

ESTRATÉGIA PARA A DETECÇÃO DE TOSPOVÍRUS*

M. Eiras¹, R.O. Resende², A.C. de Ávila³

¹Centro de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: eiras@biologico.br

RESUMO

Com o objetivo de desenvolver um método simples, rápido e sensível para a detecção simultânea de espécies de tospovírus presentes no Brasil, foram desenvolvidas sondas radioativas para hibridização via dot blot. As sondas foram sintetizadas a partir de diferentes fragmentos de RT-PCR, obtidos de RNAs totais extraídos de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) com oligonucleotídeos específicos para os genes de nucleocapsídeo (N) e polimerase (L). A sonda para o gene N foi vírus específica, sendo detectada somente a espécie TSWV. Quando se utilizou a sonda para o gene L, todas as espécies de tospovírus utilizadas foram detectadas simultaneamente.

PALAVRAS-CHAVE: TCSV, GRSV, INSV, CSNV, ZLCV, IYSV, hibridização.

ABSTRACT

STRATEGY FOR DETECTION OF TOSPOVIRUSES. Radioactive probes were synthesized for the simultaneous detection of tospoviruses by a quick and sensitive dot blot hybridization assay. Total RNA of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) - infected *Nicotiana benthamiana* plants was used as template for RT-PCR using sequences of the nucleoprotein (N) and polymerase (L) genes as oligonucleotide primers. Hybridization assays using N gene-derived probes were found to be TSWV-specific, whereas the L gene-derived probe was able to detect all tospoviruses simultaneously.

KEY WORDS: TCSV, GRSV, INSV, CSNV, ZLCV, IYSV, hybridization.

INTRODUÇÃO

O gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) apresenta ampla distribuição mundial, podendo infectar mais de 1050 espécies de plantas em 92 famílias botânicas (PETERS, 1998). Dentro da moderna taxonomia de vírus, várias espécies de tospovírus têm sido propostas (PRINS & GOLDBACH, 1998). No Brasil, já foram relatadas as espécies *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) (RESENDE *et al.*, 1996; BEZERRA *et al.*, 1999).

Os métodos mais comumente utilizados para detecção de espécies de tospovírus têm sido inoculação mecânica em plantas indicadoras (BEST & GALLUS, 1953), testes sorológicos, com destaque para

ELISA (WANG & GONSALVES, 1990; RESENDE *et al.*, 1991; DE ÁVILA *et al.*, 1993) e métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) (MUMFORD *et al.*, 1996; EIRAS *et al.*, 1998; EIRAS, 1999). As técnicas de hibridização com sondas radioativas têm sido utilizadas para detecção do TSWV por serem métodos rápidos e bastante sensíveis (GERMAN & RICE, 1988; RONCO *et al.*, 1989; HUGUENOT *et al.*, 1990; RICE *et al.*, 1990). CHO *et al.* (1989) utilizaram "dot-blot" para detecção do TSWV em pimenta (*Capsicum* sp.) no Havaí, onde o teste apresentou sensibilidade equivalente à ELISA. RICE *et al.* (1990), utilizando hibridização com sonda radioativa de cDNA, detectaram TSWV através de "dot-blot", tanto em plantas infectadas, como no próprio tripes vetor.

Como objetivo de se obter um método para a detecção simultânea das espécies do gênero *Tospovirus* que ocorrem no Brasil, foram sintetizadas sondas

² Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB)

³ Embrapa - Hortaliças (CNPq)

*Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, junto à Universidade de Brasília

moleculares radioativas, a partir de produtos amplificados via RT-PCR ("reverse transcriptase-polymerase chain reaction") de diferentes regiões do genoma viral, para hibridização com RNAs totais extraídos de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram inoculadas mecanicamente (COSTA & FORSTER, 1938) com as seguintes espécies de tospovírus: TSWV, TCSV, GRSV, INSV, CSNV, ZLCV e IYSV. Dez dias após a inoculação, folhas apresentando sintomas de mosaico foram armazenadas a -80°C para posterior extração de RNAs totais. As espécies de tospovírus foram identificadas através do seqüenciamento do gene N (DE ÁVILA *et al.*, 1993a; BEZERRA *et al.*, 1999; POZZER *et al.*, 1999).

