

DIFUSÃO RADIAL PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS X NOS TECIDOS VEGETAIS IMPLANTADOS NO GEL ^{1/}

Maria A. Araújo ^{2/}

Murilo Geraldo de Carvalho ^{3/}

1. INTRODUÇÃO

Um dos mais sérios problemas da cultura da batata advém da grande suscetibilidade dos cultivares comerciais às viroses de degenerescência, que lhes reduzem o vigor e a produtividade. As viroses tendem a agravar-se, porque a batateira é multiplicada vegetativamente e os vírus acumulam-se, de uma geração para outra, através dos tubérculos produzidos pela planta doente (14).

Dentre os muitos vírus que infectam essa cultura encontra-se o vírus x da batata (PVX). O PVX (R/1: 2,1/6:E/E: S/(Fu)) (2) causa a enfermidade denominada mosaico latente e transmite-se por contato, mas não por insetos. Os vírions do PVX, partículas virais completas e funcionais, medem 515 x 13 nm (2). Dependendo da temperatura, da estirpe viral e dos cultivares, podem estar associados desde com a completa ausência de sintomas externos, com mosaico nos espaços inter-fervais, até como a necrose do broto terminal. Em cultivares muito sensíveis têm sido verificados até 50% de redução na produtividade. Todavia, na maioria dos cultivares mais comuns, raramente atinge 10% (7).

A ocorrência de infecção múltipla do vírus X e do PVY na batata constitui problema muito sério, visto que, em decorrência do efeito sinérgico, os danos à batateira são maiores que a soma dos danos causados pelos dois vírus separada-

^{1/} Parte da tese apresentada, pelo primeiro autor, à Universidade Federal de Viçosa, para a obtenção do título de «Magister Scientiae». Os autores são gratos ao Prof. H. Vaz de Mello, do Departamento de Zootecnia da UFV, pela cessão dos animais e das instalações do Setor de Cunicultura.

Aceito para publicação em 19-7-1986.

^{2/} Ex-bolsista do CNPq e ex-aluna do Mestrado em Fitopatologia.

^{3/} Departamento de Fitopatologia da UFV. 36570 Viçosa, MG.

mente. Essa constitui a enfermidade denominada mosaico rugoso (14). Também com o vírus A da batata o PVX atua sinergicamente na batata.

Uma das metas do programa de produção de batata-semente é o controle das viroses, que requer o desenvolvimento de técnicas para a detecção dos vírus no material. Para serem de real utilidade, essas técnicas devem ser de fácil execução, fornecer resultados fidedignos e em curto prazo e ser capazes de detectar o vírus presente em diminutas concentrações na amostra vegetal.

No início, o Ministério da Agricultura utilizava o bioteste, que consiste na inoculação de plantas indicadoras (6, 7). Apesar de relativamente sensível, esse método apresentava o inconveniente de ser trabalhoso e demorado. Ao contrário, os testes sorológicos, pela facilidade de aplicação e pela rapidez com que proporcionam resultados conclusivos, vêm sendo empregados com sucesso há algumas décadas nos Estados Unidos e na Europa.

Quanto aos métodos sorodiológicos de imunodifusão em gel, logo popularizados para fitovírus de partículas icosaédricas, foi necessário mais tempo para que a sua aplicação se estendesse aos vírus de partículas alongadas. Várias técnicas foram tentadas para fragmentar, ou dissociar esse tipo de partículas, e, desse modo, permitir-lhes a difusão através do gel e a interação com os anticorpos homólogos. REICHMANN (10) comparou vários produtos químicos capazes de promover a dissociação do PVX e concluiu que a piridina foi o que originou a fração protéica mais homogênea. TOMLINSON e WALKEY (16) produziram fragmentos a partir das partículas virais, tratando-as com ultra-som. Os fragmentos formaram, no gel, uma única e nítida linha de precipitado com os anticorpos para o vírus.

