Ustalenie stopnia pokrewieństwa serologicznego między czterema carlawirusami przy zastosowaniu immunoelektronomikroskopowej techniki dekoracji i testu absorpcji krzyżowej surowic

MAREK S. SZYNDEL

Katedra Fitopatologii, SGGW — AR, Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

(Otrzymano dn. 1986.12.18)

M. S. Szyndel (*Department of Plant Pathology, Agricultural University SGGW — AR, Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa, Poland*) *Acta Agrobotanica* 41 (1): 5-15 1988.

The determination of the degree of serological relationship among four carlaviruses using an immunolectron microscope-decoration technique and cross-absorption tests

Abstract

A very close serological relationship was found between CVB and PVS, while only a distant relationship was shown between CVB and CLV. Each of these viruses had its own characteristic major "antigenic fraction", distinguishing it from the others, and small "antigenic fraction" common to all four. The antiserum to CLV was shown to be the richest in various antigenic fractions, antisera against PVM and PVS had the same number of fractions but of different specificity and CVB-antiserum had the relatively smallest number of fractions.

WSTĘP

Pierwsze doniesienia o istnieniu pokrewieństwa serologicznego między wirusem M ziemniaka (potato virus M; PVM), wirusem S ziemniaka (potato virus S; PVS) i utajonym wirusem goździka (carnation latent virus; CLV) to prace Bagnalla i in. (1956) oraz Kassanisa (1956). Bagnall i in. (1959), ustalając zakres pokrewieństwa między tymi wirusami przy użyciu testu absorpcji krzyżowej surowic (Matthews, 1957), stwierdzili, że każdy z nich ma swoistą dla siebie, główną frakcję antygenową, oraz że PVM i PVS mają wspólną niewielką frakcję antygenową, a ponadto każdy z nich ma także oddzielne frakcje wspólne z CLV. Dane te potwierdzili Hakkaart i in. (1962), którzy prowadząc badania nad wirusem B złocienia (chrysanthemum virus B; CVB) ustalili także, że CVB zdaje się mieć niewielkie wspólne frakcje antygenowe z CLV i PVM, a jednocześnie wyraźnie odrębną, dużą wspólną

frakcję z PVS. Określając na podstawie porównania mian surowic homo- i heterologicznych, w teście absorpcji krzyżowej, stopień pokrewieństwa między tymi wirusami, zaproponowali następujący szereg pokrewieństwa: PVS-CVB-CLV-PVM.

W badaniach nad pokrewieństwem serologicznym różnych wirusów szerokie zastosowanie znalazły techniki immunoelektronomikroskopowe (Langenberg, 1974; Milne i Luisoni, 1977a; Roberts i in., 1980; Kerlan i in., 1982; Walkey i Webb, 1984; Shukla i Gough, 1984). Techniki te charakteryzują się bardzo wysoką czułością, a jednocześnie nie wymagają specjalnego przygotowania surowic czy preparatów wirusów (Milne i Luisoni, 1975, 1977b).

W tej pracy zastosowano stosunkowo szybką i prostą immunoelektronomikroskopową technikę dekoracji do obserwacji reakcji PVM, PVS, CLV i CVB z homo- i heterologicznymi surowicami oraz do obserwacji tych reakcji po absorpcji krzyżowej surowic. Uzyskane wyniki posłużyły jako informacja o pokrewieństwie serologicznym między tymi wirusami i do identyfikacji frakcji przeciwciał w poszczególnych surowicach oraz „frakcji antygenowych” poszczególnych wirusów.

