

MAREK S. SZYNDEL

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego —

— Akademia Rolnicza w Warszawie

## PRZEGLĄD TECHNIK IMMUNOELEKTRONOMIKROSKOPOWYCH STOSOWANYCH W WIRUSOLOGII ROŚLIN

### II. NOWOCZESNE TECHNIKI IMMUNOELEKTRONOMIKROSKOPOWE; CZUŁOŚĆ I ZASTOSOWANIE TECHNIK IEM

Nowoczesne techniki immunoelektronomikroskopowe powinny opierać się na prostych i szybkich metodach przygotowywania preparatów, zapewniających jednocześnie uzyskanie obrazu mikroskopowego jak najlepszej jakości [49].

#### *Technika zbrylania cząstek*

Technika zbrylania cząstek, zwana także w języku angielskim antibody bridging — tworzenia mostków przeciwciał [69], została opisana przez Milne'a i Luisoni w 1975 roku. Jest to prostsza i szybsza wersja techniki klasycznej [3], jednocześnie bardzo podobna do techniki leaf-dip serology [4].

Preparaty immunoelektronomikroskopowe przygotowuje się przy użyciu tej techniki w następujący sposób [49]: kawałek (2 mm<sup>2</sup>) blaszki liściowej z chorej rośliny rozciera się w 10 µl surowicy rozcieńczonej w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0 i mieszaninę inkubuje się 15 minut w warunkach temperatury pokojowej. Siatkę pokrytą błoną Formvaru i napyłoną węglem nakłada się na mieszaninę, a następnie przemywa 30 kroplami buforu fosforanowego, 50 kroplami wody i preparat kontrastuje się 5 kroplami 2% octanu uranylu przed odsączaniem i wysuszeniem.

Procedurę tę można zmodyfikować w różny sposób. Zamiast rozcierać fragment liścia w kropli surowicy, można do kropli tej dodać nieoczyszczonego soku z rośliny porażonej lub zawiesiny oczyszczonego wirusa [35, 48, 50, 51, 70, 78]. Czas inkubacji może być różny: od 5 minut [60] do 2—6 godzin [23, 30, 70] lub nawet do całej doby w przypadku badań nad wirusem liściozwoju ziemniaka [35]. Ohki i wsp. [60] zaproponowali, aby siatki nakładać na 5 minut na kroplę mieszaniny surowicy

z antygenem i, po płukaniu, na kroplę octanu uranylu. Istotną sprawą jest także rozcieńczenie surowicy. Milne i Luisoni [49, 50, 51] zalecają stosowanie surowicy w rozcieńczeniu 10—20 razy mniejszym niż wynosi miano tej surowicy. Jeżeli surowicy się dostatecznie nie rozcieńczy, może wystąpić głównie zjawisko opłaszczania, dekoracji cząstek, a ich zbrylanie może być zahamowane. Jest to sytuacja analogiczna do hamowania precypitacji w obecności nadmiaru przeciwciał w testach precypitacji [65].

Jak stwierdzają twórcy tej techniki [49, 50, 51], za jej pomocą uzyskuje się 2 lub 3 specyficzne efekty: zbrylanie cząstek wirusa przez przeciwciała, około 10-krotny wzrost liczby cząstek na siatce po inkubacji z surowicą homologiczną w porównaniu do kontroli oraz czasem opłaszczanie cząstek przeciwciałami. Przy użyciu tej techniki w sposób prosty i szybko można przygotować preparaty do mikroskopu (przygotowanie jednej próbki trwa od 10 do 20 minut). Siatki, próbki wirusa ani surowice nie muszą być specjalnie przygotowywane, zbędne jest stosowanie agaru, a po dokładnym płukaniu uzyskuje się bardzo wyraźne obrazy elektronomikroskopowe [49, 60]. Czasami zbrylanie cząstek może być utrudnione, na przykład gdy koncentracja wirusa jest bardzo niska, szanse zetknięcia się cząstek ze sobą mogą być bardzo małe. Można tę trudność niekiedy przezwyciężyć przedłużając czas inkubacji i podnosząc temperaturę, w jakiej przebiega reakcja. Technika ta jest jednak mało przydatna do badania wirusów, które mają tendencję do samoistnego tworzenia agregatów cząstek [48].

