

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

Viroides em Citros no Estado do Rio de Janeiro

Jocarstea Aparecida Brinati Leone

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

VIROIDES EM CITROS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

JOCARSTEA APARECIDA BRINATI LEONE

Sob a orientação do Professor Dr.
Paulo Sérgio Torres Brioso

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitossanidade Aplicada.

Seropédica, RJ
Maio de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L583v Leone, Jocarstea Aparecida Brinati , 04/04/1988-
Viroides em Citros no Estado do Rio de Janeiro /
Jocarstea Aparecida Brinati Leone. - Carangola/MG,
2019.
70 f.: il.

Orientadora: Paulo Sérgio Torres Briosso.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Fitossanidade e
Biotecnologia Aplicada, 2019.

1. Fitopatógenos. 2. Detecção. 3. Reverse
Transcriptase-PCR. I. Briosso, Paulo Sérgio Torres,
01/04/1956-, orient. II Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Fitossanidade e
Biotecnologia Aplicada III. Título.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

JOCARSTEA APARECIDA BRINATI LEONE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de Concentração em Fitopatologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso. UFRJ
(Orientador)

Dr^a. Eliana Borges Rivas. Instituto Biológico de São Paulo

Dr. Fábio Souto de Almeida. UFRRJ

Dedico

A Deus,

A minha mãe Eliana Brinati.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por minha vida, por ter me dado forças e sabedoria para poder alcançar meus objetivos, foi e é o meu sustento. A minha mãe Eliana Brinati, minha rainha, minha base, meu tudo, obrigada por me incentivar, puxar minha orelha quando foi preciso, por me apoiar e não medir esforços por mim para que eu pudesse realizar o meu sonho acadêmico.

As minhas avós Maria da Penha Brinati e Terezinha Rocha Leone, pelo carinho, amor e oração, ao meu Tio Alessandro Brinati e sua família pelo apoio, a minha irmã Karstea Brinati e as minhas sobrinhas Ayana Brinati e Ana Julia Brinati por confiar em mim.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela chance de estudar nesse lugar incrível, onde tive a minha formação acadêmica e de vida, ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde pela oportunidade e através do Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada (PPGFBA) pelo qual pude fazer parte, me tornando mestre.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o meu mestrado.

Ao meu orientador Paulo Sérgio Torres Briosso pela oportunidade de fazer parte do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F), por todo conhecimento adquirido ao longo do meu mestrado, pela paciência, compreensão e oportunidade, gratidão eterna.

Aos meus amigos que a UFRRJ me deu, em especial a Amanda Souza (Pi), a Jéssica Leal (Jhessica), Thayane Aguiar (Migs), Ricardo César (Ricarditto), Layzza Rocha (Layzzinha), obrigada por tudo, vivemos momentos inesquecíveis. A Roberta Coura, que mesmo distante sempre me ajudou, aos meus amigos do setor de Horticultura da UFRRJ, pelo amor e Orações na Cisterna. A Família L.O.D.F Savana Lemes, Thais Paula, Douglas Proque, Tuany Candida, Natalia Roque, Jennifer Ariane Alves, Ana Claudia Almeida, Eduarda Cardoso, Gabriel Bernabé, Lidiane Pedro por todo apoio, ajuda com meu experimento, por estarem sempre ao meu lado me fazendo sorrir em todos os momentos. A Etiene por ser como uma mãe, me ajudando sempre, amo vocês.

A Natali Ribeiro por toda força e consideração. Ao Jorge Ferreira da EMATER/RJ por me ajudar com as visitas nas propriedades, ao Dr. André Santos da UFRJ por transmitir seus conhecimentos na parte de genética. A Dra. Regina Melo Sartori Coelho e a todos da LANAGRO-GO pela grande contribuição e aprendizado. Aos amigos que fiz em Seropédica.

Aos professores por todo conhecimento passado durante esses dois anos.

A toda equipe do PPGFBA e a todos os funcionários do setor de Fitopatologia.

A todas as pessoas que acreditaram em mim, que eu pudesse ir mais longe.

Muito Obrigada!

RESUMO

LEONE, Jocarstea Aparecida Brinati. **Viroides em citros no estado do Rio de Janeiro**. 2019. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Os viroides infectam plantas de grande importância econômica como os citros. Objetivando detectar a presença de viroides através de métodos moleculares em árvores cítricas, cinco propriedades em Araruama, no Estado do Rio de Janeiro foram avaliadas. Vinte e duas amostras foram coletadas a partir de plantas com nanismo, rachadura no tronco e epinastia, sendo realizada a extração de RNA das folhas e empregado a técnica de RT-PCR com *primers* específicos para cinco espécies de viroide que infectam citros. O resultado da eletroforese em gel de agarose mostrou-se positivo para os viroides *Citrus exocortis viroid* (CEVd); *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd); *Hop stunt viroid* (HSVd) e *Citrus viroid* III (CVd-III), sendo o último encontrado em todas as propriedades e na combinação com outros viroides, o HSVd e CBLVd estavam presentes em duas propriedades e o CEVd isoladamente em apenas uma propriedade. Não foi detectada a presença do *Citrus viroid* IV (CVd-IV) nas amostras avaliadas. Foram observadas diferenças na expressão dos sintomas associados ao CEVd o que pode ter ocorrido devido a interferências entre as espécies de viroides que infectavam uma mesma planta. A transmissão pode ter sido mecanicamente através da poda das plantas cítricas ou através de mudas infectadas com viroide. A utilização de métodos moleculares mostrou-se eficiente na identificação da presença de viroides em plantas cítricas no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Fitopatógenos. Detecção. Reverse Transcriptase-PCR.

