

## APENDICE 1

### GENERALIDADES SOBRE LOS VIRUS

#### 1.1. INTRODUCCION

Un virus se puede definir como algo extremadamente pequeño infeccioso que puede multiplicarse sólo dentro de una célula viva y es potencialmente patógeno. Son tan pequeños que solo pueden visualizarse bajo un microscopio de gran aumento o mediante el microscopio electrónico.

Los virus sólo se pueden replicar en células vivas. Fuera de una célula el virus es inerte como una partícula de polvo, pero da lugar a una vida tan pronto como llega a una célula susceptible. La célula puede ser la de una bacteria, hongo, alga, planta, insecto o animal. Dependiendo de sus huéspedes los virus se han dividido en varios grupos: virus bacteriales (Bacteriófagos), virus de insectos, virus de animales, etc.

Los virus de las plantas fueron los primeros en descubrirse hacia finales del siglo pasado. Las enfermedades virosas fueron durante mucho tiempo un enigma ya que estas no serían causadas por ninguno de los patógenos conocidos hasta esa época: bacterias u hongos. Adolfo Meyer en 1886 fue el primero en demostrar que una enfermedad que daba apariencia de mosaico al tabaco se podía transmitir a plantas sanas inyectándolas con savia proveniente de plantas infectadas.

El ruso D. Iwanowski en 1892 demostró que los extractos de plantas infectadas permanecían infecciosos aún después de pasarlos a través de filtros diseñados para evitar el paso de bacterias. En esta forma demostró que estaba trabajando con partículas infecciosas que llamó bacterias submicroscópicas. Sin embargo M.W. Beijerinck confirmó los hallazgos de Iwanowski e indicó que se había encontrado algo diferente a hongos y bacterias. Más tarde este patógeno se denominó "virus" que en latín significa veneno.

Desde esa época hasta nuestros días se han descubierto cientos de virus y nos hemos dado cuenta de lo perjudicial que pueden ser al afectar la salud hu-

mana y atacar las plantas y animales, así como los beneficios que se pueden derivar con su uso para el control de insectos que amenazan la agricultura.

Para una mayor cobertura sobre éste tema tan amplio el lector debe consultar los libros consignados en la bibliografía.

## 1.2. CLASIFICACION

De acuerdo con el Comité Internacional de Clasificación, los virus se agrupan por la similitud de algunos caracteres, sin tomar en consideración la indole del huésped que infectan. La clasificación se basa en la constitución química y la forma de la partícula madura considerando seis propiedades: composición del ácido nucleico, tamaño, sensibilidad al éter, presencia o ausencia de una envoltura, simetría y número de capsómeros.

Existen muchos virus cuya clasificación esta pendiente, porque no hay absoluta seguridad respecto al alguno de sus caracteres. Wildy (1971) ha propuesto una clasificación de los virus de animales la cual ha tenido buena aceptación entre los virólogos de insectos. A continuación la lista de las familias y los géneros en los cuales existen representantes de virus de insectos. Poxviridae (Entomopoxvirus), Parvoviridae (densovirus), Reoviridae (virus Citoplasmático de insectos), Rhabdoviridae (Rhadovirus), Picornaviridae (Picornavirus), Baculoviridae (Baculovirus) e Iridoviridae (Iridovirus).

## 1.3. MORFOLOGIA

Las unidades que componen los virus son llamadas partículas aunque el término más apropiado es virión. Los viriones al agregarse forman grandes agregados o cristales los cuales se pueden observar fácilmente en un microscopio de luz. Estas estructuras en forma de cristal se conocen con el nombre de cuerpos de inclusión.

Los viriones individuales se pueden observar sólo con el microscopio electrónico son tan pequeñas que aún al electromicroscopio tienen que aumentarse

varios miles de veces para poder obtenerse una imagen clara. No se pueden medir convenientemente en términos de centímetros o milímetros. Por consiguiente se usa una unidad especial el nanómetro (nm). Un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro. O sea que:

$$1 \text{ (micra)} = 1000 \text{ nm}$$

$$1 \text{ mm (milímetro)} = 1'000.000 \text{ nm}$$

En algunos casos se usa en la literatura la milímicra ( $m\mu$ ) que es igual al nm.