SHEPARD e SECOR (13) compararam os anti-soros obtidos com o PVX e com a sua proteína dissociada com piridina e verificaram que ambos reagiam aos antígenos homólogos e heterólogos. Todavia, o anti-soro para a proteína apresentava título mais alto, sendo, portanto, mais adequado para os testes sorológicos. Compararam também as técnicas de difusão radial e difusão dupla e verificaram que a primeira era mais sensível que a segunda na detecção do PVX no extrato foliar. Essa técnica foi adequada também à diagnose desse vírus em brotações de tubérculos (12). Em 1970, SHALLA e SHEPARD (11) concluíram, baseados em algumas propriedades físicas, que, durante a dissociação, ocorriam mudanças na conformação da proteína do PVX, com a formação concomitante de novos determinantes antigênicos, o que provavelmente explica a disparidade antigênica entre o PVX e a proteína dissociada do PVX.

A técnica de difusão radial foi modificada por SLACK e SHEPHERD em 1975 (14). Esses autores desenvolveram um método em que fragmentos de folhas de cevada eram colocados diretamente sobre um gel que continha, além do anti-soro para o vírus do mosaico-em-faixa da cevada (BSMV), dibutilinaftaleno sulfato de sódio (LEONIL), um detergente que dissocia partículas virais. LIMA (4) fez uma adaptação dessa técnica e detectou o «Blackeye cowpea mosaic virus» (BICMV) em hipocótilos de caupi colocados diretamente sobre um gel com dodecilssulfato de sódio (SDS), outro eficiente dissociador de fitovírus. HINOSTROZA DE LEKEU (3), utilizando essa técnica, que tem a vantagem de dispensar a trituração dos tecidos e o tratamento prévio dos antígenos, detectou o PVY em fragmentos foliares de batateira, em meio com anti-soro para esse vírus e 0,6% de LEONIL.

O presente trabalho teve por finalidade isolar, purificar e produzir anti-soro para o PVX, dissociar o vírus em seus componentes, preparar anti-soros para a proteína capsidial dissociada, PVX (D) (15), e, finalmente verificar, dispondo de ambos os tipos de anti-soros, com qual deles e sob que condições se tornaria viável a difusão simples em gel de ágar, para a detecção direta do PVX nos tecidos foliares infectados e implantados no gel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e Identificação do Virus X

O isolado viral foi obtido localmente de planta de batata de procedência desconhecida. Algumas passagens alternadas em hospedeiro de lesão local (*Gomphrena globosa* L.) e de infecção generalizada asseguraram que não havia outro fitovírus no inóculo, além do próprio PVX. Extratos foliares em tampão de fosfato a 0,05 M, pH 7,2, presente sulfito de sódio a 0,01 M, constituíram o inóculo nas transmissões de uma planta para outra em casa de vegetação. A identidade do PVX foi comprovada mediante ensaios de inoculação em indicadoras, microscopia eletrônica e testes sorológicos. Entre as indicadoras, foram utilizadas principalmente *G. globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum*, 'White Burley' e 'TNN', *N. sylvestris*. Para as preparações 'leaf dip', tomaram-se as lesões típicas pardo-avermelhadas em *G. globosa* e, mais tarde, as soluções virais das etapas finais da purificação. No microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, mod. EM 109, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFV, compararam-se, quanto à morfologia, partículas dos vírus X e Y da batata, ambas alongadas, mas de dimensões distintas. Para os testes de imunodifusão em ágar dispôs-se de anti-soro, AS-PVX, fornecido por W.J. Zettler, da Universidade da Flórida, Gainesville, E.U.A. Extratos foliares de *N. glutinosa* com o isolado em consideração receberam igual volume de SDS a 3% antes de serem colocados em cavidades periféricas circulares, em gel de ágar 'Noble' a 0,9% (p/v). Este continha 0,5% SDS (p/v) e 1% (p/v) de ázida sódica.