ABSTRACT

LEONE, Jocarstea Aparecida Brinati. **Viroids in citros in the state of Rio de Janeiro**. 70 p. Dissertation (Master in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biological Sciences and Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

Viroids infect plants of great economic importance such as citrus. In order to detect the presence of viroids by molecular methods in citrus trees, five properties in Araruama, State of Rio de Janeiro were evaluated. Twenty-two samples were collected from plants with dwarfism, trunk cracking and epinastia. RNA was extracted from the leaves and the RT-PCR technique was used with specific primers for five citrus-infected viroids. The result of agarose gel electrophoresis was positive for Citrus exocortis viroid (CEVd); Citrus bent leaf viroid (CBLVd); Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus viroid III (CVd-III), the latter being found in all properties and in combination with other viroids, HSVd and CBLVd were present in two properties, and CEVd alone in only one property. Citrus viroid IV (CVd-IV) was not detected in the evaluated samples. Differences in the expression of CEVd-associated symptoms were observed, which may have occurred due to interference between the viroid species that infected the same plant. Transmission may have been mechanically through pruning of citrus plants or through viroid-infected seedlings. The use of molecular methods was efficient in identifying the presence of viroids in citrus plants in the state of Rio de Janeiro.

Keywords: Phytopathogens. Detection. Reverse Trascriptase-PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Citricultura	3
3.2 Histórico: Porta-enxerto de Citros.....	4
3.3 Características do porta-enxerto.....	5
3.4 Variedades de porta-enxertos de Citros	6
3.4.1 Limão ‘Cravo’ (<i>Citrus limonia</i> L. Osbeck).....	6
3.4.2 Citrumelo ‘Swingle’ (<i>Citrus paradisi</i> Macfad x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.)	6
3.5 Características gerais dos Viroides e taxonomia	7
3.6 Transmissão dos viroides	11
3.7 Sintomas de viroides em plantas	11
3.8 Viroides em Citros	12
3.8.1 <i>Citrus exocort viroid</i> (CEVd).....	12
3.8.2 <i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	12
3.8.3 <i>Citrus Bent leaf viroid</i> (CBLVd)	13
3.8.4 <i>Citrus viroid-III</i> (CVd-III).....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Local do experimento e coleta das amostras	14
4.2 Inoculação Mecânica	15

4.3 Extração de RNA	16
4.4 Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	17
4.5 Eletroforese	18
4.6 Sequenciamento	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Coleta das Amostras e Extração de RNA	21
5.2 Análise das Sequências.....	32
6 CONCLUSÃO.....	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8 ANEXOS	47
Protótipo de Kit diagnóstico de <i>Hop stunt viroid</i>	47
KIT HSVIROIDE.....	47
- O teste pode detectar isolados do viróide citado que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as seqüências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (NCBI - <i>National Center for Biotechnology Information</i>, EMBL - <i>European Molecular Biology Laboratory</i>).	52

LISTA DE FIGURA

- Figura 1. Representação esquemática das estruturas secundárias do RNA genômico dos viroides das famílias Pospiviroidae e Avsunviroidae. (A) Família Pospiviroidae, com os domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e 8
- Figura 2. Plantas cítricas enxertadas com Limão ‘Cravo’, com suspeita da presença de viroides, pertencente a amostra da planta da propriedade 1 na região de Araruama (RJ). Em A e B, as plantas apresentam rachaduras no tronco, sintoma típico da doença. Na figura C observa-se que as folhas apresentam descoloração e epinastia, na figura D as árvores de citrus apresentavam nanismo. Fotos: Jocarstea A.B. Leone. 24
- Figura 3. Sintomas de rachaduras forte em Limão ‘Cravo’ da propriedade 3 da região de Araruama (RJ). Figura A, mostra as rachaduras espalhadas por todo o tronco. Na imagem B, é possível observar o tamanho da fenda, característica essa de infecção ocasionada por viróide. Foto: Jocarstea A. B. Leone..... 25
- Figura 4. Na imagem A, representa a planta da propriedade 2, onde se observa um sintoma de rachadura menor, e na Figura B, sintomas fracos de epinastia nas folhas, onde foi encontrado o viroide CVD-III. Na Figura C, sintomas médios de rachaduras nos troncos, representando a propriedade 4, na figura D, sintomas fracos, quase imperceptíveis de rachaduras na propriedade 5, positivo para viróide. Foto: Jocarstea A. B. Leone. 26
- Figura 5. Imagem de planta cítrica enxertada com Limão-cravo da propriedade 5 no Município de Araruama (RJ,) árvore sem sintomas aparente de doenças ocasionadas por viroide. Foto: Jocarstea A. B. Leone. 27
- Figura 6. CVd-III. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CVd-III (269 pb). Amostra de folhas de citros das propriedades 1, 2, 3, 4, 5 identificadas no gel pelas letras em sequência A, B, C, D, E e F, sendo a letra F referente também a propriedade 1. M- marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher), na faixa identificada pela letra U está o *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em A, B, C, D, E – *amplicon* de 269 pb. 28

Figura 7. HSVd. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para HSVd (302 pb). Amostras de folhas de citros das propriedades 1, 2, 3, 4, 5 identificadas no gel pelas letras em sequência A, B, C, D, E e F, sendo a letra F referente também a propriedade M- marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher), na faixa identificada pela letra U está o *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em A, C – *amplicon* de 302 pb, representando as propriedades 1 e 3.28

Figura 8. CBLVd. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 2 representada pela letra A; 3 = B, 4 = C, 5 = D, 2 = E e 3 = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb, representando as propriedades 3 e 5.29

Figura 9. CBLVd. Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 3 a amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B, 16 = C, 17 = D, 18 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U - *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb..... 30

Figura 10. CBLVd. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 3 e 5. A amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B; 16 = C; 21= D; 22 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U - *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb, representando as propriedades 3 e 5.....31

Figura 11. CEVd. Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CEVd (371 pb). Amostras de citros da propriedade 3. A amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B, 16 = C, 17 = D, 18 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA

Ladder, Thermo Fisher).U - <i>amplicon</i> (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – <i>amplicon</i> de 371 pb.....	32
Figura 12. Sequência nucleotídica oriunda do sequenciamento de amostra pertencente a propriedade 1. A marca em vermelho representa o <i>Primer R – Primer Reverse</i> e em verde o primer F- <i>Primer Forward</i>	33
Figura 13. Sequência genômica do viroide HSVd isolado PTZ57R/T.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxonomia dos Viroides.....	10
Tabela 2. Informações sobre as amostras coletadas no Município de Araruama/RJ	15
Tabela 3. Componentes da reação de RT-PCR e volumes utilizados no preparo do Mix.....	17
Tabela 4. Primers utilizados na reação de RT-PCR	17
Tabela 5. Dados gerais das propriedades estudadas da Região de Araruama/RJ e resultados encontrados	20
Tabela 6. Panorama dos viroides encontrados em plantas de citros em de limão da região de Araruama/RJ.....	23