El tamaño de los virus varía mucho, desde 15 a 30 nm los más pequeños hasta 250 a 300 nm los más grandes. Los viriones de un determinado virus son bastante uniformes en cuanto a su tamaño y forma. Para medir los viriones y observar detalles de su estructura con el microscopio electrónico se usa la técnica de evaporación de un metal por ejemplo, platino o tungsteno, de modo que se forma una capa sobre la preparación viral y tiene por objeto aumentar el contraste. Esta tinción negativa se hace a un ángulo determinado para que se proyecte la sombra, y a partir de la longitud de ésta, es posible calcular la altura del virión y determinar su tamaño con base en el aumento del microscopio y el ángulo del sombreado. El método que utiliza ácido fosfotúngstico mezclado con el virus es más exacto. Este ácido es más denso que el virus a los rayos de electrones, y entonces es posible la observación en contraste negativo.

Se encuentran varios tipos y formas de viriones: esféricos, en forma de platillo, varillas rectas, varillas encorvadas y en forma de renacuajo. Aunque se ha encontrado que algunos virus tienen diferentes tipos de viriones, en general los viriones de un mismo virus son de un sólo tipo.

Los virus tienen básicamente simetría cúbica, helicoidal o una combinación de ambas, aunque hay algunos casos en que carecen de simetría y a estos se les considera complejos. Los virus de simetría cúbica son icosaedros. La imagen resultante de su sombreado sólo se puede reproducir por ésta figura geométrica.

Algunos virus como los herpesvirus (Figura 1) tienen una membrana que rodea el cápsido. No se sabe mucho acerca de la composición de ésta membrana

pero es posible que el virión la adquiriera al atravesar la membrana citoplasmática o la membrana nuclear de la célula durante el proceso de maduración.

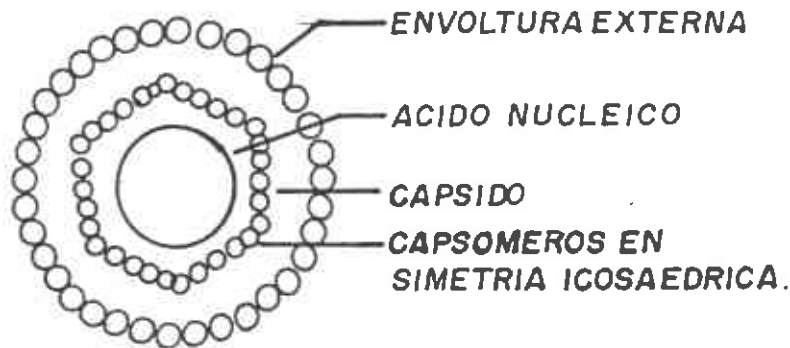


FIGURA 1. Morfología del virus del herpes

#### 1.4. NATURALEZA QUIMICA DE LOS VIRUS

Los virus son nucleoproteínas o sea están compuestos de ácido nucleico y proteína, siendo el ácido nucleico la parte principal del virus el cual lleva la información genética y es esencial para la infección. La proteína actúa como una capa protectora del ácido nucleico.

El ácido nucleico llamado así porque se descubrió primero en el núcleo de las células está compuesto de sólo cuatro nucleótidos diferentes. Los nucleótidos se combinan para formar largas cadenas de ácidos nucleicos. Aunque solo se encuentran cuatro tipos de nucleótidos en un ácido nucleico, las combinaciones de los cuatro tipos pueden ser innumerables debido a que cada nucleótido puede ocurrir más de mil veces en una cadena. Cada nucleótido (Figura 2) consiste de una molécula de un compuesto nitrogenado (base), una molécula de azúcar y una molécula de fosfato combinadas todos éstos según un patrón definido.

