

## ALGUMAS PROPRIEDADES DO VIRUS DO MOSAICO DO PICÃO (\*)

G.B. KUHN\*\*, M.T. LIN<sup>1</sup> & E.W. KITAJIMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept.<sup>o</sup> Biol. Veg., <sup>2</sup> Dept.<sup>o</sup> Biol. Cel. IB Univ. Brasília, 70.910 – Brasília – DF.  
(Aceito para publicação em 20/02/82)

## RESUMO

O vírus do mosaico do picão (VMP) foi inativado no extrato foliar mantido entre 55–60°C por 10 minutos e nas diluições acima de 10<sup>-3</sup> ou ainda quando conservado após 5 e 21 dias a 24–26°C e a 4–5°C, respectivamente. Nos exames ao microscópio eletrônico de preparações “leaf dip” sempre foram detectadas partículas alongadas e flexíveis, com comprimento normal de ca. 735 nm e, esporadicamente, formações lamelares. Em seções ultrafinas verificou-se a presença de inclusões citoplasmáticas lamelares do tipo catavento. Essas inclusões puderam ser observadas em células epidérmicas quando examinadas no microscópio de luz. O VMP foi parcialmente purificado pela clarificação do suco com n-butanol e pela precipitação do vírus por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. A partir deste preparado foi elaborado um antissoro. Entretanto, a detecção do vírus por meio de testes de dupla difusão em agar gel com sulfato dodecil de sódio foi inconsistente. (Fitopatologia Brasileira 7:185-195, 1982)

## ABSTRACT

## Some properties of Bidens Mosaic Virus

Bidens mosaic virus (BMV) was inactivated in leaf extracts 55–60°C for 10 minutes, was not recovered from leaf extracts diluted beyond 10<sup>-3</sup>, or when preserved for longer periods

\*. Parte do trabalho de tese do primeiro autor para obtenção do Grau de Mestre em Fitopatologia conduzido no Dept.<sup>o</sup> Biol. Veg. na UnB, sob apoio institucional da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Resumo apresentado no XI Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Viçosa–MG, 20–24 de fevereiro, 1978.

\*\* Endereço atual: EMBRAPA/UEPAE de Bento Gonçalves, Cx. Postal 130, 95.700 – Bento Gonçalves, RS.

than 5 and 21 days respectively at room temperature 24 – 26° and 4 – 5° C. Electron microscopic examinations showed cytoplasmic lamellar and pinwheel inclusion bodies, which were also detected by light microscopy, in epidermal cells. Elongated particles with a normal length of ca. 735 nm were consistently seen in “leaf dip” preparations. The virus was partially purified by sap clarification with 8% n-butanol, concentration by differential centrifugation, followed by centrifugation in sucrose density gradient and recovery of the viral band. An antiserum to this virus was prepared, however detection of BMV in double diffusion in agar gel containing sodium dodecyl sulfate gave inconsistent results.

(Fitopatologia Brasileira 7:185-195. 1982)

## INTRODUÇÃO

Um vírus alongado causando mosaico em picão (*Bidens pilosa* L.) foi isolado na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas. Estudos morfológicos indicaram que o vírus pertencia ao grupo potyvirus (Kitajima et al., 1961). Posteriormente, já denominado vírus do mosaico do picão (VMP), foi constatado em plantações comerciais de girassol (*Helianthus annuus* L.), causando a doença descrita como mosaico ou mancha anular (Costa & Kitajima, 1966). Foi também recuperado de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) com sintomas de mosaico (A.S.Costa, dados não publicados). O VMP foi encontrado também no Distrito Federal. Objetivando-se uma melhor caracterização do vírus, foram iniciados estudos a partir de 1976, com um isolado originado em plantas de picão com mosaico encontrado em Brasília, DF. Em trabalho anterior foram relatados resultados sobre infectividade, transmissão, sintomatologia e suscetibilidade de algumas cultivares de alface e de girassol (Kuhn et al., 1980). No presente trabalho, são apresentados dados sobre as propriedades físicas *in vitro*, morfologia, citopatologia, purificação e serologia do VMP.

## MATERIAL E MÉTODOS

As propriedades físicas do VMP no extrato foliar foram determinadas de acordo com os procedimentos descritos previamente (Lin et al., 1979), usando-se como fonte de vírus folhas de *Nicotiana tabacum* L. “TNN” maceradas em presença de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo 0,1%

de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Nos ensaios de infectividade foram utilizadas plantas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. como hospedeira de lesão local. A proporção de tecido foliar e tampão nos ensaios de determinação do envelhecimento “*in vitro*” e do ponto termal de inativação foi de 1 g e 4 ml, respectivamente.

