

Técnicas de Detecção e Estudo de Vírus em Plantas

Thor Vinícius Martins Fajardo¹
Osmar Nickel²

Foto: Thor V. M. Fajardo.



Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e, uma vez estabelecida a compatibilidade com a planta hospedeira, replicam-se exclusivamente pela utilização de constituintes químicos das células hospedeiras. Assim, colonizam as células que compõem os diferentes tecidos da hospedeira e comprometem a integridade do organismo infectado em todos os níveis. Em decorrência disto, ocorrem várias alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares nas plantas infectadas. Acontece uma verdadeira “batalha” metabólica e, nas plantas suscetíveis, os vírus passam a controlar parte do metabolismo da célula parasitada. O processo infeccioso ocasionado pela infecção viral resultará em queda de produtividade e da qualidade da produção, refletindo na rentabilidade da cultura.

Os sintomas associados à infecção viral em espécies e cultivares suscetíveis são perda contínua e gradual do vigor da planta, produção reduzida, coloração anormal das folhas, folhas com aparência atípica, brotação irregular, engrossamento e amadurecimento irregular dos ramos, presença de caneluras no lenho e casca do tronco com aparência alterada, além do

amadurecimento irregular da uva e fruta com menor teor de açúcares (BASSO et al., 2010). É importante destacar que nem sempre a videira infectada por vírus exibirá sintomas perceptíveis, pois a infecção pode ser latente em algumas cultivares comerciais; entretanto, mesmo nestes casos a presença do vírus poderá causar prejuízos.

Uma vez que a planta esteja infectada por vírus é impossível curá-la adotando-se métodos tradicionais de controle, como aqueles utilizados para outros patógenos a exemplo de fungos e bactérias. As possibilidades de controle são comuns a todas as viroses, destacando-se, no campo, o manejo visando eliminar fontes de inóculo, o monitoramento e o controle de vetores (BASSO et al., 2014). O recomendado é basear o controle em estratégias de prevenção por meio da utilização de materiais propagativos comprovadamente livre de patógenos virais.

Com os avanços nos métodos de detecção dos vírus, verificou-se que a maioria desses patógenos em videira ocorre na forma de infecções mistas, sendo este mais um desafio para o diagnóstico e o controle das doenças resultantes. As ferramentas, visando

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br.

² Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: osmar.nickel@embrapa.br.

o diagnóstico dos vírus que infectam a videira, têm evoluído ao longo dos anos, tendo começado pela indexação biológica, passando pelos testes sorológicos e moleculares. A Tabela 1 mostra uma comparação entre as diferentes técnicas de detecção de patógenos virais, abordadas nessa publicação, em relação a sensibilidade, especificidade, praticidade, rapidez e custo.

Indexação Biológica

No método biológico, a transmissão de vírus ocorre por meio da enxertia ou por inoculação mecânica, podendo ser realizado em dois grupos de plantas hospedeiras, denominadas indicadoras, empregadas de acordo com a doença a ser identificada. O primeiro grupo é formado por plantas lenhosas, que são diferentes cultivares de copa ou de porta-enxerto de videiras sensíveis a determinadas viroses e, o segundo, é constituído por plantas herbáceas. A indexação em plantas lenhosas é realizada para a detecção dos vírus que infectam a videira e que são limitados ao floema, não sendo transmitidos mecanicamente. Estes pertencem às famílias *Closteroviridae* (GLRaVs) e *Flexiviridae* (GRSPaV). A indexação é feita por meio de enxertia de gemas de videiras candidatas em mudas das videiras indicadoras, porta-enxertos ou material de copa. As plantas enxertadas são mantidas em casa de vegetação por até dois anos, quando ocorre a avaliação final dos sintomas. Para o complexo rugoso da videira, após o arranquio das plantas, a

casca do porta-enxerto é removida para verificar a presença de caneluras no lenho (Fig. 1A) (LIMA; FAJARDO, 2012).

Apesar do tempo de avaliação e as variações que podem ocorrer na reação das plantas indicadoras em função das condições ambientais, a indexação biológica ainda é necessária, principalmente, para a detecção de vírus não caracterizados molecularmente e por oferecer informações sobre características biológicas do isolado ou espécie viral. Via de regra, a indexação biológica identifica a virose e não especificamente a espécie viral responsável pelos sintomas. Outra grande limitação da indexação biológica é o espaço requerido para a manutenção das plantas até o diagnóstico final (NICKEL; FAJARDO, 2009).

