbruksförsöksstationen i Wageningen, Adolf Mayer. Han åtog sig fallet. Sju år senare kom hans rapport [41].

Sjukdomen yttrade sig så att bladen på unga tobaksplantor några veckor efter utplantering på fält blev mosaikfläckiga i ljusare och mörkare grönt. De mörkgröna fläckarna växte starkare än de ljusa och bildade med tiden blåsor och bucklor. Odlare i olika trakter hade olika namn på sjukdomen. De förkastades av Mayer, som föreslog det internationella namnet ”Mosaikkrankheit des Tabaks”.

Vad kunde då orsaken till denna mosaiksjuka vara? Mayer intervjuade tobaksodlarna, som hade de mest skiftande åsikter om anledningen, såsom



Tomatblad angripet av tobaksmosaikvirus. Foto: SLU Info/Växter.

felaktig gödsling, för stark sol, kalla nätter, för våt jord, dåligt frö (från sjuka moderplantor), dåligt handlag vid utplantering, fel på drivbänkarna eller rent häxeri. För att bemöta de mer rimliga anklagelserna gjorde Mayer en rad försök som visade att gödsling, kalkning, ändrade drivbänkar, aktsamhet om rötterna, temperaturväxlingar etc inte hade någon som helst betydelse för sjukdomens uppkomst eller utbrott. Inte ens fröets härkomst spelade någon roll; frön från sjuka moderplantor gav inte fler mosaiksjuka avkomlingar än frön från friska plantor.

Växtsaften smittsam

Det enda som faktiskt inverkar på sjukdomsfrekvensen var odlingsjordens tidigare användning. På jord där tobak inte tidigare hade odlats, uppträdde sjukdomen aldrig. Detta faktum stärkte Mayer i tron att sjukdomsorsaken måste vara något slags parasit. Sökandet efter svampar och skadedjur i och runt mosaikplantor gav inget resultat. Men medan undersökningarna pågick gjorde Mayer en viktig upptäckt: växtsaften i de sjuka plantorna var smittsam! Mosade han ett mosaikfläckigt blad med några droppar vatten, sög upp saften i ett kapillär rör och stack in röret i en tjockare bladnerv på en frisk planta, insjuknade i 9 fall av 10 den så behandlade plantan efter 10–11 dagar.

Om nu växtsaften var smittsam måste ju parasiten, ”det infektiösa”, finnas i den. Saft från sjuka och friska plantor undersöktes i mikroskop – ingen synbar skillnad. Koch’s färgnings- och odlingsmetoder för bakterier tillämpades förgäves. Försök att infektera friska plantor med de bakterier som växte på odlingssubstraten och med diverse andra bakterier, extrakt av jord från fält med mosaiksjuka och av olika slags gödsel, ja t.o.m. med riven gammal ost, misslyckades, i varje fall med att åstadkomma mosaik.

Filtrerade tobakssaft

Nu resonerade Mayer så, att smittan i saften kunde utgöras av antingen ”ett oformat eller ett format ferment”. Med ”oformat ferment” menades ett kemiskt ämne, ett enzym. Mayer ansåg det

”oerhört” att ett enzym kunde föröka sig själv till att orsaka sjukdom. Ett ”format ferment” var en svamp eller en bakterie, som oftast (men inte alltid) kunde samlas upp i ett filter. För att undersöka vilket slags ferment det här kunde röra sig om, filtrerade Mayer infektiös tobakssaft, först genom enkelt filterpapper, varvid filtratet visade sig lika smittamt som ofiltrerad saft, sedan genom dubbelt filter, varefter saften inte längre var i stånd att smitta en enda planta.

Av dessa synnerligen ofullständigt beskrivna försök drog Mayer slutsatsen att tobakens mosaiksjuka orsakas av en bakterie. Ett enzym hade trängt igenom även dubbelt filterpapper (han gjorde också några försök att kemiskt fälla ut ”enzymet”, utan att lyckas), och en svamp hade inte gått igenom alls (och borde förresten i åtminstone något stadium vara synlig). Härmed ansåg sig Mayer ha gjort vad han kunde. Andra forskare tog nu vid.

Bakterietoxin misstänkt orsak

I Ryssland lästes Mayers rapport av botanikern Dmitri Ivanovski, som hade skickats till Ukraina och Bessarabien för att undersöka skadliga sjukdomar i tobaksodlingarna där. Han identifierade en av sjukdomarna som Mayers tobaksmosaik, och visade att smittämnet passerade ett nyligen utvecklat s.k. Chamberland-filter av porös lera. Han trodde som Mayer att sjukdomen orsakades av en bakterie, men genom toxisk påverkan, och att det var toxinet som passerade filtret, eftersom han inte lyckades isolera och odla bakterien. Fyra år tidigare upptäcktes nämligen difteribakteriens toxin, en sjukdomsförklaring som borde kunna tillämpas även i andra fall [63].

I Holland, där Mayer givit upp arbetena med tobaksmosaiken, började Martinus Beijerinck, professor i mikrobiologi, intressera sig för den märkliga sjukdomen [32, 63]. Genom omfattande mikroskopiska undersökningar och odlingsförsök blev han helt på det klara med att bakterier kunde det inte röra sig om. Smittämnet trängde igenom tjocka porlinsfilter och agarskikt utan

att förlora sin infektiösa förmåga. Han drog slutsatsen att detta smittämne måste vara flytande eller åtminstone vattenlösligt.

Beijerinck studerade också smittans vandring i växten och upptäckte, att om plantans färdigvuxna delar infekteras, tar det 10–12 dagar innan de första sjukdomssymptomen börjar synas på de nya bladen (i analogi med Mayers resultat), men om smittämnet injiceras alldeles nära toppen, där cellerna fortfarande delar sig, tar det bara 3–4 dagar. Från en planta som smittats med en ytterst liten mängd infektiös växtsaft, kan man när sjukdomen brutit ut infektera ett ”obegränsat” antal nya plantor. Smittämnet måste alltså föröka sig, och förökningen måste försiggå i unga vävnader, i celler som delar sig. I färskpressad växtsaft förökade det sig inte alls: om infekterad saft blandades med frisk, fungerade det bara som en utspädning.

Förökar sig i levande celler

Beijerinck hade alltså här ett smittämne, flytande eller vattenlösligt, som på något sätt förökade sig, men bara inuti levande celler. Han föreställde sig att smittämnet måste släppas in i cellen och där införlivas i cellens egen förökning. Han framförde som sin uppfattning att tobaksmosaik orsakas av ett ”*Contagium vivum fluidum*”, ett levande, flytande smittämne [7].

År 1903 bemötte Ivanovski andra forskares ståndpunkter och redogjorde för egna kompletterande undersökningar [34]. Han jämförde i viss mån Beijerincks uppfattning med Albert Woods’, en amerikansk fysiolog och patolog. Woods hade funnit att gula bladdelar, oavsett orsaken, innehöll ett överskott av oxiderande enzymer [67]. Han ansåg att tobakens mosaiksjuka helt kunde förklaras av sådana överskott, som utlöstes av ogynnsamma faktorer såsom olämplig väderlek, dålig jord eller näringsbrist, mekaniska skador etc. Enzymerna (oxidaser och peroxidaser) skulle t.o.m. kunna smitta friska plantor genom att störa deras ämnesomsättning och stimulera dem att bilda eget enzymöverskott [68]. Ivanovski tolkade både Beijerinck och Woods så, att enligt dem ett kemiskt ämne, något slags molekyler,

skulle kunna föröka sig själva inuti en växt. Detta föreföll honom högst osannolikt. Att sjukdom skulle kunna uppstå och överföras med ämnen som normalt finns i en frisk planta om än i lägre halt (enzym), tycktes honom särskilt otroligt [34].

Mul- och klövsjukans gåta

I slutet av 1890-talet tillsattes i Tyskland en kommission för att lösa gåtan med den smittsamma mul- och klövsjukan. Ivanovski [34] hänvisade till kommissionens rapport som kom ut år 1898. Löffler och Frosch, kommissionsledare och författare, visade där att djur som smittades med filtrerad, bakteriefri lymfa insjuknade lika snabbt som de som infekterades med ofiltrerad lymfa, och inte nog med det – de djur som smittats med den filtrerade lymfan var lika väl som djuren i kontrollgruppen i stånd att i sin tur infektera nya djur. Enligt kommissionen kunde smittämnet alltså inte vara ett aldrig så starkt gift, för inget sådant kan föröka sig till den grad, utan måste vara en levande agent, i Löfflers och Froschs tankevärld en mikrob, fast mycket liten. Att lymfan efter upprepad filtrering förlorade sin infektionsförmåga, ansåg de bevisa att sjukdomsalstraren inte kunde vara ett flytande eller vattenlösligt ämne.