Para determinar a preservação do VMP em tecido seco foram utilizadas folhas de plantas de *Emilia sonchifolia* (L) DC, inoculadas mecanicamente e, posteriormente, conservadas segundo a técnica descrita por Lin et al. (1979). A infectividade do vírus foi determinada por inoculação mecânica em *Nicotiana tabacum* “TNN”, *Nicotiana debneyi* Domin, *Chenopodium quinoa* Willd. e *Chenopodium amaranticolor*, utilizando-se nos testes 3 plantas de cada espécie, sendo as duas primeiras hospedeiras sistêmicas e as 2 últimas de lesões locais.

Os estudos eletrono-microscópicos foram desenvolvidos no microscópio eletrônico modelo EM9 ou JEOL JEM 100 C, utilizando-se tecido infectado e não infectado pelo VMP de plantas de *Nicotiana tabacum* “TNN”, *Bidens pilosa*, *Helianthus annuus*, *Zinnia elegans* Jacq., *Pisum sativum* L. *Nicotiana* híbrida (*Nicotiana clevelandii* X *N. glutinosa*) e *Chenopodium amaranticolor*. Os exames iniciais foram feitos a partir de preparações “leaf dip”, combinado com o método de contração negativa (Kitajima, 1965), visando detectar associação de partículas virais com os sintomas das plantas examinadas. Para exames citológicos em secções ultrafinas, o tecido foliar foi fixado

inicialmente, em glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 por 3 horas, em seguida lavado 3 vezes em tampão fosfato 0,02 M e após fixado por 2 horas em OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4. Posteriormente, o tecido foi desidratado em acetona e incluído em Epon 812, sendo então seccionado, contrastado negativamente com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinado ao microscópio eletrônico. Exames ao microscópio de luz foram realizados em tecido foliar infectado e não infectado de plantas de *Nicotiana tabacum* "TNN" e *Helianthus annuus*, de acordo com o método descrito por Christie (1967).

Na purificação do VMP, as centrifugações a baixa e alta rotação foram realizadas na centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5 e na ultra centrífuga Beckmann modelo L5-50, respectivamente. Alguns métodos empregados na purificação de outros membros do grupo potyvirus (Shepherd & Pound, 1960; Delgado-Sanchez & Grogan, 1966; Christie et al., 1968; Damirdagh & Shepherd, 1970; Hiebert & McDonald, 1973; Fulton, 1974), foram estudados nas tentativas de obter um método eficiente para purificação do VMP. Nas purificações foram utilizadas folhas de plantas infectadas sistemicamente. Estas foram colhidas 8-16 dias após a inoculação mecânica, conduzida no estágio de 4-6 folhas.

Para obtenção de antissoro, um coelho foi imunizado com injeções intramusculares do antígeno emulsionado em igual volume de adjuvante completo de Freund (Difco Lab. Detroit, Mich., U.S.A.). O animal foi previamente sangrado para se obter o soro normal. Foram aplicadas 4 injeções com intervalos de 10 dias, injetando-se de cada vez, em média, 2cc das preparações obtidas nas purificações. Decorridos 40 dias da primeira injeção do antígeno, foi feita a sangria ini-

cial, seguida de mais 4 com intervalos de 10 dias.

No estudo e observações das reações serológicas foram empregados os testes de microprecipitina em placa de petri (Ball et al., 1974) e da dupla difusão em agar gel com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Purcifull & Batchelor, 1977) ou sem SDS (Ball et al., 1974).

O relacionamento serológico entre o VMP e o *Bidens mottle virus* (BMoV), um potyvirus isolado de picão na Flórida, U.S.A. (Christie et al., 1968), foi estudado por meio do teste de dupla difusão em agar gel com SDS.

## RESULTADOS

O vírus do mosaico do picão foi inativado no extrato foliar mantido na temperatura entre 55–60°C por 10 minutos e nas diluições acima de 10<sup>-3</sup> e, também, quando conservado após 5 e 21 dias a 24–26°C e a 4–5°C, respectivamente.

O VMP permaneceu infectivo por um período superior a 20 meses, quando preservado em tecido foliar seco, tendo infectado todas as plantas das quatro hospedeiras inoculadas mecanicamente.