No caso das plantas herbáceas, a inoculação é feita mecanicamente. As folhas de videira infectadas com vírus são maceradas em tampão e o extrato é friccionado na superfície das folhas dessas indicadoras, previamente pulverizadas com agentes abrasivos. Estes abrasivos provocam pequenos ferimentos no limbo foliar das plantas propiciando a penetração das partículas virais no tecido vegetal. As plantas inoculadas são mantidas em casa de vegetação. Quando o vírus é transmitido às plantas indicadoras, estas apresentam sintomas entre 5 a 20 dias após a inoculação. Os vírus de maior importância transmitidos por este método pertencem aos gêneros *Nepovirus* (GFLV), *Vitivirus*

Tabela 1. Comparação entre diferentes métodos de detecção de patógenos virais em plantas.

Técnica	Sensibilidade ¹	Especificidade ²	Praticidade ³	Rapidez	Custo
Indexação biológica (indicadoras herbáceas e lenhosas)	++ ⁴	++	+	+	++
Testes sorológicos (ELISA, dot-ELISA, western blot)	++	+++	++	++	+++
Hibridização molecular	+	++++	++	+	+++
(RT-)PCR convencional	+++	++++	+++	+++	+++
(RT-)PCR one step (em tubo único)	+++	++++	++++	++++	+++
Multiplex (RT-)PCR	+++	++++	+++	+++	+++++
PCR em tempo real (com sondas TaqMan)	+++++	+++++	++++	+++++	+++
Clonagem, sequenciamento de nucleotídeos, estudo de homologia de seqüências	+++++	+++++	+++	++++	+++

Legenda:

1. sensibilidade: probabilidade de detectar positivos verdadeiros.

2. especificidade: probabilidade de detectar negativos verdadeiros.

3. praticidade: exequibilidade em análises rotineiras nas etapas de execução e interpretação.

4. quantidade de "+" indica como os métodos variam com relação a cada critério considerado de aceitável (+) a ótimo (++++).

(GVA e GVB) e *Closterovirus* (GLRaV-2). As indicadoras mais utilizadas pertencem aos gêneros *Nicotiana* e *Chenopodium* (LIMA; FAJARDO, 2012).

Métodos Sorológicos

A sorologia apresenta diversos métodos para a detecção viral que se caracterizam pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais. Um dos métodos sorológicos mais comuns para detecção de vírus em material vegetal é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Neste, os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção (Fig. 1B). Nesta reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizados como antígeno (LIMA; FAJARDO, 2012). Os tipos de ELISA dividem-se em dois grupos: direto, no qual o anticorpo e o conjugado (anticorpo + enzima) são específicos para a detecção do antígeno viral e indireto, o conjugado da reação (anti-anticorpo + enzima) não detecta especificamente o antígeno, mas reconhece um fragmento universal do anticorpo específico. Este por sua vez, liga-se especificamente ao antígeno viral.

No teste dot-ELISA, o extrato das amostras é fixado em membrana, ao contrário do ELISA tradicional, no qual as amostras são depositadas em poços de uma placa de microtitulação. Além desta diferença, sistemas distintos de substrato e enzima são usados nas reações, sendo que no dot-ELISA o produto da reação enzimática é um precipitado insolúvel e de cor púrpura (Fig. 1C).

A coleta do material vegetal a ser utilizado no preparo dos extratos é muito importante. Considerando-se que os vírus apresentam distribuição irregular dentro da planta, o estádio fenológico considerado e o tipo de tecido a ser coletado devem estar associados a maior concentração destes patógenos na planta, visando favorecer a sua detecção. No preparo do extrato, tecido cambial ou pecíolos e nervuras de folhas maduras coletadas no final do ciclo vegetativo constituem fontes de antígeno ideais para a detecção dos vírus GLRaVs, GVA, GVB e GRSPaV, enquanto que para GFLV e GFkV, a detecção é

mais acurada em preparações obtidas a partir de folhas novas, coletadas no início do ciclo vegetativo da videira (LIMA; FAJARDO, 2012).

