

## SORODIAGNOSE DO MOSAICO LATENTE EM CLONES DE BATATA<sup>1/</sup>

Maria A. Araújo<sup>2/</sup>

Murilo Geraldo de Carvalho<sup>3/</sup>

Aquira Mizubuti<sup>4/</sup>

### I. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum L.*), hortaliça de grande importância econômica e alimentar, é, depois do trigo, do arroz e do milho, a principal fonte de subsistência da população mundial (5).

Um dos mais sérios problemas da cultura é a sua grande suscetibilidade às viroses, que muito lhe reduzem o vigor e a produtividade. As viroses tendem a se agravar porque a batata é multiplicada vegetativamente e os vírus acumulam-se, em decorrência de transmissão por vetores e da propagação pelos tubérculos produzidos pela planta doente.

Uma das metas dos programas de produção de batata-semente certificada é a eliminação das viroses dos clones de batata. Esse objetivo requer a disponibilidade de técnicas de grande sensibilidade para a detecção de vírus no material vegetal. Para que sejam de real utilidade, essas técnicas devem ser também de fácil execução e fornecer resultados fidedignos em curto prazo.

Para o mosaico latente, virose causada pelo vírus X da batata, o teste de inoculação em indicadores (13), utilizado no Brasil em certa época (3), foi substituído pelos métodos sorológicos, em virtude de o primeiro ser relativamente trabalhoso, menos sensível e requerer mais tempo para apresentar resultados. As vantagens da imunodifusão sobre alguns métodos sorológicos tradicionais estimularam a pesquisa orientada para utilizá-la também para vírus alongados, que não se difundem ou se difundem mal no gel de ágar. PURCIFULL e SHEPHERD (7) degradaram

<sup>1/</sup> Aceito para publicação em 19-7-1986.

<sup>2/</sup> Ex-bolsista do CNPq e ex-aluna de Mestrado em Fitopatologia, na UFV.

<sup>3/</sup> Departamento de Fitopatologia da UFV. 36570 Viçosa, MG.

<sup>4/</sup> Departamento de Fitotecnia da UFV. 36570 Viçosa, MG.

quimicamente alguns vírus de partículas alongadas, permitindo que suas subunidades protéicas se difundissem adequadamente e se precipitassem no gel diante dos anticorpos específicos. O vírus Y foi dissociado com tampão de etanolamina-HCl, pH 10,5, e formou linhas fortes de precipitado no gel (7). PÓLAK *et alii* (6) adicionaram pirrolidina aos extratos foliares de fumo com o vírus Y e detectaram esse vírus alongado em difusão dupla em gel. REICHMANN (8) comparou vários reagentes químicos, quanto à propriedade de dissociar do vírus X a proteína capsídial, e concluiu que a piridina foi o que proporcionou a fração protéica mais homogênea. TOMLINSON e WALKEY (12) fragmentaram com ultra-som a partícula do vírus X; os fragmentos daí resultantes difundiram-se no gel e produziram uma única e nítida linha de precipitado diante do anti-soro específico (12).

SHEPARD e SECOR (11) compararam, quanto à eficiência na detecção sorológica, os anti-soros para o PVX com os obtidos com a proteína purificada a partir da dissociação das partículas virais com piridina. Ambos os tipos de anti-soros reagiram bem diante de um e outro抗原s. Todavia, o anti-soro para a proteína apresentou título mais alto e, portanto, deveria ter sido o preferido nos testes sorológicos. Ao comparar as técnicas de difusão radial simples, que estudavam, com a de difusão dupla em ágar, verificaram que a primeira foi mais sensível na detecção do PVX no extrato foliar. A técnica de difusão radial simples foi adequada também para a diagnose do mosaico latente nas brotações de tubérculos (9).