1 INTRODUÇÃO

A citricultura tem um grande destaque no Brasil, além de ser considerado o maior produtor mundial de suco de laranja, o país exporta cerca de 98% da sua produção de laranja (NEVES, 2010). A produção média em 2018 foi de aproximadamente 17.100.491 toneladas (IBGE, 2018), sendo os principais estados produtores Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (IBGE, 2017). No Rio de Janeiro, Araruama e Rio Bonito são consideradas as regiões com maior de produção de frutas cítricas, entre elas laranja, limão, tangerina e tangerina poncã (EMATER-RIO/ASPA 2017).

Entre os fatores que mantém a citricultura competitiva no país estão o desenvolvimento de tecnologias, como densidade de plantas por hectare, mudas de melhor qualidade, variedades mais bem adaptadas e melhores combinações de porta-enxertos. Os porta-enxertos influenciam em diversas características das plantas como os níveis de sólidos solúveis totais, tamanho da copa e do fruto, resistências a agentes causadores de doenças e ao frio, dentre outras (POMPEU JUNIOR, 2005).

Dentre os porta-enxertos o limão cravo é o mais utilizado no Brasil (SCHÄFER *et al.*, 2001), devido a facilidade de produção de mudas, compatibilidade com diversas cultivares de copas, resistência a seca, resistência ao vírus causador da tristeza dos citros e resistência mediana a gomose (*Phytophthora* sp.), porém é suscetível a morte súbita dos citros (MSC), ao exocorte (*Citrus exocort viroid*) e a xiloprose (*Hop stunt viroid*) (POMPEU JUNIOR *et al.*, 2002, 2003,2005.). Depois do limão ‘Cravo’ o Citrumelo é o segundo porta-enxerto mais utilizado, pois possui resistência a alguns agentes de doenças como o vírus da tristeza dos citros, MSC, a *Phytophthora* sp. da gomose, ao viróide da exocorte e da xiloprose e a nematoides (DANTAS, 2009; LIBERATO *et al.*, 2013; BASTOS *et al.*, 2014).

A utilização de porta-enxertos possibilitou combater fatores abióticos e bióticos e assim alcançar ganhos na produtividade, porém, foi responsável por grandes problemas fitossanitários na citricultura como a gomose, tristeza, declínio e morte-súbita dos citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

Entre os microrganismos que causam danos a citricultura estão os viroides. Eles são os menores fitopatogénos conhecidos, com genoma de RNA de fita simples, circular, com forte estrutura secundária, compreendendo entre 246 a 401 nucleotídeos, sem cápsula proteica e

dependendo da célula hospedeira para a sua replicação. Seu genoma, quando comparado a de um vírus, é pelo menos, dez vezes menor (DIENER, 1996; FLORES *et al.* 2005; EIRAS *et al.*, 2006).

Os viroides estão classificados em duas famílias, oito gêneros 32 espécies e diversas variantes de sequência de acordo com as características biológicas e moleculares (Tabela 1.) (ICTV, 2018).

Os viroides podem causar sintomas em plantas cítricas como malformações nas folhas, epinastia, rugosidade, lesões cloróticas e necróticas, rachaduras no caule, exsudação de goma, ser capaz de induzir nanismo na planta, definhamento da copa, amarelecimento, entre outros, em casos mais extremos pode levar a morte da planta. Em alguns eventos acontece a ausência de sintomas. Os viroides não possuem vetores e dificilmente são transmitidos por pólen e sementes, mas podem ser transmitidos mecanicamente com muita facilidade e por instrumentos de poda contaminados. O intercâmbio de material propagativo é a principal via de disseminação (FLORES & DURAN-VILA, 1996; EIRAS *et al.*, 2009, BRIOSO & POZZER, 2013).

Em regiões de clima quente a diversidade de viroides pode ser superior, pois se replicam com maior eficiência. Portanto, plantas que são originárias de climas temperados e cultivadas em condições tropicais e subtropicais, também podem ser hospedeiras de novos viroides (SIGH *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2005; EIRAS EIRAS *et al.*, 2006;).

Os citros naturalmente podem ser hospedeiros de, pelo menos, sete espécies de viroides dentre eles: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus bark cracking* (CBCVd), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Citrus Viroid-V* (CVd-V) e *Citrus viroid-VI* (CVd-VI). Estes viroides ocorrem em infecções simples ou mistas e, com isso, pode existir interferências e sinergismos entres eles (GARNSEY & RANGLES, 1987; DURAN-VILA *et al.*, 1988; ITO *et al.*, 2002; HASHEMIAN, 2009; EBRAHIMI-MOGHADAM, 2018).

Ainda são poucas as pesquisas com relação a diversidade genética de viroide para a criação de métodos de identificação e controle desse patógeno em citros e em outras culturas de importância econômica (BARTOLINI & SALAZAR, 2003; EIRAS *et al.*, 2006; GOBATTO, 2013).

No Estado do Rio de Janeiro, até o momento não existem pesquisas ou levantamentos de viroides em citros.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Realizar um levantamento e identificar os viroides em citros na cidade de Araruama no estado do Rio de Janeiro e propor estratégias de controle.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar através de métodos moleculares viroides associados a cultura dos citros;
- Produzir insumos básicos como fragmentos genômicos amplificados, primers específicos e kit de diagnóstico molecular para viroides através de processos biotecnológicos;
- Sequenciar viroides obtidos ou de estirpes já conhecidas e identificadas;
- Distinguir das cinco propriedades avaliadas, os viroides presentes;
- Traçar o panorama quanto à presença de viroides nas cinco propriedades produtoras de citros avaliadas;
- Propor métodos de controle da doença e realizar trabalho de conscientização dos produtores da região de Araruama, quanto a presença do patógeno.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Citricultura

Citros são considerados originários das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia. As plantas cítricas pertencem ao gênero *Citrus* da família Rutaceae, no qual, estão incluídos as laranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus deliciosa* Tenore), limões [*Citrus limon* (L.) Osbeck], limas ácidas Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) e Galego e [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle], lima da Pérsia (*Citrus limettioides* Tanaka), Pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) cidra (*Citrus medica* L.), laranja azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] (JUNIOR *et al.*, 2005).