Utilizou-se o método descrito por CHOMCZYNSK & SACCHI (1987) para a extração de RNAs totais, em que 1 g de folhas de *N. benthamiana* foram maceradas em nitrogênio líquido, colocadas em contato com 10 mL de isotiocianato de guanidina 4M e transferidas para tubo de centrífuga. Após agitação vigorosa por 1 min, adicionou-se à mistura 1 mL de acetato de sódio 2M pH 4,0, seguida de nova agitação por 1 min e adição de 10 mL de fenol. Depois de mais uma agitação vigorosa, acrescentou-se à mistura 2 mL de clorofórmio mais álcool isoamílico (29:1). A mistura foi então centrifugada a 15.000 g por 40 min, a fase aquosa foi coletada e transferida para novo tubo, sendo adicionado igual volume de isopropanol. Em seguida, a mistura foi agitada por inversão e deixada em repouso por 12 h a -20°C . A seguir, promoveu-se centrifugação por 30 min a 15.000 g, sendo o sedimento ressuspenso em 1 mL de água previamente tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato de sódio (DEPC).

Para a RT-PCR foram utilizados 2 pares de oligonucleotídeos. O primeiro par de oligonucleotídeos, denominados BR60 e BR65, foi desenhado para anelar em regiões conservadas do gene N (RNA S). O oligonucleotídeo BR60 (5' CCCGGATCCTGCAGACAATTGTGTCA 3') é complementar à região não traduzida da porção 3' terminal do SRNA (nucleotídeos 1 a 15), e o BR65 (5' ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3') é idêntico à região correspondente a 200 nucleotídeos após o códon de iniciação (AUG) da proteína N (nucleotídeos 433 a 453). Os fragmentos resultantes da PCR por esses dois oligonucleotídeos apresentam 453 pares de bases (pb).

Para o RNA L foram desenhados dois oligonucleotídeos denominados PDH001 (vc) (5' CCCGGATCCTCGAGAGCAATCAGGTAACA 3'), complementar à região 3' terminal (nucleotídeos 1 a 17), e L1 (5' AATATAACTATAGAAACGAAA 3') idêntico à região correspondente a 731 nucleotídeos

antes o terminal 3' do RNA L (nucleotídeos 711 a 731). Os produtos da amplificação com esses dois oligonucleotídeos apresentam 731 pb. A posição dos oligonucleotídeos e os fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR estão esquematizados na Figura 1.

Para a síntese das fitas de DNA complementar (cDNA), foram utilizados 3 μL (aproximadamente 1mg) de RNA total extraído, 1 μL (10 ng/ μL) dos oligonucleotídeos BR60 (para o gene N) ou PDH001 (para o gene L) e 6 μL de água estéril. Após aquecimento a 90°C por 2 min, seguido de choque térmico em gelo por 2 min, foram adicionados 4 μL de tampão da enzima transcriptase reversa (Gibco BRL), 0,3 μL (1U) da enzima transcriptase reversa (AMV, Gibco BRL), 0,2 μL de inibidor de RNase (RNasin), 0,2 μL da mistura de dNTPs (25mM) e 10 μL de água estéril. As amostras foram mantidas a 37°C por 1h.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada segundo EIRAS (1997), onde para um volume final de 50 μL de cada amostra, acrescentaram-se 4 μL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (CENBIOT/RS), 0,2 μL da mistura de dNTPs (25mM), 0,3 μL (2,5U) da enzima *Taq* DNA polimerase (CENBIOT/RS), 1 μL (10 ng/ μL) de cada oligonucleotídeo, 33 μL de água estéril e 10 μL do cDNA. As amostras foram submetidas à reação de PCR em termo ciclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin Elmer), sendo aquecidas a 94°C por 5 min e posteriormente submetidas a 30 ciclos de 1,5 min para desnaturação a 94°C , 2 min para anelamento a 48°C e 1 min para extensão a 72°C . Ao término dos 30 ciclos, a temperatura foi mantida a 72°C por 7 min para o término da extensão pela *Taq* DNA polimerase e finalmente mantida a temperatura de 4°C . Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob luz ultra-violeta (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os produtos da RT-PCR obtidos (453 pb para o gene N, e 731 pb para o gene L) foram eluídos do gel utilizando-se o *Sephaglass Bandprep kit* (Pharmacia Biotech) e utilizados diretamente para a confecção das sondas radioativas. Para isso, foi utilizado o *DNA labelling kit (dCTP) Ready to Go* (Pharmacia Biotech), conforme instruções do fabricante.