O presente trabalho foi executado com os objetivos de escolher, dentre alguns bons agentes dissociadores do PVX, o melhor, em nossas condições, para dissociar as partículas desse vírus nas amostras vegetais, possibilitando a utilização adequada do teste de difusão radial simples em ágar; avaliar a sensibilidade do teste de difusão radial simples diante do vírus X purificado; verificar se é possível concentrar rápida e eficientemente esse vírus a fim de detectá-lo sorologicamente, ainda que presente em concentrações muito baixas nas amostras em análise; testar os clones de cultivares diversos de batata disponíveis na UFV quanto à sanidade para o mosaico latente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Procedencia, isolamento e identificação vírus X

O vírus X da batata foi retirado de batateira de fora da Zona da Mata. Foi isolado e identificado com base nas reações induzidas em espécies indicadoras específicas (1); destas, algumas (13) foram instrumentais para excluir do inóculo final outros vírus talvez presentes na batata. A identidade do PVX foi comprovada, após os testes com as indicadoras, mediante o teste de difusão radial dupla em ágar, com anti-soro fornecido por W.J. Zettler, da Universidade da Flórida, pela morfologia da partícula, em exames no microscópio eletrônico de transmissão do Centro de Microscopia Eletrônica da UFV e por alguns outros critérios.

### 2.2. Manutenção e purificação do vírus

O vírus X foi mantido em disponibilidade *in vivo* e *in vitro*. *Nicotiana glutinosa* e *N. tabacum* 'White Burley' foram utilizadas para multiplicá-lo em casa de vegetação e, em tecidos dessecados e mantidos a -18°C, para constituir o estoque a que se recorreu, quando necessário, para garantir a uniformidade e a pureza do inóculo.

Um mês após a inoculação com o extrato foliar, apresentando-se as plantas com as folhas deformadas e mosqueadas, estas eram colhidas para a purificação viral imediata ou dentro do período máximo de 6 meses, dispondo-se das folhas congeladas.

O vírus X foi purificado segundo o roteiro adotado para esse fim por SHEPARD e SECOR (11), com modificações. A qualidade e o rendimento viral nas preparações purificadas foram avaliados espectrofotometricamente e, no primeiro caso, mediante microscopia eletrônica. Foi adotado o valor de 2,97 como coeficiente de extinção nessas determinações (2).

### 2.3. Preparo da proteína capsidial purificada e dos anti-soros

A proteína foi dissociada do PVX, com piridina, segundo a técnica de REICHMANN (8). A seguir, foi estabilizada e purificada com ácido fórmico a 9% em coluna cromatográfica de Sephadex G-25 (1, 4). Foi localizada espectrofotometricamente, em 280 nm, nas frações do eluato, nas quais, a seguir, foi lyofilizada.

Os anti-soros foram obtidos de coelhos brancos, raça Nova Zelândia, com cinco meses, aproximadamente, no início da imunização. Imediatamente antes da primeira injeção foram coletados 20 ml de sangue de cada animal, para se dispor do soro normal. Os imunógenos foram o PVX, para um tipo de anti-soro, e a proteína capsidial, PVX (D), para o outro tipo.

No primeiro dia os animais receberam duas injeções da suspensão viral, uma intravenosa, em solução salina, e outra intramuscular, na pata traseira; dessas preparações virais, a última foi emulsificada, em volumes iguais, em adjuvante incompleto de Freund. A seguir, foi aplicada uma série de quatro injeções intramusculares em cada animal, com intervalo de 5 a 15 dias. A quantidade de vírus aplicada de cada vez, estimada espectrofotometricamente, variou de 3 a 4 mg.

Adotaram-se sangrias semanais, iniciadas 20 dias após a primeira injeção. Os animais permaneceram em jejum durante 12 horas, antes de cada coleta de 20 a 30 ml de sangue. As amostras foram colocadas numa incubadora, a 28°C, durante 45 minutos, para estimular a coagulação. Em seguida, foram transferidas para a geladeira, ai permanecendo por 12 horas. O coágulo foi retirado e o soro centrifugado a 5.000 rpm, por 15 minutos. A seguir, foi repartido em pequenas frações, em volumes iguais, e armazenado em congelador.

Apenas PVX (D) foi empregado como imunógeno, por via intramuscular, no músculo coxim plantar das patas traseiras. Para tanto, a proteína lyofilizada foi ressuspensa em água destilada e emulsificada, 1:1-v:v, em adjuvante completo. Seguiram-se injeções de 7 mg no músculo coxim plantar do segundo dedo; de 4 mg, um mês após, na outra pata traseira; e de 4 mg, quinze dias depois desta. As coletas de sangue e o preparo do soro normal e dos anti-soros foram efetuados conforme descrito.