Ivanovski, som tidigare själv trott att det som passerade filtret var ett gift, hade nu övertygats om att upphovet till tobakens mosaiksjuka måste vara en liten "kropp", inte ett *contagium fluidum* eller *solutum* utan ett *contagium fixum*. Den enda återstående stötstenen var Beijerincks uppgift om smittämnets förmåga att tränga genom agar. För att undanröja detta sista hinder höllde Ivanovski ut tusch, en lösning av små svarta korn i vatten, på agarplattor, dels med nygjord, just stelnad agar, dels med agar som fått stå någon eller några dagar. Han fann att i den nygjorda agarn trängde tuschkornen inte alls in, däremot i den äldre agarn, där ett flera mm tjockt skikt färgades svart. Med ledning av filterporstorlekarna räknade Ivanovski ut att tobaksmosaiksmittämnet måste vara mindre än tuschkornen och alltså kunna diffundera ännu lättare genom agarn, utan att för den skull vara flytande eller vattenlösligt.

Ivanovskis ståndpunkt var nu klar: tobakens mosaiksjuka orsakas av en mikrob av något slag [34].

"Filtrerbara virus"

Debatten fortsatte. Några få trodde i likhet med Woods på enzymer, andra såsom Hunger [33] på toxiner som orsak till tobaksmosaiken, men en liten mikrob ansågs av de flesta som den bästa förklaringen. Vid denna tid var den organiska kemin outvecklad, och vattenlösliga molekyler troddes genomgående vara mycket små. Inom human- och veterinärpatologin, som direkt hade sitt ursprung i bakteriologin, var mikrobänkandet fast etablerat. Under 1800-talets sista decennier upptäcktes och isolerades den ena bakterien efter den andra med hjälp av filter, lämpliga näringssubstrat och mikroskop. När nu enstaka patogener gick igenom filtren, vägrade att växa på substraten och inte gick att upptäcka i mikroskop, tycktes det bara tyda på att mikroberna var för små, alternativt metoderna för grova [63].

Inom i synnerhet veterinärmedicinen hade man börjat kalla den nya sortens sjukdomsalstrare för "osynliga" eller "ultrasynliga" mikrober. Eugenio Centanni, som år 1902 upptäckte att den patogen som orsakar kycklingpest passerade filter, ansåg "filtrerbara virus" vara en bättre benämning [12]. Ordet "virus" hade på 1700-talet kommit att användas om varje ämne, identifierat eller ej, som orsakade en smittsam sjukdom. Efter mikobeteorins genombrott i slutet av 1800-talet fortsatte man att använda ordet "virus" i betydelsen sjukdomsorsak, även om patogenen hade isolerats och identifierats som t.ex. en bakterie. I de fall den inte hade gjort det trodde man ändå att den var en mikroorganism. Som Pasteurs sade år 1890: "Varje virus är en mikrob" [32].

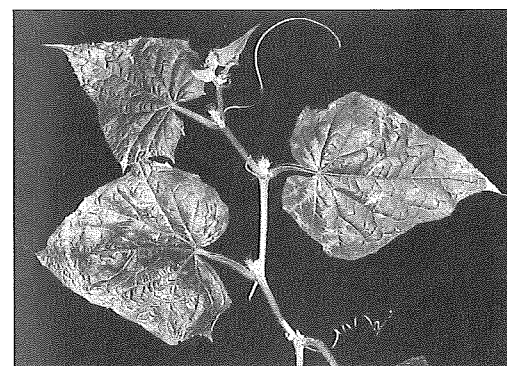
Mrowka, stabsveterinär vid en tysk flottbas vid Gula havet, var av en annan mening. Han såg att "filtrerbara virus" inte betedde sig som "organiserade element", bakterier eller urdjur. Snarare uppträdde de likt kolloider (finfördelad enhetlig materia) vid sin passage genom filter. Ur blodserum från djur infekterade med kycklingpest fällde han år 1912 med hjälp av garvämnen ut ett äggviteämne, globulin, som han sedan renade

genom upprepad centrifugering. (Centrifugen, utvecklad ur Gustav de Laval's mjölkseparator från 1880, hade nu börjat användas av kemister m.fl.) Mrowka visade att det utfällda globulinet var infektiöst, andra fraktioner av det centrifugerade materialet däremot inte [43].

Partikelstorleken bestämdes

Mrowkas artikel lästes av Andriewsky, veterinär i St Petersburg, som därigenom inspirerades till att försöka bestämma partikelstorleken i det infektiösa globulinet från kycklingpest. Han gjorde jämförande filtreringsförsök och kom fram till att kycklingpestens partikel måste vara mindre än en hemoglobinmolekyl, som enligt Zsigmondy, kolloidkemist, var 2,3–2,5 nm i diameter [2].

Nästa försök att mäta en viruspartikels storlek genom jämförelse med bl.a. hemoglobin vid filtrering, gjordes år 1921 av B. M. Duggar, fysiolog vid Missouri's botaniska trädgård, och hans assistent Joanne Karrer [20]. De var naturligt nog intresserade av växtpatogena virus och hänvisade till arbeten av Allard år 1916 med tobaksmosaik och av Doolittle år 1920 med gurkmosaik, som gav symptom liknande dem av tobaksmosaik men i andra växtslag. Både Allard och Doolittle hade funnit infektiösa partiklar passera genom vissa filter men inte genom andra. Utgångspunkten för Duggar och Karrer var överflödet av rapporter om filtrerbara organismer och bristen



Gurkmosaik ger symptom liknande dem av tobaksmosaik men i andra växtslag. Foto: SLU Info/Växter.

på rapporter om mer exakta storleksmätningar, baserade på standardisering av de filter man använt. Andriewsky's artikel [2] kom inte till deras kännedom förrän deras egen var skriven, ett exempel på hur forskningen försenas av skiljeväggar mellan olika ämnesområden. Själva kom de liksom Andriewsky fram till en partikelstorlek (för tobaksmosaikens smittbärare) som ungefär stämde överens med hemoglobinet, men inte med hemoglobinmolekylen, utan med den kolloidala partikeln, sammansatt av flera molekyler, motsvarande en diameter av ca 30 nm.

Smitta via ympar, insekter eller växtsaft

I en föreläsning vid the American Philosophical Society's årsmöte i Philadelphia den 1 april 1923 [21] samlade Duggar och Karrer Armstrong (som gift sig sedan sist) alla dittills kända fakta om filtrerbara virus funna i växter, och om sjukdomar som antagligen orsakades av sådana. De fäste uppmärksamheten på likheten i utseende mellan ärftliga färg- och formförändringar och sådana som inte ärvs men som överförs genom ympning av grenar eller skott på symptomlösa träd eller plantor. De diskuterade deras smittsamhet. I de flesta av fallen tycktes ympning vara det enda överföringssättet, men några sjukdomar kunde överföras på annat sätt (också). En mutationslik förändring i *Datura* fördes vidare med fröet till 79% av avkomlingarna [10], ett fall av "icke-Mendelsk nedärvning". En sjukdom på amerikanska sockerbeter, "beet curly top", överfördes med en särskild insekt, en stritart, förutsatt att en viss tid förflöt från det att striten sög på en infekterad betplanta till dess att den sög på en frisk. Mosaiksjukdomarna, tobaksmosaik, gurkmosaik, bönmosaik etc, smittade direkt via växtsaften, men bara genom sår av något slag [21].

