

GLI ANTICORPI MONOCLONALI IN VIROLOGIA VEGETALE

M. BARBA (coordinatore), G. GRASSI, N. LOI e E. LUISONI

Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale del M.A.F, Roma, Istituto Sperimentale per le Colture Industriali del M.A.F., Bologna; Istituto di Difesa delle Piante dell'Università di Udine, Istituto di Fitovirologia applicata del C.N.R., Torino.

RIASSUNTO

Gli anticorpi monoclonali costituiscono una applicazione delle biotecnologie che ha favorito lo sviluppo delle correlazioni e dello studio della struttura dei virus e aperto la possibilità di diagnosi per patogeni fino ad ora di difficile individuazione. Essi presentano vantaggi rispetto ai sieri policlonali tradizionali quali elevata specificità e ripetitività della reazione nonché illimitata produzione.

La complessità e gli alti costi di preparazione non hanno incentivato fino ad ora la produzione degli anticorpi monoclonali in Italia. Pochi sono attualmente gli Istituti che si sono attrezzati allo scopo.

SUMMARY

MONOCLONAL ANTIBODIES IN PLANT VIROLOGY

Monoclonal antibodies production is a new biotechnology that has improved the development of correlations and the structural studies of viruses, and opened new possibilities for the diagnosis of those pathogens of difficult detection. When compared with policlonal antisera, they have some advantages as high specificity, uniformity of reaction and unlimited production.

The complexity and the high cost of monoclonal antibodies preparation do not have stimulated until now their production in Italy. Infact, few Institutions are, at present, equipped for this purpose.

E' indubbio che la virologia vegetale ha subito recentemente una svolta di qualità per la disponibilità di nuovi metodi di indagine. Gli anticorpi monoclonali (indicati MAbs dall'inglese monoclonal antibodies) costituiscono una delle applicazioni delle biotecnologie che ha favorito lo sviluppo delle correlazioni e lo studio della struttura dei virus e aperto la possibilità di diagnosi per patogeni fino ad ora di difficile individuazione.

La capacità antigenica del virus risiede nel suo rivestimento proteico. L'avvolgimento nello spazio della proteina virale determina la

formazione di siti altamente immunogeni (determinanti antigenici o epitopi). Quando una sospensione virale viene iniettata in un animale di laboratorio per produrre un antisiero, si ottiene una miscela di anticorpi specifici per i vari determinanti antigenici: il così detto siero policlonale. A differenza di questo, l'anticorpo monoclonale è specifico di un solo determinante antigenico.

Dal 1981 ad oggi sono stati prodotti una sessantina di anticorpi monoclonali verso i principali virus e micoplasmi delle piante.

In questa relazione si fa cenno alla tecnica di produzione, alla loro applicazione e allo stato della ricerca in questo campo specifico in Italia.

PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

La tecnica di produzione degli anticorpi monoclonali è stata descritta per la prima volta nel 1975 da Kohler e Milstein. Gli anticorpi monoclonali derivano da una fusione somatica tra cellule di mieloma murine (cellule maligne) e linfociti di topi immunizzati contro un dato antigene.

Le cellule fuse, o ibridomi, assicurano le due proprietà: capacità dei linfociti, o plasmacellule, di secernere anticorpi diretti verso un unico determinante antigenico e capacità delle cellule tumorali di crescere indefinitamente in coltura.

Generalmente vengono immunizzati topi del ceppo BALB/C di 2-4 mesi di età seguendo un protocollo che può variare sia in funzione della quantità di antigene utilizzato che per il numero di iniezioni somministrate durante il periodo di immunizzazione (Al Moudallal et al., 1982; Cianfriglia et al., 1986).

Le cellule di milza, provenienti dal topo immunizzato, vengono fuse con cellule tumorali precedentemente selezionate, in presenza di un induttore chimico (il polietilenglicole) che, provocando la formazione di ponti citoplasmatici tra le membrane cellulari, le "incolla" tra di loro. Cambiando osmolarità le cellule si rigonfiano, le membrane si rompono dando origine, così, a cellule con due (o più) nuclei che, in poche ore si fondono avviando processi di mitosi sincrone.

Dopo 10-20 giorni dalla fusione, i soprannatanti delle colture vengono saggiati, con ELISA indiretta, per la presenza di anticorpi specifici verso l'antigene usato per l'immunizzazione. In caso positivo, vengono clonati più volte per diluizione al limite su piastre di coltura in modo da avere un solo clone secernente MAb per pozzetto.