### 2.4. Difusão radial simples em gel de ágar

Os testes de difusão radial foram conduzidos em placas de Petri de 7 cm de diâmetro, previamente tratadas com filme de formvar a 0,3%, em clorofórmio. Baseou-se o meio no descrito por SHEPARD e SECOR (11), preparado em tampão de tris-HCl salina a 0,02M, pH 7,2, com 1,5% de ágar «Noble», 0,5% de azida sódica e 10,20 ou 30% (v/v) de anti-soro para a proteína do PVX dissociada (PVX (D)). O ágar foi fundido com o emprego de um volume de tampão igual à metade do volume final e colocado em banho-maria, regulado para 45-50°C. Ao anti-soro acrescentou-se

um volume de tampão adequado para que fosse atingida a concentração requerida. Em seguida, as soluções foram deixadas em banho-maria, a 45°-50°C. Quando ambas as soluções atingiram essa temperatura, acrescentou-se a azida sódica ao ágar fundido e misturaram-se as duas soluções. Cada placa recebeu 5 ml da mistura.

Após a gelificação, foi feito o maior número possível de cavidades no gel, para possibilitar clara visualização dos precipitados. Os conjuntos foram feitos com 42 e 72 cavidades por placa, as primeiras com vazador de 4 mm de diâmetro e as outras com 3 mm, distanciadas de 3 e 2 mm, respectivamente.

As amostras de fumo e batateira testadas foram trituradas em almofariz, com água destilada, na proporção de 1/1 (p/v), e filtradas em gaze. Os extratos obtidos foram misturados com cada um dos três agentes para dissociação da proteína do vírus, SDS a 3%, piridina e pirrolidina a 5%, na proporção de 1/1, 2/1 e 1/1 (v/v), respectivamente. Placas com soro normal foram preparadas de modo semelhante e extratos de plantas sadias foram também empregados no teste.

As placas foram mantidas em câmara úmida, a 24°C, e as observações foram feitas durante 48 horas, com intervalo inicial de duas horas, em caixa preta com luz incidindo, por baixo e em ângulo, sobre o gel.

### 2.5. Sensibilidade do teste de difusão radial

A sensibilidade dos testes foi estimada diante de extratos foliares e do vírus X purificado.

Aos extratos foliares de *N. glutinosa* e batata, cv. 'Bintje', preparados em água destilada, um mês depois da inoculação, adicionou-se igual volume de pirrolidina a 5%. Em seguida, eles foram diluídos para 1/2, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 e 1/500 em tampão de tris-HCl salina a 0,02M, pH 7,2, e colocados em cavidades feitas num gel preparado com 20% v/v de anti-soro para a proteína dissociada do PVX, PVX (D). Como controle foram empregados extratos de folhas sadias dos respectivos hospedeiros, obtidos do modo descrito para as infectadas.

Igual volume de pirrolidina a 5% foi adicionado a uma solução do PVX purificado. Essa solução foi diluída sucessivamente em tampão de tris-HCl salina a 0,02M, pH 7,2, para 1.000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 e 0,1 ug/ml. Pequeno volume de cada diluição foi colocado em cavidades circulares feitas num gel preparado com 20% do anti-soro para a proteína do PVX.

### 2.6. Aumento da concentração do vírus X nas amostras

Grande número de amostras de batateiras procedentes da região de Viçosa deu resultados negativos nas inoculações mecânicas em *Gomphrena globosa* e nos testes sorológicos com anti-soros para o PVX provenientes do CENARGEN/EMBRAPA e da Universidade da Flórida (EUA). Diante desses resultados, que poderiam, em princípio, ser explicados pelos teores muito baixos do vírus nessas amostras, os extratos do material testado foram concentrados dez vezes, visando melhorar a detecção do PVX no suco foliar. As amostras foram trituradas em almofariz, em tampão de borato a 0,1 M, pH 8,2, com 1,0% de sulfato de sódio, na proporção de 1/1 (p/v), e filtradas em gaze. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 2.500 rpm, durante 15 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se igual volume de tampão de acetato de potássio a 5%, pH 4,4. A mistura foi agitada e, a seguir, deixada na geladeira durante 30 minutos. Centrifugou-se novamente, eliminou-se o sobrenadante, lavaram-se as paredes dos tubos com água destilada e adicionou-

se 1/10 do volume inicial de tampão de extração. A seguir, elevou-se o pH para 7,0-7,5, com 1 a 3 gotas de NaOH a 3%. Centrifugou-se e armazenou-se o sobrenadante em geladeira.