2.2. Manutenção e Purificação do Virus X

Folhas de *N. glutinosa* com deformação foliar e outros sintomas causados pelo PVX foram finamente cortadas e deixadas em 4°C, por 48 h, em dessecador com sílica gel. Esses tecidos foliares dessecados, mantidos a seguir em pequenos frascos, a -18°C, serviram para a renovação periódica do inóculo. Em casa de vegetação, efetuaram-se transferências periódicas de uma planta para a outra principalmente de *N. glutinosa*, com o objetivo de manutenção *in vivo*, além de contar, em pronta disponibilidade, com as folhas infeccionadas para as purificações do vírus. Um mês depois da inoculação de cada lote de multiplicadoras, colheram-se todas as folhas com sintomas para uso imediato na purificação ou para armazenamento, a -18°C, empregado na purificação dentro de 6 meses.

Como na oportunidade não se dispunha de coacervante, seguiu-se o método de SHEPARD e SECOR (13), com modificações, para purificar o patógeno. O vírus X, após a multiplicação, armazenado ou não, foi extraído em tampão de borato das folhas de *N. glutinosa*, e o extrato foi clarificado com n-butanol, seguindo-se alguns ciclos sucessivos de centrifugação diferencial (1).

A qualidade das preparações purificadas e a concentração do vírus nessas preparações foram rotineiramente estimadas ao espectrofotômetro, adotando-se o coeficiente de extinção, em 260 nm, $E_{1\text{cm}}^{0,1\%}$, de 2,97 (2). As preparações finais de

melhor qualidade foram ainda examinadas por microscopia eletrônica, como mencionado, para a comprovação visual de que não mais continham estruturas contaminantes de origem celular.

2.3. Purificação e Utilização da Proteína Capsidial no Preparo de Anti-Soro

A proteína constituinte do capsídio foi dissociada do PVX, purificada e con-

centrada segundo a técnica de MOREIRA *et alii* (8). Em resumo, essa técnica consistiu na dissociação com piridina e fracionamento numa coluna Sephadex G-25 previamente equilibrada com ácido fórmico a 9%. As frações com a proteína foram identificadas em espectrofotômetro de UV, em 280 nm, e o polipeptídeo foi, a seguir, concentrado, mediante liofilização (1). A análise eletroforética, em gel de poliacrilamida, foi empregada para estimar-lhe o peso molecular e fornecer critério para assegurar que a proteína capsidial era a única entidade biológica presente na preparação, de conformidade com o esperado.

Para a produção de anti-soros em coelhos, cada série imunogênica foi precedida da retirada do soro normal. Adotou-se a via intramuscular para as injeções do antígeno. A proteína purificada e liofilizada foi ressuspensa em água destilada e emulsificada (v/v) em adjuvante completo de Freund. Foram injetados, inicialmente, 8 mg da proteína no músculo coxim plantar do segundo dedo da pata traseira. A segunda injeção, de 4 mg, foi aplicada, um mês depois, na outra pata, e, 15 dias mais tarde, o coelho recebeu a terceira injeção, também de 4 mg.

As sangrias foram iniciadas 20 dias após a primeira injeção, colhendo-se 20 a 30 ml de sangue por vez. O coágulo foi retirado e o soro centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. O anti-soro, PVX (D)-AS, foi repartido em pequenos frascos e, nessa condição, armazenado em congelador. Junto com esse anti-soro, preparou-se outro, com o vírus purificado, não dissociado, mediante uma injeção intravenosa, seguida de injeções intramusculares, em coelho, empregando-se, para as últimas, o vírus emulsificado em adjuvante incompleto de Freund.

Os títulos de ambos os tipos de anti-soros, PVX (D)-AS e PVX-AS, foram estimados por meio dos testes de microprecipitina e difusão dupla em gel de ágar. Para o primeiro, os anti-soros e o soro normal foram diluídos, numa série de 1:2 até 1:1024, em tris-HCl a 0,02 M, pH 7,2, com NaCl a 0,85% (p/v). Utilizou-se um círculo de papel celofane fervido, aplanado, quadriculado, ajustado para cobrir todo o fundo de uma placa de Petri. Cada quadrícula recebeu 20 μ l de cada diluição de um dos anti-soros e 20 μ l da solução tamponada, com o vírus ou proteína viral purificados, a 0,1 mg/ μ l. A placa com os reactantes foi incubada a 37°C, em ambiente saturado de umidade. As sucessivas leituras em binocular estereoscópica foram efetuadas contra fundo escuro e com iluminação, incidente na placa, por baixo e em ângulo.