Per ottenere una elevata quantità di supernatante contenente MAb, i cloni positivi vengono trasferiti in fiasche di coltura: in questo modo si arriva ad una concentrazione di circa 50-100 ug/ml di MAb (Galfrè et al., 1981). Se ne può ottenere una concentrazione maggiore iniettando intraperitonealmente gli ibridomi in topi precedentemente trattati con immunosoppressori ed inducendo la formazione di un tumore ascitico. In questo caso, la concentrazione dell'anticorpo nel fluido ascitico raccolto dal peritoneo può arrivare a circa 10 mg/ml.

APPLICAZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI ALLA VIROLOGIA VEGETALE.

Confrontando i sieri policlonali con gli anticorpi monoclonali si riscontrano vantaggi e svantaggi a carico degli uni o degli altri, o semplicemente differenze di comportamento che rendono preferibili ora gli uni ed ora gli altri, a seconda del metodo di lavoro e degli scopi che ci si prefigge.

1) Specie animali interessate. Gli antisieri policlonali contro i virus dei vegetali sono generalmente antisieri di coniglio, molto più raramente di capra, cavia, topo, ratto o altre specie. Un certo successo hanno avuto recentemente, gli anticorpi ottenuti dalle uova di gallina, perché molto diversi filogeneticamente (e dunque senza possibilità di correlazioni sierologiche) dai primi: sono quindi molto adatti a certe prove sierologiche "a due anticorpi" (Al Moudallal et al., 1984).

Gli anticorpi monoclonali sono in grandissima maggioranza di topo, talora di ratto. Ciò non comporta differenze molto sensibili, anche se normalmente il topo e il ratto sono produttori di anticorpi meno efficienti del coniglio. Per altri versi invece i MAb sono abbastanza diversi dagli anticorpi dei sieri policlonali (vedi in seguito).

2) Differenza di specificità. È l'argomento forse più importante e più soggetto ad equivoci. Un antisiero policlonale è costituito da un'ampia ed eterogenea miscela di anticorpi monoclonali. È chiaro, quindi, che esso reagirà con tutti o quasi tutti i numerosi determinanti antigenici dell'immunogeno, mentre un MAb reagirà con un solo o con pochissimi, molto simili, determinanti antigenici.

Ciò non significa, però, che mescolando insieme diversi MAb si costituisca una miscela con le caratteristiche di un siero policlonale. Possono infatti emergere caratteristiche negative, soprattutto se gli antigeni hanno pochi determinanti antigenici; inoltre i MAb sono generalmente meno avidi di quelli policlonali (Kurstak et al., 1984; Steensgard, 1984).

Tenendo presente genesi e struttura dei MAb, ci si spiega anche il fenomeno della eterospecificità: alcuni MAb reagiscono più intensamente (o addirittura esclusivamente: Halk, 1986) con antigeni diversi da quello omologo perché il determinante antigenico in questi ultimi è più accessibile ai siti anticorpali dell'anticorpo. Questo suggerisce la necessità di saggiare i MAb nel momento dello screening con differenti ceppi dello stesso virus per evitare di scartare cloni che possono essere utili nell'applicazione successiva dei MAb prodotti.

Il fenomeno non avviene mai nei sieri policlonali perché non interessa mai la maggioranza degli anticorpi e dunque viene sempre mascherato da quegli anticorpi che non sono eterospecifici.

Poiché un MAb è diretto contro un unico determinante antigenico (e da questo punto di vista è sempre altamente specifico), nei confronti di altri MAb sarà più o meno specifico a seconda che questo determinante antigenico sia più o meno comune ad altri isolati o ceppi o addirittura virus diversi. Si è giunti al caso limite di trovare, per mezzo di MAb,

una relazione sierologica fra la proteina del capsidio del ceppo comune (U1) del virus del mosaico del tabacco (TMV) e la subunità grande dell'enzima ribulosio-1,5 bifosfato carbossilasi (RuBisCo) (Dietzgen e Zaitlin,1986).

Può quindi essere utile studiare le relazioni sierologiche con MAb's perché si possono mettere in evidenza differenze impercettibili con sieri policlonali (Huss et al., 1987; Massalski e Harrison,1987).