### 2.7. Sorodiagnose do mosaico latente

Tubérculos dos clones e cultivares de batata listados no Quadro 1 foram plantados, com três repetições, em vasos plásticos e conservados em casa de vegetação. Seis semanas depois do plantio foram coletadas três amostras foliares por planta, uma da terça parte superior, outra da parte mediana e a terceira da terça parte inferior de cada uma.

QUADRO 1 - Relação dos clones e cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) testados quanto à infecção pelo PVX

CULTIVARES	CLONES
Achat	070
Baraka	088 - 4
Bintje	056 - 1
Chiquita	Cusco X 188 - B (80)
Cusco	Cusco X 188 - C (80)
Delta	Cusco X 188 - 12 (80)
Idra	088 X Baraka - 2 (80)
Mantiqueira	088 X Baraka - 5 (80)
Mineira	088 X Baraka - 3 (80)
Nicola	088 X Baraka - 8 (80)
Omega	0089 X 005 - 1 (79)
Palma	0088 X 0089 - 1 (80)
Patroness	Univita X 089 - 1 (80)
Radosa	088 X Delta - 2 (80)
Univita	045 X 089 - 1 (80) Nicola X 088 - 1 (80)

Tentou-se detectar o vírus, com o teste de difusão radial, depois de concentrá-lo nas amostras, com o anti-soro para o PVX (D) a 20%, v/v, incorporado ao gel, e pirrolidina a 5%, como agente dissociador do antígeno. Foram testadas três repetições de cada amostra, cada uma numa placa de Petri diferente.

As testemunhas utilizadas foram extratos de folhas de *N. glutinosa* e batata, cv. 'Bintje', infectadas pelos PVX e de folhas sadias, concentradas 10 vezes, do modo já descrito.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Difusão radial simples em ágar

O títuo 1:128 foi encontrado no teste de microprecipitina para os anti-soros preparados com o PVX e com a proteína viral, PVX (D) (1).

Ocorreu reação antígeno-anticorpo em todas as concentrações do anti-soro para o PVX (D) testadas no ensaio de difusão radial. A intensidade da reação foi proporcional à concentração de anti-soro utilizada. Para prosseguimento do trabalho, optou-se pela concentração de 20%, visto ter propiciado intensa precipitação e implicar gasto de anti-soro inferior ao de 30%. Não houve reação quando se utilizou soro normal ou quando outro antígeno, que não o homólogo, esteve presente no meio.

As reações obtidas com o uso de vários agentes testados para a dissociação do PVX nos extratos foliares mostraram que, com a utilização de piridina ou pirrolidina a 5% (Figura 1), houve formação de halos de precipitado nas cavidades que continham o PVX purificado ou extrato de plantas infectadas pelo vírus, com semelhança entre os halos formados com o uso dos dois reagentes. Essas reações não ocorreram nos extratos de plantas sadias ou nas placas que continham soro normal incorporado ao gel. Entretanto, a utilização de SDS a 3% induziu o apare-

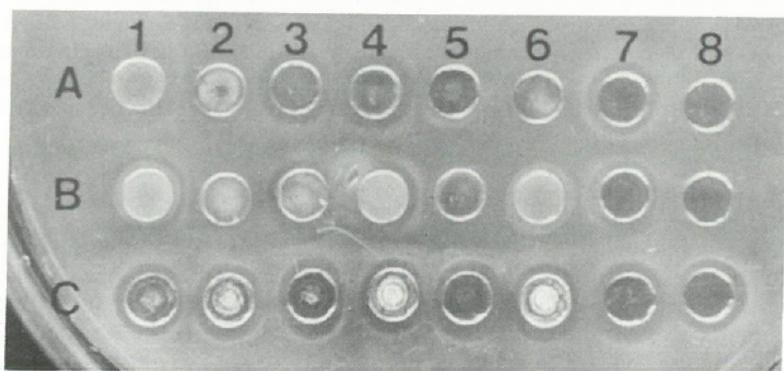


FIGURA 1 - Teste de difusão radial com AS PVX (D) e com diferentes dissociadores do antígeno. Gel com 1,5% de ágar "Noble", 0,5% de  $\text{NaN}_3$ , e 20% de AS PVX (D) em tampão de tris-HCl salina 0,85%, 0,05M, pH 7,2. As cavidades receberam extratos foliares de:  
 (1) batateiras infectadas pelo PVX;  
 (2) Nicotiana tabacum não inoculada;  
 (3) batateira infectada pelo PVX;  
 (4) N. tabacum infectada pelo PVX;  
 (5 e 6) não inoculada;  
 (7) N. glutinosa infectada pelo PVX;  
 (8) N. glutinosa não inoculada.