O resultado do ELISA é determinado por uma reação enzimática da fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo que atua sobre um substrato específico e a avaliação é realizada pela leitura da absorbância em uma leitora de placas. Poços que receberam amostras infectadas desenvolvem cor amarelada. As amostras são consideradas positivas quando o valor da sua leitura for pelo menos duas vezes superior àquele do extrato da planta sadia, utilizado como controle negativo. Este método apresenta como vantagens: ser rápido, podendo-se obter os resultados em um período relativamente curto (24 a 48 h), ser sensível e poder ser utilizado para a avaliação de um grande número de amostras. As limitações do teste ELISA residem no fato de não haver anticorpos produzidos comercialmente para a identificação de todos os vírus que infectam videira e títulos virais muito baixos podem resultar em falsos-negativos. Nestes casos, outros tipos de testes devem ser utilizados na identificação (BASSO et al., 2014) ou há a possibilidade de se produzir anticorpos específicos contra determinado vírus a partir da expressão do gene da proteína capsidial em bactérias (FAJARDO et al., 2007).

A proteína que compõe a capa que envolve a partícula viral pode ser separada por eletroforese, procedimento no qual as proteínas migram através de géis impulsionadas por uma corrente elétrica. As proteínas separadas são visualizadas pelo tingimento com corantes específicos (Fig. 1D) e a informação obtida por este procedimento, a exemplo da massa molecular da proteína capsidial, auxilia na caracterização e no diagnóstico viral.

O *Western blot* é uma técnica imunoeletróforética utilizada na caracterização de proteínas virais. Neste método, proteínas totais extraídas de plantas infectadas são desnaturadas e, posteriormente, separadas em gel de SDS-poliacrilamida. Na etapa seguinte, as frações da proteína são transferidas do gel para uma membrana. Esta transferência pode ser ativa, pela aplicação de uma voltagem para propiciar a migração das proteínas do gel para a membrana, ou passiva, na qual esta ocorre por capilaridade. O processo de detecção das proteínas virais imobilizadas nas membranas envolve a sua

exposição aos anticorpos produzidos contra a proteína do vírus a ser detectado e a revelação da membrana utilizando-se reagentes específicos (Fig. 1E) (LIMA; FAJARDO, 2012).

Métodos Moleculares

Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção do ácido nucleico, a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o mais utilizado. A maioria dos vírus de plantas pode ser identificada por meio desta técnica. A RT-PCR baseia-se na amplificação e detecção do material genético dos vírus de RNA ou apenas PCR, no caso dos vírus de DNA, em amostras vegetais infectadas. Neste método pelo menos parte da sequência de nucleotídeos do genoma do vírus a ser detectado precisa ser conhecida para dar origem aos iniciadores (*primers*) que serão utilizados na reação. O processo envolve as enzimas transcriptase reversa e *Taq* DNA polimerase e a reação é automatizada pela incubação em um termociclador programado para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e, posteriormente, executar os múltiplos ciclos da PCR, que visam à produção de um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA. Dessa forma, a amplificação seletiva de um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois iniciadores, é realizada a partir do RNA do vírus utilizado como molde (LIMA; FAJARDO, 2012). Há variações da técnica de (RT-)PCR como a imunocaptura RT-PCR (onde a partícula viral é capturada previamente à exposição do ácido nucleico), a RT-PCR *one step* (realizada em uma única etapa e em tubo único) e a multiplex RT-PCR (onde ocorre a detecção de mais de um vírus em uma única reação); as vantagens e desvantagens de algumas dessas variações são mencionadas na Tab. 1.

O preparo do extrato da planta infectada a ser utilizado na RT-PCR é muito importante, tendo em vista que os tecidos da videira contêm altas concentrações de polissacarídeos e de compostos fenólicos que podem inibir a ação das enzimas utilizadas nas reações. A vantagem deste método é a sua alta sensibilidade, isto é, mesmo que o patógeno esteja presente na amostra vegetal em pequenas quantidades, a amplificação pela PCR propicia a sua detecção. Os produtos da reação

são visualizados por meio de eletroforese em um gel de agarose. O emprego de brometo de etídeo, corante mais utilizado, se intercala na molécula do DNA e altera o comprimento de onda emitido de uma fonte de luz ultravioleta, permitindo que este possa ser visualizado na forma de uma banda (Fig. 1F). Quando nenhum DNA de tamanho esperado for visualizado no gel de agarose, significa que a amostra vegetal não está infectada com o patógeno, a concentração do vírus encontra-se abaixo do limiar de detecção da técnica ou, ainda, os iniciadores utilizados não possuem suficiente homologia com a sequência viral (LIMA; FAJARDO, 2012).