D'altro canto, nel campo diagnostico si possono utilizzare MAb's molto specifici per determinare la presenza di ceppi particolari, oppure poco specifici per accertare la presenza di qualsiasi ceppo o addirittura di ogni virus di un determinato gruppo (Dore et al., 1987; Dougherty et al., 1985; Huss et al.,1987)

- 3) Reazione con i dsRNA. Si sono ottenuti buoni risultati con MAb's anti dsRNA (Delage et al., 1984) che hanno permesso di rilevare la presenza di mycovirus e aperto possibilità per il rilevamento del viroide del tubero fusiforme della patata (PSTV) e di Reovirus (Benhamou et al.,1987).
- 4) Omogeneità di prodotto. Una volta ben caratterizzato, un MAb è di disponibilità illimitata e costante, e dunque potrà essere usato sempre e dovunque assicurando una costanza di risultati.
- 5) Costi di produzione. Si deve osservare che il costo di produzione è molto più alto per un MAb che non per un antisiero policlonale. La scelta dunque va fatta tenendo conto anche della quantità di materiale necessario. Si consideri che con un quantitativo di antigene di circa 1 milligrammo si può ottenere e saggiare a fondo qualche MAb, oppure ottenere oltre 100 ml di antisiero policlonale, sufficiente per almeno un milione di prove ELISA.

Un modo per abbassare i costi sarebbe forse quello di inoculare un topo con una miscela di immunogeni e poi selezionare i cloni di interesse ottenuti con un solo procedimento di fusione (Halk,1986).

- 6) Caratteristiche operative nelle prove sierologiche. Gli anticorpi dei sieri policlonali possono essere impiegati in qualsiasi prova sierologica. Gli MAb's debbono essere testati con cura prima di ogni impiego: tutti sono usabili nelle prove ELISA, anche perché con questo metodo subiscono il primo esame e quindi gli MAb's che non fossero adatti ad esso verrebbero eliminati automaticamente.

Alcuni MAb's sono anche stati usati in immunomicroscopia elettronica, sia in ISEM che in decoration (semplice o con impiego di oro colloidale) ma non in clumping (Himmler et al.,1988a e b; Pead e Torrance,1988, Torrance et al.,1988; Aebig et al.,1987; Su,1987).

Altri sono stati usati in Western e in dot blotting (Torrance et al.,1988; Dietzgen e Zaitlin,1986; Sherwood et al.,1987); alcuni anche in prove di precipitazione (contrariamente a quanto spesso si ritiene) e cioè in immunodiffusione con o senza polietilenglicole e in precipitating ring interface test, in prove di fissazione del complemento e in prove di agglutinazione al latex (Halk, 1986; Joklik 1982; Molinaro et al.,1987; Nozu et al.,1986; Omura et al.,1986; Steensgaard,1984).

- 7) Uso in studi strutturali. Nonostante non manchino esempi di studi di

struttura effettuati con sieri policlonali opportunamente ottenuti o assorbiti (Luisoni et al., 1975), certamente i MAb hanno offerto un mezzo validissimo per ottenere una ben più alta precisione e semplicità d'uso: se ci è consentito un paragone un pò estemporaneo, sarebbe come colpire un bersaglio con una carabina di precisione piuttosto che con una doppietta caricata a pallini.

I determinanti antigenici o epitopi presenti sulla superficie del virione sono costituiti da 5-7 residui amminoacidici situati linearmente sulla catena peptidica (determinanti continui) o da residui amminoacidici distanti, ma messi in correlazione tra loro dai ripiegamenti della molecola proteica (determinanti discontinui). L'uso di MAb nello studio del virus, quali il TMV, di cui si conosce la struttura antigenica (Van Regenmortel, 1982; Altschuh et al., 1983) ha confermato l'importanza dei ripiegamenti della proteina nella struttura terziaria e quaternaria per la formazione degli epitopi (Van Regenmortel, 1984). Infatti, utilizzando mutanti del virus con sostituzioni amminoacidiche singole o doppie è stata definita la differenza tra sierotipi del virus ed è stato dimostrato che sostituzioni amminoacidiche anche in posizioni interne alla superficie del virione possono diminuire l'affinità di legame degli anticorpi (Al Moudallal et al., 1982).

Che il ripiegamento della molecola proteica giochi un ruolo fondamentale nella costituzione degli epitopi è confermato dal fatto che MAb diretti verso subunità dissociate del virione possono essere incapaci di reagire con la molecola intatta e viceversa (Halk et al., 1984; Al Moudallal et al., 1982). Ciò può essere dovuto, oltrechè alla conformazione fisica dell'antigene, anche alle condizioni in cui il saggio viene effettuato (Halk et al., 1984).