Tratados com:

- A. pirrolidina a 2,5%
- B. piridina a 30%
- C. SDS a 1,5%

cimento de precipitado em volta das cavidades com extratos de plantas infectadas ou sadias (Figura 1). Por isso, a alternativa de seu uso foi descartada. Esses resultados estão de acordo com os de SHEPARD (10), que, comparados vários agentes dissociadores, verificou que a piridina e a piroolidina atuavam com a mesma eficiência, no teste de difusão radial, na detecção do PVX em extratos foliares de batateiras, produzindo halos de precipitação de diâmetro e intensidade semelhantes, bem como que a utilização de SDS foi inadequada, em razão do aparecimento freqüente de reações inespecíficas.

Apesar de ter sido baixo o título do anti-soro, não houve reação com a planta sadia em nenhuma das vezes em que o teste foi conduzido. Esse resultado confirma o elevado grau de pureza do imunógeno injetado e mostra que as técnicas de purificação e de dissociação viral foram eficientes.

Nos testes posteriores, utilizou-se a piroolidina a 5% como dissociador viral, porque, em relação à piridina, empregada com o mesmo propósito, oferece menor risco à saúde do operador.

Foi de três horas o tempo decorrido entre a colocação dos extratos nas cavidades, no gel, e o início do aparecimento do precipitado, que se intensificou com o passar do tempo. Em contraste, SHEPARD e SECOR (11) detectaram esse mesmo tipo de reação em 30-45 minutos, uma diferença que pode ser atribuída ao anti-soro de título de 1/32 utilizado por esses pesquisadores, enquanto aqui se empregou anti-soro para o qual se determinara o título de 1:2 em difusão dupla em ágar.

Os halos de precipitado desenvolvidos junto às cavidades, em placas com 42 e 72 destas, foram semelhantes entre si na intensidade e no tempo para a ocorrência da reação (Figura 2). As últimas implicaram o processamento de maior número de amostras por placa e, em consequência, menor gasto de anti-soro. Cada amostra testada consumiu, em média, 15  $\mu$ l de anti-soro, ou seja, metade do volume gasto por SHEPARD e SECOR (11) em teste de difusão radial com concentração de 25% (v/v) de anti-soro, com título de 1/32, incorporado ao gel.

### 3.2. Sensibilidade do teste de difusão radial

As maiores diluições dos extratos foliares obtidos de plantas infectadas em que foi possível detectar o vírus X da batata foram de 1:1.300, para *Nicotiana glutinosa*, e 1:50 para batata. Essas observações foram validadas para a inexistência de reações entre o anti-soro e o extrato de folhas sem o PVX e entre o soro normal e o antígeno purificado ou contido no extrato.

Os resultados referentes ao vírus purificado indicaram que a concentração de 1,0 ug/ml do PVX purificado foi suficiente para que um halo de precipitação se tornasse perceptível a olho nu junto à cavidade, no teste de difusão radial simples (Fig. 3). Resultado semelhante foi verificado por SHEPARD e SECOR (11), apesar de terem trabalhado com anti-soro para o PVX (D) de título superior ao utilizado no presente trabalho.

### 3.3. Sorodiagnose do Mosaico Latente em Clones e Cultivares Diversos de Batata

O teste de difusão radial simples mostrou, nas condições em que foi conduzido, que nenhum dos cultivares e clones de batata testados (Quadro 1) estava infectado pelo vírus X. Isso foi atestado pela sensibilidade verificada para o teste, que indicou ser possível obter resultado sorológico positivo com o extrato de folhas de batata diluído até 50 vezes. Para o ensaio com o material disponível na UFV,