No exame das preparações rápidas "Leaf dip" foi observada, em todas as hospedeiras infectadas, a presença de partículas alongadas e flexíveis (Fig. 1). Esporadicamente, foram também constatadas formações citoplasmáticas, normalmente associadas à infecção de potyvirus. Nas plantas não infectadas nenhuma alteração foi observada. Medidas 37 partículas do VMP foi encontrado o valor de 735nm como comprimento normal (Fig. 2).

Nos exames de secções ultrafinas de tecido foliar de *Emilia sonchifolia* e *Pisum sativum*, foram observadas inclusões lamelares

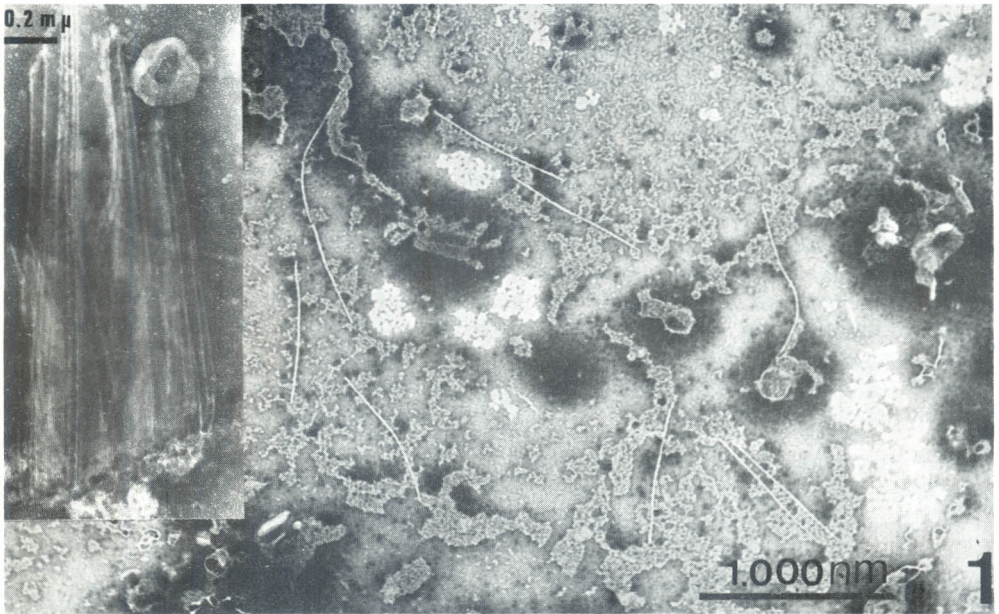


Fig. 1. Preparação leaf-dip de fumo 'TNN' infectado sistemicamente pelo vírus do mosaico do picão. A inserção mostra uma inclusão lamelar encontrada ocasionalmente em tais preparações.

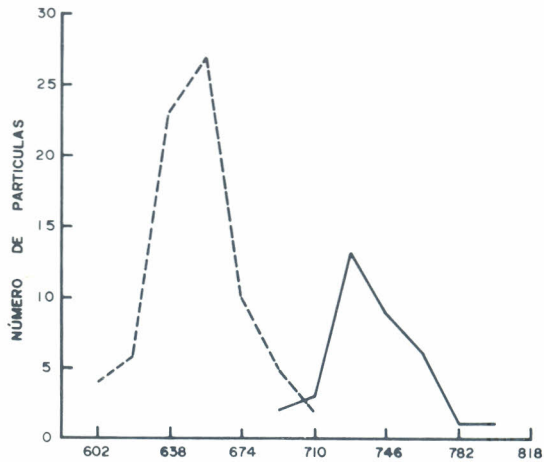


Fig. 2. Diagrama de distribuição das mensurações das partículas do mosaico do picão (—) e do vírus S da batata (-----) determinadas a partir de preparações "leaf-dip".

e do tipo catavento "Pinwheel" (Fig. 3), cuja presença nos tecidos infectados é típica para membros do grupo potyvirus. Os mesmos exames feitos nos tecidos correspondentes de plantas sadias não mostraram qualquer alteração.

Ao microscópio de luz, os exames de células epidermais de folhas infectadas com o VMP, revelaram a presença de inclusões cilíndricas (Fig. 4) no citoplasma, próximas ao núcleo. Tais inclusões foram também encontradas dispostas perpendicularmente à parede celular (Fig. 5). Estas inclusões não foram constatadas em tecido de plantas sadias.