Sammanfattningsvis, skrev Duggar och Karrer Armstrong, tyder fakta på att virus utanför cellen beter sig som vilken kolloidal partikel som helst, alldeles livlös, medan det inuti cellen däremot tycks uppvisa en särdeles aktivitet. En ny märklig upptäckt måste de också nämna, det s.k. d'Herelle's fenomen. Med det förhöll det sig på följande sätt:

Den 4 december år 1915 publicerades i den medicinska tidskriften the Lancet en artikel av den engelske mikrobiologen F.W. Twort [59]. Titeln lät inte ana något ovanligt. Twort hade kommit på tanken att det bland "ultramikroskopiska virus" likaväl som bland bakterier, svampar och andra varelser borde finnas stammar, raser eller arter som inte var sjukdomsframkallande, inte parasiterande på andra. Sådana borde vara lättare att odla på konstgjorda substrat. Twort försökte ihärdigt isolera virus från jord, gödsel, gräs, hö, halm och dammvatten och han prövade flera hundra odlingssubstrat – förgäves. Då övergick han till att försöka isolera något odlingsbart från djur med rabies och kokoppor, även det förgäves.

Glasiga fläckar på agar

Det var när han arbetade med ett isolat av vaccinia, kokoppevirus, som han upptäckte ett märkligt fenomen. I flera av de provrör med näringsagar som han hållt sitt isolat i, uppträdde liksom vattniga områden, och de små förorenande bakterier, mikroocker, som ofta fanns på agarn, växte inte vidare när han flyttade över dem till nya rör. Lät han dem vara kvar bildades genomskinliga, "glasiga" områden i deras kolonier och i dessa genomskinliga fläckar kunde han inte hitta några bakterier längre, bara ett slags små "korn". Tog han ytterst lite från en sådan fläck och nuddade friska vita eller gula mikroockolonier med, uppstod en ny glasig fläck runt den punkt där kolonin nuddats. Från denna nya fläck kunde en ny liten portion tas ut och smitta nya kolonier o.s.v., o.s.v., men aldrig kunde det "glasiga" växa själv på något enda slags medium. Späddes det med vatten eller saltlösning passerade det genom de finaste porlinsfilter. Det kunde i viss mån smitta stafylokocker, men inte streptokocker, kolibakterier etc.

Twort tänkte sig flera möjliga förklaringar till fenomenet. Att det rörde sig om ett "filtrerbart ultramikroskopiskt virus" förstod han, men vad var då det? Det var det ju ingen som visste. Bakterierparasiten kunde vara en mycket liten amöba (ett slags urdjur), "levande protoplasma", ett enzym med tillväxtpotentialer, troligen en del

av bakterien själv, kanske från ett tidigare stadium i dess historia, eftersom den tycktes kunna uppstå spontant i kolonier av mikroocker. Om det var ett separat virus kunde det vara en icke-patogen form av vaccinia (eftersom det var detta virus han hade tillfört från början) varvid han föreställde sig att ett icke-patogent virus mycket väl kan angripa bakterier, medan dess patogena form endast kan växa i infekterade djur.

I varje fall var Twort nästan säker på att det han hade upptäckt var en infektiös sjukdom på bakterier. Längre fram i sin artikel beskriver han ett liknande fenomen på tyfoïdbaciller och beklagar att han inte fått tillfälle att fara till Dardanellerna och undersöka dysenteriförhållandena där. Han har ingen ekonomisk möjlighet att arbeta vidare och komma fram till definitiva slutsatser om det han funnit, men han överlämnar med sin artikel riktlinjer för vidare verksamhet till dem som är mera lyckligt lottade än han.

Mikrob blir bakteriofag

Tworts artikel väckte ingen respons, kanske beroende på kriget. Två år senare, 1917, kom en rapport från fransmannen Felix d'Herelle. Han hade i Paris kunnat bevittna ett utbrott av dysenteri, just ett sådant som Twort hade önskat sig. Nu beskrev han hur han hittat en mikrob, antagonistisk mot dysenteribakterien. Utan någon detaljerad redogörelse för sina experiment och med stor självsäkerhet i sin slutsats, gav han den osynliga mikroben namnet bakteriofag [19]. Tworts arbete nämnde han inte med ett ord, trots att vissa omständigheter tyder på att han kände till det [63].

Namnet bakteriofag vann gehör, och dess förintande verkan på bakterierna kom länge att kallas d' Herelles fenomen". Det var detta fenomen som Duggar och Armstrong nämnde år 1923 [21]. De frågade: om nu alla virus är minibakterier, varför lever då inget av dem i smör, i mjölk, i jord? Finns det någon ultramikroskopisk organism som går att odla utanför cellen? Är det möjligt att en protoplastisk partikel, en cell, kan vara lika liten som en hemoglobinpartikel och ändå bära med sig alla egenskaper som en individ måste ha just för att kunna vara en individ?

Men – för att kunna sprida sig så snabbt i växtvävnader som ju virus bevisligen gör, måste partiklarna vara så små att de ryms i de protoplasmabryggor som förenar cellerna. Växtceller är till skillnad från djurceller försedda med vägg, och de smala plasmabryggorna är enda vägen in.

Gen som hoppat över skaklarna

"Sammantaget", slutar Duggar och Armstrong, "kan vi inte undvika intrycket att den agent som orsakar mosaiksjuka kan vara en produkt av värdcellen, inte en enkel produkt såsom ett enzym, utan en kromatinpartikel, kanske en gen, som hoppat över skaklarna och fått förmågan att föröka sig, som fortsätter att skapa störningar och stimulans i sin väg – och den vägen är bara den levande cellen [21].

James Johnson, växtpatolog i Wisconsin, ägnade hela sitt liv åt tobaksplantans sjukdomar. Hans lärjunge Maurice Mulvanias ansåg det vara på tiden att tillämpa nya idéer och ny teknik på forskningen om tobaksmosaikvirusets natur. Han fann att förvånande få undersökningar av virus i egenskapen kemiskt ämne hade gjorts, och att samverkan med forskare sysselsatta med animala virus praktiskt taget inte förekom [45].

Mulvanias undersökningar av hur tobaksmosaikvirus i orenad saft reagerar för ljus, värme, dialys etc. ledde honom fram till att virus måste vara något mindre än en cell, en icke-levande enhet, kanske en enkel kolloid. Hans kännedom om Mrowkas och Andriewskys arbeten [43, 2] medverkade till hans uppfattning av virus som (möjligen) ett protein, med enzymatiska egenskaper.

Tobak testplanta

H. H. McKinney i Washington, även han växtpatolog, gick ett par steg längre 1927 [42], genom att inse att för att kunna studera virus på ett tillfredsställande sätt krävdes dels att ovidkommande material i växtsaften togs bort genom rening, dels att det infördes en kvantitativ metod, så att man i varje steg av arbetet kunde mäta

virushalten i den lösning man hade. Denna kvantitativa metod måste utarbetas först. Ett möjligt mått på koncentrationen i en viruslösning var hur många gånger lösningen kunde spädas och fortfarande vara infektiös. För att mäta infektionsförmågan krävdes ett lätt saftöverförbart virus och en lättsmittad, lättodlad indikatorplantart. McKinney, som annars arbetade med sädeslagens virus, valde tobaksmosaik med tobak som testplanta. Som mått på infektionsförmågan kunde han varken använda symptomstyrkan eller inkubationstiden (tiden mellan infektion och symptomframkomst), för de varierade mycket litet; andelen smittade plantor däremot var ett fungerande mått.

Supercentrifugering

Som reningsmetod fann McKinney filtrering vara otillräcklig; virushalten i filtraten blev för låg. Han övergick därför till att utnyttja tyngdkraften och dess förstärkning, centrifugalkraften, som verkar på en lösning så att större och tyngre partiklar sjunker till botten fortare än de som är mindre och lättare. Eftersom tyngdkraften verkade för långsamt och dessutom gav alltför varierande resultat, övergick McKinney till den s.k. supercentrifugen med ett maxvarvtal på 50 000 per minut, motsvarande ungefär 70 000 x jordens dragningskraft.

McKinney nådde inte ända fram, men andra fortsatte på den inslagna amerikanska vägen mot ett rent, karakteriserbart virus, en väg som gjorts möjlig av framgångarna inom kemi och teknik. Carl Vinson och A. W. Petre vid Boyce Thompson Institute for Plant Research i New York gjorde en serie experiment med rening av tobaksmosaikvirus genom omväxlande utfällning och centrifugering [60, 61, 62]. De prövade många utfällande tillsatser, salter, organiska vätskor etc. Deras renaste produkt var lika infektiös som den växtsaft de utgick från men innehöll bara 1 % av dess torrs substans [62].

Antiserum mot växtvirus?