Outros métodos moleculares incluem as hibridizações, *Northern blot* (utilizada na detecção de RNA) e *Southern blot* (empregada na detecção de DNA). Em ambos os casos, o ácido nucleico viral, imobilizado em membranas, é detectado por meio da utilização de sondas moleculares. Estas são constituídas por fragmentos de DNA ou RNA complementares à sequência do genoma do vírus a ser detectado e podem ser sintetizadas e marcadas *in vitro* por meio das técnicas de (RT-)PCR ou transcrição. As chamadas “sondas frias”, aquelas que não são radioativamente marcadas, são etiquetadas, geralmente, com digoxigenina. Para as amostras serem consideradas positivas, deve haver complementaridade entre a sequência utilizada como sonda e aquela do vírus presente na amostra testada, formando fitas duplas (DNA:RNA ou RNA:RNA) (LIMA; FAJARDO, 2012). Os resultados positivos são detectados pela presença de manchas na membrana que serve de suporte para a fixação do ácido nucleico extraído das amostras (Fig. 1H). Esta técnica é altamente específica, sendo mais utilizada na caracterização de isolados virais e, também, como método diagnóstico.

Clonagem, Sequenciamento de Nucleotídeos e Estudo de Homologia de Sequências

Os produtos da (RT-)PCR são analisados em géis de agarose, preparados em tampão, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz UV. As bandas observadas, correspondentes a fragmentos de tamanhos esperados, são recortadas dos géis e eluídas com a utilização de

kits comerciais. Os fragmentos de DNA eluídos são ligados a vetores e estes são utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* por meio de choque térmico ou eletroporação (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas (Fig. 1I) é extraído utilizando-se kits comerciais e a confirmação da presença dos fragmentos virais clonados nos plasmídeos recombinantes é realizada por digestão com enzima de restrição adequada. O sequenciamento automático de nucleotídeos dos clones recombinantes, normalmente, é realizado pelo método Sanger (terminador da cadeia). A etapa de análise posterior inclui a realização de alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos (Fig. 1J) e de aminoácidos deduzidos e a geração das matrizes de identidade (Fig. 1K) com auxílio de algoritmos de alinhamento de sequências múltiplas, disponíveis em programas de bioinformática (Clustal, BioEdit). Um dos recursos mais comuns para o alinhamento de sequências é o BLAST contra a base de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Nas análises normalmente são incluídas sequências de isolados virais homólogos e heterólogos disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O estudo de relacionamento filogenético utilizando sequências virais é desenvolvido com auxílio de programas específicos de bioinformática (MEGA) que resultam na geração de dendrogramas (Fig. 1L). A determinação da diversidade genética da população viral, existente em determinada região ou hospedeira, pode viabilizar a diagnose focada em testes diagnósticos mais abrangentes, capazes de detectar maior número de isolados e estirpes de uma espécie viral.

RT-PCR em Tempo Real

A (RT-)PCR convencional é uns dos métodos mais confiáveis para a detecção de vírus em videira, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Estima-se que a PCR seja 100-1000 vezes mais sensível que o ELISA (Tabela 1). Entretanto, a detecção de patógenos, baseada em PCR, sofre com a limitada capacidade de processamento das amostras. Além disto, a possibilidade de pareamento incorreto dos iniciadores e o fato de requerer eletroforese em gel para avaliar o resultado podem comprometer a sua especificidade

e eficiência, respectivamente. A detecção por PCR em tempo real ou PCR quantitativa (*Real-time PCR*) é uma técnica muito sensível que pode ser utilizada para superar essas limitações. Esta técnica, derivada da PCR, vem ganhando espaço no diagnóstico viral por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos, pois permite a utilização da etapa linear da amplificação para a determinação da quantidade de ácido nucleico viral e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR convencional que apresenta somente resultados qualitativos.

Fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos. Os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos de amplificação. As sondas, fragmentos de DNA marcados com fluoróforos, são empregadas na reação para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados. A sonda do tipo TaqMan (Life Technologies) apresenta nas extremidades um fluoróforo e um bloqueador. Durante a reação, a sonda hibridiza-se com a sequência da fita simples de DNA complementar e alvo da amplificação. No processo de amplificação a sonda é degradada pela *Taq* DNA polimerase, separando-se, assim, o bloqueador da molécula fluorescente. Isto resulta em aumento exponencial da intensidade da fluorescência (Fig. 1G). Esse aumento de fluorescência ocorre apenas quando a sonda se hibridiza e quando a amplificação da sequência-alvo é estabelecida, determinando a sensibilidade e especificidade dessa técnica. A PCR em tempo real já foi empregada na detecção de vírus que infectam diferentes hospedeiras, incluindo a videira (DUBIELA et al., 2013).