Dentre as hospedeiras sistêmicas *Nicotiana tabacum* "TNN", *Nicotiana* híbrida e *Helianthus annuus* a mais conveniente para multiplicação do vírus foi a primeira, em razão de seu rápido crescimento, maior concentração do vírus no tecido (Tabela 1) e por apresentar maior facilidade na clarificação do extrato na purificação. De um modo geral, a clarificação do extrato foi mais eficiente com o emprego de n-butanol (8% v/v) agitado por 4 horas a temperatura de 12–15°C. Contudo, quando a fonte de vírus foi *Emilia sonchifolia* ou *Helianthus annuus*, uma boa clarificação somente foi conseguida com o método de filtração "Celite pad" (Lin & Campbell, 1972). As preparações purificadas conforme o método esquematizado na fig. 6, quando observadas ao microscópio eletrônico, mostraram maior quantidade de partículas do vírus em comparação com as preparações obtidas nas demais tentativas de purificação, porém, ainda apresentavam-se contaminadas com materiais da hospedeira.

O título do antissoro foi determinado pelo teste de microprecipitina, utilizando-se como antígeno, extrato clarificado de *Nicotiana tabacum* "TNN" infectada com o VMP. O extrato de folha sadia e o soro normal foram usados como controle. Não houve

formação de precipitado quando se testaram extratos infectado e sadio com o soro normal. Os antissoros originados das sangrias feitas 50 a 60 dias após a 1ª injeção do antígeno, foram os que deram precipitado mais visível e reagiram com o extrato infectado e sadio até as diluições de 1:2048 e 1:256, respectivamente.

Em testes de dupla difusão em agar gel com SDS em placa, foram testadas as hospedeiras *Zinnia elegans*, *Lupinus albus* L., *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa*, *Nicotiana* híbrida e *Emilia sonchifolia*. Quando se utilizou o soro normal, não foi observada reação com o extrato das plantas infectadas nem das sadias tratadas com 0,85% NaCl. Entretanto, com o extrato das plantas tratado com 3% de SDS, ocorreram reações não específicas com os extratos infectados e sadios.

Quando o antissoro foi testado contra o extrato das plantas na presença 0,85% de NaCl, ocorreram reações não específicas com todos os extratos, indistintamente. Porém, quando o tratamento do extrato foi feito com 3% de SDS, algumas vezes ocorreu a formação de linha de precipitina entre o antissoro e o extrato das plantas infectadas e não com o extrato das plantas sadias. Entretanto, em outros testes conduzidos da mesma maneira e com as mesmas hospedeiras os resultados foram negativos.

Nos testes de dupla difusão com extrato tratado com 3% de SDS, indicaram ausência da linha de precipitina entre o antissoro contra o BMoV\* e o extrato de *Nicotiana* híbrida e *Nicotiana tabacum* "TNN" infectadas com o VMP, tendo ocorrido a reação entre o antissoro e o extrato de *Nicotiana* híbrida infectada com o BMoV\*\*. Também

---

(\*), (\*\*) Antissoro e extrato liofilizado gentilmente cedido pelo Dr. Purcifull, da Universidade da Flórida, Gainesville, Flórida.