En annan väg till klarhet om virus' natur var den immunologiska. Det var sedan tidigare känt att extrakt från såväl djur som växter hade antigena

egenskaper, d.v.s. förmåga att i varmblodiga djur framkalla specifika antikroppar, som band och oskadliggjorde det antigena ämnet [22, 9]. De antigena egenskaperna ansågs vara knutna till en speciell sorts proteiner, globuliner.

För att utröna effekten av en mosaiksjukdom på växtens globulinnehåll, extraherade M. Dvorak i North Dakota år 1927 växtsaft från dels frisk, dels mosaiksjuk potatis (utan närmare precisering av sjukdomen) som han renade från grövre beståndsdelar och injicerade i kaniner. Utvunnet antiserum (blodserum med antikroppar) blandades med renad frisk och sjuk växtsaft. Olika spädningar av antiserum och av växtsaft prövades, och vardera slagets antiserum (mot frisk resp. sjuk saft) blandades med såväl sjuk som frisk växtsaft. Reaktionen syntes som en utfällning, precipitin, av antigen-antikropp-komplex i de fall antigen och antikroppar motsvarade varandra. Dvoraks slutsats av experimenten blev att mosaiksjukan påverkade växtsaftens globulin till att framkalla delvis andra antikroppar än den friska saften gjorde [22].

Året därpå upprepade och utvidgade Helen Purdy Dvoraks serologiska undersökningar, men med tobaksmosaikvirus [49, 50]. Hon fann att mosaikhaltig tobakssaft förlorade sin infektiösitet om den blandades med antiserum mot tobaksmosaikvirus, däremot inte när antiserum mot frisk tobakssaft tillsattes [49]. Frisk och virushaltig tobakssaft visade sig ha vissa antigena substanser gemensamt, medan virushaltig saft av tomat, paprika, petunia och tobak hade gemensamma antigena substanser som inte kunde påvisas i frisk tobakssaft. Alla antikroppar i serum mot frisk saft avlägsnades genom absorption vid tillsats av virussaft, men i serum mot virussaft blev det antikroppar över efter absorption med frisk saft.

Helen Purdy tolkade försiktigt dessa resultat så, att en specifik antikropp mot virussaft fanns närvarande i antiserum mot sådan saft, men resultatet talade själva om att sådant antiserum också måste innehålla antikroppar mot frisk saft, och att det alltså inte var växtens eget globulin som ändrades av sjukdomen [50].

Jorgen Birkeland, som tagit del av både Dvoraks och Purdys artiklar, satte upp de tre möjligheter han såg till förklaring av virussaftens antigena egenskaper och beslöt försöka ta reda på vilken av dem som stämde bäst med verkligheten. Möjligheterna var: 1) virus förändrade plantans eget antigen, 2) virus bands till plantans antigen, 3) virus verkade själv som antigen.

En antigen fraktion

För att kunna avgöra frågan måste Birkeland jämföra frisk och infekterad växtsaft och deras antisera inte bara med varandra utan också med en ren viruslösning och dess antiserum, så fri som möjligt från växtprotein, eftersom "bevisen för att det bara är protein som kan fungera som antigen är överväldigande". Han använde en av Vinson och Petre's reningsmetoder [61] och kom till följande resultat av sin jämförelse: Saften från en virusinfekterad planta innehåller, förutom samma antigena beståndsdelar som den från en frisk planta, även en antigen fraktion, oskiljbar från virus självt. Denna antigena faktor är specifik för varje särskilt virus. Med all säkerhet är denna faktor antingen virus självt eller ett virusväxt-protein-komplex [9].

Lika delar protein och thymonukleinsyra

Utvecklingen av biokemisk teknik under 1930-talet visade också väg till kunskap om bakteriofagernas sammansättning. I Frankfurt utvecklade Max Schlesinger differentialcentrifugerings-tekniken, alltså konsten att genom omväxlande lågvarvig och högvarvig centrifugering befria viruslösningen från beståndsdelar större respektive mindre än viruspartiklarna. År 1933 hade han både renframställt en kolibakteriofag "i mängder synliga för blotta ögat" och ur sedimentationsdata från centrifugeringen beräknat dess partikelstorlek till 90 nm. På samma sätt mätte han andra bakteriofager och jämförde med tidigare mätningar som baserats på filtrering. Schlesingers värden var genomgående högre, ofta dubbelt så höga [51], och genomgående riktigare, som historien skulle komma att visa. År 1934 hade han kemiskt analyserat sin renframställda fag, och

funnit att den huvudsakligen bestod av protein med så hög fosforhalt "att det låg nära till hands att tänka sig att det utgjordes av nukleoproteider" [52]. Före sin tragiska död i exil i London 1937 hann han visa att hans rena fagmaterial bestod av ungefär lika delar protein och thymonukleinsyra, nu känd som DNA [53].

Max Schlesinger var den förste att visa vad ett virus är rent kemiskt. Han borde fått äran som banbrytare, men den fick han inte. Den tillkom i stället den amerikanske biokemisten Wendell Stanley, en mindre omsorgsfull man, men betydligt mer ärestylen. Hans verk påskyndade utvecklingen, men hans slutsats var förhastad. Vad gjorde han då? Han kristalliserade ett "protein med tobaksmosaikvirusets egenskaper" [56].

Infektiös kristall

Mrowka var för tidigt ute med sitt globulin år 1912. Schlesinger och flera av hans kollegor föll offer för nazismen [63]. Men för Stanley räckte det med att visa upp en infektiös kristall för att hela världen skulle haka på. Just den kristallina formen togs som intäkt för att ämnet var rent, och det var det som fascinerade: att ett rent kemiskt ämne kunde parasitera och föröka sig. Efter Stanleys föreläsning om sitt arbete vid den 2:a internationella mikrobiologiska kongressen i London 1936, tog patologer, mikrobiologer, biokemister, fysikaliska kemister och kristallografer fatt i kristallerna och undersökte dem med all tillgänglig teknik. Många fick material direkt från Stanley, som själv också arbetade vidare med det, andra gjorde egna kristaller.

En engelsk grupp, bestående av Frederick Bawden, "virusfysiolog", Norman Pirie, biokemist, samt John Bernal och Isadore Fankuchen från kristallografiska laboratoriet i Cambridge, bekräftade Stanleys resultat, men fann att det gick att rena proteinet ytterligare till en flytande kristallisk fas [6]. De upptäckte också att proteinet innehöll 0,5 % fosfor och 2,5 % kolhydrat, som kunde isoleras som nukleinsyra av ribostyp från upphettat protein. Mätningar i flytande och torrade kristaller med hjälp av röntgenstråle-refraktion avslöjade parallella stavformiga molekyler, identiska i genomskärning, uppbyggda av

underenheter. Deras genomskärningsyta beräknades vara minst 20100 Ångström² (1Å=0,1nm), längden var svårare att bedöma och inte säkert lika för alla. Författarna bedömde fyndet vara av ett visst intresse, som skulle stegras betydligt om det kunde visas att stavarna de hittat verkligen var viruspartiklar.

Inget inre vatten

Året därpå, 1937, hade Bawden och Pirie undersökt de flytande kristallerna ytterligare [5]. De visade sig bestå av enbart protein och nukleinsyra utan inre vatten, vilket skarpt skilde dem från bakterier. Nukleinsyran innehöll en pentos (sockerart med 5 kolatomer) och färgades inte av det reagens som påvisar desoxi-varianten (en pentos med 2 syreatomer mindre). Den reagerade inte med antiserum mot tobaksmosaikvirus, vilket däremot det ursprungliga preparatet gjorde. Förhållandet mellan mängderna nukleinsyra och protein i detta ändrades inte genom utfällning med specifika antisera, vilket visade att de båda ämnena måste hänga ihop, inget av dem kunde vara en förorening av det andra. Stanley hade från början inte uppgivit några fynd av vare sig fosfor, svavel eller kolhydrater i sina preparat men medgav år 1937 fosfor- och svavelmängder som stämde med Bawden och Pirie's. Den nukleinsyra som han till sist erkände fanns i hans preparat avfärdade han som en förorening, uppenbarligen för att inte förta "renheten" från sina kristaller.