MATERIAŁ I METODY

Izolaty wirusów i surowic

Izolat M-24a wirusa M ziemniaka i izolat S-66a wirusa S ziemniaka otrzymano od dr A. Kowalskiej z Instytutu Ziemniaka w Młochowie. PVM namnażano w roślinach *Lycopersicon esculentum* cv. Najwcześniejszy, a PVS w *L. esculentum* cv. Nevskij. Izolat CLV otrzymano od dr A. Hein z Uniwersytetu Hohenheim (RFN) i namnażano go w roślinach *Dianthus barbatus*, a izolat CVB pochodził od dr S. Kryczyńskiego z SGGW – AR w Warszawie i uzyskiwano go z roślin *Chrysanthemum morifolium* cv. Blanche. Surowice otrzymano od: dr Z. Mierzwy z Instytutu Ziemniaka w Gdańsku (PVM i PVS), od dr C. Wettera z Uniwersytetu Saarlandes (RFN) (CLV) oraz surowicę przeciw CVB od dr D. Z. Maata z IPO Wageningen (Holandia).

Testy absorpcji krzyżowej surowic

Sok z roślin wyciskano w obecności 0,067 M buforu fosforanowego o pH 7,0 z dodatkiem 0,5% Na_2SO_3 w przypadku PVM, PVS i CVB lub z dodatkiem 0,01 N Na_2SO_3 w przypadku CLV. Porcję surowicy mieszano z siedmioma porcjami soku z rośliny stanowiącej źródło wirusa i uzyskane mieszaniny inkubowano 3 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie

przetrzymano w zamrażarce (-20°C) przez 5 tygodni. W tygodniowych odstępach mieszaniny, po rozmrożeniu, wirowano przez 20 minut przy 5-7 tys. obr./min w wirówce typu Janetzki K-24 i uzyskane supernatanty ponownie zamrażano. Po ostatnim rozmrożeniu mieszaniny wirowano raz przez 15 minut przy 5-7 tys. obr./min i raz przez pół godziny przy 10 tys. obr./min, a uzyskane supernatanty przesączano przez sączi bibułowe. Uzyskane w ten sposób preparaty odpowiednio absorbowanych surowic traktowano jako surowice rozcieńczone 1:8. Do absorpcji krzyżowej surowic przy użyciu kilku wirusów mieszano ze sobą jednakowe porcje soku z roślin stanowiących źródła tych wirusów i dalej postępowano zgodnie z opisaną procedurą. Nie stosowano absorpcji sokiem ze zdrowych roślin, gdyż przy użyciu techniki dekoracji nie obserwowano we wstępnych testach niespecyficznego oplaszczania cząstek.

Sposób przygotowania preparatów immunoelektronomikroskopowych techniką dekoracji podano w pracy Szynkla (1988). Badania prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu elekronowego marki IEM 100C firmy JEOL w Pracowni Mikroskopii Elektronowej SGGW-AR w Warszawie.

WYNIKI

Wartości granicznych rozcieńczeń soków (uzyskane metodą precypitacji) używanych do wysycania surowic w testach absorpcji krzyżowej wyniosły: 1:256 dla PVM, 1:128 dla PVS, 1:256 dla CLV i 1:16 dla CVB. W tabeli 1 przedstawiono określone techniką dekoracji wartości miana surowic homo- i heterologicznych nie absorbowanych i wysycanych krzyżowo zawiesinami wirusów. Przy określaniu miana surowic heterologicznych posługiwano się rozcieńczeniami surowic tylko do 1:8196, gdyż było ono osiągalne lub przekraczane tylko w wariantach z surowicami homologicznymi.

Wartości miana trzech homologicznych surowic (przeciw PVM, CLV i CVB) były wyraźnie wyższe od wartości miana surowic heterologicznych, co wskazuje, że każdy z tych wirusów ma wyraźnie odrębną, dużą i swoistą tylko dla siebie „frakcję antygenową”. Natomiast miano surowicy homologicznej przeciw PVS okazało się niewiele tylko wyższe od miana tej surowicy wobec CVB, co świadczy, że swoista dla PVS „frakcja antygenowa” jest stosunkowo niewielka.