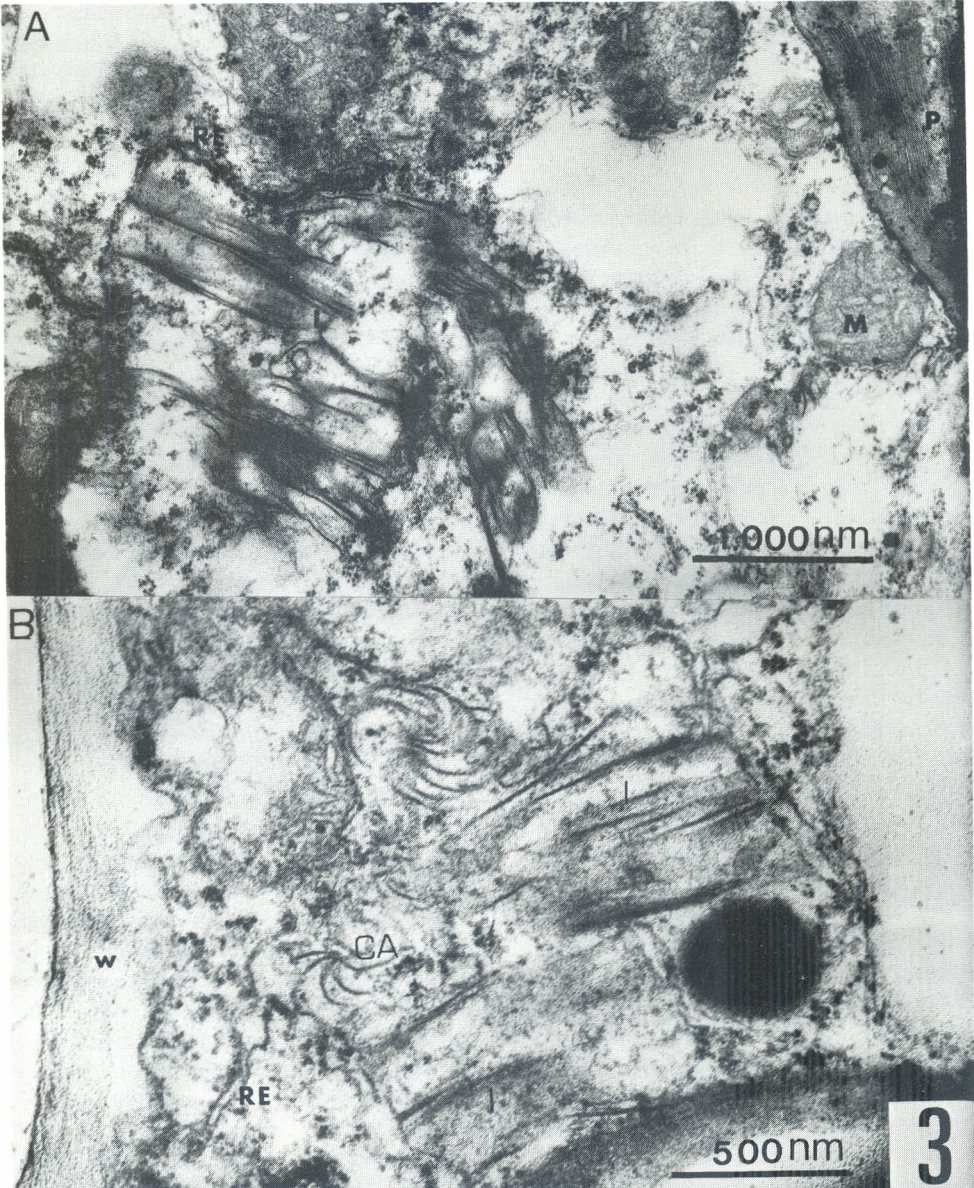


Fig. 3. Grupo de inclusões lamelares (I) em folhas de *Emilia* sp. infectada experimentalmente pelo vírus do mosaico do picão. Algumas dessas inclusões exibem o característico perfil de catavento (CA). W =parede celular, RE =retículo endoplasmático, P =protoplasto, M =mitocôndria.

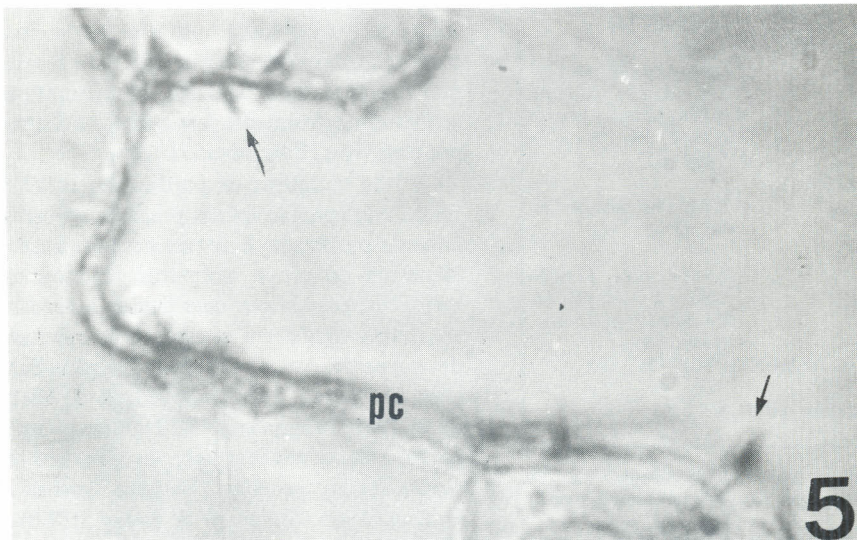
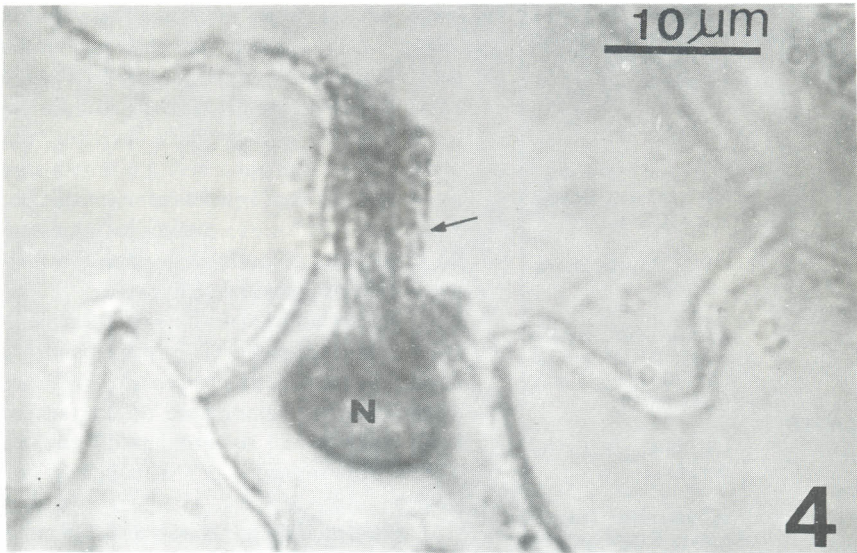


