

# IDENTIFICAÇÃO DE VIRÓIDES OCORRENDO EM POMARES DE LIMA ÁCIDA TAHITI QUEBRA-GALHO EM HOLAMBRA, (SP)

MARIA LUÍSA PENTEADO NATIVIDADE TARGON<sup>1</sup>,  
SÉRGIO ALVES DE CARVALHO<sup>1</sup>, CAMILO LÁZARO MEDINA<sup>2</sup>,  
GERD WALTER MÜLLER<sup>3</sup>, EDUARDO SANCHES STUCHI<sup>4</sup>,  
KLEBER MARTINS BORGES<sup>1</sup> e MARCOS ANTONIO MACHADO<sup>1</sup>

## RESUMO

No Estado de São Paulo, o termo quebra-galho é utilizado para designar clones de lima ácida Tahiti infectados com viróides e que são cultivados pelas suas características agronômicas desejáveis, como floradas fora de época, que permitem colheita quase que contínua durante o ano. Além disso, o Tahiti Quebra-Galho produz frutos de coloração verde-escura, com poucas ou nenhuma mancha de luz para exportação. Visando à caracterização de viróides presentes em pomares dessa lima na região de Holambra (SP) coletaram-se borbulhas de dez plantas pertencentes a seis diferentes propriedades. Instalaram-se testes biológicos com a indicadora cidra Etrog em casa de vegetação. A presença das espécies de viróides: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd, também conhecido como CVd-II) e *Citrus viroid III* (CVd-III) nos tecidos da indicadora, foi, também, avaliada por hibridização de impressões de tecido. Observaram-se diferenças na intensidade dos sinais de hibridização entre amostras do mesmo pomar e entre espécies de viróides. A variação na presença dessas espécies, bem como diferenças na concentração, indica a provável existência de seu balanceamento nas plantas, que depende da combinação copa/porta-enxerto e das condições

<sup>1</sup> Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP), Brasil. Bolsista CNPq.

<sup>2</sup> Grupo de Consultores em Citros. (GCONCI) Caixa Postal 39, 13490-000 Cordeirópolis (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, Maringá (PR), Brasil.

<sup>4</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura, Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, Caixa Postal 74, 14700-971 Bebedouro (SP), Brasil.

edafoclimáticas do local. A seleção de variantes de interesse, como 1A e 9F, com poucos sintomas de rachaduras, mesmo nas copas de Tahiti Quebra-Galho enxertadas em Trifoliata ou Trifoliata Flying Dragon é importante, podendo ser realizada pelo processo descrito neste trabalho, que se mostrou sensível, confiável e fácil de executar.

**Termos de indexação:** Cítricos, exocorte, cachexia/xiloporose, teste biológico e molecular.

## SUMMARY

### IDENTIFICATION OF CITRUS VIROIDS OCCURRING IN TAHITI QUEBRA GALHO ACID LIME ORCHARDS IN HOLAMBRA, STATE SÃO PAULO, BRAZIL

In São Paulo State, the term Quebra-galho (branch breaker) is used to designate the Tahiti lime clones infected with viroids. These clones are planted due to their desirable agronomical characteristics as the constant out-of-season flowering, allowing almost continuous harvest. Further, the dark green fruits with none or few light spots are preferred for export. In this work, ten trees belonging to six different orchards were selected, indexed on Etrog citron and assayed by Imprint hybridization using probes from *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd, also known as CVd-II), and *Citrus viroid III* (CVd-III) species. There were observed differences in the intensity of the hybridization signal among samples from the same orchard and among viroid species. It was possible to observe not only variation in the viroid species in the plants, but also differences in their concentration. These observations suggest that the viroid species occur depending on the scion/rootstock combinations and the edaphoclimatic conditions. The selection of variants of interest, as 1A and 9F, with few trunk crack symptoms even on Tahiti Quebra-Galho grafted onto Trifoliata or Flying Dragon rootstocks, is important and can be accomplished using the process described in this work, that was shown to be sensitive, reliable and easy to perform.