*Elektronomikroskopowa technika immunosorpcji*  
(ang. *immunosorbent electron microscopy — ISEM*)

Technika ISEM [69] jest niejako zmodyfikowaną wersją klasycznej techniki Derricka [18], gdyż opiera się na tej samej zasadzie: przeciwciała surowicy są absorbowane do błonek na siatkach, co umożliwia specyficzne wyłapanie zwiększonej liczby cząstek wirusa z zawiesiny. Przygotowanie preparatów tak, jak to zaproponował Derrick [18], trwa około 90 minut. Milne i Luisoni [51] poszukując szybkich technik IEM skrócili tę procedurę do 25 minut, przy zachowaniu niezmięnionej czułości testu. Zastosowali 5-minutowy okres inkubacji z badanym wirusem i kontrastowanie preparatów 2% octanem uranylu. Prace nad techniką zaproponowaną przez Derricka podjęli także badacze szkoccy [68], dążąc do zmaksymalizowania jej czułości. Dlatego obecnie stosowane są dwa warianty techniki ISEM:

— wariant ISEM z krótkim czasem inkubacji [14, 31, 38, 44, 47, 48, 51, 57, 66, 84],

— wariant ISEM z długim czasem inkubacji. W wariacie tym czas pokrywania siatek przeciwciałami wynosi około 30 minut [7, 13, 14, 28, 40, 62, 68, 70, 72, 76, 80], a czas inkubacji „uczulonych” siatek z zawiesiną wirusa od 1 do 2 godzin [7, 20, 28, 31, 57, 62, 72, 80], do 4 godzin, a nawet do całej doby [13, 14, 20, 62, 68].

Obecnie uważa się, że bez względu na stosowany wariant ISEM do całkowitego pokrycia siatek przeciwciałami wystarcza okres 5 minut [31, 37]. Przedłużanie czasu inkubacji z 15 minut do 4 godzin powoduje 4-krotne zwiększenie liczby wyłapanych cząstek [14, 68], a przedłużenie do 16 godzin nawet 5-krotny wzrost [18]. Czasem długotrwała inkubacja umożliwia wykrycie wirusów, które przy krótkim czasie inkubacji nie są wykrywane [37, 47]. Są również doniesienia, że np. ilość wyłapanych cząstek geminowirusów po okresie 15-minutowej inkubacji była wyższa niż po 4 godzinach oraz, że w badaniach niektórych wirusów całonocna inkubacja może powodować dezintegrację ich cząstek [37].

Obok stosowania odpowiednich dla danego wirusa czasów inkubacji bardzo istotną sprawą jest właściwe rozcieńczenie surowicy. Stwierdzono, iż nie powinno być ono mniejsze niż 1:500—1:1000, gdyż przy niższych rozcieńczeniach obserwuje się inhibicję zjawiska wyłapywania cząstek przez niespecyficzne białka surowicy [38, 39, 47, 48]. Zbyt wysokie rozcieńczenia surowicy także nie są polecane, gdyż występuje nasilenie niespecyficznej adsorpcji cząstek wirusa do błonki [38, 39, 57]. Jeżeli istnieje konieczność użycia surowic silnie skoncentrowanych (np. dostępne są surowice tylko o niskim mianie), można stosować do wstępnego pokrycia błonek roztwór białka A (1—10  $\mu\text{g/ml}$ ), a dopiero potem specyficzną surowicę [26, 39, 47, 55, 66, 73]. Białko A produkowane jest w ścianie komórkowej bakterii *Staphylococcus aureus* i wykazuje wysokie powinowactwo z fragmentem Fc cząstek  $\gamma$ -globulin [39, 55, 73]. Pierwsze doniesienia że białko A znacznie zwiększa czułość testu ISEM [66, 73] zostały uznane za błędne [26, 37, 39, 47]. Tylko przy wysokiej koncentracji wirusów uzyskuje się czasem dodatkowy wzrost liczby wyłapanych cząstek [39, 47]. Główną zaletą użycia białka A jest obok zachowania wysokiej czułości testu ISEM, eliminacja ryzyka inhibicji wyłapywania cząstek wirusa. Podobne efekty można uzyskać stosując do pokrycia błonek oczyszczoną frakcję  $\gamma$ -globulin [57].