Fig. 4. Célula epidermal de girassol, infectada pelo vírus do mosaico do picão, observada ao microscópio de luz, corada com "calcomine orange" e "luxol" brilhant Green. Nota-se um grupo de inclusões cilíndricas (seta) próximo ao núcleo (N).

Fig. 5. Grupo de inclusões cilíndricas (seta) dispostas perpendicularmente à parede celular (pc) em célula epidermal de fumo infectado pelo vírus do mosaico do picão.

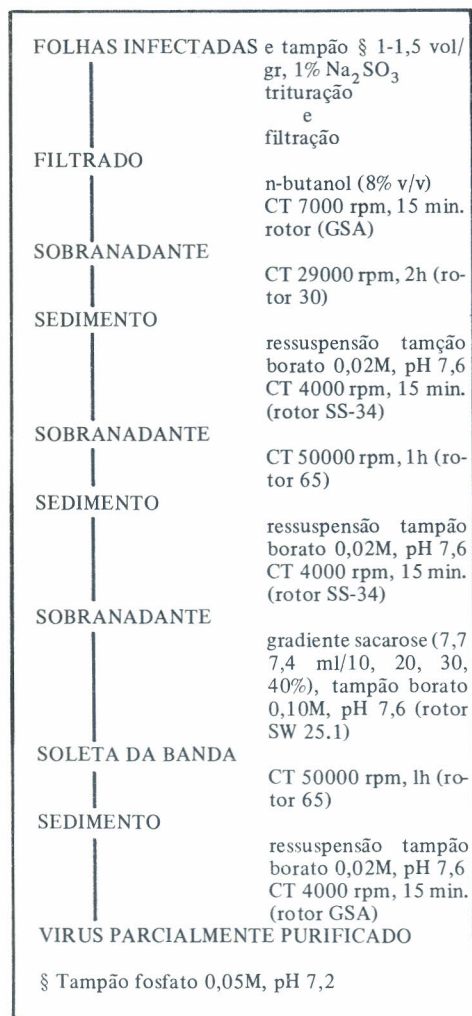


Fig. 6. Esquema do método utilizado para a purificação parcial do vírus do mosaico do picão.

não ocorreu linha de precipitina entre o antissoro contra o VMP e o extrato com BMoV.

## DISCUSSÃO

As propriedades físicas *in vitro* do VMP se correlacionam com aquelas mencio-

nadas para o grupo potyvirus (Edwardson, 1974), onde o ponto termal de inativação para os membros deste grupo está situado entre 50–65°C, ponto final de diluição entre 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> e longevidade “*in vitro*” por poucos dias. A maioria desses resultados estão de acordo com aqueles mencionados por A.S. Costa (dados não publicados), indicando ser o vírus utilizado neste estudo o mesmo isolado no Estado de São Paulo.

Apesar do número de partículas medidas ter sido pequeno (37), principalmente devido à baixa concentração do VMP nas hospedeiras, o comprimento normal encontrado neste estudo se aproxima do valor de 720nm determinado por Kitajima *et al.* (1961).

Confirmando a inclusão do VMP entre os potyvirus, exames de epiderme ao microscópio de luz ou secção ultrafina ao microscópio eletrônico de tecido infectado revelaram a presença de inclusões citoplasmáticas lamelares normalmente associadas à infecção por potyvirus (Edwardson, 1974).