Najniższe wartości miana surowic heterologicznych uzyskano z CLV, zaś dla wirusa S ziemniaka wartość miana surowicy homologicznej i heterologicznej przeciw CVB była identyczna. Surowica przeciw CVB była surowicą o najwyższym mianie przeciwciał i najsilniejszą reakcję heterologiczną wykazała z PVS, choć jednocześnie zawierała bardzo mało przeciwciał dla pozostałych wirusów, zwłaszcza dla CLV. Surowicą stosunkowo najbogatszą w heterologiczne przeciwciała okazała się surowica przeciw CLV.

Tabela 1 — Table 1

Homo- i heterologiczne miano surowic przeciw PVM, PVS, CLV, i CVB nieabsorbowanych i wysyconych krzyżowo preparatami wirusów

The homo- and heterologous titers of PVM, PVS, CLV, and CVB antisera, unabsorbed and cross-absorbed with virus preparations

Surowica przeciw Antiserum	Wirus użyty do absorpcji surowicy Virus used for absorption of the antiserum	Odwrotność miana surowic testowanych wobec The inverse of the titre of antisera tested against			
		PVM	PVS	CLV	CVB
PVM	—	4096	32	32	256
	PVM	0	0	0	0
	PVS	512	0	16	32
	CLV	1024	16	0	32
	CVB	1024	0	32	0
	PVS+CLV	1024	0	0	32
	PVS+CVB	2048	0	16	0
	CLV+CVB	2048	0	0	0
	PVS+CLV+CVB	1024	0	0	0
PVS	—	32	4096	64	2048
	PVM	0	4096	0	0
	PVS	0	0	0	0
	CLV	0	4096	0	0
	CVB	16	2048	32	16
	PVM+CLV	0	4096	0	2048
	PVM+CVB	0	2048	16	0
	CLV+CVB	8	2048	0	0
	PVM+CLV+CVB	0	2048	0	0
CLV	—	256	128	8192	128
	PVM	0	32	2048	128
	PVS	16	0	1024	64
	CLV	0	0	0	0
	CVB	16	32	2048	0
	PVM+PVS	0	0	2048	128
	PVM+CVB	0	32	2048	0
	PVS+CVB	16	0	2048	0
	PVM+PVS+CVB	0	0	2048	0
CVB	—	64	4096	16	> 65536
	PVM	0	2048	0	> 8196
	PVS	16	256	0	> 8196
	CLV	16	1024	0	> 8196
	CVB	0	256	0	2048
	PVM+PVS	0	512	0	> 8196
	PVM+CLV	0	512	0	> 8196
	PVS+CLV	16	64	0	> 8196
	PVM+PVS+CLV	0	128	0	> 8196

Z testów wynika, że jedynie w przypadku surowicy przeciw CVB z wirusem B złocienia nie uzyskano kompletnej absorpcji homologicznych przeciwciał, ale miano przeciwciał tej surowicy było wyraźnie obniżone — o 5 rzędów rozcieńczeń.

Stwierdzono, że po homologicznej absorpcji surowic nie występowały reakcje z pozostałymi wirusami, z wyjątkiem surowicy przeciw CVB absorbowanej CVB z wirusem S ziemniaka, a po heterologicznej absorpcji surowic nie obserwowano ponownej reakcji serologicznej z wirusami użytymi do absorpcji, z wyjątkami: surowicy przeciw PVS absorbowanej CVB z wirusem B złocienia oraz surowicy przeciw CVB absorbowanej przez PVS, PVM + PVS, PVS + CLV i PVM + PVS + CLV z wirusem S ziemniaka.

Po heterologicznej absorpcji surowicy przeciw CVB przez wirusy we wszystkich kombinacjach oraz po absorpcji surowicy przeciw PVS przez PVM, CLV i PVM + CLV homologiczne miano tych surowic, w porównaniu z mianem surowic nie absorbowanych, nie uległo zmianie. Jednocześnie w dwóch przypadkach, to jest: surowica przeciw PVM absorbowana PVS i surowica przeciw CLV absorbowana PVS, homologiczne miano tych surowic było zredukowane aż o 3 stopnie rozcieńczeń. Uzyskane dane z jednej strony wskazują na odległe pokrewieństwo serologiczne między PVM i PVS oraz CLV i PVS, a z drugiej świadczą o istnieniu wspólnych, niewielkich „frakcji antygenowych”.