Sequenciamento de Nova Geração

A maior limitação para a detecção de novos vírus ou para a detecção não direcionada de patógenos virais, ou seja, que não são alvos pré-estabelecidos da detecção, é que as técnicas mais comumente utilizadas são específicas e se baseiam em afinidade pelo antissoro (ELISA), na utilização de iniciadores específicos para a amplificação direcionada do DNA (PCR) e na hibridização de DNA (sondas). Sendo assim, são direcionadas para a detecção de vírus conhecidos e suas variantes mais próximas.

Assim, o processo de identificação de vírus, ainda não descritos, ou de maneira não direcionada pode constituir tarefa difícil ou infrutífera. Para superar esse entrave, um marcante e recente avanço na identificação e descoberta de vírus foi o desenvolvimento e a implementação do “sequenciamento de nova geração” (*Next-generation sequencing*, NGS). Sua principal vantagem é permitir a identificação de todo o viroma presente em uma determinada hospedeira, incluindo populações virais altamente divergentes, as quais poderiam ser mais difíceis de detectar com base em técnicas moleculares comumente utilizadas (FAJARDO et al., 2015).

As plataformas de NGS são capazes de gerar enormes quantidades de sequências de nucleotídeos com grande economia de tempo e custo em relação ao procedimento tradicional de sequenciamento (Sanger). Essa maior eficiência resulta do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento em paralelo, prescindindo do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A técnica consiste em sequenciar massalmente a população de RNA e/ou DNA presentes em plantas com sintomas de doença,