Os RNAs totais extraídos foram adicionados (1 μg) em membranas de náilon (*HybondTM-N+*, Amersham) utilizando-se o aparelho *Convertible Filtration Manifold System* (Gibco BRL), durante 15 min. Após exposição a UV por 5 min para fixação dos RNAs, as membranas foram pré-hibridizadas em solução de pré-hibridização (SSC 4X + 0,1% SDS + 0,05% blotto + 40% formamida + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmão) por 3 h a 45°C , a fim de se promover o bloqueio de todas as regiões onde não se depositaram os ácidos nucléicos. A seguir as membranas foram incubadas a 45°C por 12 h em contato com a sonda radioativa,

previamente desnaturada a 95 °C por 3 min. Após a hibridização, a membrana foi lavada em SSC 2X a 45 °C por 20 min e em seguida em SSC 1X + SDS 0,1% a 45 °C por 20 min. Finalmente, a membrana foi colocada em contato com um filme de raio-X (KODAK) e revelada após 72 h de exposição (OWENS & DIENER, 1981; SAMBROOK *et al.*, 1989; HUGUENOT *et al.*, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de hibridização com sondas moleculares radioativas têm sido amplamente utilizadas para a detecção de patógenos em plantas, devido à sua sensibilidade e especificidade. Essas técnicas apresentam sensibilidade pelo menos 10 vezes superior à ELISA (EIRAS, 1999), mas exigem cuidados especiais para a manipulação de elementos radioativos. Apesar disso, as sondas radioativas têm sido empregadas com sucesso para detecção de diversos vírus e viróides em plantas (OWENS & DIENER, 1981; WETZEL *et al.*, 1990; SEQUEIRA, 1992) e também para detecção de vírus nos insetos vetores (RICE *et al.*, 1990).

Inicialmente, os métodos utilizados para detecção de tospovírus baseavam-se em inoculação mecânica em plantas indicadoras (BEST & GALLUS, 1953). Entretanto, após inoculações sucessivas pode haver atenuação dos sintomas devido à formação de mutantes defectivos interferentes (DI) (RESENDE *et al.*, 1991a). ELISA também tem sido empregada para detecção de tospovírus (WANG & GONSALVES, 1990; RESENDE *et al.*, 1991), e apesar da elevada sensibilidade e baixo custo, não apresenta um caráter universal, sendo vírus-específica. A mistura de antissoros para a detecção universal de tospovírus através de ELISA também não é adequada devido a necessidade de se misturar

pelo menos seis diferentes antissoros, o que resulta em diluição dos antissoros com possibilidade de escapes. Recentemente, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido empregada para detecção de espécies de tospovírus, apresentando um caráter universal (MUMFORD *et al.*, 1996; EIRAS *et al.*, 1998). Esta técnica, apesar da elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, pode apresentar resultados falsos negativos, podendo, dessa forma, haver o escape à detecção, além do elevado custo (EIRAS, 1997).