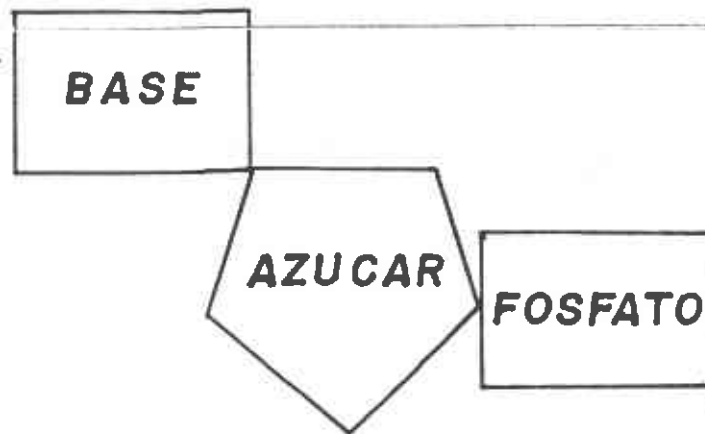


FIGURA 2. Estructura simplificada de un nucleótido

Existen cuatro tipos diferentes de bases en un ácido nucléico, cada uno formando un tipo diferente de nucleótido. Los azúcares pueden ser de dos clases diferentes: ribosa y desoxirribosa, pero sólo un tipo de azúcar se encuentra en un ácido nucléico en particular. Si el ácido nucléico tiene ribosa se llama ácido ribonucleico (ARN) y si tiene desoxirribosa se llama ácido desoxirribonucleico (ADN). Tres bases son comunes en los dos tipos de ácidos: adenina, citosina y gúanina. La cuarta base difiere encontrándose timina en ADN y uracil en ARN. Químicamente adenina y gúanina son purinas: citosina, timina y uracil son pirimidinas. Cuando un fosfato de un nucleótido se combina con la molécula del azúcar de otro, se forman largas cadenas de nucleótidos (Figura 3).

La mayoría de los virus de las plantas contienen ARN, solo un virus de las plantas que causan una enfermedad en coliflor tiene ADN. Los virus que afectan algas contienen ADN. Los virus de animales contienen ADN y ARN. La proteína que cubre el ácido nucléico no está simplemente colocada sobre él, sino que está hecha por paquetes simétricos de unidades de proteína. Estas unidades se pueden comparar con ladrillos usados en la construcción de paredes.

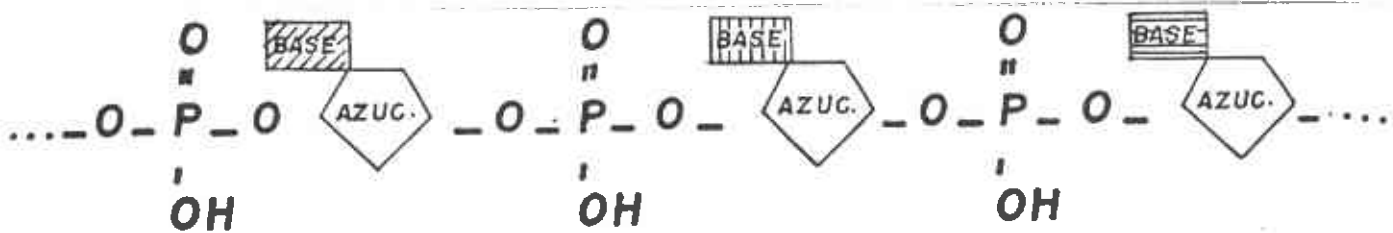


FIGURA 3. Porción de un ácido nucléico

Las proteínas están compuestas de aminoácidos que contienen pequeños números de carbono, hidrógeno, oxígeno y algunas veces átomos de azufre. Cada aminoácido tienen como mínimo dos lugares para unirse el uno al otro. Así que la estructura más simple que pueden formar son cadenas. Algunos aminoácidos sin embargo tienen más de dos lugares en donde pueden establecerse uniones. Esto hace a las proteínas estructuras tridimensionales más complejas en vez de una simple cadena. Las proteínas por consiguiente pueden ser muy complejas máxime si se tiene en cuenta que actualmente se conocen más de 20 aminoácidos que pueden formar combinaciones infinitas.

En los virus los aminoácidos se compactan formando unidades. Varios cientos de éstas unidades se combinan y forman la capa que protege el ácido nucléico del virus.