DYSKUSJA

Kiedy w testach absorpcji krzyżowej surowic badane są cztery spokrewnione serologicznie wirusy (A, B, C, D), możliwa jest do ustalenia następująca liczba i rodzaj frakcji przeciwciał o różnej specyficzności serologicznej (Matthews, 1957):

Frakcja przeciwciał reagująca ze wszystkimi wirusami:

Frakcje przeciwciał reagujące z trzema wirusami:

Frakcje przeciwciał reagujące z dwoma wirusami:

Frakcje przeciwciał reagujące tylko z jednym wirusem:

Dla każdej ze stosowanych surowic można wyznaczyć maksymalnie 8 różnych frakcji przeciwciał (dla wirusa A są to frakcje mieszczące się w zakreślonym polu), ale tylko wtedy, gdy wszystkie wyniki krzyżowych testów serologicznych są pozytywne. Negatywny wynik testu jednoznacznie eliminuje obecność określonej frakcji przeciwciał lub nawet kilku różnych frakcji

przeciwciał w badanej surowicy. Szczegółowy sposób analizy frakcji przeciwciał dla surowicy przeciw PVM symbolicznie oznaczonej jako surowica przeciw wirusowi A przedstawiono w tabeli 2, wykorzystując dane o wynikach reakcji serologicznych z tabeli 1. Doświadczalnie uzyskane wyniki testów absorpcji krzyżowej surowic umożliwiły weryfikację ustalonych hipotetycznie wszystkich możliwych frakcji przeciwciał występujących w surowicy przeciw PVM. Negatywne wyniki testów nr 8 i 15 świadczą, że surowica ta nie zawiera teoretycznie możliwych frakcji ab i abc. W związku z tym frakcje te zostały wykreślone również i spośród możliwych teoretycznie wyników innych testów (4, 5, 7, 9 i 14). Jeżeli surowica jest absorbowana jednym wirusem, a wyniki testów serologicznych z pozostałymi trzema wirusami są dodatnie (np. testy 1, 2 i 3), to zakładając, że występuje w surowicy frakcja zawierająca trzy różne rodzaje przeciwciał, można uznać, iż to właśnie ona jest odpowiedzialna za te reakcje serologiczne. Ewentualna obecność frakcji zawierających dwa rodzaje przeciwciał (ac lub ad) albo tylko jeden ich rodzaj (a) jest wyraźniej udokumentowana w testach, w których surowica absorbowana jest mieszaniną dwóch lub trzech wirusów (porównaj testy 1, 2 i 3 z testami 11, 13 i 16). Dlatego w tabeli 2 dla pozostałych surowic podano już tylko te frakcje przeciwciał, których obecność wyniki danego testu najlepiej dokumentują (Matthews, 1957).

Ponieważ w testach z użyciem nie absorbowanych surowic każdy carlawirus reagował z każdą surowicą, to można przyjąć, że każda z badanych surowic ma frakcję przeciwciał reagującą ze wszystkimi wirusami, to jest frakcję abcd. Wykorzystując dane z tabeli 2 ustalono, że poszczególne surowice mają następujące frakcje przeciwciał:

- surowica przeciw PVM: abcd, a abd, acd, ac, ad,
- surowica przeciw PVS: abcd, b, abc, ab, bc, bd,
- surowica przeciw CLV: abcd, c, abc, acd, bcd, ac, bc, cd,
- surowica przeciw CVB: abcd, d, abd, ad, bd.