**Index terms:** Citrus, exocortis, cachexia/xiloporosis, biological indexing, imprint hybridization.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a área plantada da lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Yu Tanaka) é de, aproximadamente, 48 mil hectares, com um rendimento médio de 935 mil toneladas. As principais áreas produtoras localizam-se nos estados: São Paulo, Bahia, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, sendo São Paulo responsável por 80% de toda a produção (LUCHETTI et al., 2003). Existem dois clones principais de Tahiti cultivados comercialmente: o IAC-5 ou Peruano, sadio, e o Quebra-Galho, um clone velho, com árvores de pequeno porte, ramos quebradiços, produzindo múltiplas floradas por ano e comprovadamente infectado por viróides (GIRALDO, 1990). O interesse no Tahiti Quebra-Galho deve-se, principalmente, à qualidade dos frutos, que são uniformes e sem manchas, próprios para exportação.

Viróides são os menores patógenos de plantas conhecidos. Apresentam uma molécula de RNA circular de fita simples com tamanho que varia de 246 a 401 nucleotídeos. Não possuem capa protéica e atividade de RNA mensageiro (FLORES et al., 1998, 2000; DIENER, 2001), e estão presentes nos hospedeiros como uma população complexa de variantes (GANDIA & DURAN-VILA, 2004).

Os citros são hospedeiros de cinco espécies de viróides (DURAN-VILA et al., 1988), que podem provocar doenças como exocorte, associada à descamação do porta-enxerto de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), *Poncirus trifoliata* e híbridos, e cachexia ou xiloporose que se relacionam a caneluras no tronco de lima doce da Palestina (*Citrus limettioides* Tanaka), usado como porta-enxerto, e caneluras na face do câmbio do tronco e projeções na casca com fortes impregnações de goma em espécies sensíveis como o tangelo Orlando (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) (MÜLLER et al., 2005).

Os viróides encontrados nos citros, de acordo com a reação em plantas indicadoras e por caracterização molecular, são, atualmente, classificados como: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), também conhecido como CVd-I), *Hop stunt viroid* (HSVd, também conhecido como CVd-II), *Citrus viroid* III (CVd-III) e *Citrus viroid* IV (CVd-IV) (DURAN-VILA et al., 1988, FLORES et al., 1998; 2000; ITO et al., 2002).

O interesse no uso de viróides como potencial agente ananizantes data de mais de 30 anos (OWENS et al., 2000), e alguns trabalhos têm demonstrado que a infecção de determinadas copas enxertadas em Trifoliata com as espécies de viróides CBLVd, CVd-IIa (variante não patogênico) ou CVd-III resulta em plantas menores e com boa produção de frutos (OWENS et al., 2000). Atenção especial vem sendo dada a viróides da espécie CVd-III como agentes ananizantes, existindo grande interesse em selecionar variantes adaptados para usar em determinadas plantas (OWENS et al., 2000).

Na região da Holambra, existe uma grande área plantada de Tahiti Quebra-Galho, com árvores apresentando diferentes níveis de sintomas associados com CEVd. Em alguns casos, as plantas são muito irregulares e, em outros, mais ou menos homogêneas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as espécies de viróides presentes em plantas desses pomares, por meio de indexação biológica em cidra Etrog e hibridização de impressões de tecidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Fontes de viróides.** Coletaram-se borbulhas de 10 plantas uniformes e representativas dos talhões de lima ácida Tahiti clone Quebra-Galho em 6 propriedades (A, B, C, D, E, F) do município de Holambra (SP) (Tabela 1). A indexação biológica em cidra Etrog (*Citrus medica* Linnaeu x L.) efetuou-se no Centro APTA Citros Sylvio Moreira e, após 5 meses da enxertia, coletou-se material para hibridização de impressões de tecidos.

**Indexação Biológica.** Enxertaram-se borbulhas de cada quadrante das 10 plantas em 3 plântulas de limão Cravo de 4 meses de idade mantendo-as em vasos com substrato, sob casa de vegetação. Utilizaram-se duas borbulhas da planta fonte de inóculo por plântula, com 3 repetições. Ao mesmo tempo, enxertou-se uma borbulha de cidra Etrog 861 S1 sadia em cada plântula, acima das duas borbulhas fontes de inóculo. Os sintomas de CEVd, caracterizados pela ocorrência de epinastia foliar, foram observados nas brotações de cidra.