La cantidad de ácidos nucléicos difiere en los diferentes virus desde un 5% hasta un 35%. Aunque la proteína es la más abundante en un virus, es el ácido nucléico el responsable de la iniciación de la infección

## 1.5. SEROLOGIA

La identificación de los virus se basa en sus propiedades como son el síntoma que ocasionan en la planta o animal que afectan; la temperatura, el tiempo de almacenamiento y la dilución a la cual pierden su infectividad; las dimensiones, la estructura y composición química de sus viriones. Todas estas propiedades ayudan a la identificación y a conocer más los virus, pero la serología es el método más rápido usado en la identificación de los virus especialmente los de las plantas.

Los virus son inmunogénicos debido a su cubierta proteínica. Se llaman inmunogénicos porque los animales cuando se inyectan con un virus, producen anticuerpos específicos contra ellos. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con los virus in vitro dando precipitados reconocibles. Esta propiedad serológica tiene una gran ventaja en la identificación de un virus.

Los anticuerpos contra un virus se obtienen inyectando una suspensión concentrada del virus a algún animal. Por conveniencia se usa conejos. Se les aplica varias inyecciones algunas intravenosas y algunas intramusculares a intervalos regulares. Para el animal, el virus es una sustancia extraña, un antígeno. Tan pronto como el antígeno entra en el cuerpo se inician ciertas reacciones.

Los glóbulos blancos atacan el antígeno y lo llevan a los nódulos linfáticos y al bazo, los cuales son estimulados a producir gamma-globulinas para neutralizar los antígenos. Estas gamma-globulinas se conocen como anticuerpos los cuales se liberan en el torrente sanguíneo. La producción de anticuerpos se inicia inmediatamente después de la inyección del antígeno, pero toma varios días para alcanzar cantidades detectables.

Luego el animal se desangra, se permite que coagule la sangre para extraer el suero. Los anticuerpos solubles permanecen en el suero y éste suero se denomina antisero. El suero que se toma de un animal que no ha recibido ningún antígeno se lo denomina sero normal.

Varios tipos de pruebas serológicas se pueden llevar a cabo para detectar los anticuerpos en el antiserio de una preparación. En los virus de las plantas usualmente dos tipos de pruebas se usan: tubos con precipitina y pruebas de difusión en gelatina. Para la prueba de precipitina la solución del virus se mezcla con antiserio a diferentes diluciones preparadas en solución salina (0,85% NaCl) y la mezcla se incuba a 37°C. Los anticuerpos reaccionan con los virus formando precipitados visibles. Con sero normal no se produce precipitado.

Para la prueba de difusión en gelatina, una capa de agar-gel se vierte en un plato. Se cortan orificios circulares, uno en el centro y varios alrededor. El antiserio se vierte en el hueco central y los antigenos en los otros. El antígeno y los anticuerpos se dispersan en el gel y reaccionan formando precipitados que aparecen como líneas blancas definidas entre los orificios central y los que lo rodean. Este método es más útil para virus pequeños que se pueden dispersar en gels.

En pruebas serológicas se toma ventaja de la reacción específica entre un antígeno y sus anticuerpos homólogos. El antígeno y sus anticuerpos correspondientes concuerdan perfectamente como una llave y la cerradura. Cada antígeno tiene una estructura físico-química que lo distinga uno del otro. Similarmente anticuerpos correspondientes también difieren y reaccionan específicamente. Así anticuerpos producidos contra TMV reaccionan solo con TMV y no con otro virus.

#### 1.6. MICROSCOPIA ELECTRONICA

El microscopio electrónico funciona bajo el mismo principio de un microscopio ordinario excepto que usa rayos de electrones en vez de luz para la resolución de un objeto. Los electrones también se mueven en ondas como la luz, pero la longitud de onda de los electrones es mucho más corta. Por consiguiente los electrones no pierden objetos tan pequeños como los virus, lo que si ocurre con las ondas más grandes de la luz. Así como la luz se enfoca con lentes de

vidrio, los electrones se enfocan mediante lentes electromagnéticas. La imagen enfocada se ve claramente en una pantalla fluorescente y se puede fotografiar con una película de fotografía común y corriente.