- 8) Uso in processi di purificazione. Mentre talvolta i vantaggi dei MAb sono stati esaltati fuor di misura (alcuni brillanti risultati sono stati ottenuti in sierologia coi MAb solo perchè si sono scelti questi ultimi come strumento, ma si sarebbero potuti ottenere anche con i policlonali) forse nel campo della purificazione con cromatografia di affinità i MAb non sono stati valutati appieno. Si sa infatti che la loro avidità può essere molto variabile dall'uno all'altro (pur essendo in genere più ridotta rispetto a un siero policlonale) ma ovviamente è sempre costante nell'ambito di un unico MAb. E' pertanto possibile valutare accuratamente il migliore fra i diversi MAb di cui si dispone e le più adatte condizioni operative per ottenere un agevole e, soprattutto, totale distacco degli antigeni dalla colonna, il che è più difficile nel caso dei sieri policlonali proprio a causa della loro eterogeneità. Questa difficoltà è certamente una delle prime cause dello scarso sviluppo che finora questa semplice e brillante tecnica di purificazione ha avuto (Gera et al., 1989; Ronald et al., 1986; Diaco et al., 1986).

APPLICAZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI ALLA DIAGNOSI DEI MICOPLASMI.

Un'ulteriore importante applicazione degli anticorpi

monoclonali consiste nella diagnosi di malattie del gruppo dei giallumi causate da organismi tipo micoplasmi (MLOs). L'attuale impossibilità di coltivare questi microrganismi e l'inadeguatezza dei metodi di purificazione rendono difficile ottenere una quantità sufficiente di MLO purificato da usare come antigene per preparare specifici antisieri policlonali con buon titolo e che non diano reazioni aspecifiche col sano.

Attualmente la produzione di MAbS è il solo mezzo di cui si dispone per selezionare specifici anticorpi per gli MLOs. Con una parziale purificazione del micoplasma, infatti, si possono selezionare MAbS che non reagiscono con antigeni contaminanti della pianta. Inoltre l'elevata affinità di legame e l'alta specificità per il corrispondente determinante antigenico richiedono piccole quantità di proteine per la immunizzazione. In alcuni casi, con una immunizzazione in vitro di meno di 1 ng di antigene parzialmente purificato, sono stati ottenuti anticorpi monoclonali (Luben et al.,1982) che, impiegati in ELISA o immunofluorescenza o Western blotting di elettroforesi proteica, hanno consentito una diagnosi specifica.

Fino ad ora sono stati ottenuti MAbS per il micoplasma dell'"aster yellow" (AY), ceppo "New Jersey" (Lin e Chen, 1985c), per il micoplasma agente del "maize bushy stunt" (Chen e Jang,1988), per il micoplasma del "primula yellows" (Clark et al.,1989) e per l'agente della Flavescenza dorata della vite (Schwartz et al.,1989).

Gli anticorpi monoclonali possono, inoltre, essere utilizzati per la purificazione dei MLOs usando cromatografia di affinità (Jiang et al.,1988), o in studi di "gene cloning" ed espressione del gene stesso. L'identificazione della proteina prodotta dal gene clonato nel batterio, usando l'anticorpo monoclonale specifico, è, infatti, uno strumento efficace per dimostrare l'avvenuta ligazione e trasformazione. La loro specificità può così essere usata per completare studi di biologia molecolare.

L'elevata specificità di risposta non permette, tuttavia, di fare classificazioni generali dei micoplasmi. Solo la disponibilità di diversi monoclonali per ogni micoplasma potrà permettere di fare sia una più larga diagnosi sia correlazioni e raggruppamenti tassonomici.

L'ottenimento di monoclonali che riconoscano epitopi comuni a tutti i micoplasmi (se mai esistono) potrebbe essere utile nella diagnostica generale e nei problemi di quarantena.

Sono stati prodotti anche MAbS verso gli spiroplasmii; in questo caso la possibilità di coltivarli in vitro ha favorito la produzione di anticorpi utilizzati a scopi diagnostici e tassonomici (Lin e Chen, 1985a, 1985b). In passato, infatti, epitopi comuni condivisi tra le diverse specie di spiroplasmii avevano causato discordanze nei risultati di studi sierologici eseguiti con anticorpi policlonali convenzionalmente prodotti.