Tabela 1. Características gerais (idade, porte, presença de sintomas e porta-enxertos utilizados) das plantas de lima ácida Tahiti Quebra-Galho selecionadas de diferentes propriedades no município de Holambra, (SP)

| Propriedade/<br>Amostra <sup>1</sup> | Porta-enxerto               | Idade<br>(anos) | Planta ou<br>amostra | Características da planta  |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------|--|
| 1A                                   | Trifoliata                  | 7               | 1                    | Tamanho muito maior em relação ao restante do talhão Sem sintomas e aparentemente livre de CEVd. |
| 2A                                   | Trifoliata                  | 7               | 2                    | Acentuado sintoma de CEVd (descamamento) no tronco do porta-enxerto. Excelente rendimento.       |
| 3B                                   | Trifoliata<br>Flying Dragon | 7               | 3                    | Porte pequeno, mais ou menos 1,5 m, sem sintomas de descamamento no porta-enxerto.               |
| 4B                                   | Trifoliata<br>Flying Dragon | 7               | 4                    | Sintomas típicos daqueles causados pelo CEVd na copa e porta-enxerto.                            |
| 5C                                   | Cravo                       | 8               | 5                    | Porte grande (3m), sem sintomas de exocorte. Não é proveniente de um bom pomar                   |
| 6D                                   | Cravo                       | 10              | 6                    | Porte grande (4m), sem sintoma de viróides   |
| 7D                                   | Trifoliata                  | 10              | 7                    | Rachaduras nos ramos da copa e pouco descamamento no porta-enxerto, com bom rendimento.          |
| 8E                                   | Cravo                       | 9               | 8                    | Muito vigorosa, apresentando poucos sintomas.  |
| 9F                                   | Trifoliata<br>Flying Dragon | 9               | 9                    | Poucos sintomas na copa e nenhum no porta-enxerto  |
| 10F                                  | Trifoliata<br>Flying Dragon | 9               | 10                   | Abundantes sintomas de viróides, boa produção, limões verde-escuros, sem manchas.                |

<sup>1</sup> As letras indicam as propriedades e, os números, as amostras coletadas nas propriedades.

**Síntese de sondas marcadas com digoxigenina (DIG).** Obtiveram-se tais sondas por PCR, usando como molde DNA de plasmídeos contendo o genoma completo das espécies de viróides CEVd, CVd-II e CVd-III, e mistura de dNTPs do DIG DNA Labeling and Detection Kit – Roche (TARGON et al., 2001; 2005). A Tabela 2 apresenta as seqüências dos *primers* utilizados.

Tabela 2. Sequência dos *primers* complementares e homólogos

| Viróide | <i>Primers</i> <sup>1</sup> | Seqüência                        |
|---------|-----------------------------|----------------------------------|
| CEVd    | Complementar (CEVd-c)       | 5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3'         |
|         | Homólogo (CEVd-h)           | 5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3'        |
| CVd-II  | Complementar (CVd-II-c)     | 5'-GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG-3' |
|         | Homólogo (CVd-II-h)         | 5'-CGCCCCGGGGCAACTTCTCAGAATCC-3' |
| CVd-III | Complementar (CVd-III-c)    | 5'-TTCGTCGACGACGACAGGTA-3'       |
|         | Homólogo (CVd-III-h)        | 5'-GGCAGCTAAGTTGGTGACGC-3'       |

<sup>1</sup> Os *primers* de CEVd são complementares e homólogos aos nucleotídeos 81-98 e 99-117 respectivamente do CEVd-C (GROSS et al., 1982). Os primers do CVd-II são complementares e homólogos aos nucleotídeos 60-85 e 78-102, respectivamente, do HSVd (OHNO et al., 1983) com a modificação descrita por ASTRUC et al. (1996). Os primers do CV-III são complementares e homólogos aos nucleotídeos 76-95 e 96-115, respectivamente, do CV-IIIb (RAKOWSKI et al., 1994).