Nas tentativas de purificação do VMP foram conseguidas apenas preparações parcialmente purificadas e de baixa concentração. Membros do grupo potyvirus são normalmente difíceis de purificar devido à tendência das partículas em se agregarem, resultando na perda parcial ou total (Delgado-Sanches & Grogan, 1966; Damirdagh & Shepherd, 1970; Langenberg, 1973). Além da agregação, a baixa concentração do vírus nos tecidos das hospedeiras (Delgado-Sanches & Grogan, 1966; Shepherd & Pound, 1960) e as contaminações das preparações com materiais das hospedeiras (Van Regenmortel, 1964; Langenberg, 1973) contribuem para o insucesso na purificação dos vírus deste grupo. A baixa concentração do vírus no tecido foi confirmada através de microscopia eletrônica, no exame de diversas hospedeiras.



TABELA 1. Concentração relativa do vírus do mosaico do picão em folhas e caule de hospedeiras com infecção sistêmica inoculadas mecanicamente na mesma data.

Fonte de inóculo	Hospedeira <sup>a</sup>		
	<i>Nicotiana tabacum</i> "TNN"	<i>Nicotiana</i> híbrida	<i>Helianthus annuus</i>
Folha	143 <sup>b</sup>	59	74
Caule	85	2	9

<sup>a</sup> Foram testadas 3 plantas de cada hospedeira, sendo a coleta das folhas e caule feita 6 dias após a inoculação das plantas.

<sup>b</sup> Lesões locais por folha de *Chenopodium amaranticolor*. Média de 9 plantas (total de 3 folhas por planta).

Fatores inerentes à própria planta ou as condições nas quais elas se desenvolvem, podem afetar a concentração do vírus no tecido. Em testes realizados com o vírus Y da batata sob condições de temperatura e luminosidade controladas, Delgado-Sanches & Grogan (1966) constataram que as folhas da hospedeira diretamente inoculadas foram melhor fonte de vírus para purificação, do que as demais sistemicamente infectadas, não havendo correlação entre a severidade dos sintomas e a concentração do vírus. No estudo do VMP, o material para a purificação sempre foi colhido 8–16 dias após as plantas serem inoculadas, período em que, aparentemente, a concentração do vírus permanecia mais ou menos estável e, normalmente, as folhas coletadas foram as não inoculadas diretamente e com os sintomas mais severos.

Embora seja bastante comum se correlacionar a severidade dos sintomas com a maior concentração do vírus no tecido da planta, isto pode não ser verdadeiro para o VMP. Noutros trabalhos a serem realizados com este vírus, seria aconselhável um estudo

mais detalhado com relação a esse aspecto. Outras hospedeiras sistêmicas para a multiplicação do vírus, além daquelas mencionadas no presente trabalho, deveriam ser estudadas para verificar qual a mais adequada para fins de purificação.

O antissoro preparado para o VMP revelou a presença de anticorpos contra as proteínas normais da hospedeira, conforme verificado na avaliação do título do antissoro, o qual reagiu com o extrato de folhas sadias até 1:256. Este tipo de reação já era esperado, uma vez que as preparações usadas como antígeno achavam-se apenas parcialmente purificadas.

Testes de dupla difusão em agar gel com SDS têm sido extensivamente utilizados na diagnose e no estudo do relacionamento de potyvirus (Purcifull & Batchelor, 1977). No estudo do VMP, empregando-se SDS no meio (0,5%), e no tratamento do antígeno (3%), foram obtidos resultados inconsistentes na detecção do vírus, ocorrendo reação em alguns testes com determinadas hospedeiras e não em outros, às vezes utilizando-se as

mesmas hospedeiras. Conforme Shepard & Shalla (1970), para o emprego de teste de dupla difusão com o uso de SDS na diagnose do vírus alongado, é necessário que o título de antissoro seja bastante alto visto que o tratamento do antígeno com detergente, no caso o SDS, fragmenta a partícula do vírus, reduzindo a afinidade entre o anticorpo e o antígeno fragmentado. Isto se explica por ter sido o anticorpo produzido contra a partícula inteira do vírus e não com a proteína separada do ácido nucleico viral.