STATO DELLA RICERCA IN ITALIA

La complessità e gli alti costi non hanno incentivato fino ad

ora la produzione degli anticorpi monoclonali in Italia. Pochi sono attualmente gli Istituti che si sono attrezzati allo scopo.

L'Istituto Sperimentale per le Colture Industriali di Bologna ha prodotto, finora, MAbs verso il virus del mosaico del pomodoro (ToMV), il virus Y della patata (PVY), il virus agente della rizomania della bietola (BNYVV) e il virus del mosaico dell'erba medica (AMV) isolato da patata. L'impiego dei monoclonali anti ToMV è stato rivolto allo studio ed alla differenziazione mediante ELISA e DOT-ELISA di isolati virali reperiti nelle varie zone pomodoricole italiane. I monoclonali sono stati utilizzati nei test sierologici effettuati nelle fasi di selezione di materiale resistente al virus in discorso.

Gli anticorpi verso il PVY hanno consentito di distinguere alcuni determinanti antigenici di vari ceppi del virus (Grassi *et al.*, 1989). Tra i monoclonali prodotti uno è in grado di riconoscere un determinante comune a tutti i ceppi di PVY studiati e perciò è stato impiegato nel rilevamento di routine del virus.

Per quanto riguarda i monoclonali anti BNYVV, il loro impiego ha consentito di aumentare la sensibilità e la riproducibilità del test ELISA (Grassi *et al.*, 1988). Ciò ha permesso di mettere a punto dei metodi di selezione per la resistenza al virus della rizomania basati sulla determinazione del contenuto virale nelle piante di barbabietola (Grassi *et al.*, 1989).

Nel caso dell'AMV i MAbs hanno consentito di adottare il test ELISA di tipo indiretto per la diagnosi massale di piante di patata da seme nell'ambito di un vasto programma di controllo sanitario delle sementi.

E' attualmente in corso la produzione di anticorpi monoclonali specifici del virus del giallume moderato della bietola (BMYV) e dell'accartocciamento della patata (PLRV).

Anticorpi monoclonali contro il virus del mosaico del pioppo (PoMV) sono stati prodotti in collaborazione tra l'Istituto Zooprofilattico di Brescia e l'Istituto di Fitoviologia Applicata di Torino. Questi hanno mostrato una maggiore sensibilità quando impiegati nella sierodiagnosi di PoMV da foglie di pioppo se confrontati con anticorpi policlonali.

L'Istituto di Difesa delle Piante di Udine ha iniziato recentemente un lavoro in collaborazione con il Department of Plant Pathology, Rutgers University del New Brunswick rivolto all'ottenimento di anticorpi monoclonali per la diagnosi di MLOs associati alla flavescenza dorata della vite (FD-MLO) e agli scopazzi del melo (AP-MLO).

L'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale di Roma ha prodotto anticorpi monoclonali specifici che hanno reso possibile la diagnosi del virus del mosaico del melo (ApMV) a partire da diverse matrici vegetali e senza reazioni crociate con il virus della maculatura necrotica del susino (PNRV) o con componenti sane degli ospiti utilizzati (Pasquini e Barba, in stampa).

Sono stati inoltre prodotti MAbs impiegati di routine nel rilevamento del virus del mosaico del cetriolo (CMV) a partire da diverse matrici vegetali. I monoclonali ottenuti sono raggruppabili in tre classi ciascuna delle quali mostra una intensità di reazione diversa (Barba, 1989).

E', infine, in fase di conclusione la produzione di MAbs per il virus del nanismo del susino (PDV) e per il closterovirus type III della vite .