**Hibridizações de impressões de tecidos.** Brotações das plantas de interesse foram coletadas, cortadas longitudinalmente e firmemente pressionadas na superfície de membranas Hybond-N (Amersham Biosciences). Efetuaram-se duas impressões de cada amostra. As amostras foram fixadas nas membranas durante 1 min sob luz UV, no aparato CL-1000 *Ultraviolet crosslinker UVP*. Antes da hibridização, incubaram-se as membranas por 5 min em solução contendo mercaptoetanol a 2M e, em seguida, lavaram-nas duas vezes com água destilada para evitar *background* (PALÁCIO et al., 2000). A pré-hibridização e a hibridização foram feitas em 50% formamida e 6x SSCP, a 50°C (SAMBROOK et al., 1989). Após a hibridização, lavaram-se as membranas duas vezes por 15 min em 2x SSC; 0,1% SDS, à temperatura ambiente, e duas vezes por 60 min em 0,1x SSC; 0,1% SDS, a 60°C. Efetuou-se detecção com uma diluição 1:200 do substrato quimioluminescente CSPD, de acordo com as instruções da Roche para o *DIG DNA labeling and detection kit*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da indexação biológica em cidra Etrog são apresentados na Tabela 3. As amostras 1, 3, 8 e 9 não induziram, nessa indicadora, os sintomas de epinastia foliar, típicos de viróides (ROISTACHER, 1991). Os resultados da indexação molecular através de hibridização de impressões de tecidos com sondas específicas das espécies de viroides encontram-se na Tabela 3 e na Figura 1. Em todas as hibridizações, utilizaram-se controles positivos e negativos (dados não apresentados). Observaram-se diferenças na intensidade do sinal de hibridização entre as amostras, entre amostras da mesma propriedade, e entre as espécies de viróides presentes na mesma planta. Em todas as plantas, detectou-se o CEVd, sendo o sinal de hibridização bem mais fraco nas amostras 1, 3, 8 e 9 (Figura 1), indicando, provavelmente, menor concentração dessa espécie de viróide. O resultado negativo dessas amostras na indexação biológica pode ser devido à baixa concentração e/ou a um variante do CEVd que não induz sintomas de epinastia foliar em cidra, mas que se pode detectar por meio de indexação molecular.

CVd-II somente não foi detectado nas amostras 4 e 5, sendo a intensidade do sinal semelhante nas outras. A espécie CVd-III só não foi detectada na amostra 5, e o sinal foi muito fraco nas amostras 1, 2 e 3 (Figura 1).

Fazendo uma comparação entre as amostras 1 e 2, da mesma propriedade, e sendo a amostra 1 considerada escape, uma vez que seu porte era muito maior quando comparada às demais plantas do talhão (v. descrição na Tabela 1) e a 2, considerada representativa do talhão, pode-se verificar que a indexação biológica foi negativa para a amostra 1 e positiva para a 2. O sinal de hibridização com a sonda de CEVd foi bem fraco na amostra 1 e muito forte na 2, o que indica que a concentração de CEVd na 2 é muito maior que na 1. Esses resultados são coerentes com as observações feitas em campo e com a indexação biológica.

A presença indesejável de rachaduras no porta-enxerto, sintomas típicos de exocorte, esteve associada à maior concentração de CEVd nas amostras 2A, 4B e 7D. Nota-se, entretanto, que todas essas plantas estavam enxertadas sobre *Trifoliata*, variedade suscetível à exocorte (MÜLLER, et al, 2005).

Tabela 3. Resultados da Indexação Biológica e molecular realizada com plantas de lima ácida Tahiti Quebra-Galho provenientes de seis propriedades do município de Holambra-(SP)

| Propriedade/<br>Amostra <sup>1</sup> | Indexação<br>Biológica <sup>2</sup> | Indexação Molecular <sup>3</sup> |        |         |
|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------|---------|
|                                      |                                     | CEVd                             | CVd-II | CVd-III |
| 1A                                   | -                                   | +                                | +      | +       |
| 2A                                   | +                                   | ++                               | +      | +       |
| 3B                                   | -                                   | +                                | +      | +       |
| 4B                                   | +                                   | ++                               | -      | ++      |
| 5C                                   | +                                   | ++                               | -      | -       |
| 6D                                   | +                                   | ++                               | +      | ++      |
| 7D                                   | +                                   | ++                               | +      | ++      |
| 8E                                   | -                                   | +                                | +      | ++      |
| 9F                                   | -                                   | +                                | +      | ++      |
| 10F                                  | +                                   | ++                               | +      | ++      |

<sup>1</sup> As letras indicam as propriedades e, os números, as amostras coletadas nas propriedades.