Na literatura há trabalhos de detecção de tospovírus utilizando sondas radioativas específicas para o gene do nucleocapsídeo (N), que não apresentam caráter universal, sendo vírus específicas (GERMAN & RICE, 1988; RONCO *et al.*, 1989; RICE *et al.*, 1990; DE HAAN *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1989). Estes fatos foram confirmados com os resultados obtidos para o gene N (fragmento de 453 pb), os quais foram positivos somente para a espécie TSWV, homóloga à sonda utilizada (Fig. 2A). Estes resultados também confirmam os resultados de ELISA, pois a divergência da proteína do nucleocapsídeo (codificada pelo gene N) é utilizada como parâmetro taxonômico (DE ÁVILA *et al.*, 1993, 1993a).

A sonda L (fragmento de 731 pb) permitiu a detecção universal, sendo possível a hibridização com todas as espécies de tospovírus testadas (Fig. 2B). Estes resultados confirmam os dados relatados por VAN POLWIJK *et al.* (1997), que através do alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do RNA L do INSV e do TSWV encontraram níveis elevados de identidade e similaridade, indicando que a polimerase viral deve ser bastante conservada entre as espécies de tospovírus.

O presente trabalho relata pela primeira vez a utilização de sondas radioativas como método para

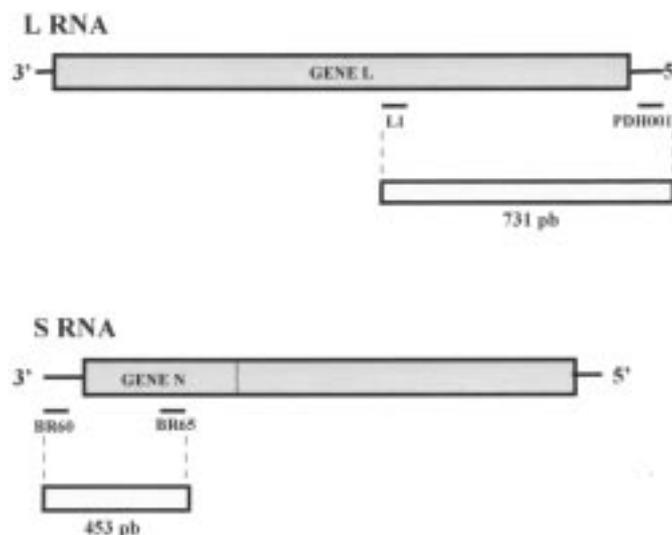


Fig. 1 - Representação esquemática indicando as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos nos RNAs genômicos de *Tospovírus* e os respectivos fragmentos de DNA, amplificados via RT-PCR, utilizados como sondas para hibridização.

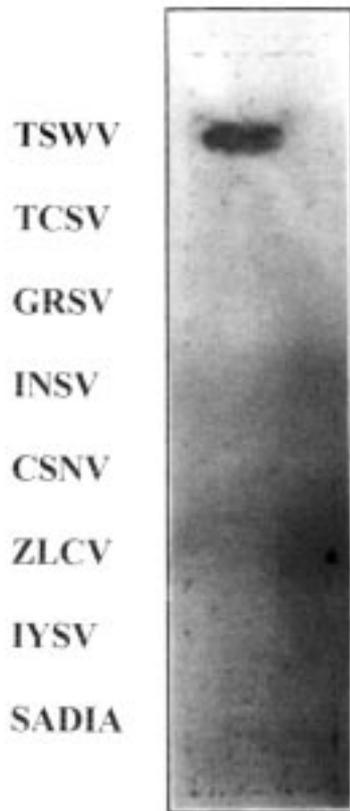


Fig. 2 - Hibridização via "slot-blot" com sonda radioativa específica para o gene N (fragmento de 453 pares de bases) (A), e para o gene L (fragmento de 731 pares de bases) (B), sintetizadas a partir da espécie *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Amostras constituem 1µg (30 µL) de RNAs totais extraídos para as seguintes espécies de tospovírus: TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV). Temperatura de hibridização de 45 °C.