Para examinar un virus en solución usando el microscopio electrónico, la muestra se monta en una rejilla cubierta con una película fina de plástico, por ejemplo Formvar. Estas rejillas son discos de cobre de 3 mm de diámetro que contienen pequeños orificios entre 60-160 huecos/cm<sup>2</sup>. Los viriones se pueden montar en rejillas mediante aspersión de una preparación del virus ó colocando directamente una gota sobre la rejilla y succionando el exceso del líquido. Las partículas del virus se adhieren a la película de Formvar, pero debido a que son muy transparentes a los electrones el contraste se debe mejorar mediante "proyección de la sombra" o usando tinción con un metal pesado que los haga opacos.

La proyección de la sombra se hace después de que las gotas sobre las rejillas se han secado. Esto se logra evaporando platino, paladio u oro en un vacío en el cual las rejillas se colocan en un ángulo apropiado a la fuente de evaporación. En la pantalla del microscopio electrónico el lado de las partículas cubiertas con metal luce oscura y la sombra luce clara. Esto se debe a que los electrones pasan directamente a través de las áreas sin el metal las cuales quedan más claras que las áreas cubiertas con el metal. Debido a que estamos acostumbrados a ver las sombras oscuras, las micrografías se hacen en negativos para que al imprimirlas el metal quede blanco en vez de oscuro. Observando las sombras producidas por virus especialmente esféricos y comparándolas con las sombras producidas por modelos, es posible deducir la simetría externa de los virus. Sin embargo ésta técnica actualmente no es muy utilizada y ha sido reemplazada por el uso de tinciones que revelan mucho más la morfología detallada de las partículas de virus.

Las tinciones pueden ser positivas o negativas. Las tinciones positivas reaccionan químicamente y se ligan a los virus (p.e. varios compuestos de osmio, plomo y uranilo). Las combinaciones químicas conducen a la alteración o desintegración de la estructura del virus. En tinciones negativas, por otra

parte, el material no reacciona con los virus pero penetra los espacios disponibles sobre la superficie o dentro del virión. Actualmente ésta es la técnica preferida para examinar la estructura de los virus con el microscopio electrónico. Las tinciones negativas más comunes son AFT (ácido fosfotungstico) a un pH 7,06 ó acetato de uranilo usado a pH 5,0. En la pantalla del microscopio electrónico las partículas de virus se ven claras y rodeadas por un fondo oscuro. El contorno de las partículas se puede ver bien y por lo general también su contenido, con lo cual se puede sacar conclusiones sobre la presencia o ausencia de ácido nucléico en el interior de las partículas.

Con la tinción negativa los aumentos pueden ser más grandes que con el método de proyección de sombra y en ésta forma se puede ver en detalle el contenido de los viriones y las subunidades de la capa de proteína del virus. Sin embargo, con la proyección de sombra se pueden hacer preparaciones "secas" sobre las rejillas cubiertas con la película de Formvar y en ésta forma se pueden enviar a laboratorios equipados con un electromicroscopio.

Los procedimientos anteriores sólo sirven para examinar soluciones que contengan virus en suspensión. Para examinar células infectadas es necesario realizar cortes muy finos del tejido afectado que no tengan más de 50-60 nm de ancho, de tal manera que los electrones puedan pasar a través. Los tejidos infectados se deben inicialmente fijar, luego embeber en una resina dura, para después seccionarlos con cuchillas de vidrio o diamante accionadas por ultramicrotones. Las secciones se colocan en rejillas y se tiñen con metales pesados. Al observar al electromicroscopio los viriones se pueden encontrar tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula.

## 1.7. PURIFICACION

El propósito de la purificación de los virus es separar el material no viroso del virus. El grado de pureza requerido depende de lo que se pretende hacer con el virus después. Las preparaciones altamente purificadas se necesitan en pruebas serológicas. A medida que la purificación aumenta hay mayor pérdida de virus. Usualmente la purificación incluye el macerado del material

infectado y la remoción de los fragmentos grandes celulares por centrifugación a baja velocidad. Luego el virus se sedimenta centrifugándolo a alta velocidad, ~~el sobrenadante se remueve y el "pellet" que se forma en la base y contiene el virus se disuelve en una solución tampón (Buffer).~~ Centrifugando de nuevo a baja velocidad se sedimenta el material no viroso.