<sup>2</sup> Teste realizado utilizando-se Cidra Etrog como indicadora. + presença de epinastia; - ausência de epinastia.

<sup>3</sup> Hibridização de impressões de tecidos com sondas marcadas com digoxigenina, específicas para as espécies de viróides CEVd, CVd-II e CVd-III. - não hibridizou; + hibridizou com sinal fraco; ++ hibridizou com sinal forte.

Das plantas selecionadas, a que apresentava características agrônômicas mais desejáveis era a amostra número 3, com porte pequeno e sem sintomas de descamamento no porta-enxerto. Nessa planta, as três espécies de viróides estão presentes e a concentração de CEVd parece ser menor, em vista do sinal de hibridização mais fraco. Apesar de maior concentração de CEVd, as três espécies de viróides estão também presentes na planta correspondente à amostra 8, que, mesmo apresentando rachaduras nos ramos da copa, mostrou pouco descamamento no porta-enxerto e bom rendimento. Todas as outras plantas amostradas foram consideradas produtivas, com exceção da número 5, proveniente de pomar uniforme, porém com plantas subdesenvolvidas para a idade (8 anos), o que pode estar relacionado ao solo, de baixa fertilidade natural (podzolizado com horizonte B argiloso, ácido e com alta saturação de alumínio). Nesta planta, somente o CEVd foi detectado.



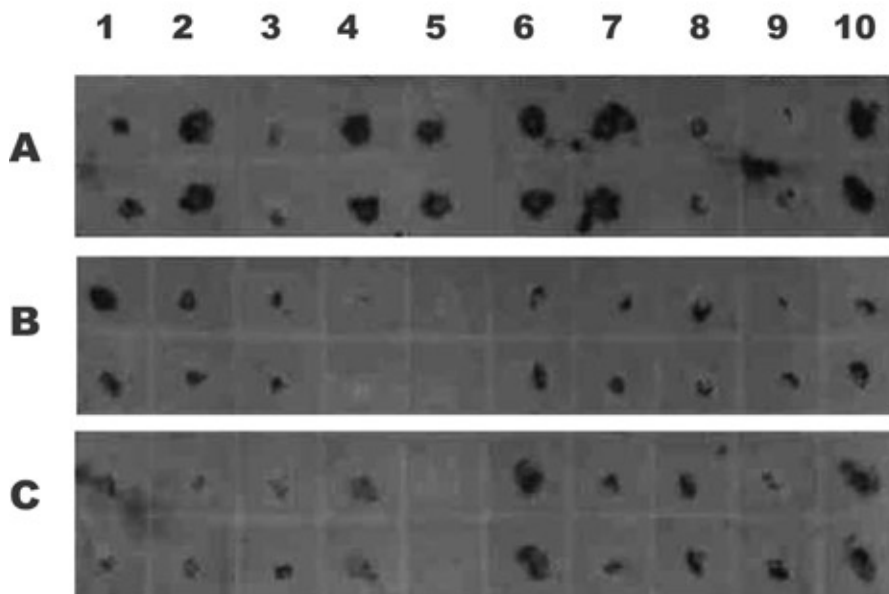


Figura 1. Indexação molecular com a técnica de hibridização de impressões de tecidos com sondas marcadas, específicas para as espécies CEVd (A), CVd-II (B) e CVd-III (C). 1 a 10. Amostras 1A, 2A, 3B, 4B, 5C, 6D, 7D, 8E, 9F e 10F respectivamente. Efetuaram-se duas impressões de cada amostra.

A variação na presença ou não das espécies de viróides nas plantas, bem como diferenças na concentração, indicam a provável existência de um balanceamento dessas espécies de viróides que depende da combinação copa/porta-enxerto e das condições edafoclimáticas do local.