Os testes de difusão dupla foram conduzidos em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, com 5 ml do meio preparado em água destilada em tampão de tris-HCl salina a 0,02M, pH 7,2, 0,9% de ágar «Noble», 0,5% de SDS e 1,0% de ázida sódica. O vírus purificado, a 0,3 mg/ml, foi tratado com dois volumes de SDS a 3% e colocado na cavidade central, de 5 mm. As diversas diluições dos anti-soros foram colocadas nas cavidades periféricas. Como controle, utilizou-se extrato de *N. glutinosa* provavelmente avirótica.

As placas foram mantidas em câmara úmida, a 4, 18 e 24°C. As observações dos resultados iniciaram-se seis horas depois e prosseguiram, com igual intervalo, na mesma caixa preta, até se completarem 48 horas.

2.4. Teste de Difusão Radial Simples Modificado

Este teste, que consistiu na adaptação das técnicas de SLACK e SHEPARD (15), LIMA (4) e HINOSTROZA DE LEKEU (3), foi conduzido em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, previamente revestidas com filme de formvar aplicado a 0,3% (p/v), em clorofórmio. Cada placa recebeu 5 ml do gel constituído de 0,8% de ágar «Noble», 0,5% de SDS, 1,0% de ázida sódica e 20% de anti-soro para o PVX (D). Na preparação do gel, tomou-se o cuidado de que o anti-soro não fosse aqueci-

do a mais de 50°C nem permanecesse em contato com SDS além de dois minutos, nessa temperatura.

Os fragmentos de folhas infectadas e sadias de *N. glutinosa* e de batata, cv. 'Bintje', foram destacados com furadores de 4 e 2 mm de diâmetro. Dispuseram-se cerca de 60 a 120 fragmentos em cada placa, com o auxílio de pinça. Cada fragmento foi levemente comprimido contra o gel. Esse utensílio foi lavado com detergente, logo depois de utilizado, para firmar cada fragmento no ágar.

As placas permaneceram em câmara úmida, a 24°C, e as observações foram feitas 12, 24, 48 e 72 horas depois, com o auxílio de uma lupa e de uma caixa preta com aberturas circulares superiores, com incidência de luz fluorescente, nas placas, de ambos os lados e obliquamente, por baixo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características do PVX e PVX (D) Purificados

O espectro de absorção do PVX purificado mostrou-se típico de um potex-vírus. Os quocientes das absorções medidas em 280 e 260 nm e entre as absorções máxima e mínima foram de 0,86 e 1,19, respectivamente, muito próximos dos encontrados por PAUL (5), citado por NOORDAM (9), valores de 0,83 e 1,15. Isso indica que o método adotado foi eficiente na purificação do vírus, o que foi confirmado pela análise eletroforética da sua proteína e pelos testes sorológicos, quando o anti-soro produzido a partir desse imunógeno não reagiu a extratos foliares obtidos da planta sadia.

Os rendimentos de vírus, calculados pela absorção em 260 nm, foram de 40 a 140 mg/kg de folha. Essa variação pode ser atribuída, na sua maior parte, à diferença na concentração do vírus nas folhas, seja no verão, seja no inverno, maior nesse último, o que parece estar relacionado com a intensidade dos sintomas nas plantas infectadas durante essa estação (2), bem como, secundariamente, com as pequenas variações na utilização do método.

Não se compararam quantitativamente as duas espécies empregadas como multiplicadoras do vírus. Prevaleceu a expectativa de maiores rendimentos de vírus ao ser utilizada *N. glutinosa* como multiplicadora, em vez de *N. tabacum*, 'White Burley'.

As micrografias eletrônicas do vírus mostraram que a preparação purificada do PVX foi bastante homogênea e que a morfologia das partículas corresponde à esperada para esse vírus.