Vid den här tiden rådde uppfattningen att ett kristallint material måste bestå av ett enda kemiskt ämne. Detta är inte sant, hävdade Bawden och Pirie. Växtfibrer, hårstrån, muskler, ja till och med bakteriesuspensioner är precis lika kristallina som renat tobaksmosaikvirus. Alltså finns det inte heller något motsatsförhållande mellan det levande och det kristallina. Över huvud taget är det meningslöst att använda orden "levande" och "icke-levande" om virus ansåg Bawden och Pirie, som tvivlade på att dessa ord hade någon som helst vetenskaplig innebörd [5].

Vad var då nukleinsyra?

Redan år 1869 hittade Fritz Miescher ett ämne som han kallade "nuklein" eftersom det bara

fanns i cellernas kärna (*nucleus*) [46]. Ett par år därefter hittade Hoppe-Seyler en liknande förening i jästceller [13]. Vid senare analys visade sig nukleinet bestå av en del protein och en del som innehöll bl.a. fosforsyra. Denna sistnämnda del fick då namnet nukleinsyra. I slutet av 1930-talet kände man till att "Mieschers nukleinsyra" var uppbyggd av fosforsyra kopplad till molekyler av sockerarten desoxiribos och till s.k. kvävebaser, puriner och pyrimidiner, alltså kol-väte-kväveringar, varav man identifierat 4 olika: purinerna adenin och guanin samt pyrimidinerna cytosin och thymin. Nukleinsyran från jäst innehöll ribos i stället för desoxiribos och pyrimidinen uracil i stället för thymin.

Hubert Loring i Princeton, USA, kunde år 1939 visa att nukleinsyran i tobaksmosaikvirus stämde med den i jäst, åtminstone beträffande tre av kvävebaserna: adenin, guanin och cytosin, och alltså var en ribonukleinsyra [38].

Virus' struktur synlig

Samma år, 1939, kunde man för allra första gången se virus! I samarbete med herrarna von Borries och Ruska vid Siemens laboratorium för elektronoptik, lyckades G. A. Kausche från Berlins Biologiska Riksanstalt se och fotografera partiklar av potatisvirus X och tobaksmosaikvirus i 20–25 000 gångers förstoring [35, 36]. Nu kunde man själv se, med hjälp av detta nya "Übermikroskop", att tobaksmosaikvirus utgjordes av 15 nm tjocka, sexkantiga stavar, 150 och 300 nm långa. Det kunde också visas att kortare bitar, som sedimenterade som en särskild fraktion i ultracentrifug, inte var infektiösa och alltså representerade sönderbrutna partiklar; ett bevis för att viruspartikeln var en molekyl med bestämd storlek [36].

Reaktionen på denna nya möjlighet kan beskrivas som en något häpen lättnad: nu hängde allt inte längre på de besvärliga kristallvinkelberäkningarna! Nu kunde man med ny säkerhet tränga längre in i materiens minsta detaljer och därigenom snabbare komma fram till den kunskap man ville nå.

Men röntgenstråleoptiken hade långt ifrån spelat ut sin roll. Ännu var elektronmikroskopet inte utvecklat dithän att det kunde ersätta de kristallografiska studierna. Genom dem avslöjade Bernal och Fankuchen 1941 en del av tobaksmosaikvirusets partikelstruktur. Proteinmolekyler, "underenheter", om $11 \times 11 \times 11 \text{ \AA}^3$ tycktes ligga packade längs staven ungefär som travade ringar, där varje ring utgjordes av 6 underenheter, därav den hexagonala strukturen. Antalet ringar längs varje stav var en multipel av 24 [8].

Under andra världskriget kom man inte mycket längre med växtvirusundersökningarna. Dels var man inne i ett svårt skede, eftersom tekniken ännu inte medgav arbete med ren nukleinsyra, man kunde inte hålla den fri från nedbrytande enzymer. Dels misstrodde tyskar, amerikaner och engelsmän varandra. Allt någon av dem gjorde, gjorde de andra om, för säkerhets skull [46].

Nukleinsyrans roll avslöjad

Avslöjandet av nukleinsyrans roll kom år 1944 från ett helt annat håll, nämligen det medicinska. Invändningsfritt visade Oswald Avery, Colin McLeod och Maclyn McCarty vid Rockefeller Institute for Medical Research, att nukleinsyra från en typ av bakterier kan få en annan typ av samma art att bete sig som den typ som nukleinsyran kom ifrån [4]. F. Griffith i England hade långt tidigare, 1928, upptäckt, att om möss injicerades med en liten dos levande pneumokocker av typ II (ofarliga bakterier) tillsammans med en stor dos avdödade av typ III (fatala), insjuknade mössen och typ III kunde utvinnas ur deras blod i renkultur. Nu ville Avery och hans medarbetare isolera den aktiva princip som åstadkom denna övergång till en annan typ, och om möjligt bestämma den kemiskt. De renade avdödade typ III-celler genom att avlägsna allt som de tänkte inte kunde vara inblandat, satte det rena preparatet till kolonier av en oinkapslad variant av typ II och såg att då i stället bakterier med glänsande polysackaridkapslar, som visade sig vara av typ III, började växa ut på substratet. Deras renade preparat, helt fritt från protein och polysackarider, visade sig efter kemisk analys

och nedbrytningsförsök med olika enzymer vara desoxiribonukleinsyra. De nya typ III-cellerna ändrade sig inte tillbaka igen, de förökade sig till enbart typ III-celler i fortsättningen. Alltså måste även den aktiva, styrande principen, desoxiribonukleinsyran, på något sätt föröka sig.

Nukleinsyran förökar sig

Hur gick det då till när en nukleinsyra förökade sig? Ett lämpligt system att studera för att få svar på den frågan borde vara virusinfekterade celler, där virusförökning och därmed en extrem nukleinsyreproduktion försiggick. Alldeles särskilt lämpliga var bakterieceller, lättodlade, enhetliga och möjliga att infektera simultant. Seymour Cohen, biokemist i Princeton, som kommit att inrikta sig på virusforskning delvis i samarbete med Wendell Stanley, valde att följa förökningen av bakteriofagen T2 i kolibakterier [15]. Han fann att medan friska bakterieceller producerar en rad olika cellbeståndsdelar, alstras i infekterade celler nästan enbart virus, desoxiribonukleinsyra (DNA) och virusprotein. Genom att sätta radioaktivt fosfor till bakteriernas näringssubstrat före eller efter infektion och sedan undersöka vart det tagit vägen, visade han att bakterieceller tillverkar virus-DNA av ämnen upptagna ur näringssubstratet och inte genom omvandling av sina egna beståndsdelar. Virusproduktionen följde inte samma mönster som förökningen av enheter "av självfördubblande typ" såsom celler. RNA medverkade inte, och syntesen av viruskomponenter beskrev inte den vanliga s-formade kurvan.

Virus tycks alltså inte föröka sig genom delning utan snarare genom kopiering; det ser ut som om virus ger cellen en mall och cellen inriktar hela sin produktionsapparat på att tillverka molekyler enligt mallen. "Denna hypotes är lätt att formulera", skrev Cohen, "men den är långtifrån lätt att förstå och ännu svårare att testa". Han förutspådde att det skulle komma att ta lång tid att förstå hur själva kopieringen går till, men att det inte borde vara omöjligt för hans samtida biokemister att isolera nödvändiga enzymer och ordna ett näringssubstrat, förse det med en lämplig energikälla, tillsätta virusmallen och så kunna odla virus på konstgjort substrat, äntligen! I själva verket blev det precis tvärtom.

Nukleinsyran nödvändig vid infektion

Direkt bevis för att nukleinsyran är nödvändig för infektion gav Roy Markham och hans medarbetare vid virusforskningsenheten i Cambridge år 1948, när de uppdagade att turnip yellow mosaic virus vid centrifugering delades i en topp- och en bottenfraktion. Den tyngre bottenfraktionen bestod av hela viruspartiklar med både (ribo-) nukleinsyra och protein, medan toppkomponenten utgjordes av enbart protein, identiskt med bottenkomponentens. Det rena virusprotein saknade helt infektionsförmåga, medan de kompletta partiklarna var starkt infektiösa. Ur plantor infekterade med dem kunde virus utvinnas som separerade i en topp- och en bottenfraktion. Ytterligare undersökningar, serologiska och elektroforetiska (som bygger på att partiklar av olika storlek och med olika elektrisk laddning rör sig olika fort i en lösning utsatt för elektrisk spänning), av samma virus tydde på att nukleinsyran fanns inuti och proteinet utanpå, som ett hölje, och att toppkomponenten utgjordes av sådana, tomma, höljen [40].