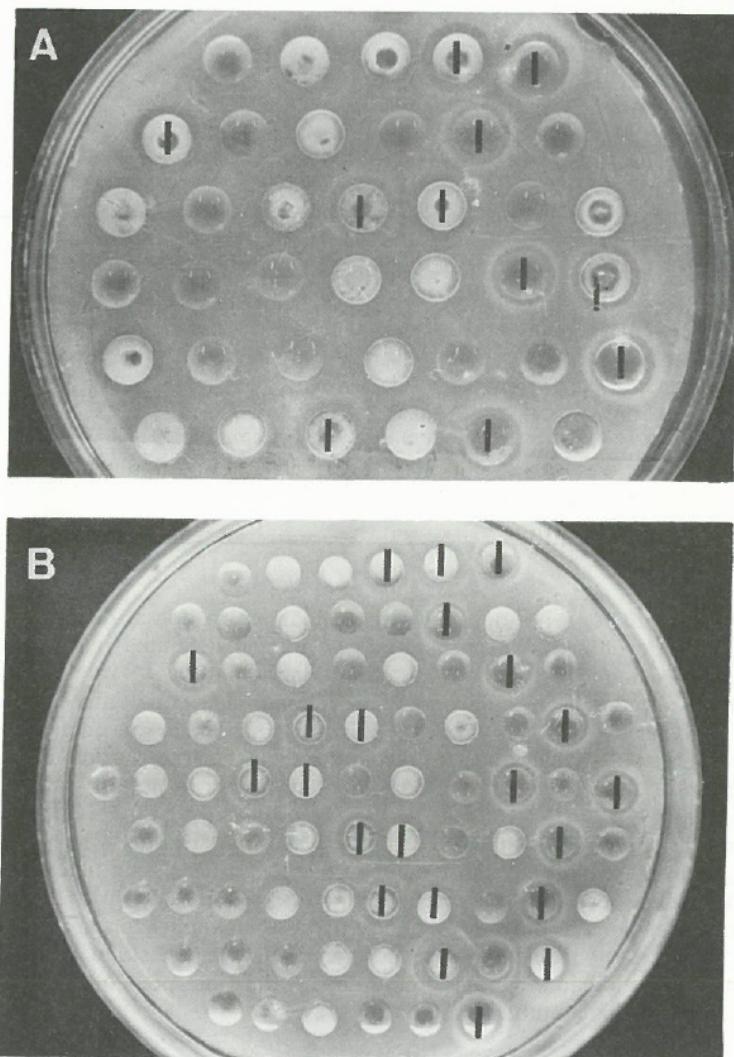


FIGURA 2 - Teste de difusão radial com AS PVX (D) e extratos foliares de batateira tratados com pirrolidina.  
Gel com 1,5% de ágar "Noble", 0,5% de  $\text{NaN}_3$  e 20% de AS PVX (D) em tampão de tris-HCl salina, 0,85%, 0,05M, pH 7,2.

(A) cavidades de 4 mm e  
(B) cavidades de 3 mm.

- Extratos de batateiras inoculadas com PVX tratados com pirrolidina a 5% (1/1, v/v) foram colocados nas cavidades em que aparecem os halos de precipitado. As cavidades não assinaladas receberam extratos de batateiras não inoculadas e tratados do mesmo modo.

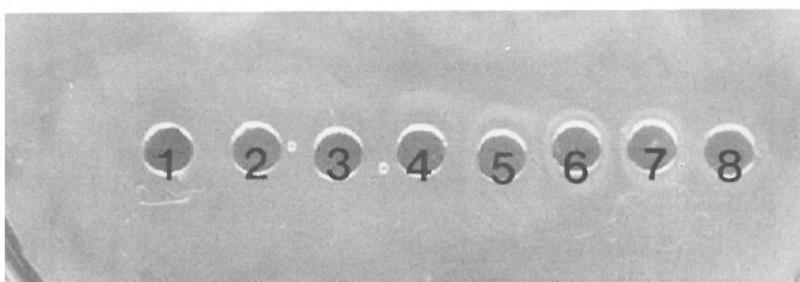


FIGURA 3 - Sensibilidade do teste de difusão radial na detecção do PVX purificado e dissociado com pirrolidina a 5%, na proporção de 1/1 (V/V). Gel com 1,5% de ágar "Noble", 0,5% de  $\text{NaN}_3$  e 20% de AS PVX (D) em tampão de tris-HCl salina 0,85%, 0,5M, pH 7,2. As cavidades 1 a 8 correspondem às concentrações de 1000, 500, 200, 100, 50, 10, 5 e 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  do vírus purificado e dissociado com pirrolidina a 5%, na proporção de 1/1 (v/v).

os extratos foram concentrados 10 vezes, e, ainda assim, apesar de aumentada a possibilidade de detecção do vírus, não se verificou nenhuma reação positiva, nos testes sorodiagnósticos, com todo o material de batata.