As primeiras sementes de laranjas foram introduzidas no Brasil pelos portugueses nos estados da Bahia e São Paulo, entre 1530 e 1540. As plantas tiveram bom desenvolvimento

devido às condições ecológicas favoráveis e a boa adaptação da planta, produzindo uma variedade chamada de 'Bahia'. A laranja 'Bahia' foi reconhecida, ainda no Brasil colônia, como uma das melhores, com mais suco e com qualidade melhor do que as que eram produzidos em Portugal (EMBRAPA, 2003).

A partir de 1930, ocorreu a implantação comercial da citricultura nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, sendo os estados do Sudeste e do Sul os que tiveram os maiores índices de desenvolvimento da cultura (EMBRAPA, 2003).

O Brasil detém a maior produção mundial de frutas cítricas, com uma área plantada estimada em 670.564 hectares e produtividade de 22.064 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2018). É o maior exportador de suco de laranja e obteve aumento na demanda internacional de 28% quando comparado ao período de 2016/ 2018 (CONAB, 2018). A concentração da cultura encontra-se na região sudeste do país, sendo os Estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo os principais produtores (IBGE, 2017). O estado de São Paulo e a região do Triângulo/Sudoeste Mineiro são os maiores produtores, em uma área de plantio de aproximadamente 465.635 hectares de citros. A estimativa de safra para estas regiões em 2018/2019 foi de 288,29 milhões de caixas (FUNDECITROS, 2018).

A citricultura brasileira tem uma grande importância no desenvolvimento socioeconômico do país, cerca de 230 mil empregos são gerados na área rural (NEVES *et al.*, 2010), além da arrecadação de impostos para o Brasil, contribuindo assim para o aumento do PIB brasileiro. A produção nacional de laranjas foi de 17.100.491 toneladas em 2018 (IBGE, 2018).

No estado do Rio de Janeiro a área total de plantação de laranja, limão, tangerina e tangerina poncã é cerca de 7.426,77 hectares, sendo os municípios de Araruama e de Rio Bonito, as regiões com maior produção (EMATER/RJ,2018).

Em 2017, a produção de frutas cítricas no Estado do Rio de Janeiro foi de 115.825,46 toneladas aproximadamente (EMATER-RIO/ASPA 2017).

3.2 Histórico: Porta-enxerto de Citros

A laranjeira 'Caipira' [*C. sinensis* (L.) Osbeck], era utilizada como porta-enxerto pelos brasileiros, no início do século XX onde ocorreram grandes perdas, consequência da suscetibilidade dos citros ao agente da gomose (*Phytophthora* spp.) e da baixa resistência a

seca. Devido a esses fatores, os produtores substituíram o porta-enxerto pela laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium* L.). Na década de 40, nove milhões de plantas cítricas existentes no Brasil estava enxertadas sobre a laranja Azeda e morreram devido a sua suscetibilidade ao vírus da tristeza que foi introduzido no país na década de 30 e disseminado pelo pulgão preto [*Toxoptera citricidus* (kirkadi)] (KIRKALDY, 1907). O limão ‘Cravo’ por apresentar bons atributos relacionados à facilidade de produção de mudas, compatibilidade com cultivares de copas existentes na época, resistência a seca e tolerância ao vírus da tristeza dos citros, passou a ser o porta-enxerto essencial e um dos mais utilizados no Brasil (POMPEU JUNIOR, 1991).

Com o surgimento do declínio dos citros na década de 70, milhões de plantas de citros enxertadas com limão ‘Cravo’ foram devastadas, ocasionando diversificação com os porta-enxertos tolerantes como a tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) e limoeiro ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.) (POMPEU JUNIOR, 2005).

Em 2001, surgiu a doença chamada Morte Súbita dos Citros (MSC) em laranjeiras ‘Valência’, relatada em municípios do Estado de Minas Gerais e de São Paulo, causando erradicação de milhões de pomares enxertados com limão ‘Cravo’ (FERNANDES & BASSANEZI, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002), com isso houve novamente a necessidade de diversificação dos porta-enxertos. Portanto, a variação de porta-enxertos é de grande importância, devido aos problemas que a citricultura brasileira vem enfrentando constantemente, com doenças que podem atingir grandes proporções e algumas combinações de copa/ porta-enxerto (POMPEU JUNIOR, 2005).

3.3 Características do porta-enxerto

A muda cítrica exerce um papel muito importante para a formação de um pomar de qualidade, sendo necessário que as mudas sejam saudáveis, vigorosas e com boa formação. As características essenciais da muda cítrica são: a origem do enxerto e do porta-enxerto e a condição do sistema radicular (LIMA, 1986).

Os porta-enxertos de citros influenciam várias características hortícolas e sanitária da cultivar e podem repercutir na aptidão do pomar em relação a produção e qualidade dos frutos (CASTLE *et al.*, 1992; SCHÄFER *et al.*, 2001).

Um porta-enxerto deve apresentar alguns atributos importantes, como a resistência a pragas e doenças; compatibilidade com as principais copas comerciais, sendo fundamental para

o sucesso do pomar ao decorrer do tempo; elevada produção de frutos e de qualidade; adaptação a diferentes condições de solo e clima; alta taxa de poliembrionia; facilidade de propagação e enxertia com as principais copas comerciais e indução de vigor do porta-enxerto à copa (CASTLE *et al.*, 1993; CARLOS *et al.*, 1997).

A escolha do porta-enxerto é tão importante quanto a da copa pois, a relação entre ambos define as características agronômicas, garantindo assim a melhor atividade da planta (BASTOS *et al.*, 2014).