Protinets funktion

Om nu nukleinsyran både infekterar värdcellen och dirigerar förökningen, vad har då proteinet för funktion? Än en gång var det bakteriofagerna som fick ge svar. Att fagernas proteinhölje kunde skiljas från DNA genom osmotisk chock och bilda tomma "spöken" med förmåga att adsorberas till bakteriernas cellvägg visades år 1951 av Roger Herriott [30]. Alfred Hershey i Washington, en av dem som grundade Cold Spring Harbor's berömda "fag-grupp", och Martha Chase gav år 1952 en bild av hur en bakteriecell infekteras [31]. Bakteriofagerna adsorberas till bakteriens cellvägg med hjälp av sitt proteinhölje. Höljet stannar utanför cellen, men DNA tar sig in. I korthet är detta vad experimenten med radioaktivt fosfor och svavel för märkning av DNA respektive protein i olika utvecklingsstadier av infektionen avslöjade. Hershey och Chase drog själva slutsatsen att proteinet tjänar som skydd för DNA utanför cellen, att det fäster fagen på cellväggen och att det ombesörjer injektionen av DNA i cellen.

Om likheten mellan virus och gener

Tidigare under 1900-talet, när gränserna mellan vetenskaperna inte var så skarpa och, framför allt, forskningen var mer överblickbar, lade både mikrobiologer och genetiker märke till likheterna mellan virus och gener. I en not i Franska biologiska sällskapets skriftserie 1920 jämförde fagforskaren Eugene Wollman en tolkning av d'Herelles fenomen med Charles Darwins antagande om ärftlighetens grunder [66]. Bordet och Ciuca hade tidigare samma år kallat bakteriofagernas verkan "en ärftlig, smittsam variation", som måste tillskrivas sådana intracellulära faktorer som både kunde föröka sig i nedstigande led och sprida sig horisontellt i mediet. Darwin antog år 1868 att cellerna sände ut små korn som "cirkulerade fritt i systemet", förökade sig genom delning och så småningom gav upphov till likadana celler som dem de kom ifrån. Permanenta förändringar i dessa korn åstadkom den ärftliga variationen.

Om man nu översatte Darwins "system" med "bakteriekulturer", skulle hans "små korn" helt enkelt vara "de intracellulära faktorerna", bakteriofagerna.

Genetikern H. J. Muller i Texas skrev två år senare om genernas märkliga förmåga till autokatalys, alltså till att kunna arrangera sin egen förökning genom att omvandla omgivande material till en produkt identisk med sig själva. Ja, han gick så långt som till att skriva: "det nya materialet läggs intill den ursprungliga genen", och det är genen själv som åstadkommer detta genom att attrahera det byggmaterial protoplasman tillhandahåller. Han jämförde detta fenomen med d'Herelle's, som även det var autokatalytiskt, och inte nog med det, kunde förändras på ett bestående sätt, motsvarande genernas mutationer. Antingen kunde det vara så att d'Herelle's substans och generna, båda med ärftlig variation, verkade på totalt olika sätt, vilket skulle öppna möjligheten till två helt olika slags liv. Eller kanske d'Herelle's virus verkligen var gener; i så fall fick man ytterligare en vinkel att angripa genproblemet från [44].

Genernas kemiska byggnad klarnar

År 1933 beskrev en annan genetiker, M. Demerec, gener med utgångspunkt från deras lokalisering i cellen, deras mikroskopiskt synliga struktur, de egenskaper de gav upphov till och i vilken ordning de satt på kromosomen, samt hur de kunde förändras genom bestrålning. Sedan visade han i en figur en komplicerad organisk molekyl, ett grovt diagrammatiskt exempel på hur en gen skulle kunna vara konstruerad, kemiskt sett. Figuren föreställde thymonukleinsyra, DNA. De fyra baserna fanns med, korrekt ritade, liksom socker och fosforsyra. Det var bara hopsättningen av dem som inte stämde med den nutida versionen [18].

En tredje genetiker, C. D. Darlington i London, delade 1944 in generna i nukleära gener, plastogener och plasmagener [17]. De nukleära generna fanns i cellkärnan, plastogenerna i cellens plastider och plasmagenerna i protoplasman. Darlington ansåg virus vara ett slags plasmagen som inte behövde vara medfödd, utan kunde förvärfvas senare genom infektion, en gen som "frodades i fel organism".

Samma år, 1944, var det som Averages, MacLeods och McCarty's artikel om den transformerande substansen i pneumokocker publicerades, i en medicinsk tidskrift. Författarnas slutsats var att den transformerande principen utgjordes av en nukleinsyra av desoxiribostyp, och i diskussionen föreslog de att den kunde vara en gen, ett virus eller en "överförbar mutagen". Men artikeln var avsedd för mikrobiologer, inte för genetiker. Sådana läste inte tidskriften den stod i, och genetiska sökord eller hänvisningar fanns inte i de utdragsjournaler där referatet var infört, Chemical Abstracts och Biological Abstracts [69]. Budskapet om nukleinsyrens roll nådde helt enkelt inte fram till genetikerna.

Eller var det så att de helt enkelt vägrade att tro på en så enkel kemisk grund för sitt komplicerade ämne? Inte ens Muller, som skrivit så framsynt om genernas funktion år 1922, ägnade mer än ca 3 % av sin tid åt "nukleinsyrens möjliga roll" när

han talade inför Royal Society i London om "Genen" i november 1945. Tanken att generna utgjordes av DNA vann långsamt insteg under åren vid 1900-talets mitt utan att klart deklarerats, och utan att någon tycktes göra något försök att bevisa det. Tidskriften *Advances in Genetics* innehöll ingen referens till Averages artikel förrän 1955 [69].

Nukleinsyrens struktur

En som tagit intryck av artikeln om den transformerande substansen, däremot, var biokemisten Erwin Chargaff i New York. Han inspirerades till att börja arbeta med nukleinsyror, och han och hans medarbetare gjorde omfattande undersökningar av DNA och RNA i olika organ i olika djurarter, varvid mängden av de olika kvävebaserna i förhållande till varandra (baskvoterna) jämfördes [14, 69]. Just dessa baskvoter blev en värdefull ledtråd för vinnarna av "the race for the double helix", James Watson och Francis Crick [69].

Det räckte ju inte med att känna till den kemiska sammansättningen av DNA. Nyckeln till dess fundamentala funktion måste ligga i strukturen.

Biologiska molekylers form hade i slutet av 1940-talet blivit ett eget forskningsämne som kallades molekylärbiologi. En molekylärbiolog var enligt Crick en blandning av kristallograf, biofysiker, biokemist och genetiker (som de närmaste decennierna framåt kom att arbeta huvudsakligen med virus). Gissningar och modellbygge var minst lika viktiga arbetssätt som teknik och beräkningar [57].

DNA:s gåta

Molekylärbiologernas stora uppgift i början av 50-talet var att lösa DNA-ets gåta, att bestämma hur molekylerna måste se ut för att kunna fungera, som molekyl först och främst, men helst också på sitt unika sätt. I februari 1953 hade Linus Pauling och Robert Corey i Kalifornien en struktur med tre tvinnade strängar färdig [48]. I april samma år publicerades det slutliga förslaget av Watson och Crick i Cambridge [65]. Deras struktur bestod av två strängar av fosfat-socker-fosfat-socker i pa-

rallell spiral; the double helix, sammanhållna av de hopparade kvävebaserna, så att en purinbas från den ena strängen binder en pyrimidinbas från den andra; adenin-thymin och guanin-cytosin.

Strukturen stämde dels med alla kristallografiska mått, dels med Chargaffs baskvoter. Den medgav ett oändligt antal variationer, eftersom baserna längs den ena strängen kunde komma i precis vilken ordning som helst. Samtidigt erbjöd den en suverän kopieringsmekanism (vilken inte undgått författarna) genom att varje bas på den ena strängen måste kopplas till sin motsvarighet på den andra, innebärande att den ena strängens ordning föreskriver den andras.

Mekanismen var klar, bitarna hade fallit på plats. Allt var inte provat men skulle komma att bli det.