detecção simultânea de tospovírus. Com os resultados obtidos, têm-se à disposição novas possibilidades de diagnóstico molecular, que pode ser aplicado para detecção de tospovírus em programas de quarentena e para indexação de material vegetal proveniente de cultura *in vitro*. Além disso, hibridização com sondas não radioativas também podem ser utilizadas apresentando vantagens com relação à possibilidade de serem armazenadas por tempo indeterminado e por apresentarem menor risco para manipulação (EIRAS, 1997). Com o aumento da diversidade de tospovírus (De Ávila *et al.*, 1998; BEZERRA *et al.*, 1999; POZZER *et al.*, 1999), os métodos de detecção universal serão importantes principalmente para se evitar a introdução de uma nova espécie de tospovírus em

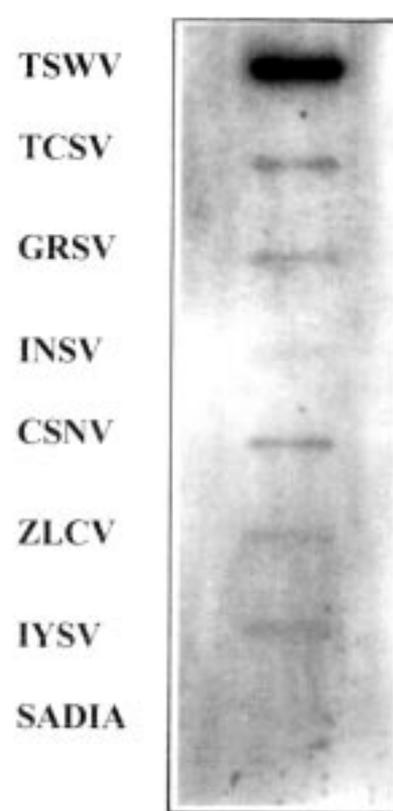


Fig. 3 - Hibridização via "slot-blot" com sonda radioativa do gene L (fragmento de 731 pares de bases), sintetizadas a partir da espécie *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Amostras constituem 1µg (30µL) de RNAs totais extraídos para as seguintes espécies de tospovírus: TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV). Temperatura de hibridização de 45 °C.

uma nova região ou país, como recentemente ocorreu com a grande dispersão do INSV no hemisfério norte (MARCHOUX *et al.*, 1991) e com a introdução acidental do CSNV na Holanda (VERHOEVEN & ROENHORST, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEST, R.J. & GALLUS, H.P.C. Strains of tomato spotted wilt virus. *Austr. J. Biol. Sci.*, v.15, n.2, p.212-214, 1953.
- BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from zucchini. *Phytopathology*, v.89, n.11, p.823-830, 1999.
- CHO, J.J.; MAU, F.R.L.; GERMAN, T.L.; HARTMANN, R.W.; YUDIN,