3.4 Variedades de porta-enxertos de Citros

3.4.1 Limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck)

O limão ‘Cravo’ é a espécie mais empregada na citricultura brasileira (MODESTO *et al.*, 1996), pois apresenta algumas características positivas: resistência ao vírus da tristeza dos citros; resistência a seca; facilidades na obtenção de sementes; grande vigor no viveiro antes e depois da enxertia; rápido crescimento das plantas; produção precoce, compatibilidade com todas as cultivares de copas. Apresenta melhor desempenho quando plantado em solos arenosos e profundos, entre outros (POMPEU JUNIOR, 2005).

Geralmente, o limão cravo apresenta resistência média aos agentes da gomose causada, principalmente, por *Phitophthora parasítica* Dastur (= *Phytophthora nicotiane* Breda de Hann, 1896) e *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) mas é suscetível aos agentes causadores do declínio e morte súbita dos citros, a viroides que causam a exocorte e a xiloporose. Estes microrganismos patogênicos reduzem a produtividade, encareçam os tratos culturais e as colheitas, reduzem a vida útil dos pomares, refletindo negativamente na cadeia produtiva (POMPEU JUNIOR *et al.*, 2002; POMPEU JUNIOR *et al.*, 2005).

3.4.2 Citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macfad x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)

Citrumelo ‘Swingle’ é um híbrido testado como porta-enxerto e a partir da década de 40 começou a ser experimentado em variedades comerciais em alguns estados norte-americanos, como a Florida, o Texas e a Califórnia (CASTLE *et al.*, 1993; BASTOS *et.al.*, 2014). É o segundo porta-enxerto mais utilizado, perdendo apenas para o limão ‘Cravo’ (DANTAS, 2009).

O Citrumelo ‘Swingle’ foi introduzido no Brasil por possuir resistência ao vírus da tristeza dos citros, aos agentes da morte súbita dos citros, declínio e da gomose, aos viroides do exocorte e da xiloprose, aos nematoides, além de tolerância ao frio. Seu uso como porta-enxerto propicia frutos de qualidade e induz a maturação tardia dos frutos, quando comparado aos frutos do limão-cravo. Apesar de serem produtivas, as plantas que são enxertadas com citrumelo são exigentes em adubação, principalmente quanto ao potássio. (LIBERATO *et al.*, 2013; BASTOS *et al.*, 2014).

Possui incompatibilidade com algumas espécies de citros cultivadas comercialmente, como a laranja ‘Pera’, originando plantas pouco produtivas e de vida curta (MORAIS *et al.*, 2015).

3.5 Características gerais dos Viroides e taxonomia

Os viroides são considerados os menores agentes infecciosos conhecidos, possuem RNA de fita simples, circular, com estrutura secundária acentuada, sem envoltório proteico e capazes de se replicar no interior de uma célula (DIENER, 1996; EIRAS *et al.*, 2006). O tamanho do genoma pode variar entre 246 e 401 nucleotídeos, cerca de dez vezes menor que o genoma dos menores RNAs virais. Por não codificarem proteínas, são dependentes da célula hospedeira para a sua replicação, movimento e ciclo infeccioso (FLORES *et al.*, 2005; EIRAS, *et al.*, 2006).

Em 1971, foi identificado e caracterizado por Diener o primeiro viroide, o *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) e sequenciado posteriormente por Gross *et al.* (1978), causando a doença do “tubérculo afilado da batatinha”. No decorrer dos anos, outros viroides associados à doenças importantes foram identificadas em culturas como o citros causando o *Citrus exocortis viroid* (CEVd); “nanismo do crisântemo” *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd); “Cadang-cadang do coqueiro” *Coconut Cadang cadang viroid* (CCCVd) entre outros (FLORES *et al.* 2005; EIRAS, *et al.*, 2006; GOBATTO, 2013).

Os viroides CSVd, CEVd e *Coleus blumei viroid* (CBVd) foram identificados e caracterizados no Brasil, infectando de forma natural plantas como crisântemo, citros e *Coleus* respectivamente. HLVD e PSTVd foram detectados em materiais de amostras vegetais em quarentena (EIRAS, 2006). O mesmo autor destacou a ocorrência de CEVd, CVD-II e CVD-

III associados ao exocorte em citros em São Paulo e CEVd e HSVd em videiras no Rio Grande do Sul (EIRAS *et al.*, 2006).

Como já mencionado a taxonomia dos viroides se divide em duas famílias: os membros da família *Avsunviroidae* possuem genoma com estruturas secundárias bastantes ramificadas, replicação nos cloroplastos e atividades ribozimais e tem três gêneros (tabela 1.) Os membros da família *Pospiviroidae* se replicam no núcleo da célula por um mecanismo chamado círculo rolante assimétrico e não possuem atividade de ribozima, (EIRAS *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2009; OWENS *et al.*, 2011; GOBATTO, 2013).

O genoma desses viroides (figura 1.) apresentam estrutura secundária em forma de bastão com cinco domínios: C – que compreende a Região Central Conservada (CCR), P – referente a patogênese em alguns viroides; V – associado a grande variabilidade entre os viroides semelhantes, TL e TR – localizam-se nos extremos esquerdo e direito, respectivamente e, possivelmente, podem estar relacionados com a recombinação e replicação dos viroides (EIRAS *et al.*,2009; OWENS *et al.*, 2011).

O RNA dos membros da família *Avsunviroidae*, não contém CCR e se autoclivam através de ribozimas “cabeça-de-martelo” (Figura 1.) (FLORES *et al.*, 2005; EIRAS, EIRAS *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2009; GOBATTO, 2013; GIGUÈRE *et al.*, 2014, GIGUÈRE & PERREAULT, 2017).