W przypadku surowicy przeciw CVB uzyskane wyniki nie są bardzo pewne, gdyż surowica ta nie została w pełni zabsorbowana wirusem B złożenia. Było to najprawdopodobniej spowodowane stosunkowo małą koncentracją wirusa w zawieszynie użytej do absorpcji oraz bardzo dużą ilością przeciwciał występujących w tej surowicy. Podobne trudności z uzyskaniem kompletnej absorpcji przeciwciał surowicy homologicznej (w przypadku surowicy przeciw PVS) mieli także Hakkaart i in. (1962). Surowica przeciw CVB prawdopodobnie zawiera jeszcze mniej frakcji przeciwciał, niż to przedstawiono, natomiast na pewno nie zawiera ich więcej, gdyż w testach wyeliminowano obecność frakcji przeciwciał wspólnych z CLV, to jest acd, bcd i cd.

Ponieważ frakcje przeciwciał surowicy są komplementarne do struktur powierzchni cząstek wirusa wywołujących ich powstanie, można utworzyć wzory „frakcji antygenowych” badanych wirusów. Przyjmując, że: abcd = G,

Tabela 2 — Table 2

Określenie frakcji przeciwciał surowic przeciw PVM, PVS, CLV i CVB na podstawie testów absorpcji krzyżowej surowic w badaniach nad czterema carlawirusami

The determination of antibody fractions of antisera against PVM, PVS, CLV and CVB on the basis of cross-absorption tests of the antisera in studies of four carlaviruses

Numer testu Test number	Suro-wica przeciw Anti serum	Wirus użyty do absorpcji surowicy Virus used for absorption of antiserum	Wirus użyty do testu po absorpcji Virus used to the test after absorption	Wynik reakcji serologicznej Result of the serological reaction	Wszystkie możliwe do ustalenia frakcje przeciwciał surowicy przeciw PVM i główne frakcje pozostałych surowic* All of the possible to establish antibody fractions antiserum against PVM and the main fractions of the remaining antisera*
1	2	3	4	5	6
1	PVM (A)	B	A	+	a, ac, ad, acd
2		B	C	+	ac, acd
3		B	D	+	ad, acd
4		C	A	+	a, <u>ab</u> , ad, abd
5		C	B	+	<u>ab</u> , abd
6		C	D	+	ad, abd
7		D	A	+	a, <u>ab</u> , ac, <u>abc</u>
8		D	B	—	nie ma frakcji: <u>ab</u> , <u>abc</u>
9		D	C	+	ac, <u>abc</u>
10		B+C	A	+	a, ad
11		B+C	D	+	ad
12		B+D	A	+	a, ac
13		B+D	C	+	ac
14		C+D	A	+	a, <u>ab</u>
15		C+D	B	—	nie ma frakcji: <u>ab</u>
16		B+C+D	A	+	a
17	PVS	A	B	+	b
18		A	C	—	—
19		A	D	—	—
20		C	A	—	—
21		C	B	+	b
22		C	D	—	—
23		D	A	+	abc
24		D	B	+	abc
25		D	C	+	abc
26		A+C	B	+	bd
27		A+C	D	+	bd
28		A+D	B	+	bc

c.d. Tabeli 2

1	2	3	4	5	6
29		A+D	C	+	bc
30		C+D	A	+	ab
31		C+D	B	+	ab
32		A+C+D	B	+	b
33	CLV	A	B	+	bcd
34		A	C	+	bcd
35		A	D	+	bcd
36		B	A	+	acd
37		B	C	+	acd
38		B	D	+	acd
39		D	A	+	abc
40		D	B	+	abc
41		D	C	+	abc
42		A+B	C	+	cd
43		A+B	D	+	cd
44		A+D	B	+	bc
45		A+D	C	+	bc
46		B+D	A	+	ac
47		B+D	C	+	ac
48		A+B+D	C	+	c
49	CVB	A	B	+?	bd
50		A	C	—	—
51		A	D	+?	bd
52		B	A	+?	ad
53		B	C	—	—
54		B	D	+?	ad
55		C	A	+?	abd
56		C	B	+?	abd
57		C	D	+?	abd
58		A+B	C	—	—
59		A+B	D	+?	d
60		A+C	B	+?	bd
61		A+C	D	+?	bd
62		B+C	A	+?	ad
63		B+C	D	+?	ad
64		A+B+C	D	+?	d