Dla uzyskania prawidłowych wyników testu techniką ISEM zasadniczą sprawą jest użycie właściwie przygotowanych preparatów kontrolnych. Siatki muszą być pokryte warstwą surowicy kontrolnej, rozcieńczonej w tym samym stopniu co surowica badana, aby wyeliminować niespecyficzną adsorpcję cząstek wirusa. Tylko w takich warunkach możliwa jest prawidłowa interpretacja reakcji z surowicami homo- i heterologicznymi [38, 57]. Warto zaznaczyć, że aby wynik testu serologicznego

wykonanego techniką ISEM uznać za pozytywny, wymagany jest minimum 3-krotny wzrost liczby cząstek na siatkach „uczulonych” w stosunku do liczby cząstek na siatkach kontrolnych [37].

Z innych czynników, które mogą mieć wpływ na wyniki uzyskane tą techniką ważne są: koncentracja wirusa, temperatura w jakiej przeprowadza się test, rodzaj i molowość używanych buforów, rodzaj rośliny-gospodarza wirusa, odczyn surowic i ekstraktu wirusa itp. [7, 14, 18, 20, 38, 57, 62, 68]. Stwierdzono także, że jeśli siatki zostaną wprowadzone w ruch obrotowy w polu magnetycznym w trakcie reakcji serologicznej, to (przy niezmienionym czasie inkubacji) zwielokrotnia to liczbę wychwytyanych cząstek [77].

### *Technika dekoracji cząstek*

W preparatach immunoelektronomikroskopowych, przygotowywanych technikami zarówno klasycznymi, jak i techniką zbrylania cząstek, występuje czasami zjawisko dekorowania cząstek czy agregatów cząstek wirusów specyficznymi przeciwciałami. Jednak dopiero Milne i Luisoni w 1975 roku zastosowali w badaniach wirusów roślin technikę immunoelektronomikroskopową, której założeniem było uzyskanie obrazu pojedynczych cząstek wirusa opłaszczonych cząstkami specyficznymi przeciwciał, tworzących wyraźnie widoczną otoczkę. W tym celu należało najpierw unieruchomić cząstki wirusa na siatce wykorzystując fakt, że są one adsorbowane do błonki i dopiero potem przeprowadzić reakcję serologiczną. Obserwowane zjawisko oraz tę technikę IEM nazwano dekoracją [50, 51, 69]. Milne i Luisoni [49] zalecają następujący sposób przygotowania preparatów: niewielką ilość (2 mm<sup>2</sup>) tkanki porażonego liścia rozciera się w kropli wody i na tę kroplę nakłada się na kilka sekund siatkę mikroskopową, następnie przemywa się ją 30 kroplami 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,0 i nanosi na kroplę surowicy rozcieńczonej 10- lub 20-krotnie mniej niż jej miano końcowe. Po 15 minutach inkubacji siatki przemywa się 20 kroplami buforu, 50 kroplami wody i preparaty kontrastuje się 5 kroplami 2% roztworu octanu uranylu. Jako źródło wirusa może być używany także nieoczyszczony sok z porażonych roślin, frakcje pobrane z gradientów sacharozy czy chlorku cezu, jak również oczyszczone preparaty wirusa [2, 15, 16, 31, 48, 49, 50, 51, 53, 78, 81, 84]. Czas nanoszenia preparatu wirusa może być różny: 10 sekund [49], 5—15 minut [31, 81, 82], a nawet 30—45 minut [71]. Czas inkubacji wirusa z surowicą bywa przedłużany do 30 minut [16, 42, 82]. Schenk [71] w badaniach nad optymalizacją warunków tej techniki stwierdził, że różnicowanie czasu inkubacji wirusa z surowicą w zakre-

sie od 2 do 120 minut nie miało wpływu na wynik testu, podobnie jak stosowanie różnych rozcieńczeń surowicy w przedziale od 1:5 do 1:320. Większość badaczy stosuje rozcieńczenia surowicy takie, jak w schemacie Milne'a i Luisoniego [49], choć można stosować także surowice zupełnie nie rozcieńczone oraz surowice o bardzo niskiej jakości. Technika dekoracji cząstek jest chyba jedyną techniką serologiczną, w której może być używana, bez konieczności absorpcji, surowica reagująca częściowo z białkiem roślinnym [52, 84]. Nie stwierdzono istotnej różnicy w reakcji opłaszczania cząstek przy stosowaniu zwykłej surowicy i oczyszczonych immunoglobulin [51].