Aminosyrafrekvensen bestäms

Året därpå föreslog Watson på basis av röntgenstrålediffraction en ny spiralstruktur, nu av tobaksmosaikvirus, med RNA i mitten som en spiralfjäder och ca 1200 proteinmolekyler, vardera med en molekylvikt på 35000, fästa längs med den, bildande ett hölje runt om [64].

Den elektronmikroskopiska bekräftelsen på att partiklarna verkligen såg ut på det sättet kom 1955 från Californien, av Roger Hart [29].

Om man med biokemiska metoder först skilde tobaksmosaikvirusets proteindel från dess RNA och sedan sammanförde dem igen, förenade de sig till partiklar, visade H. Fraenkel-Conrat och Robley Williams i Californien 1955. Det gick också bra att på detta sätt göra partiklar av RNA från en virusstam och protein från en annan. Hybridviruset reagerade serologiskt som proteinleverantören men gav vid infektion symptom i växten som liknade dem av den stam som RNA-et kom ifrån [23, 24, 25].

Några år senare lyckades det att spjälka tobaksmosaikvirusets proteinhölje enzymatiskt aminosyra för aminosyra (det finns 20 st olika

aminosyror, proteinets minsta beståndsdelar) och bestämma dem, så att hela höljet blev kemiskt kartlagt. Gruppen vid Max-Planck-institutet i Tübingen kom först, i juni 1960 [1], Berkeleygruppen i Californien som god tvåa i september samma år [58].

Vad vet vi om virus idag?

Under tiden som följde utforskades nukleinsyran i virus efter virus. De flesta växtvirus visade sig innehålla enkelsträngad RNA [39, 55], men det finns också sådana med dubbelsträngad RNA [26] och sådana med DNA, dubbelsträngad [54] eller enkelsträngad [28]. Många växtvirus, kanske de flesta, har inte all sin nukleinsyra i en partikel utan i två eller tre eller flera; de är vad vi kallar multikomponenta. Under 1970-talet började tobaksmosaikvirusets RNA kartläggas, och vi vet nu ganska mycket om både i vilken ordning nukleotiderna kommer och vilka slags protein de kodar för [16]. Vi vet mycket om hur virus förökar sig, vi kan tillverka komplementärt DNA motsvarande virus-RNA, vi kan tillverka hybrider och vi kan bygga in nukleinsyredelar från virus i värdväxters genuppställning för att få växterna att själva producera virusprotein som hindrar det riktiga viruset från att infektera, s.k. transgena plantor.

Vad vi ännu vet mycket litet om däremot, är samspelet mellan virus och värd, om hur sjukdomarna egentligen uppstår. Därvid är det inte vår kunskap om virus som är otillräcklig, utan snarare vår insikt i hur cellen verkar, och, i ännu högre grad, hur den sammansatta organismen, det komplicerade livet, fungerar. Man kan nog idag säga, att vi vet vad virus är. Det som återstår är resten av livet. Genom studier av virus har molekylärbiologin växt fram och utvecklats. Trots att virus från vår synpunkt sett är något snett i tillvaron, är det med dess hjälp vi har nått in till livets kärna. Nu är vi, med molekylärbiologins hjälp, på väg ut igen till det alltmer sammansatta.

Litteratur

- Anderer, F. A., Uhlig, H., Weber, E. & Schramm, G. 1960. Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus. *Nature* 186, 922–925.
- Andriewsky, P. 1914. L'ultrafiltration et les microbes invisibles. *Zbl. Bakt. Parasitkde Abt. I*, 75, 90–93.
- Arthur, J. C. 1885. Proof that bacteria are the direct cause of the disease in trees known as pear blight. *Bot. Gaz.* 10, 343–345.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J. exp. Med.* 79, 137–158.
- Bawden, F. C. & Pirie, N. W. 1937. The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B*, 123, 274–320.
- Bawden, F. C., Pirie, N. W., Bernal, J. D. & Fankuchen, I. 1936. Liquid crystalline substances from virus infected plants. *Nature, Lond.* 138, 1051–1052.
- Beijerinck, M. W. 1899. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Flecken-krankheit der Tabaksblätter. *Zbl. Bakt. Parasitkde Abt. II*, 5, 27–33.
- Bernal, J. D. & Fankuchen, I. 1941. X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations. *J. gen. Physiol.* 25, 111–165.
- Birkeland, J. 1934. Serological studies of plant viruses. *Bot. Gaz.* 95, 419–436.
- Blakeslee, A. F. 1921. An apparent case of non-Mendelian inheritance in *Datura* due to a disease. *Nat. Acad. Sci., Proc.* 7, 116–118.
- Brock, T. D. 1988. Robert Koch. *A life in medicine and bacteriology*. Science Tech Madison, W.I. and Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Centanni, E. 1902. Die Vogelpest. *Zbl. Bakt. Parasitkde Abt. I*, 31, 182–201.
- Chargaff, E. 1947. On the nucleoproteins and nucleic acids of microorganisms. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* 12, 28–34.
- Chargaff, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6, 201–209.
- Cohen, S.S. 1947. The synthesis of bacterial viruses in infected cells. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* 12, 35–49.
- Crick, F. H. C. 1968. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38, 367–379.
- Darlington, C.D. 1944. Heredity, development and infection. *Nature, Lond.* 154, 164–169.
- Demerec, M. 1933. What is a gene? *J. Hered.* 24, 369–378.
- d'Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 165, 373–375.
- Duggar, B. M. & Karrer, J. L. 1921. The sizes of the infective particles in mosaic disease of tobacco. *Ann. Mo. bot. Gdn*, 8, 345–356.
- Duggar, B. M. & Karer Armstrong, J.L. 1923. Indications respecting the nature of the infective particles in the mosaic disease of tobacco. *Ann. Mo. bot. Gdn*, 10, 191–212.
- Dvorak, M. 1927. The effect of mosaic on the globulin of potato. *J. Infect. Dis.* 41, 215–221.
- Fraenkel-Conrat, H. 1956. The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 882–883.
- Fraenkel-Conrat, H. & Singer, B. 1957. Virus reconstitution. II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 540–548.
- Fraenkel-Conrat, H. & Williams, R. C. 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 41, 690–698.
- Gomatos, P. J. & Tamm, I. 1963. Animal and plant viruses with double-helical RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50, 878–885.
- Grafe, A. 1991. *A history of experimental virology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Harrison, B. D., Barker, H., Bock, K. R., Guthrie, E. J., Meredith, G. & Atkinson, M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270, 760–762.
- Hart, R. G. 1955. Electron-microscopic evidence for the localization of ribonucleic acid in the particles of tobacco mosaic virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 41, 261–264.
- Herriott, R. M. 1951. Nucleic acid-free T2 virus 'ghosts' with specific biological action. *J. Bact.* 61, 752–754.
- Hershey, A. D. & Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. gen. Physiol.* 36, 39–56.
- Hughes, S. M. 1977. *The virus, a history of the concept*. Heinemann, London.
- Hunger, F. W. T. 1905. Untersuchungen und Betrachtungen über die Mosaik-Krankheit der Tabakspflanze. *Z. Pfl. Krankh.* 15, 257–311.
- Ivanovski, D. 1903. Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Z. Pfl. Krankh.* 13, 1–41.
- Kausche, G. A. 1939. Über Versuche zum Nachweis und zur Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus. *Mitt. Deutsch. Biol. Reichsanst.* 59, 15–23.
- Kausche, G. A., Pfankuch, E. & Ruska, H. 1939. Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus in Übermikroskop. *Naturwissenschaften* 27, 292–299.
- Koch, R. 1876. Die Ätiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2, 277–310.
- Loring, H. 1939. Properties and hydrolytic products of nucleic acid from tobacco mosaic virus. *J. biol. Chem.* 130, 251–258.
- Mandel, H. G., Matthews, R. E. F., Matus, A. & Ralph, R.K. 1964. Replicative form of plant viral RNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 16, 604–609.
- Markham, R., Matthews, R. E. F. & Smith, K. M. 1948. Specific crystalline protein and nucleoprotein from a plant virus having insect vectors. *Nature, Lond.* 162, 88–90.
- Mayer, A. 1886. Ueber die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Landw. Versuchsstat.* 32, 451–467.
- McKinney, H. H. 1927. Quantitative and purification methods in virus studies. *J. agric. Res.* 35, 13–38.
- Mrowka, 1912. Das Virus der Hühnerpest ein Globulin. *Zbl. Bakt. Parasitkde Abl. I*, 67, 249–268.
- Muller, H. J. 1922. Variation due to change in the individual gene. *Am. Nat.* 56, 32–50.
- Mulvanian, M. 1926. Studies on the nature of the virus of tobacco mosaic. *Phytopathology* 16, 853–871.
- Olby, R. 1974. *The path to the double helix*. London, Macmillan.
- Pasteur, L. & Joubert, J. 1877. Etude sur la maladie charbonneuse. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 84, 900–906.
- Pauling, L. & Corey, R. B. 1953. Structure of the nucleic acids. *Nature* 171, 346.
- Purdy, H. A. 1928. Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 25, 702–703.
- Purdy, H. A. 1929. Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *J. exp. Med.* 49, 919–935.
- Schlesinger, M. 1933. Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen. *Biochem. Z.* 264, 6–12.
- Schlesinger, M. 1934. Zur Frage der chemischen Zusammensetzung des Bakteriophagen. *Biochem. Z.* 273, 306–311.
- Schlesinger, M. 1936. The Feulgen reaction of the bacteriophage substance. *Nature, Lond.* 138, 508–509.
- Shepherd, R. J., Wakeman, R. J. & Romanko, R. R. 1968. DNA in cauliflower mosaic virus. *Virology* 36, 150–152.
- Shipp, W. & Haselkorn, R. 1964. Double-stranded RNA from tobacco leaves infected with TMV. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52, 401–408.
- Stanley, W. M. 1935. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science, N. Y.* 81, 644–645.
- Stent, G. S. 1968. That was the molecular biology that was. *Science* 160, 390–395.
- Tsugita, A., Gish, D. T., Young, J., Fraenkel-Conrat, H., Knight, C. A. & Stanley, W. M. 1960. The complete amino acid sequence of the protein of tobacco mosaic virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 46, 1463–1469.
- Twort, F. W. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet, II*, 1241–1243.
- Vinson, C. G. 1927. Precipitation of the virus of tobacco mosaic. *Science, N.Y.* 66, 357–358.
- Vinson, C. G. & Petre, A. W. 1929. Mosaic disease of tobacco. *Bot. Gaz.* 87, 14–38.
- Vinson, C. G. & Petre, A. W. 1931. Mosaic disease of tobacco. II. Activity of the virus precipitated by lead acetate. *Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.* 3, 131–145.
- Waterson, A. P. & Wilkinson, L. 1978. An introduction to the history of virology. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Watson, J. D. 1954. The structure of tobacco mosaic virus. I. X-ray evidence of a helical arrangement of sub-units around the longitudinal axis. *Biochem. Biophys. Acta* 13, 10–19.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.
- Wollman, E. 1920. A propos de la note de M.M. Bordet et Ciuca. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 83, 1478–1479.
- Woods, A. F. 1899. The destruction of chlorophyll by oxidizing enzymes. *Zbl. Bakt. Parasitkde Abt. II*, 5, 745–754.
- Woods, A. F. 1902. Observations on the mosaic disease of tobacco. *Bull. U.S. Dep. Agric., Washington*, no 18.
- Wyatt, H. V. 1972. When does information become knowledge? *Nature* 235, 86–89.