A análise eletroforética da proteína capsial dissociada do PVX mostrou haver um componente protéico amplamente majoritário, com peso molecular de cerca de 27.100 d, e dois outros, que migraram no gel ligeiramente mais rápido que aquele. Esses dois, provavelmente, resultaram de atividade proteolítica parcial sobre a subunidade capsial, nas fases iniciais da purificação (1;5). Nenhum outro polipeptídeo foi resolvido no desenvolvimento eletroforético, o que se interpretou como indicação satisfatória de que a proteína viral estava disponível com elevado grau de pureza.

O título 1:128 foi encontrado (microprecipitina), para os anti-soros para o vírus X e a sua proteína, nas imunizações realizadas pelas vias venosa e intramuscular. Não reagiram entre si o extrato foliar de *N. glutinosa* avirótica, o hospedeiro de multiplicação e cada um dos referidos anti-soros, numa confirmação da boa qualidade e especificidade dos imunógenos. Para os anti-soros em apreço, não se verificou nenhuma reação sorológica diante dos antígenos respectivos. Porém, da apli-

cação do PVX (D) no dedo da pata resultou anti-soro com título baixo (1:2), porém mensurável, no teste de difusão dupla no ágar. SHEPHERD e SECOR (13) obtiveram título de 1:32 com PVX (D) utilizada como imunógeno e aplicada numa série de quatro injeções intramusculares de 2 mg cada uma. A modesta resposta às imunizações com o vírus e com a sua proteína relatada no trabalho presente foi atribuída, em grande parte, à repressão das células imunocompetentes pelos antibióticos presentes na ração alimentar ministrada ininterruptamente aos coelhos imunizados.

3.2. Ensaio de Difusão Radial Simples Modificado

No teste de difusão radial simples (13), extratos de tecidos vegetais com o antígeno estão presentes em cavidades, geralmente circulares, abertas no gel, achando-se os anticorpos incorporados e uniformemente distribuídos no ágar. A reação antígeno-anticorpo faz surgir linhas brancas de precipitado em torno e junto da borda das cavidades. Vírus alongados, como o PVX, devem ser dissociados nas amostras para que possam difundir-se para dentro do gel e encontrar-se com os anticorpos. No teste de difusão simples modificado, eliminam-se o preparo do extrato de cada amostra, a feitura e o preenchimento das cavidades no gel. Fragmentos de órgãos vegetais, geralmente folhas, são comprimidos contra a superfície do ágar. O halo de precipitado surge mais tarde junto de cada fragmento vegetal, com o antígeno compatível com os anticorpos presentes no gel.

Não se verificaram halos de precipitado quando os fragmentos de batateiras infectadas pelo PVX foram introduzidos diretamente no gel, em vez de colocados seus extratos nas cavidades. Todavia, em volta de quase todos os fragmentos de *N. glutinosa* de dois e quatro mm, que corresponderam a 60 e 118 amostras por placa, formaram-se tênues, porém claras linhas de precipitado a partir de 24 horas após a montagem do ensaio (Figura 1A). A Figura 1 B permite visualizar as linhas de precipitado mais fortes, mas não as mais fracas. Na terceira linha, do lado direito da testemunha (T), vê-se uma amostra infectada, que apresenta a linha de precipitado bem nítida. Essas reações tornaram-se cada vez mais nítidas até 72 horas, quando começaram a surgir reações inespecíficas nos fragmentos de plantas saudáveis.

A razão principal de não ter sido detectado o PVX em fragmentos de batateira pode ter sido a menor concentração do vírus nessa planta, visto que, em ensaio anterior, ele foi detectado em extratos de *N. glutinosa* seis vezes mais diluído (1:300) que no extrato foliar de batata utilizado naquela oportunidade (1:50) (1). Essa restrição ao emprego das folhas de batata deverá desaparecer quando se dispuser de anti-soros de melhores títulos e se estudarem melhor as condições gerais de condução do teste.

Embora haja outras técnicas sorodiológicas ainda mais sensíveis, desenvolvidas mais recentemente, a técnica de difusão radial modificada apresenta bom potencial de emprego em razão de não exigir tratamento prévio da amostra, possibilitar o teste de grande número de amostras por placa, apresentar sensibilidade relativamente alta, principalmente se for obtido um anti-soro com título maior, e ser de baixo custo, quando comparada a outras, que requerem importação de equipamento e de material de consumo.