La separación de los virus por diferencia de tamaño se puede lograr por centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente y por ultracentrifugación.

La centrifugación diferencial como se explico arriba, permite separar el virus de otras partículas que difieren bastante en cuanto a velocidad de sedimentación y consiste en ciclos alternos de centrifugación a alta y baja velocidad. Además de sedimentar el virus mediante centrifugación a alta velocidad es posible precipitar el virus adicionándole sustancias químicas a la solución que contiene el virus y sedimentarlo así después mediante centrifugación a baja velocidad.

La centrifugación por gradientes se incluye como un paso en los procedimientos de purificación para separar partículas que no difieren mucho en velocidad de sedimentación. Consiste en sedimentar el material mediante una solución estabilizadora que contenga un gradiente de un soluto, de tal manera que la parte más densa de la solución quede en el fondo del tubo. Generalmente se emplea un gradiente de sacarosa de 5 a 20% que se forma en el mismo tubo de la centrifuga, mezclando en forma apropiada una solución de sucrosa al 20% con otra al 5%. La solución que se quiere sedimentar, menos densa que la sacarosa al 5%, se coloca flotando en la parte superior del gradiente y luego el tubo se centrifuga en una ultracentrifuga. Una vez transcurrido el tiempo apropiado, las distintas fracciones del gradiente se colectan después de perforar el fondo del tubo y hacer gotear la solución.

La separación de partículas de diferente densidad se logra por centrifugación a equilibrio en un gradiente de densidad o centrifugación a equilibrio isopícnico, que consiste en centrifugar la muestra en una solución concentrada de una sal de alto peso molecular, como cloruro de cesio (CsCl). Cuando la mez-

cla se centrifuga a alta velocidad por un tiempo prolongado (24 a 48 horas) la sal tiende a concentrarse en el fondo formando una banda en la región donde su densidad es igual a la de la solución ~~salina en ese punto del gradiente.~~ Una vez alcanzado el equilibrio, las distintas fracciones se colectan en la forma descrita para la centrifugación en gradiente de sacarosa.

El papel del gradiente de densidad en estas técnicas es para prevenir los movimientos por difusión y mantener diferentes especies moleculares en zonas localizadas.

Para este método se necesita de una ultracentrifuga como el modelo Spinco L 50 y adecuados rotores con cubos oscilantes.

Después de centrifugar las bandas de virus se pueden visualizar debido a la dispersión que causa a la luz. El contenido del tubo se remueve apropiadamente antes del ensayo. La base del tubo se puede punzar y el contenido permitirle que goteen en una serie de tubos de ensayo. Comercialmente se puede obtener un fraccionador (ISCO density gradient fractionator) basado en desplazamientos hacia arriba del contenido del tubo con una solución densa de sucrosa. La absorción UV(254 m $\mu$ ) de la columna del líquido se mide y registra y las fracciones de diferentes tamaños se colectan como se desee. Después de colectar las diferentes fracciones de un gradiente, se pueden usar varios procedimientos para identificar el virus, los componentes no virosos y las partes celulares. Estos incluyen pruebas de infectividad, espectro de absorción y examinación al electromicroscopio.

Ultracentrifugación es la centrifugación llevada a cabo a altas velocidades. Hay dos tipos que se conocen: preparativa que es cuando el contenido de los tubos se analizan después de que la centrifuga para y analítica cuando el tubo se observa ópticamente durante la centrifugación. La preparativa es la más empleada y se usa para aislar y concentrar virus. Los tubos llenos con la solución que contiene el virus se colocan en el rotor el cual se acelera gradualmente hasta alcanzar la velocidad deseada. La velocidad se indica en revoluciones por minuto (rpm). Esta rotación produce un campo centrifugo,

cuya fuerza se indica en función del número de veces de la gravedad (g). Generalmente se usan dos tipos de rotores en la centrifuga los de ángulo fijo y los oscilantes.