A seleção de variantes de interesse, como 1A e 9F, com poucos sintomas de rachaduras, mesmo enxertadas em Trifoliata ou Trifoliata Flying Dragon, porta-enxertos tidos como suscetíveis à exocorte, é muito importante. Essas estirpes menos agressivas de viróides poderão ser utilizadas em programas subsequentes de preimunização, visando à obtenção de plantas de Tahiti com características agrônomicas mais desejáveis e menos sujeitas à exocorte. Neste trabalho, a integração das observações de campo com as análises das indexações molecular e biológica mostrou-se uma estratégia muito interessante, de fácil exequibilidade e com resultados práticos promissores.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com recursos da FAPESP para M.L.P.N. Targon, Processo 99/03510-0.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTRUC, N.; MARCOS, J.F.; MACQUAIRE, G.; CANDRESSE, T. & PALLÁS, V. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.837-846, 1996.
- DIENER, T.O. **The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? Advances in Virus Research**, v.57, p.137-184, 2001.
- DURAN-VILA, N. & ROISTACHER, C.N.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. & SEMANCICK, J.S. A definition of citrus viroid groups and their relationship to exocortis disease. **Journal of General Virology**, v.69, p.3069-3080, 1988.
- FLORES, R.; RANGLES, J.W.; BAR-JOSEPH, M. & DIENER, T.O. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. **Archives of Virology**, v.143, p.623-629, 1998.
- FLORES, R.; RANGLES, J.W.; BAR-JOSEPH, M. & DIENER, T.O. Subviral agents: Viroids. In: VAN REGENMORTEL M.H.V.; FAUQUET C.M.; BISHOP D.H.L.; CARSTENS E.B.; ESTES M.K.; LEMON S.M.; MCGEOCH D.J.; MANILOFF J.; MAYO M.A.; PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (Eds), **Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000, p 1.009-1.024.
- GANDÍA, M. & DURAN-VILA, N. Variability of the progeny of a sequence variant of *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd). **Archives of Virology**, v.149, p.407-416, 2004.
- GIRALDO, J.A.C. **Distribuição do viróide da exocorte em plantas de limão Tahiti, *Citrus latifolia* Tanaka**. 1990. 87p. (Mestrado em Agronomia). UNESP - Faculdade de Ciências Agrônomicas do Campus de Botucatu, Botucatu.
- GROSS H.J.; KRUPP G.; DOMDEY H.; RABA M.; JANK P.; LOSSOW C.; ALBERTY H.; RAMM K. & SÄNGER H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. **European Journal of Biochemistry**, v.121, p.249-257, 1982.
- ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K.; IWANAMI, T.; NAKAHARA, K.; HATAYA, T.; ITO, T.; ISAKA, M. & KANO, T. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. **Phytopathology**, v.92, p. 542-547, 2002.

- LUCHETTI, M.A.; MATTOS Jr, D.; DE NEGRI, J.D. & FIGUEIREDO, J.O. Aspectos gerais e distribuição de cultivo. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI; FIGUEIREDO, J.O. (Ed). **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. p.1-12.
- MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A. & RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JR, D. et al. **Citros**. Campinas, Instituto Agrônômico/Fundag, 2005. Cap. 19, p. 567-604.
- OHNO, T.; TAKAMATSU, N.; MESHI, T. & OKADA, Y. Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.6158-6197, 1983.
- OWENS, R.A.; THOMPSON, S.M.; FELDSTEIN, P.A. & GARNSEY, S.M. Effects of sequence variation on symptom induction by citrus viroid III. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, 1998. Campinas. **Proceedings...** Riverside: IOCV, Univ. California Press, 2000 p.257-264.
- PALACIO, A.; FOISSAC, X.; DURAN-VILA, N. Indexing of citrus viroids by Imprint Hybridization: Comparison with other detection methods. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, 1998. Campinas. **Proceedings...** Riverside: IOCV, Univ. California Press, 2000. p.294-301.
- RAKOWSKI, A.G.; SZYCHOWSKI, J.A.; AVENA, Z.S. & SEMANCIK, J.S. Nucleotide sequence and structural features of the Group III citrus viroids. **Journal of General Virology**, v.75, p.3581-3584, 1994.
- ROISTACHER, C.N. **Graft-transmissible diseases of citrus**: handbook for detection and diagnosis. Roma: International Organization of Citrus Virologists/FAO, 1991. 266p.
- SAMBROOK, B.; FRITSH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; STUCHI, E.S.; SOUZA, J.M.; MÜLLER, G.W.; BORGES, K.M. & MACHADO, M. A. Técnicas de hibridização para indexação de viróides de citros no Estado de São Paulo, Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 1, p. 25-38, 2005.
- TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, S.A.; MULLER, G.W. & STUCHI, E.S. Diagnóstico molecular na detecção de viróides em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 243-257, 2001.