BIBLIOGRAFIA

- AEBIG J.A., JORDAN R.L., LAWSON R.H., HSU H.T. (1987). Immunochemical and biological properties of a mouse monoclonal antibody reactive to prunus necrotic ringspot ilarvirus. *Intervirology*, 28, 57-64.
- AL MOUDALLAL Z., BRIAND J.P., VAN REGENMORTEL M.H.V.(1982). Monoclonal antibodies as probes of the antigenic structure of tobacco mosaic virus. *EMBO J.*, 1, 1005-1010.
- AL MOUDALLAL Z., ALTSCHUH D., BRIAND J.P., VAN REGENMORTEL M.H.V.(1984). Comparative sensitivity of different ELISA procedure for detecting monoclonal antibodies. *J. Immunol.Methods*, 68, 35-43.
- ALTSCHUH D., HARTMAN D., REINBOLT J., VAN REGENMORTEL M.H.V. (1983). Immunochemical studies of TMV. Localization of four epitopes in the protein subunits by inhibition tests with synthetic peptides and cleavage peptides from three strains. *Molecular Immunology*, 20, 271-280.
- BARBA M. (1989). The use of monoclonal antibodies for the diagnosis of plant viruses. *Phytoparasitica*, 17:2,139.
- BENHAMOU N., PARENT J.G., GARZON S., ASSELIN A., QUELETTE G.B., JOLY J.R. (1987). Use of monoclonal antibody against poly (I): poly (C) for detecting mycoviruses and potential applications to potato spindle tuber viroid and animal reoviruses. *Can. Jour. of Pl. Pathol.*, 9, 106-114.
- CHEN T.A. e JIANG X.F. (1988). monoclonal antibodies against the maize bushy stunt agent. *Can. J. Microbiol.*, 34,6-11.
- CIANFRIGLIA M., MARIANI M., ARMELLINI D., MASSONE A., LAFATA M., PRESENTINI R., ANTONI G.(1986). Methods for high frequency production of soluble antigenic-specific hybridomas, specificities and affinities of the monoclonal antibodies obtained. *Methods in Enzimology*, 121, 193-210.
- CLARK M.F., DAVIES D.L., BUSS S.L. e MORTON A. (1989). Serological discrimination among mycoplasma -like organisms using polyclonal and monoclonal antibodies. *Acta Horticulturæ*, 235, 107-113.
- DELAGE G., NAHON E., HUYNH T., JEUSSET J., LACOUR F. (1984). A monoclonal antibody to the double-stranded polyribonucleotide complex poly(A).poly(U). *Molecular Immunology*, 21 (10), 939-944.
- DIACO R., HILL J.H., DURAND D.P. (1986). Purification of soybean mosaic virus by affinity chromatography using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 67, 345-351.
- DIETZGEN R.G., ZAITLIN M. (1986). Tobacco mosaic virus coat protein and the large subunit of the host protein ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase share a common antigenic determinant. *Virology*, 155, 262-266.
- DORE I., DEKKER E.L., PORTA C., VAN REGENMORTEL M.H.V. (1987). Detection by ELISA of two tobamoviruses in orchids using monoclonal antibodies. *J.*

- Phytopathology, 20, 317-326.
- DOUGHERTY W.G., WILLIS L., JOHNSTON R.E. (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology*, 144, 66-72.
- GALFRE' G. and MILSTEIN C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymology*, 73, 3-46.
- GERA A., SADKA A., SPIEGEL S., SALOMON R., SMORODINSKY N.I. (1989). Use of monoclonal antibodies in the purification of an inhibitor of virus replication by affinity chromatography. *J. gen. Virol.*, 70, 1293-1296.
- GRASSI G., CERATO C., BENSO P., BORGATTI S. (1988). Monoclonal and conventional antibodies for the detection of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in sugar beet. *Phytopath. Medit.*, 27, 1-6.
- GRASSI G., FANTINI R. e BIANCARDI E. (1989). A new approach to selecting sugar beet for resistance to rizomania virus (BNYVV). *Phytopath. medit.*, 28, 131-139.
- GRASSI G., CERATO C., BENSO P. e SUPPINI S. (1989). Serological differentiation of potato virus Y strains by means of monoclonal antibodies. *abst. EAPR, Budrio*.
- HALK E.L. (1986). Serotyping plant viruses with monoclonal antibodies. *Methods in Enzymology*, 118, 766-780, Ac. Press.
- HALK E.L., HSU H.T., AEBIG J., FRANKE J. (1984). Production of monoclonal antibodies against three ilarviruses and alfalfa mosaic virus and their use as serotyping reagents. *Phytopathol.*, 74, 367-372.
- HIMMLER G., BRIX U., LAIMER M., MATTANOVICH D., KATINGER H. (1988). ELISA and gold-labelled immunosorbent electron microscopy with plum pox virus specific monoclonal antibodies. *5th Int. Congr. Pl. Pathol.*, Kyoto, Aug. 20-27.
- HIMMLER G., BRIX U., STEINKELLNER H., LAIMER M., MATTANOVICH D., KATINGER H.W.D. (1988). Early screening for anti-plum pox virus monoclonal antibodies with different epitope specificities by means of gold-labelled immunosorbent electron microscopy. *J. Virol. Methods*, 22, 351-358.
- HUSS B., MULLER S., SOMMERMEYER G., WALTER D., VAN REGENMORTEL M.H.V., (1987). Grapevine fanleaf virus monoclonal antibodies: their use to distinguish different isolates. *J. Phytopathology*, 119, 358-370.
- JIANG Y.P., LEI J.D. e CHEN T.A. (1988). Purification of aster yellow agent from diseased lettuce using affinity chromatography. *Phytopathology*, 78, 828-831.
- JOKLIK K. (1982). Monoclonal antibodies, recombinant DNA technology, and other new approaches. *Viral diseases in South-East Asia and the western Pacific ISBM* by Ac. Press Australia.
- KOHLER G. and MILSTEIN C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- KURSTAK E. e NARUSYK R.G. (1984). Control of virus diseases. recent advances in immunological and biochemical virology, 479.
- LIN C.P. e CHEN T.A. (1985a). Production of monoclonal antibodies against *Spiroplasma citri*. *Phytopathology*, 75, 848-851.
- LIN C.P. e CHEN T.A. (1985b). Monoclonal antibodies against corn stunt