Stosując technikę dekoracji nie tylko szybko i łatwo przygotowuje się preparaty do obserwacji, ale również uzyskuje się preparaty, w których można obserwować miejsca wiązania przeciwciał z cząstkami wirusa, co nie jest możliwe przy zastosowaniu techniki zbrylania cząstek. W skrajnie trudnych warunkach testu znalezienie i obserwacja nawet jednej tylko cząstki wirusa umożliwia teoretycznie uzyskanie wyniku [48, 51].

Czasami stosowana jest tak zwana „podwójna dekoracja cząstek” [33, 34, 78]. Udekorowane przeciwciałami cząstki wirusów traktowane są owczą surowicą przeciw króliczym immunoglobulinom. Większość surowic przeciw wirusom roślin produkowanych jest na królikach, dlatego też zastosowanie surowicy przeciw króliczym IgG powoduje dodatkowe opłaszczenie unieruchomionych na siatkach cząstek. Dzięki temu można, stosując bardzo niewielkie powiększenia w mikroskopie elektronowym, obserwować dużą powierzchnię siatki i łatwo wykrywać cząstki. Skracą to bardzo czas oglądania jednego preparatu [33, 34, 78].

Na podobnej zasadzie oparta jest technika GLAD (ang. gold-labelled antibody decoration) — dekoracja przeciwciałami znakowanymi złotem [41]. Użyty do wtórnej dekoracji kompleks złoto-antykrólicze IgG jest dodatkowym wskaźnikiem reakcji serologicznej między wirusem a specyficzną dla niego surowicą. GLAD zalecana jest do szybkiego wykrywania wirusów roślin występujących w niskich koncentracjach [41].

### *Technika kombinowana ISEM + dekoracja*

Milne i Luisoni [51] zaproponowali połączenie techniki ISEM i techniki dekoracji. Preparat mikroskopowy przygotowuje się najpierw jednym z wariantów techniki ISEM, ale przed kontrastowaniem inkubuje się ponownie siatki na kropli surowicy przez około 15 minut. Pozytywny wynik reakcji serologicznej w postaci wielokrotnego wzrostu liczby cząstek wyłapanych w porównaniu z kontrolą, jest potwierdzony dodat-

kowo przez wyraźne opłaszczenie cząstek wirusa przeciwciałami. Technika kombinowana łączy w sobie wszystkie zalety obu „składowych” technik i obecnie jest bardzo powszechnie stosowana w wirusologii roślin [1, 6, 11, 31, 35, 46, 58, 78, 79].

### *Czułość i zastosowanie technik immunoelektronomikroskopowych*

Czułość każdej techniki serologicznej może być określona przez najmniejszą ilość wirusa możliwą do wykrycia przy użyciu danej techniki. Dla ISEM wartość ta waha się w granicach 0,15—20 ng/ml [7, 18, 25, 34, 62]. Van Regenmortel [65] dla porównania czułości różnych technik serologicznych podaje następujące wartości minimalnej koncentracji wirusa wykrywanego każdą z nich: podwójna dyfuzja w żelu 2—20  $\mu$ g/ml, precypitacja 1— $\mu$ g/ml, elektroforeza rakietowa 0,2—10  $\mu$ g/ml, immunosmoforeza 50—100 ng/ml, test lateksowy 5—20 ng/ml, test ELISA 1—10 ng/ml. Wielu autorów potwierdza fakt, że testy IEM są tak samo czułe lub nawet czulsze niż testy enzymatycznej immunosorpcji i testy biologiczne [7, 27, 28, 57, 58, 80]. Wyznaczając technikami IEM miano surowic uzyskano wzrost miana o 2—3 stopnie w porównaniu z wartościami miana otrzymywanymi technikami precypitacji dyfuzji w żelu [15, 52, 78].