O VMP apresenta algumas propriedades em comum com o "Bidens Mottle Virus" (BMoV), isolado do picão na Flórida, U.S.A. (Christie *et al.*, 1968). Em estudos realizados por Kuhn *et al.* (1980) verificou-se que o VMP e o BMoV se assemelhavam em alguns aspectos, mas não em outros, o que levou à suposição de não se tratar do mesmo vírus. Nos dados obtidos no presente trabalho, ambos os vírus apresentaram morfologia de

partículas semelhantes, induziram inclusões citoplasmáticas similares e perderam a infectividade quando diluídos acima de  $10^{-3}$ . Entretanto, o BMoV permaneceu infectivo por 16 dias no extrato da planta quando conservado no ambiente, enquanto o VMP permaneceu apenas 5 dias, perdendo a infectividade aos 7 dias, nas mesmas condições. O ponto termal de inativação encontrado para o BMoV situou-se entre 50–55°C, e para o VMP, entre 55–60°C. Métodos de purificação citados para o BMoV (Hiebert & McDonald, 1973; Christie *et al.* 1968) não foram eficientes para purificar o VMP, mesmo utilizando-se a mesma hospedeira para multiplicação do vírus. No estudo do relacionamento serológico, através de testes de dupla difusão em agar gel com SDS, não se verificou reação positiva entre o antissoro contra o BMoV e o suco com o VMP. Essas divergências reforçam a hipótese já mencionada de não se tratar do mesmo vírus.

#### LITERATURA CITADA

- BALL, E.M.; AAPOLA, A.I.E.; DUFFUS, J. E.; HAMILTON, R.I.; RAGETLI, H. W.J.; ROCHOW, W.F. & SHEPARD, J. F. Serological tests for the identification of plant viruses. St. Paul, American Phytopathological Society, 1974. 31p.
- CHRISTIE, R.G. Rapid staining procedurs for differentiatin g plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology* 31: 268 - 271. 1967.
- CHRISTIE, S.R.; EDWARDSON, J.R. & ZETTLER, F.W. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from Bidens and Lepidium. *Plant. Dis. Rep.* 52: 763 - 768. 1968.
- COSTA, A.S. & KITAJIMA, E.W. Vírus do mosaico do picão ataca o girassol. O Estado de São Paulo, São Paulo, 30 nov. 1966. *Supl. Agr.* 605: 12 - 13.
- DAMIRDAGH, I.S. & SHEPHERD, R.J. Purification of the tobacco etch and other viruses of the potato Y group. *Phytopathology* 60: 132 - 142. 1970.
- DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R. G. Purification and properties of potato virus. Y. *Phytopathology* 56: 1397 - 1404. 1966.
- EDWARDSON, J.R. Some properties of the potato virus Y-group. *Agric. Exp. Sta. Monog. Series n° 4.*, 398p. 1974.

- FULTON, R.W. Recent advances in virus purification. In: 3rd Intern. Symposium on virus diseases of ornamental plants, College Park. U.S.A. Acta Horticultura. p. 93 - 104. 1974.
- HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. Virology 56: 349 - 361. 1973.
- KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. J. Electron Microsc. (Japan) 14: 119-121. 1965.
- KITAJIMA, E.W.; CARVALHO, A.M.B. & COSTA, A.s. Morfologia do vírus do mosaico do picão. Bragantia 20: 503 - 512. 1961.
- KUHN, G.B.; LIN, M.T. & COSTA, C.L. Transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. Fitopatologia Brasileira 5: 39 - 50. 1980.
- LANGENBERG, W.G. Serology, physical properties, and purification of unaggregated infectious maize dwarf mosaic virus. Phytopathology 63: 149 - 154. 1973.
- LIN, M.T. & CAMPBELL, R.N. Characterization of broccoli necrotic yellows virus. Virology 48: 30 - 40. 1972.
- LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; CUPERTINO, F.P. & COSTA, C.L. Properties of a possible carlavirus isolated from a cerrado native plant. *Cassia Sylvestris*. Plant Dis. Rep. 63: 501 - 505. 1979.
- PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion test with sodium dodecyl sulfate (SDS) - treated plant viruses and plant viral inclusions. Agr. Exp. Station Bulletin nº 788, University of Florida, Gainesville. 39p. 1977.
- SHEPARD, J.F. & SHALLA, T.A. An antigenic analysis of potato virus X and of its degraded protein. Virology 42: 825 - 834. 1970.
- SHEPHERD, R.J. & POUND, G.S. Purification of turnip mosaic virus. Phytopathology 50: 797 - 803. 1960.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. Separation of an antigenic plant protein from preparations of plant viruses. Phytopathology 54: 282 - 289. 1964.