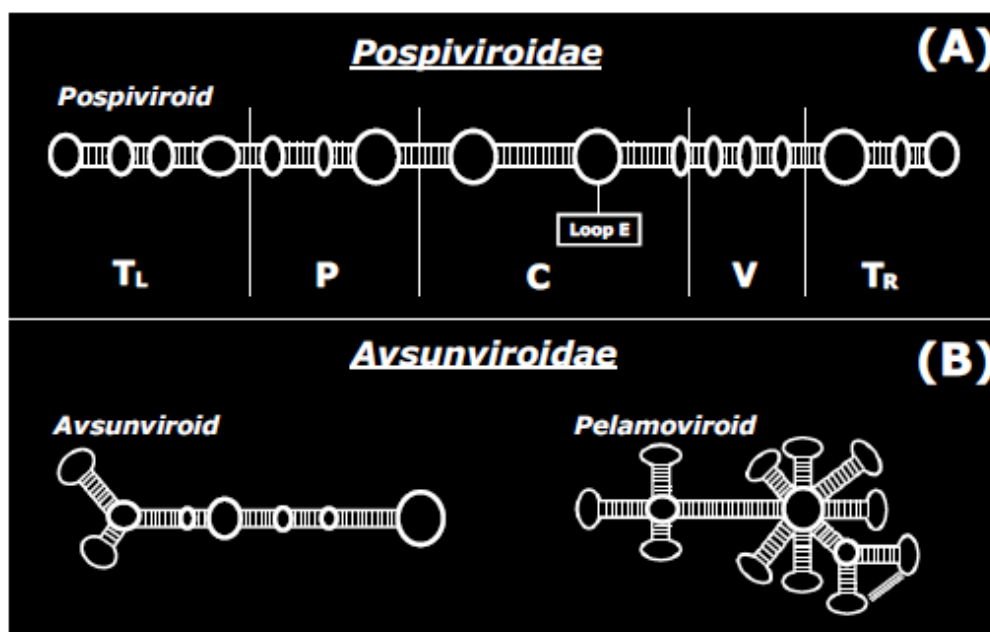


Figura 1. Representação esquemática das estruturas secundárias do RNA genômico dos viroides das famílias Pospiviroidae e Avsunviroidae. (A) Família

Pospiviroidae, com os domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e Terminal Direito (TR) incluindo o *Loop E*; (B) família *Avsunviroidae* com os Gêneros *Avsunviroid* e *Pelamoviroid*, apresentando, mutuamente conformação de “quase-bastão” altamente estruturada. Fonte: Daniella Gobatto. Figura adaptada de Eiras (2012).

Tabela 1: Taxonomia dos Viroides

Família	Gênero	Espécie	Acrônimo	Tamanho (nt)	
<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	Avocado sunblotch viroid	ASBVd	246-250	
	<i>Elaviroid</i>	Eggplant latent viroid	ELVd	332-335	
	<i>Pelamoviroid</i>	<i>Crysanthemum chlorotic mottle viroid</i>		CChMVd	398-401
		Peach latent mosaic viroid		PLMVd	335-338
	<i>Apscaviroid</i>	<i>Apple dimple fruit viroid</i>		ADFVd	306-307
		Apple scar skin viroid		ASSVd	329-330
		<i>Australian grapevine viroid</i>		AGVd	369
		<i>Citrus bent leaf viroid</i>		CBLVd	318
		<i>Citrus dwarfing viroid</i>		CDVd	294-297
		<i>Citrus viroid V</i>		CVd-V	293-294
<i>Citrus viroid VI</i>			CVd-VI	329	
<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i>			GYSVd-1	366-368	
<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i>			GYSVd-2	363	
<i>Pear blister canker viroid</i>			PBCVd	315-316	
<i>Cocadviroid</i>	<i>Citrus bark cracking viroid</i>		CBCVd	284	
	Coconut cadang-cadang viroid		CCCVd	246-301	
	<i>Coconut tinangaja viroid</i>		CTiVd	254	
	<i>Hop latent viroid</i>		HLVd	256	
<i>Pospiriviroidae</i>	<i>Coleviroid</i>	Coleus blumei viroid 1	CbVd-1	248-251	
		<i>Coleus blumei viroid 2</i>	CbVd-2	301-302	
		<i>Coleus blumei viroid 3</i>	CbVd-3	361-364	
	<i>Hostuviroid</i>	<i>Dahlia latent viroid</i>		DLVd	342
		Hop stunt viroid		HSVd	295-303
	<i>Pospiviroid</i>	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>		CSVd	354-356
		<i>Citrus exocortis viroid</i>		CEVd	368-374
		<i>Columnnea latent viroid</i>		CLVd	370-375
		<i>Iresine viroid 1</i>		IrVd-1	370
		<i>Pepper chat fruit viroid</i>		PCFVd	348
Potato spindle tuber viroid			PSTVd	356-360	
<i>Tomato apical stunt viroid</i>			TASVd	360-363	
<i>Tomato chlorotic dwarfviroid</i>		TCDVd	360		
<i>Tomato planta macho viroid</i>		TPMVd	360		

*Em negrito estão as espécies-tipo de cada gênero

3.6 Transmissão dos viroides

Os viroides não possuem vetores e sua transmissão por pólen e por semente é difícil. Porém, são facilmente transmitidos mecanicamente e por instrumentos de poda, devido a sua alta estabilidade em extratos. A principal via de disseminação dos viroides, afetando principalmente plantas de importância econômica, tem sido através de material propagativos oriundos de outros locais e países. A prática de enxertia tem propiciado disseminação mundialmente dos viroides (HADIDI *et al.*, 2003, EIRAS, EIRAS *et al.*, 2006; BRIOSO & POZZER, 2013).

3.7 Sintomas de viroides em plantas

Em temperaturas elevadas (30 a 33°C) e alta luminosidade, os viroides acumulam-se e induzem sintomas nas plantas mais facilmente. As condições em que a planta se encontra, em relação ao estado nutricional, virulência do isolado e cultivar influenciam no aparecimento de sintomas (DURAN VILA *et al.*, 1988).

Os viroides podem causar nas folhas epinastia, malformações, rugosidade e lesões cloróticas e necróticas, no caule podem causar descoloração, caneluras, exsudação de goma e necrose, de um modo geral, induz nanismo, amarelecimento, definhamento da copa e em casos mais graves, pode levar a morte da planta. Em alguns casos, os sintomas são imperceptíveis, ou seja, acontece de forma latente, sendo a ausência de sintomas um dos fatores da disseminação desses patógenos. Cada espécie de viroide induz sintoma diferente, em geral (FLORES & DURAN-VILA, 1996; EIRAS *et al.*, 2009).