Czułość poszczególnych technik IEM nie jest identyczna. Homologiczne miano surowicy przeciw wirusowi sterylności i karłowatości owsa uzyskane w teście dekoracji wynosiło 1:400, w teście zbrylania 1:1600, zaś w teście ISEM 1:6400 (48). Huth i wsp. [31] w badaniach nad wirusem żółtej mozaiki jęczmienia z użyciem surowicy przeciw wirusowi żółtej mozaiki pszenicy uzyskali reakcję wyłapywania większej liczby cząstek w teście ISEM, a nie obserwowali zjawiska dekoracji cząstek w teście dekoracji. Natomiast Schenk [71] prezentuje zupełnie przeciwne wyniki. W badaniach nad wirusem X ziemniaka uzyskał 3-krotnie wyższą czułość techniki dekoracji niż ISEM.

Oprócz możliwości określania koncentracji wirusów i mianowania surowic techniki IEM stosuje się głównie w badaniach nad wykrywaniem i identyfikacją wirusów roślin. Polecane są, zwłaszcza ISEM i techniki kombinowane, do badań wirusów występujących w roślinach w bardzo niskich koncentracjach lub gdy w doświadczeniach dysponuje się tylko bardzo małymi próbkami materiału badawczego. Jako przykłady można wymienić badania nad wirusami występującymi we floemie roślin [32, 35, 68, 70], nad wirusami przenoszonymi z nasionami [9, 27, 28, 40, 45, 83], nad wirusami przenoszonymi z uredosporami grzybów rdzawnikowych [22], czy badania nad występowaniem wirusów w określonych tkankach czy organelach komórkowych [11, 16, 27, 28, 71, 72]. Techniki

te w zasadzie przeznaczone są do szybkiego przebadania raczej małej liczby próbek, ale przy wykorzystaniu mieszaniny surowic można je stosować nawet do rutynowych testów określania zdrowotności roślin [29, 34, 80].

Posługując się technikami IEM uzyskuje się prawidłowe dane o długości cząstek wirusów, często ulegających uszkodzeniom w trakcie oczyszczania [51, 53], gdyż do testów tych można używać nieoczyszczonego soku z roślin. Możliwa jest również analiza frakcji z gradientu sacharozy, chlorku cezu lub z prążków po rozdiale elektroforetycznym, a także np. zawartości słabych łuków precypitacji z testów podwójnej dyfuzji w żelu [15, 51]. Techniki te umożliwiają nie tylko wykrycie i identyfikację wirusów w przypadku mieszanych infekcji roślin — dekoracja [31, 32, 53, 76, 78, 84], ale także badania cząstek wirusów i wiroidów na poziomie molekularnym: transkapsydacja, struktury antygenowe kapsydu, wykrywanie serologiczne ds-RNA [8, 12, 19, 21, 24, 42, 43, 54, 61].

Najpowszechniej technik immunoelektronomikroskopowych używa się do określania stopnia pokrewieństwa serologicznego między szczepami wirusów [33, 57, 74], jak i między różnymi wirusami [2, 36, 50, 70, 78, 81].

Należy wspomnieć, że omawiane techniki znalazły zastosowanie także do wykrywania wirusów roślin w zwierzętach będących ich wektorami: w mszycach, nicieniach i skoczkach [25, 63, 64, 67] oraz w badaniach nad wirusami grzybów [5, 17], nad organizmami mikoplazmopodobnymi [10, 20, 75] i nad ludzkimi rotawirusami [56, 59].

#### LITERATURA

1. Accotto G. P.: *Phytopath. Medit.* 21, 75—78, 1982.
2. Adams A. N., Barbara D. J.: *Ann. appl. Biol.* 96, 201—208, 1980.
3. Almeida J. D., Waterson A. P.: *Advan. Virus Res.* 15, 307—338, 1969.
4. Ball E. M., Brakke M. K.: *Virology* 36, 152—155, 1968.
5. Barton R. J., Atkey P. T.: *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.* 1982, 115—116, 1984.
6. Begtrup J.: *Tidsskrift for Plantearl* 87, 179—182, 1983.
7. Beier H., Shepherd R. J.: *Phytopathology* 68, 533—538, 1978.
8. Boccardo G., Milne R. G.: *J. virol. Meth.* 3, 109—113, 1981.
9. Brlansky R. H., Derrick K. S.: *Phytopathology* 69, 96—100, 1979.
10. Caudwell A.: *in: Progres Agr. et Viticole* 24, 835—838, 1981.
11. Chase A. R., Zettler F. W.: *Plant Disease* 66, 891—893, 1982.
12. Chen M. H., Hiruki C., Okuno T.: *Can. J. Pl. Pathol.* 6, 191—195, 1984.