Przyjęto następujące oznaczenia: PVM = wirus A, PVS = wirus B, CLV = wirus C, CVB = wirus D. Przeciwciała surowicy, które reagują z wirusem A oznaczono jako a, z wirusem B — b, z wirusem C — c, z wirusem D — d. Wyniki oznaczone „?” są niepewne. Podkreślenia — objaśnienia w tekście.

PVM = virus A, PVS = virus B, CLV = virus C, CVB = virus D. Serum antibodies which reacted with virus A are denoted by a, with virus B — b, with virus C — c, with virus D — d. The results labeled with „?” are uncertain. Results underlined — explanation in text.

* Podkreślone frakcje oznaczają wyniki negatywne

Underlined fractions mean negative effects.

$abc = e$, $abd = f$, $acd = g$, $bcd = h$, $ab = i$, $ac = j$, $ad = k$, $bc = l$, $bd = m$, $cd = n$ – otrzymujemy następujące wzory:

PVM = G. a. f. g. j. k.

PVS = G. b. e. i. l. m.

CLV = G. c. e. g. h. j. l. n.

CVB = G. d. f. k. m.

Reasumując, należy stwierdzić, że każdy z badanych wirusów ma wyraźnie odrębną niż u pozostałych wirusów, specyficzną tylko dla siebie, raczej dużą (z wyjątkiem PVS) „frakcję antygenową”, a jednocześnie wszystkie mają jedną, wspólną dla wszystkich, niewielką „frakcję antygenową” – G. PVM i PVS nie mają innych identycznych „frakcji”, natomiast CLV ma dwie identyczne „frakcje” z PVM i dwie identyczne z PVS, nie zawiera zaś „frakcji” wspólnych z CVB. Pokrewieństwo serologiczne między CLV i CVB możliwe jest dzięki występowaniu „frakcji” G. CVB ma prawdopodobnie dwie identyczne „frakcje” z PVM i identyczną „frakcję antygenową” z PVS, która warunkuje bliskie pokrewieństwo między tymi wirusami. Graficznie pokrewieństwo między badanymi wirusami nie da się przedstawić w układzie szeregowym, tak jak proponowali Hakkart i in. (1962), a jedynie w postaci czworokąta nieforemnego (rys. 1). Porównując uzyskane wyniki z danymi z literatury można stwierdzić, że największe rozbieżności dotyczą pokrewień-

Rys. 1. Schemat pokrewieństwa serologicznego między carlawirusami. Podane liczby przedstawiają różnicę między wartościami miana surowic homo- i heterologicznych, wyrażoną jako ujemny logarytm przy podstawie 2

Fig. 1. A diagram of the serological relationships among carlaviruses. The giving numbers represent the differences between the titres of homo- and heterologous antisera, expressed as the negative base 2 logarithm

stwa między CVB i CLV. Choć uważa się, że wirusy te są blisko serologicznie spokrewnione – indeks serologicznego zróżnicowania – SDI wynosi 3,7 (Wetter i Milne, 1981), to jednak Koenig (1978) uzyskiwała bardzo niską wartość miana surowicy przeciw CVB z CLV (1:2), przy mianie surowicy homologicznej 1:2048, a Bos i in. (1972) w ogóle nie stwierdzili reakcji serologicznej między CLV i surowicą przeciw CVB. Nie jest więc żadnym zaskoczeniem, że wyniki zrelacjonowanych tu badań wskazują na bardzo odległe pokrewieństwo między tymi wirusami. Różnica miana surowic homo- i heterologicznych obliczona jest jako średnia z testów w obu kierunkach i wyrażona jako $-\log_2 x$ wynosi 10. Rozbieżność wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach może być spowodowana nie tylko stosowaniem różnych technik serologicznych, ale i różniących się izolatów wirusów i różnych surowic.