A associação de alguns viroides com sintomas específicos em campo é difícil de ser determinado, já que na maioria das vezes se encontra em infecção mista. E como existe uma diversidade de sintomas ocasionados por viroides, por vezes se torna difícil diferencia-los dos sintomas causados por vírus (GILLINGS *et al.*, 1991; EIRAS *et al.*, 2009).

3.8 Viroides em Citros

3.8.1 *Citrus exocort viroid* (CEVd)

O *Citrus exocortis viroid* (CEVd) é o agente causal da exocorte dos citros. Essa doença atinge grande parte das regiões citrícolas do mundo, os sintomas estão relacionados com descamação do porta-enxerto ‘Limão-cravo’ (*C.s limonia*) e quando infectam a cultura de *Poncirus trifoliata* provocam nanismo (EIRAS *et al*, 2009, BARBOSA, 2010).

Atualmente, existe um grande número de variantes do CEVd, cujas sequencias ficam disponíveis em bancos de dados internacionais (EIRAS *et al*, 2009, BARBOSA, 2010). As variantes do CEVd apresentam genoma com aproximadamente 370 nucleotídeos fazem parte do gênero *Pospiviroid* e pertencem a família *Pospiviroidae* (FLORES *et al.*, 2005). Devido ao seu grande número de hospedeiros, infecta plantas de importância econômica como cenoura, videira, berinjela, citros, plantas herbáceas, *Gynura aurantiaca* DC, crisântemo (*Chrysanthemum morifouum* Ram), entre outros. Os sintomas ocasionados nas plantas podem ser diferentes, como por exemplo: distorção, epinastia foliar, nanismo, necrose, entre outros. Além do mais, pode haver infecção latente (DURAN-VILA, 1988, DURAN-VILA, 1996; EIRAS *et al*, 2009). A sua transmissão na maioria das vezes ocorre através de materiais propagativos e por meio de instrumentos de poda como canivetes e tesouras de poda.

3.8.2 *Hop stunt viroid* (HSVd)

“Xiloprose” dos citros foi descrita pela primeira vez na Palestina, presente em lima doce (*C. limettiodes* Tan.) (REICHERT & PERLBERGER, 1934) assim como a “Cachexia” descrita por CHILDS, 1950. em tangelo ‘Orlando’, equivalem a mesma doença. São provocadas por variantes do *Citrus viroid* II (CVd-II) que mais tarde foi subdividido em CVD-IIa, CVd-IIb e CVd-IIc por possuírem mobilidade eletroforética distinta (DURAN VILA *et al.*, 1988).

O CVD-IIa tornou-se bastante disseminado em plantações de citros no mundo, por manifestar título baixo e seus sintomas muitas das vezes são imperceptíveis, principalmente quanto à prejuízos a cultura dos citros (EIRAS *et al.*, 2009).

As variantes de CVD-II (HSVd), em pepino provocam sintomas de nanismo e em cidra ‘Etrog’ causam severidades em diferentes graus. Plantas como ‘Parson’s Special’, tangelo ‘Orlando e ‘Alemow’ possuem sistemas biológicos de grande importância para a identificação

de variantes do CVd-II, pois induzem a xiloprose provocando indícios da doença nas mesmas (PALACIO-BIELSA *et al.*, 2004).

Os sintomas característicos da xiloprose são: descoloração, exsudação de goma, bronzeamento dos tecidos do floema, fendas e descascamento. Algumas variedades comerciais são sensíveis ao viroide como mandarinas e híbridos (tangors e tangelos) e kumquats (*Fortunella* sp) (CHIDS, 1950. EIRAS *et al.*, 2009).

As variantes do HSVd possuem genoma com tamanho entre 294 e 303 nucleotídeos (nt) e devido a suas características biológicas e moleculares constituem uma única espécie do gênero *Hostuviroid* pertencente a família *Pospiviroidae* (FLORES *et.al.*, 2005; EIRAS *et al.*, 2009).

3.8.3 *Citrus Bent leaf viroid* (CBLVd)

O viroide CBLVd tem sido relatado em grande parte dos países produtores de citros, possui três variantes CVd-Ia, CVd-Ib e semelhança com CVd-I-LSS e expressa toda a virulência em plantas de citros. As variantes do CBLVd apresentam tamanho genômico de 327 a 329 nucleotídeos (CVD-Ia), 325 a 319 nucleotídeos (CVD-Ib) e 325 a 330 nucleotídeos (CVD-I-LSS), pertencente a família *Pospiviroidae* do gênero *Apscaviroid* (WEI *et al.*, 2017). Normalmente, o CBLVd não causa sintomas na maioria das espécies e variedades de citros, podem expressar nas nervuras centrais das folhas de cidra ‘Etrog’ sintomas de epinastia foliar e pontos necróticos, ocasionando uma acentuada curvatura das folhas, o que deu origem ao nome do viroide. No tronco pode-se observar abaixo da casca algumas depressões. (DURAN-VILA *et al.*, 1986; EIRAS *et al.*, 2009).

Em árvores de *P. trifoliata* são observadas pequenas depressões no tronco, nanismo pouco aparente e volume da copa reduzido (ROISTACHER *et al.*, 1993). Citros Etrog [*Citrus medica* (L.)] co-infectado com CBLVd, CEVd, CVd-III e CVd-IV exibem sintomas de epinastias, enrolamento das folhas e desnutrição (WEI, 2017).

O CBLVd tem um círculo de hospedeiros reduzido a membros da família Rutaceae, mas um caso experimental através de enxertia para abacateiro, tornou-se uma exceção (HADAs *et al.*, 1992, EIRAS, *et al.*, 2006).

A transmissão ocorre através da enxertia via experimentos, por seiva e mecanicamente, algumas variedades cítricas como o limão, laranja doce, são suscetíveis ao CBLVd (WEI, 2017).