Information till författare

Artiklar i Växtskyddsnotiser kan skrivas på svenska, norska, danska eller engelska. Sträva efter ett ledigt språk. Använd fackuttryck om de behövs, men förklara dem. Undvik förkortningar i löpande text. Skriv kort; artikeln ska helst inte vara längre än 4–6 sidor i tryck, inklusive tabeller och figurer. En sida utan bilder motsvarar ungefär 500 ord.

Tekniska instruktioner

Manuskriptet lämnas på diskett tillsammans med en utskrift av hela dokumentet. Ange ordbehandlingsprogram och gärna programversion, samt dokumentets namn. Bifoga gärna en ASCII-version av dokumentet om det inte är skrivet i Word (Mac- eller PC-version).

Placera tabeller och figurtexter sist. Redigera så lite som möjligt: använd inga understrykningar, avstava inte, justera inte högermarginalen och gör inga indragningar vid nytt stycke eller i litteraturlistan. Eventuella redigeringsanvisningar kan lämnas på separat papper. Kontakta gärna redaktören om något är oklart (tel. 018 - 67 17 07).

Figurer och tabeller

Alla figurer (fotografier, teckningar och diagram) numreras löpande med arabiska siffror. I texten skrivs hänvisningarna "figur 1" eller (fig. 1). Ange alltid fotograf respektive tecknare till bilderna!

Teckningar bör göras i tusch och vara minst 1,5 gånger så stora som i tryck. Fotografier behöver inte vara anpassade till spaltbredd eller sidbredd, men ska helst inte vara mindre än de förväntas bli i tryck. Färgbilder publiceras bara undantagsvis. För färgbilder är diapositiv bäst som original. SLU Info/Växter har ett stort fotoarkiv och kan ofta bidra med bilder. Vi kan också hjälpa till med att fotografera av diabilder till svart/vita.

Tabeller numreras löpande med arabiska siffror. Hänvisningar i texten skrivs "tabell 1" eller (tab. 1). Tabeller ska vara skrivna med hjälp av tabulatorer och inte med mellanslag. Fundera på om alla tabeller är nödvändiga. Kan deras innehåll kanske sammanfattas i en figur eller i texten?

Litteraturlista

Litteraturlista skrivs utan blankrad och alfabetiskt efter författarnamn enligt följande exempel:

- Ainsworth, G.C., James, P.W. & Hawksworth, D.L. 1971. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 6th ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Bracker, C.E. 1966. Ultrastructural aspects of sporangiophore formation in *Gilbertella persicaria*. In *The Fungus Spore*, 39-58. Ed. M.F. Madelin. Butterworths, London.
- Bracker, C.E. & Butler, E.E. 1963. The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 55, 35-58.

I texten skrivs referenserna enligt följande: (Ainsworth et al. 1971), (Bracker & Butler 1963), Bracker (1966), (Bracker 1966), (Fuhrer et al. 1989, 1992; Heagle et al. 1979; Kohut et al. 1987).

Författarporträtt och engelsk text

En enkel författarbeskrivning med titel, verksamhetsområde, adress och telefon till arbetsplatsen bifogas.

Engelsk titel, engelska figurtexter och abstract på högst 200 ord ska finnas till varje originalartikel, men kan i t.ex. referat utelämnas. Även "Key words" bör bifogas. Författaren ansvarar för att engelsk text blir språkgranskad. Meddela alltid om så inte har skett! Om uppsatsen skrivs på engelska, ska titel, figurtexter och sammanfattning skrivas på något skandinaviskt språk.

Korrektur och författarexemplar

Granska och returnera korrekturet utan onödigt dröjsmål. Den elektroniska överföringen av texten minskar visserligen riskerna för fel, men utesluter dem inte. Undvik större ändringar i originaltexten på detta stadium.

Särtryck förekommer inte, men författaren får 10 exemplar av tidskriften vid utgivningen. På begäran skickas gärna ytterligare 15 gratisexemplar, men vid större beställningar debiteras självkostnadspris.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Virus på hagebruksvekster i Norge	32
<i>Dag-Ragnar Blystad</i>	
Melon-nekroseflekkvirus i agurk	35
<i>Dag-Ragnar Blystad och Bjørg Nes</i>	
Virus Research at the Danish Institute of Plant and Soil Science	38
<i>Merete Albrechtsen, Elisabeth Johansen, Gorm Palmgren, Karen Bech, Karen Husted och Steen Lykke Nielsen</i>	
Plant viruses at the University of Helsinki, Finland	43
<i>Jari Valkonen</i>	
Växtvirusforskning vid Lantbrukets forskningscentral	46
<i>Anja Kuusela och Anne Lemmetty</i>	
Växtvirologisk forskning vid Institutionen för växtpatologi	48
<i>Maria Sandgren, Anna-Karin Widmark, Klas Lindsten, Bengt Eriksson och Per Oxelfelt</i>	
Virus i äpple	52
<i>Gunilla Åhman</i>	
Vad är virus? - en historia byggd på växtvirologins utveckling	56
<i>Gunilla Åhman</i>	