- spiroplasma. *Can. J. Microbiol.*, 31, 900-904.
- LIN C.P. e CHEN T.A. (1985c). Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. *Science*, 227, 1233-1235.
- LUBEN R.A., BRAZEAU P., BOHLEN P. e GUILLEMIN R. (1982) *Science* 218, 887-889.
- LUISONI E., MILNE R.G., BOCCARDO G., (1975). The maize rough dwarf virion. II Serological Analysis. *Virology*, 68, 86-96.
- MASSALSKI P.R. e HARRISON B.D. (1987). Properties of monoclonal antibodies to potato leafroll luteovirus and their use to distinguish virus isolates differing in aphid transmissibility. *J. gen. Virol.*, 68, 1813-1821.
- MOLINARO G.A., EBY W.C., REIMER C. (1987). A monoclonal antibody may show cross-reactivities in Ouchterlony assays but not in other assays. *Journal of Immunological Methods*, 96, 219-224.
- NOZU Y., USUGI T., NISHIMORI K. (1986). Production of monoclonal antibodies to satsuma dwarf virus. *Ann. Phytopat. Soc. Japan.*, 52, 86-89.
- OMURA T., TAKAHASHI Y., SHOHARA K., MINOBE Y., TSUCHIZAKI T., NOZU Y. (1986). Production of monoclonal antibodies against rice stripe virus for the detection of virus antigen in infected plants and viruliferous insects. *Ann. Phytopat. Soc. Japan*, 52, 270-277.
- PASQUINI G. e BARBA M. Production of monoclonal antibodies to apple mosaic virus and their use in serological tests (in stampa).
- PEAD M.T. and TORRANCE L. (1988). Some characteristics of monoclonal antibodies to a British MAV-like isolate of barley yellow dwarf Virus. *Ann. appl. Biol.*, 113(3), 639-644.
- RONALD W.P., TREMAINE J.H., MacKENZIE D.J. (1986). Assessment of southern bean mosaic virus monoclonal antibodies for affinity chromatography. *Phytopathology*, 76, 491-494.
- SCHWARTZ Y., BOUDON-PADIEU E., GRANGE J., MEIGNOZ R. e CAUDWELL A. (1989). Monoclonal antibodies to the mycoplasma-like organism MLO responsible for the grapevine flavescence doree. *Res. Microbiol.*, 140 (4-5), 311-324.
- SHERWOOD J.L., SANBORN M.R., KEYSER G.C. (1987). Production of monoclonal antibodies to peanut mottle virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunobinding assay. *Phytopathology*, 77, 1158-1161.
- STEENSGAARD J. (1984). The mechanism of immune precipitation. *Immunology Today*, 5 (1), 7-10.
- SU H.J. (1987). Application of monoclonal antibody technique to serological studies on virus and virus-like diseases of plants; *Korean J. Plant Pathol.* 3(1), 20-21.
- TORRANCE L., PEAD M.T., BUXTON G. (1988). Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Ann. appl. Biol.*, 113, 519-530.
- VAN REGENMORTEL M.H.V. (1982). Serology and immunochemistry of plant viruses. New York Academic Press.
- VAN REGENMORTEL M.H.V. (1984). Monoclonal antibodies in plant virology. *Microbiol. of Science*, 1(3), 73-78.