4. RESUMO

Estudou-se a possibilidade de diagnosticar o mosaico latente (PVX) na batata com um ensaio de difusão radial simples, modificado pela substituição da transfe-

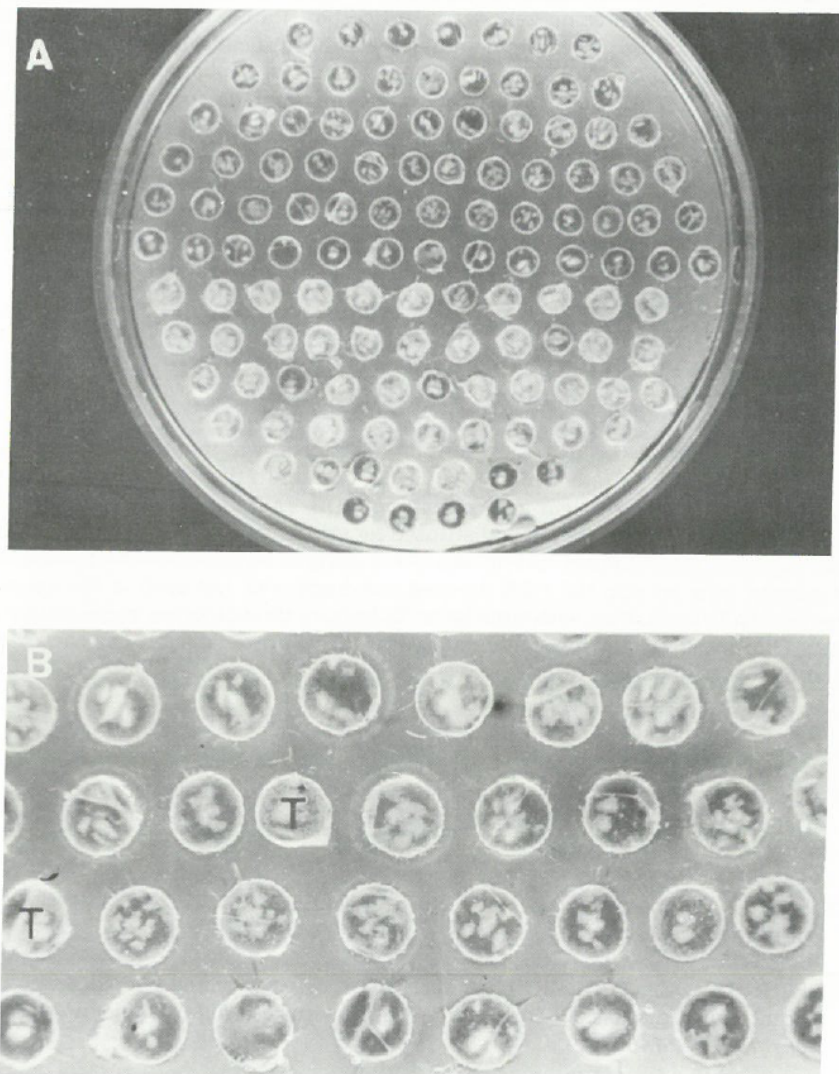


FIGURA 1 - Teste de difusão radial modificado, com o emprego de fragmentos foliares de N. glutinosa diretamente no gel.

Gel com 0,8% de ágar "Noble", 1,0% de NaN_3 , 0,05% de SDS e 20% de AS PVX (D), em tampão de tris-HCl salina, 0,05M, pH 7,2. (A) Placa de 7 cm com 118 fragmentos foliares de N. glutinosa. (B) Amostras foliares de N. glutinosa não inoculada assinaladas com "T". As demais amostras foliares provêm de N. glutinosa infectada.

rência dos extratos foliares para cavidades cortadas no gel pela implantação direta dos fragmentos foliares no gel com os anticorpos. Para a produção de anti-soros, as subunidades protéicas provieram do vírus X purificado, dissociado com piridina, estabilizadas e eluídas de coluna cromatográfica Sephadex G-25, com ácido fórmico a 9%. O anti-soro para o PVX (D) foi incorporado ao gel, e contra a superfície deste se comprimiram 120 fragmentos foliares circulares por placa de 7 cm de diâmetro. Os fragmentos das folhas sadias e infeccionadas diferenciavam-se claramente pelo desenvolvimento de um halo de precipitado exclusivamente em torno das amostras com o vírus. Os halos intensificaram-se até 72 h depois do início da implantação dos tecidos.