En los rotores de ángulo fijo las cavidades están colocadas a un ángulo fijo del eje de rotación, en éste rotor las partículas se sedimentan proporcionalmente más rápido que en las de rotor oscilante. El rotor oscilante permite que el cubo se incline hacia afuera durante la centrifugación, al desacelerar gradualmente los cubos vuelven a una posición vertical. Este tipo se usa cuando se desea mantener al mínimo la mezcla como en el caso de la centrifugación con gradientes de densidad.

Varios factores inciden en la velocidad de sedimentación, se ha comprobado que ésta aumenta con:

- a) El aumento de las revoluciones por minuto. En publicaciones que dan datos sobre purificación de virus se menciona la fuerza centrífuga como el número de veces de la fuerza de gravedad (g). La fuerza centrífuga se calcula por la distancia del tubo al eje de rotación y la velocidad de rotación. Cuando se menciona rpm se debe indicar el rotor para determinar la distancia del eje de rotación al líquido.
- b) El aumento de la distancia de los tubos a los ejes de rotación
- c) Aumento en el tamaño de la partícula
- d) Aumento de densidad de las partículas vírosas
- e) Aumento de temperatura de las suspensiones en el tubo
- f) Aumento de la viscosidad
- g) Aumento de densidad del solvente de las partículas

La espectrofotometría se utiliza también para determinar la pureza de un virus. Una preparación pura de un virus que contenga 1 mg/ml ó más de virus es opalescente, debido a la dispersión de la luz por las partículas grandes del virus. La radiación ultravioleta (UV) es absorbida en una forma característica por las soluciones de virus, ésta absorción se mide con un espectrofotómetro. Este es un método rápido y conveniente para obtener información sobre la pureza, concentración y contenido de ácido nucléico de un virus.

### 1.8. CONCENTRACION DE SOLUCIONES EN UNIDADES QUIMICAS

Con frecuencia en los estudios sobre purificación de virus las concentraciones de los productos se dan en unidades químicas las cuales es preciso tener presente para poder seguir las metodologías propuestas.

1.8.1. Concentración molar: Es el número de moles (M) en gramos de soluto por litro de solución. Ejemplos:

a) Cuál es el número de moles en gramos de 500 ml de una solución de  $H_2SO_4$  2M ?

$$\frac{2 \text{ gr-mol de sol. } H_2SO_4}{1000 \text{ ml de sol. } H_2SO_4} \times 500 \text{ ml de Sol. } H_2SO_4 = 1 \text{ gr-mol}$$

b) Cuál es la concentración molar en g/l de: 1) 0,2 M-solución de  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$   
 Peso molecular de  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O = 178$   
 $0,2 \times 178 = 35,5 \text{ g/1000ml}$   
 2) 0,05 M de  $Na_2CO_3$  - contienen:  $0,05 \times 106 = 5,3 \text{ g/l}$

1.8.2. Concentración normal: (N) es la solución que contiene un equivalente en gramos de soluto por litro de solución. Así una solución 2N contendrá 2 gramos-equivalentes por litro de solución.

Ejemplo: Determinar el número de gramos-equivalentes en 500 ml de una solución de 2N de  $Na_2SO_4$ .

$$0,5 \text{ l} \times \frac{2 \text{ gr-equiv.}}{1} = 1 \text{ gr-equiv.}$$

### 1.9. BIBLIOGRAFIA

- ~~Beemster, A.B.R. 1977. Plant viruses. International agricultural centre, Wageningen. 21p.~~
- Matthews, R.E.F. 1970. Plant virology. Academic Press, New York. 778p.
- Noordam, D. 1973. Identification of plant viruses. Methods and experiments. Centre for Agricultural publishing and documentation, Wageningen. 207p.
- Pizarro S., E. 1971. Los virus. Programa Regional de desarrollo científico y tecnológico, OEA. Serie biológica, monografía No. 8 Washington, D.C. 70p.
- Varma, A. 1973. Plant viruses. National council of educational research and training. The ganges company limited, Calcutta. 57p.
- Wildy, P. 1971. Classification and nomenclature of viruses. Monographs in virology, Vol. 5. Karger, Basel. 81p.