13. Chester J. B., Hill S. A., Wright D. M.: *Ann. appl. Biol.* 102, 325—329, 1983.
14. Cohen J., Loebenstein G., Milne R. G.: *J. virol. Meth.* 4, 323—330, 1982.
15. Conti M., i in.: *Phytopathology* 70, 394—399, 1980.
16. Delecolle B., Lot H.: *Agronomie* 1, 763—770, 1981.
17. DelVecchio V. G., Dixon C., Lemke P. A.: *Exp. Mycol.* 2, 138—144, 1979.
18. Derrick K. S.: *Virology* 56, 652—653, 1973.
19. Derrick K. S.: *Science* 199, 538—539, 1978.
20. Derrick K. S., Brlansky R. H.: *Phytopathology* 66, 815—820, 1976.
21. Derrick K. S., French R. C., Clark C. A., Gabriel C. J.: *J. virol. Meth.* 9, 293—299, 1984.
22. Erasmus D. S., von Wechmar M. B.: *Phytopath. Z.* 108, 26—33, 1983.
23. Forster R. L. S., Milne K. S.: *New Zealand J. Agric. Res.* 21, 131—135, 1978.
24. Fukuda M., i in.: *Virology* 101, 493—502, 1980.
25. Gillet J. M., i in.: *Acta Hort.* 129, 25—29, 1982.
26. Gough K. H., Shukla D. D.: *J. gen. Virol.* 51, 415—419, 1980.
27. Hagita T., Tamada T.: *Bull. Hokkaido Prefectural Agric. Exp. Stn.* 51, 83—94, 1984.
28. Hamilton R. I., Nichols C.: *Phytopathology* 68, 539—543, 1978.
29. Harville B. G., Derrick K. S.: *Pl. Dis. Repr.* 62, 290—292, 1978.
30. Hill S. A., Wright D. M.: *Plant Pathol.* 29, 143—144, 1980.
31. Huth W., Lesemann D. E., Paul H. L.: *Phytopath. Z.* 111, 37—54, 1984.
32. Jayasena K. W., i in.: *J. gen. Virol.* 57, 205—209, 1981.
33. Kerlan C., i in.: *Ann. de Virol.* 133 E, 3—14, 1982.
34. Kerlan C., Mille B., Dunez J.: *Phytopathology* 71, 400—404, 1981.
35. Kojima M., Chou T., Shikata E.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44, 585—590, 1978.
36. Langenberg W. G.: *Phytopathology* 64, 128—131, 1974.
37. Lesemann D. E.: *Acta Hort.* 127, 159—173, 1982.
38. Lesemann D. E., Bozarth R. F., Koenig R.: *J. gen. Virol.* 48, 257—264, 1980.
39. Lesemann D. E., Paul H. L.: *Acta Hort.* 110, 119—128, 1980.
40. Lima J. A. A., Purcifull D. E.: *Phytopathology* 70, 142—147, 1980.
41. Lin N. S.: *J. Virol. Meth.* 8, 181—190, 1984.
42. Lubbe J. L. M. van der, Hatta T., Francki R. I. B.: *Virology* 95, 405—414, 1979.