STRESZCZENIE

CVB i PVS okazały się najbliżej, a CVB i CLV najodleglej spokrewnione serologicznie. Każdy z wirusów ma charakterystyczną dla siebie, wyraźnie odrębną główną „frakcję antygenową”, a także jedną niewielką frakcję wspólną dla wszystkich wirusów. Największą liczbę różnorodnych frakcji przeciwciał zawiera surowica przeciw CLV, surowice przeciw PVM i PVS zawierają jednakową liczbę, ale różnych frakcji, a najmniej takich frakcji zawiera surowica przeciw CVB.

LITERATURA

- Bagnall R. H., Larson R. H., Walker J. C., 1956. Potato viruses M, S and X in relation to interveinal mosaic of Irish Cabblery variety. Bull. Wiscon. Univ. Agric. Expt. Stn. Res. 198.
- Bagnall R. H., Wetter C., Larson R. H., 1959. Differential host and serological relationships of potato virus M, potato virus S and carnation latent virus. Phytopathology 49: 435-442.
- Bos L., Maat D. Z., Markov M., 1972. A biologically highly deviating strain of red clover vein mosaic virus usually latent in pea (*Pisum sativum*) and its differentiation from pea streak virus. Neth. J. Pl. Pathol. 78: 125-152.
- Hakkaart F. A., van Slogteren D. H. M., de Vos N. P., 1962. Chrysanthemum virus B, its serological diagnosis in chrysanthemums and its relationship to the potato viruses S and M and to carnation latent virus. Tijdschrift over Planten Ziekten 68: 126-135.
- Kassanis B., 1956. Serological relationships between potato paracrinkle virus, potato virus S and carnation latent virus. J. Gen. Microbiol. 15: 620-628.
- Kerlan G., Mille B., Detienne G., Dunez J., 1982. Comparison of immunoelectronmicroscopy, immunoenzymology (ELISA) and gel diffusion for investigating virus strain relationships. Annales de Virologie 133E: 3-14.
- Koenig R., 1978. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. J. Gen. Virol. 40: 309-318.
- Langenberg W. G., 1974. Leaf-dip serology for the determination of strain relationships of elongated plant viruses. Phytopathology 64: 128-131.
- Matthews R. E. F., 1957. Plant virus serology. Cambridge University Press, 128 ss.
- Milne R. G., Luisoni E., 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. Virology 68: 270-274.

- Milne R. G., Luisoni E., 1977a. Serological relationships among maize rough dwarf-like viruses. *Virology* 80: 12-20.
- Milne R. G., Luisoni E., 1977b. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. [W:] *Methods in Virology*, K. Maramorosch i H. Koprowski (red.), Academic Press, London, tom. 6; ss. 265-281.
- Roberts I. M., Tamada T., Harrison B. D., 1980, Relationship of potato leafroll virus to luteoviruses: evidence from electron microscopical test. *J. Gen. Virol.* 47: 209-213.
- Shukla D. D., Gough K. H., 1984. Serological relationships among four Australian strains of sugarcane mosaic virus as determined by immune electron microscopy. *Plant Disease* 68: 204-206.
- Szyndel M. S. 1988. Zastosowanie immunoelektronomikroskopowej techniki dekoracji cząstek do obserwacji pokrewieństwa serologicznego carlawirusów. *Acta Agrobot.* 41: 17-26.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W., 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. *Phytopath. Z.* 110: 319-327.
- Wetter C., Milne R. G., 1981. Carlaviruses. [W:] *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*, E. Kurstak (red.), Elsevier (North-Holland Biomedical) Press, ss. 695-730.