Esses resultados estão de acordo com as observações que antecederam este estudo, realizadas com o emprego de plantas indicadoras, que indicavam não estar presentes o PVX nas amostras recolhidas regularmente, durante meses consecutivos, de culturas, no campo, de vários cultivares de batata, na região de Viçosa, MG.

Os dados em apreço têm algumas implicações significativas. Uma delas, a de que são aparentemente um bom indício de que a certificação da batata-semente importada corresponde à expectativa de não ser portadora do vírus X, a não ser em casos excepcionais. Outra, a de que se dados semelhantes foram obtidos para outros cultivares, noutras regiões produtoras de batata do Estado, o mosaico latente passa à condição secundária, em Minas Gerais, nas preocupações dos fitopatologistas ligados à cultura da batata.

#### 4. RESUMO

Foi estruturado o teste de difusão radial simples, conforme descrito por SHEPARD e SECOR (11), utilizando-se como antígeno, no preparo de anti-soros, a proteína capsidial dissociada do vírus X da batata com piridina. Essa proteína foi estabilizada e purificada em coluna cromatográfica, com ácido fórmico a 9%, e, a seguir, liofilizada, para a imunização. Pelo teste, foi possível detectar o vírus no extrato foliar de batata diluído até 50 vezes e, na forma purificada, a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dispondo-se de técnica para concentrar 10 vezes o vírus X nas amostras foliares, verificou-se, com o ensaio de difusão simples em gel de ágar, que estavam livres do vírus todas as amostras sorodiagnosticadas, provenientes de 31 clones e cultivares de batata disponíveis no Departamento de Fitotecnia, na UFV.

## 5. SUMMARY

### (SEROLOGIC DIAGNOSIS OF LATENT MOSAIC IN POTATO CLONES)

Antisera to potato virus X capsid protein were used in the serological testing of potato plant material for latent mosaic. It was initially found that purified PVX still reacted with the antisera at 1 µg/ml in the radial single diffusion test, with a visible precipitate produced around the wells in agar. So did potato leaf extracts diluted up to 50 times for the test. Leaf extracts derived from all 31 potato cultivars and clones available at the UFV were concentrated tenfold prior to testing in the single radial diffusion assay for PVX infection. None was found infected.

## 6. LITERATURA CITADA

1. ARAÚJO, M.A. *Sorodiagnose de Duas Viroses da Batata (Solanum tuberosum L.)*, Destacando-se a Detecção do Virus X por Difusão Radial. Viçosa, Imprensa Universitária, UFV, 1983. 47 p. (Tese de MS).
2. BERKS, R. *Potato Virus X*. Kew, Surrey, C.M.I./A.A.B., 1970. 4 p. (Descriptions of Plant Viruses n.º 4).
3. MALLOZZI, P. Testes virológicos para batata-semente importada. *O Biológico*, 40: 205-208, 1974.
4. 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. 1969.
5. OLIVEIRA, A.C.S. & MIRANDA, S.F. Aspectos económicos da cultura da batata. *Informe Agropecuario*, 7(76): 3-10. 1981.
6. PÓLAK, J.; RICHTER, J. & VALTIN, R. Different serological behaviour of three phytoviruses non-degraded and degraded with pyrrolidine. *Biologia Plantarum* 18:260-267. 1976.
7. PURCIFULL, D.E. & SHEPHERD, R.J. Preparation of the protein fragments of several rod-shaped plant viruses and their use in agar-gel diffusion tests. *Phytopathology*, 54: 1102-1108, 1964.
8. REICHMANN, M.E. Degradation of potato virus X. *The Journal of Biological Chemistry*, 235: 2959-2963. 1960.
9. SHEPARD, J.F. Serodiagnosis of PVX in potato tuber sprouts. *Plant Disease Reporter*, 53: 845-848. 1969.
10. SHEPARD, J.F. A radial-immunodiffusion test for the simultaneous diagnosis of potato viruses S and X. *Phytopathology*, 60: 1669-1671. 1970.
11. 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: 1838-1844. 1970.

12. TOMLINSON, J.A. & WALKEY, D.G.A. Effects of ultrasonic treatment on turnip mosaic virus and potato virus X. *Virology*, 32: 267-278. 1967.
13. WILKINSON, R.E. & BLODGETT, F.M. *Gomphrena globosa*, a useful plant for qualitative and quantitative work with potato virus X. *Phytopathology*, 38: 28. 1948.