43. Luisoni E., Milne R. G., Boccardo G.: *Virology* 68, 86—96, 1975.
44. Luisoni E., Milne R. G., Roggero P.: *Pl. Disease* 66, 929—932, 1982.
45. Lundsgaard T.: *Seed Sci. and Technology* 11, 515—521, 1983.
46. Lundsgaard T.: *Intervirology* 22, 50—55, 1984.
47. Milne R. G.: *Acta Hort.* 110, 129—135, 1980.
48. Milne R. G., Lesemann D. E.: *Virology* 90, 299—304, 1978.
49. Milne R. G., Luisoni E.: *Virology* 68, 270—274, 1975.
50. Milne R. G., Luisoni E.: *Virology* 80, 12—20, 1977.
51. Milne R. G., Luisoni E.: „*Methods in Virology*”, K. Maramorosch, H. Koprowski (red.), Acad. Press 6, 265—281, 1977.
52. Milne R. G., Luisoni E., Ling K. C.: *Pl. Dis. Repr.* 63, 445—448, 1979.
53. Milne R. G., Maenga V., Losovisolo O.: *Phytopath. Medit.* 19, 115—120, 1980.
54. Nelson M. R., Wheeler R. E.: *Phytopathology* 69, 918 abstr., 1979.
55. Nicolaieff A., Katz D., van Regenmortel M. H. V.: *J. virol. Meth.* 4, 155—166, 1982.
56. Nicolaieff A., Obert G., van Regenmortel M. H. V.: *J. clin. Microbiol.* 12, 101—104, 1980.
57. Nicolaieff A., van Regenmortel M. H. V.: *Ann Virol. (Institut Pasteur)* 131, 95—110, 1980.
58. Noel M. C., i in.: *Ann. Phytopathol.* 10, 381—386, 1978.
59. Obert G., i in.: *J. virol. Meth.* 3, 99—107, 1981.
60. Ohki S. T., Shohara K., Inouye T.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46, 51—53, 1980.
61. Otsuki Y., Takebe I.: *Virology* 84, 162—171, 1978.
62. Paliwal Y. C.: *Phytopath. Z.* 89, 25—36, 1977.
63. Paliwal Y. C.: *Can. J. Bot.* 60, 179—185, 1982.
64. Plumb R. T.: *Proc. 3-th Conf. „Virus disease of Gramineae in Europe”*, 1980 Harpenden, Herts U. K., 123—126, 1981.
65. Regenmortel M. H. V. van: „*Serology and immunochemistry of plant viruses*”, Acad. Press, 302 str., 1982.
66. Regenmortel M. H. V. van, Nicolaieff A., Burckard J.: *Acta Hort.* 110, 107—115, 1980.
67. Roberts I. M., Brown D. J. F.: *Ann. appl. Biol.* 96, 187—192, 1980.
68. Roberts I. M., Harrison B. D.: *Ann. appl. Biol.* 93, 289—297, 1979.
69. Roberts I. M., Milne R. G., van Regenmortel M. H. V.: *Intervirology* 18, 147—149, 1982.
70. Roberts I. M., Tamada T., Harrison B. D.: *J. gen. Virol.* 47, 209—213, 1980.

71. Schenk G.: Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz 17, 357—365, 1981.
72. Shalla T. A., Petersen L. J., Giunchedi L.: Virology 66, 94—105, 1975.
73. Shukla D. D., Gough K. H.: J. gen. Virol. 45, 533—536, 1979.
74. Shukla D. D., Gough K. H.: Pl. Disease 68, 204—206, 1984.
75. Sinha R. C., Benhamou N.: Phytopathology 73, 1199—1202, 1983.
76. Stanarius A., i in.: Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz 20, 351—353, 1984.
77. Stobbs L. W.: Phytopathology 74, 1132—1134, 1984.
78. Szyndel M. S.: Zastosowanie technik immunoelektronomikroskopowych do wykrywania i określania pokrewieństwa serologicznego carlawirusów". Maszynopis Rozpr. Dokt. Kat. Fitop. SGGW-AR, 146 str., 1986.
79. Taiwo M. A., Gonsalves D.: Phytopathology 72, 583—589, 1982.
80. Thomas B. J.: Ann. appl. Biol. 94, 91—101, 1980.
81. Walkey D. G. A., Webb M. J. W.: Phytopath. Z. 110, 319—327, 1984.
82. Weber I., Stanarius A.: Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz 20, 447—448, 1984.
83. Wechmar M. B. von i in.: Phytopath. Z. 109, 341—352, 1984.
84. Wieczorek M., Kaniewski W.: Prace Nauk. IOR 24, 45—60, 1982.  
Wpłynęło do Redakcji w marcu 1987 r.

Materiały nadesłano do redakcji w marcu 1987 r.