- L.S.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R. A multidisciplinary approach to management of TSWV in Hawaii. *Plant Dis.*, v.73, n.5, p.375-383, 1989.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, n.1, p.156-159, 1987.
- COSTA, A.S. & FORSTER, R.A. A transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção por suco. *Rev. de Agric. Piracicaba*, v.13, n.1, p.249-262, 1938.
- DE ÁVILA, A.C.; DE HAAN, P.; SMEETE, M.L.L.; RESENDE, R.O.; KORMELINK, R.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. *Arch. Virol.*, v.128, n.2, p.211-227, 1993.
- DE ÁVILA, A.C.; DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.*, v.74, n.2, p. 153-159, 1993a.
- DE ÁVILA, A.C.; POZZER, L.; BEZERRA, I.C.; KORMELINK, R.; PRINS, M.; PETERS, D.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. Diversity of Tospoviruses in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS IN FLORAL AND VEGETABLE CROPS, 4., 1998. Wageningen, Netherlands. Abstracts. Wageningen: 1998. p.32-34.
- DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; VAN POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R.W. Tomato Spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.*, v.72, n.10, p.2207-2216, 1991.
- EIRAS, M. Detecção de vírus de plantas através de técnicas moleculares. *Biológico*, São Paulo, v.61, n.2, p. 155-157, 1999.
- EIRAS, M. Detecção de tospovírus através de polymerase chain reaction (PCR) e sondas moleculares. Brasília: 1997. 89p. [Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, DF].
- EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; DE ÁVILA, A.C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. *Fitopatol. Bras.*, v.23, n.1, p.5-17, 1998.
- GERMAN, T.L. & RICE, D. Dot blot detection of tomato spotted wilt virus using cloned cDNA probes. *Phytopathology*, v.78, n.7, p.1599, 1988. (Abstract).
- HUGUENOT, C.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.; DE HAAN, P.; WAGEMAKERS, C.A.M.; DROST, G.A.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; PETERS, D. Detection of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. *Arch. Virol.*, v.110, n.1, p.47-62, 1990.
- MARCHOUX, G.; GEBRE-SELASSIE, K.; VILLEVIEILLE, M. Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathol.*, v.40, n.3, p.347-351, 1991.
- MUMFORD, R.A.; BARKER, I.; WOOD, K.R. An improved method for detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, v.57, n.2, p.109-115, 1996.
- OWENS, R.A. & DIENER, T.O. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, v.213, n.6, p.670-672, 1981.
- PETERS, D. An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. In: PETERS, D. & GOLDBACH R.W. (Eds.). Recent progress in tospovirus and thrips research. 1998. p.107-110.
- POZZER, L.; BEZERRA, I.C.; KORMELINK, R.; PRINS, M.; PETERS, D.; RESENDE, R.O.; DE ÁVILA, A.C. Characterization of a distinct tospovirus isolate of iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Dis.*, v.83, n.4, p.345-350, 1999.
- PRINS, M. & GOLDBACH, R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol.*, v.6, n.1, p.31-35, 1998.
- RESENDE, R.O., DE ÁVILA, A.C., GOLDBACH, R.W., PETERS, D. Comparison of polyclonal antisera in the detection of tomato spotted wilt virus using double antibody sandwich and cocktail ELISA. *J. Phytopathol.*, v.132, n.2, p.46-56, 1991.
- RESENDE, R.O., DE HAAN, P., DE ÁVILA, A.C., KITAJIMA, E.W., KORMELINK, R., GOLDBACH, R.W. & PETERS, D. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J. Gen. Virol.*, v.72, n.10, p.2375-2383, 1991a.
- RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; DE ÁVILA, A.C. New Tospoviruses Found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. *Acta Hort.*, The Hage, v.431, n.1, p.78-89, 1996.
- RICE, D.J.; GERMAN, T.C.; MAU, R.F.L.; FUJIMOTO, F.M. Dot blot detection of tomato spotted wilt virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. *Plant Dis.*, v.74, n.4, p.274-276, 1990.
- RONCO, A.E.; DAL BÓ, E.; GHIRINGHELLI, P.D.; MEDRANO, C.; ROMANOVSKI, V.; SARACHU, A.N.; GRAU, O. Cloned cDNA probes for the detection of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, v.79, n.9, p.1309-1313, 1989.
- SAMBRON, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning. 2. ed New York: Cold Spring Harbor Press. 1989.
- SEQUEIRA, J.C. Técnicas serológicas e biomoleculares de diagnóstico de vírus e viróides em plantas. *Summa Phytopathol.*, v.18, n.2, p.79-110, 1992.
- VAN POELWIJK, F.; PRINS, M.; GOLDBACH, R.W. Completion of the Impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.*, v.78, n.8, p.543-546, 1997.
- VERHOEVEN, T.J. & ROENHORST, J.W. Occurrence of tospoviruses in The Netherlands. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS IN FLORAL AND VEGETABLE CROPS, 4., 1998. Wageningen, Netherlands. Abstracts. Wageningen: 1998. p. 77-80.
- WANG, M. & GONSALVES, D. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Dis.*, v.74, n.2, p.154-158, 1990.
- WETZEL, T.; TAVERTE, G.; TEYCHENEY, P.Y.; RAVELONANDRO, M.; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J. Dot hybridization detection of plum pox virus using P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes. *J. Virol. Methods*, v.30, n.2, p.161-172, 1990.

Recebido para publicação em 18/7/00