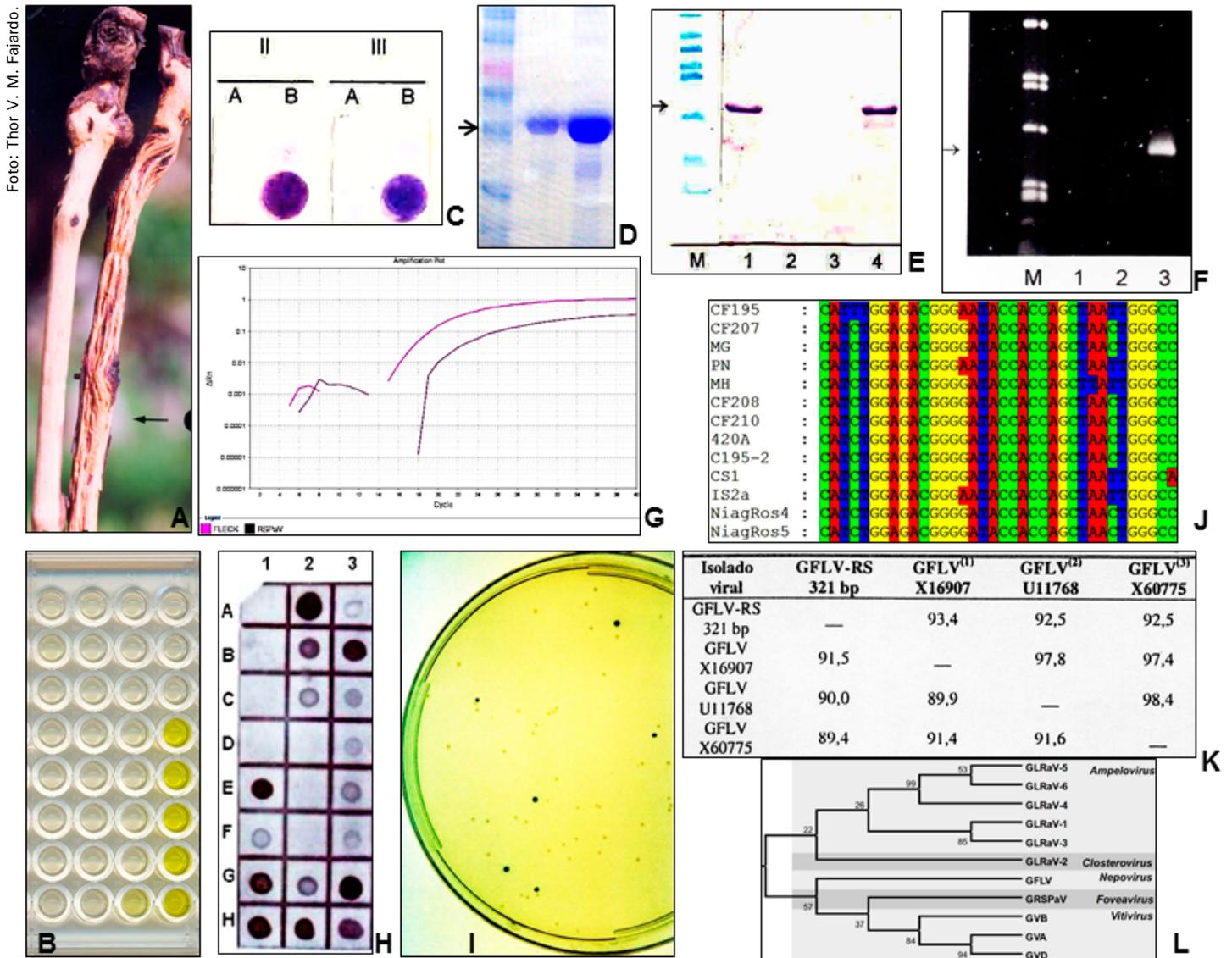


Fig. 1. Testes diagnósticos para detecção de vírus em plantas. **(A)** Indexação biológica em videira indicadora, **(B)** teste sorológico ELISA, **(C)** teste sorológico dot-ELISA, **(D)** eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), **(E)** teste sorológico *Western blot*, **(F)** gel de agarose com produto da reação de RT-PCR, **(G)** resultado gráfico da reação de RT-PCR em tempo real, **(H)** hibridização dot-blot (tipo *Northern blot*), **(I)** placa de cultivo com colônias de bactérias transformadas com plasmídeos recombinante (colônia branca) e não recombinante (colônia azul), **(J)** alinhamento múltiplo de sequências de nucleotídeos, **(K)** comparação de sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e aminoácidos deduzidos entre isolados virais (% de identidade), **(L)** dendrograma representando o relacionamento filogenético entre espécies virais.

seguindo-se etapa de análise de bioinformática para a exclusão das sequências da planta hospedeira ou contaminantes e organização e identificação das sequências dos patógenos conhecidos e de prováveis patógenos ainda não descritos.

Vírus e viroides causam doenças de importância econômica em uma ampla gama de espécies vegetais. A prevenção é a única medida prática e aplicada para evitar a disseminação destes patógenos seja pelo material propagativo infectado ou por vetores. As medidas de prevenção demandam métodos de detecção com alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade, pois muitos patógenos podem estar em baixa concentração ou em estado latente ou serem assintomáticos no material propagativo. Portanto, a detecção confiável de organismos fitopatogênicos é crucial no campo da fitopatologia, sendo empregada desde o estudo de aspectos biológicos básicos até o controle das doenças que causam. Todos os métodos/técnicas abordados nessa publicação são executados ou foram implementados no âmbito de atividades de pesquisa sobre viroses da videira e de fruteiras temperadas conduzidas no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho.

Referências

- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; SANTOS, H. P.; GUERRA, C. C.; AYUB, R. A.; NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 351-359, Nov./Dec. 2010.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZEBINI, F. M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 22, p. 160-207, 2014.
- DUBIELA, C. R.; FAJARDO, T. V. M.; SOUTO, E. R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L. F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 158-165, Mar./Apr. 2013.
- FAJARDO, T. V. M.; BARROS, D. R.; NICKEL, O.; KUHN, G. B.; ZEBINI, F. M. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 496-500, Nov./Dec. 2007.
- FAJARDO, T. V. M.; AL RWAHNIH, M.; NAGATA, T.; MELO, F. L. First report of grapevine reovirus infecting Cabernet Sauvignon grapevine in Brazil. In: BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY, 26.; MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 10., 2015, Florianópolis. **Virus reviews and research: anais**. Florianópolis: SBV, 2015. p. 188. Journal of the Brazilian Society for Virology, v. 20, suppl. 1, 2015.
- LIMA, M. F.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 43-58. (Frutas do Brasil, 14).
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 55 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69).
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 999 p.

Comunicado Técnico, 179

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão (2015): 500 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: *César Luis Girardi*
Secretária-executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Adeliano Cargin, Alexandre Hoffmann, Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço, João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Rochelle Martins Alvorcem e Viviane Maria Zanella Bello Fialho*

Expediente

Editoração gráfica: *Alessandra Russi*
Normalização bibliográfica: *Rochelle Martins Alvorcem*