5. SUMMARY

(RADIAL DIFFUSION FOR DETECTION OF VIRUS X IN PLANT TISSUE IMPLANTED IN AGAR-GEL)

A simple, modified, single diffusion serological test was found potentially very useful for diagnosis of latent mosaic (PVX) in potato. In this modified test, direct tissue implantation on agar-gel containing SDS and the antiserum prepared against the viral capsid protein substituted for grinding of leaf tissues and moving leaf extracts into cavities cut in agar. An antigen-antibody white precipitate developed only around the PVX-infected leaf fragments, not around the avirulent leaf pieces. It intensified with time up to 72 hr from time of tissue implantation in agar. One hundred and twenty circular leaf pieces were assayed per each 7-cm diameter petri dish.

6. LITERATURA CITADA

1. ARAÚJO, M.A. de. *Sorodiagnose de Duas Viroses da Batata, Destacando-se a Detecção do Virus X por Difusão Radial*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1983. 47 p. (Tese MS).
2. BERKS, R. *Potato Virus X*. Kew, Surrey C.M.I./A.A.B., 1970. 4 p. (Descriptions of Plant Viruses no. 4.).
3. HINOSTROZA DE LEKEU, A.M. New serological method for detection of potato virus diseases. 1. Detection of potato virus Y. *Phytopathologische Zeitschrift*, 95:342-345, 1979.
4. LIMA, J.A. *Black Eye Cowpea Mosaic Virus. Purification, Partial Characterization, Serology, and Immunochemical and Cytological Technique for Detection of Virus-Infected Legume Seeds*. Gainesville, University of Florida, 1978. 154 p. (Tese Ph.D.).
5. KOENIG, R.; STEGEMANN, H.; FRANCKSEN, H. & PAUL, H.L. Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. *Biochemica et Biophysica Acta*, 207:184-189. 1970.
6. MALLOZZI, P. Testes virológicos para batata-semente importada. *O Biológico*, 40:205-208. 1974.

7. MIZUBUTI, A. Principais viroses da batateira sob condições do Brasil Central. *Informe Agropecuário*, 7(76):46-50. 1981.
8. MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A.; LARKINS, B.A. & NILSEN, N. C. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 254:9921-9926. 1979.
9. NOORDAM, D. *Identification of Plant Viruses: Methods & Experiments*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1973. 207 p.
10. REICHMANN, M.E. Degradation of potato virus X. *The Journal of Biological Chemistry*, 235:2959-2963. 1960.
11. SHALLA, T.A. & SHEPARD, J.F. An antigenic analysis of potato virus X and of its degraded protein. II. Evidence for a conformational change associated with the depolymerization of structural protein. *Virology*, 42:835-847. 1970.
12. SHEPARD, J.F. Serodiagnosis of PVX in potato tuber sprouts. *Plant Disease Reporter*, 53:845-848. 1969.
13. SHEPARD, J.F. & SECOR, G.A. Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double diffusion tests in agar. *Phytopathology*, 59:1834-1844. 1969.
14. SIQUEIRA, O. *Principais viroses da batata no Brasil*. Campinas, Secretaria da Agricultura de São Paulo, C.A.T.I., 1967. 25 p.
15. SLACK, S.A. & SHEPHERD, R.J. Serological detection of seed-borne barley stripe mosaic virus by a simplified radial-diffusion technique. *Phytopathology*, 65:948-956. 1975.
16. TOMLINSON, J.A. & WALKEY, D.G.A. Effects of ultrasonic treatment on turnip mosaic virus and potato virus X. *Virology*, 32:267-278. 1967.