3.8.4 *Citrus viroid-III (CVD-III)*

Pertencente ao gênero *Apscaviroid* e da família dos *Pospiviroidae*, a variante CVD-III denominado de *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), possui tamanho genético de 276 a 295 nucleotídeos. O CVD-III, a princípio era descrito como dois viroides independentes (CVD-IIIa e CVD-IIIb) por apresentar com migração diferentes na eletroforese (DURAN-VILA *et al.*, 1988). Análises realizadas posteriormente através de hibridização confirmaram que se tratava de variantes do mesmo viroide.

Através de pesquisas pode-se observar que a presença de algumas variantes do CVD-III proporcionou redução da taxa de crescimento em árvores cítricas, sem apresentar sintomas da doença. Sendo uma aposta para a redução do tamanho dos citros (RAKWOSKI *et al.*, 1994; OWENS *et al.*, 2005). Alguns sintomas ocasionados por essas variantes ocorrem em citros ‘Etrog’ e são anelamento e necrose do pecíolo com posterior queda de folhas (EIRAS *et al.*, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento e coleta das amostras

As coletas de material vegetal, utilizado como fonte de viroides, foram realizadas no município de Araruama, Região dos Lagos, litoral do Estado do Rio de Janeiro (22° 52' 22" S e 42° 20' 35" de longitude). A coleta foi acompanhada pelo Sr. Jorge Ferreira (EMATER/RJ), que indicou as propriedades no qual havia sintomas do patógeno procurado. Foram coletadas 22 amostras de plantas enxertadas no porta-enxerto Limão ‘Cravo’ ou no ‘Citromelo’, de cinco propriedades distintas (Tabela 2).

Tabela 2. Informações sobre as amostras coletadas no Município de Araruama/RJ

Propriedade	Porta-Enxerto	Nº de Amostras coletadas	Idade da Planta	Origem	Incidência	Propriedade (ha)
Fazenda São Jorge	Limão-Cravo	10	3 Anos	RJ	Alta	100 ha
Fazenda Morro Grande	Citrumelo	3	12 Anos	RJ	Baixa	35 ha
Sítio São Sebastião	Citrumelo/Limão Cravo	5	3 Anos	RJ	Alta	1 ha
Sítio São Benedito	Citrumelo/Limão Cravo	2	3 Anos	SP	Média	2 ha
Sítio Nossa Senhora	Limão-Cravo	2	10 Anos	SP	Baixa	22 ha

Folhas de citros com sintomas de: rachaduras no tronco, nanismo, clorose e epinastia foram coletadas de forma aleatória no pomar, identificadas, armazenadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F) localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram mantidas a temperatura média de 6°C por 24h até o início das análises.

As amostras passaram por um processo de assepsia, ou seja, as folhas coletadas foram colocadas em caixas de gerbox e adicionado água destilada autoclavada, permanecendo por 15 minutos na mesma, em seguida as folhas foram deixadas em hipoclorito (1/4) durante 15 minutos e novamente em água destilada autoclavada por 15 minutos. As folhas foram deixadas em papel filtro para a retirada do excesso de água e em seguida conduzidas para a extração de RNA.

4.2 Inoculação Mecânica

Plantas sadias de *Gynura* sp., pertencente à família Asteraceae, foram inoculadas mecanicamente com extrato de folhas de citros com sintomas de epinastia, clorose da propriedade 1. O inóculo foi preparado com 0,1g das folhas de citros maceradas em almofariz e pistilo, previamente limpos e autoclavados, contendo 0,1g de celite e 9 mL de tampão de fosfato de sódio 0,01 M. As folhas de *Gynura* sp. foram friccionadas apenas com o inóculo, identificadas, lavadas com água corrente e mantidas em casa de vegetação. Dez plantas foram

utilizadas como controle e friccionadas apenas com tampão fosfato de sódio. Durante 30 dias as plantas foram observadas para aparecimento de sintomas.

4.3 Extração de RNA

A extração de RNA das amostras coletadas foi realizada de acordo com o protocolo do kit *RNeasy Plant Mini kit* (QIAGEN Brasil). Utilizou-se para o procedimento 0,1g de partes do tecido, como nervuras e limbo de folhas jovens de citros e triturados em almofariz com auxílio de pistilo (previamente tratado com solução de DEPC e autoclavado), em presença de nitrogênio líquido. Após, foi acrescentados nas amostras 450 µL de tampão RLT acrescidos de 4,5 µL de Beta-mercapetanol, sendo então transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL. As amostras foram submetidas a agitação vigorosa em *Vortex Mixer* (FisherVortexGenie2) durante 30 segundos, sendo os lisados transferidos para a coluna lilás (*QIAshredder*) do kit. As colunas foram centrifugadas a 16100 x g (13179 rpm) por dois minutos. A coluna foi descartada e a solução resultante foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionado 0,5% de etanol 95% gelado, misturado gentilmente pela inversão do tubo. Com auxílio de micropipeta, 650 µL da solução foi transferida para a coluna rosa (*Mini Spin Column*), colocada no tubo de polipropileno de 2 mL e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) durante 15 segundos. O filtrado resultante foi descartado e o tubo reutilizado com a coluna rosa, na qual foi adicionado no mesmo 700 µL de tampão RW1 e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) por 15 segundos; posteriormente, o filtrado foi descartado e na mesma coluna rosa, foi acrescentado 500 µL de tampão RPE e, centrifugado a 8000 x g (10000 rpm) por 15 segundos. Descartou-se o filtrado e 500 µL de tampão RPE foi novamente adicionado a coluna rosa e centrifugado a 8000 x g (10000 rpm) por dois minutos. Em seguida, à coluna rosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionado 50 µL de água (destilada, deionizada, tratada com solução de DEPC e autoclavada) na coluna e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) por um minuto. Por fim, a coluna foi então descartada e o tubo contendo o filtrado (RNA total extraído) foi identificado e mantido no freezer a temperatura de mais ou menos -26°C até posterior uso no teste de RT-PCR.

4.4 Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Para o teste de RT-PCR foi seguido o protocolo de Wang *et al* (2008). A reação foi preparada em um mix a um volume total de 50 µL usando os componentes do *kit* SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Tabela 3.) e os *primers* específicos para os viroides alvos e para a presença de RNA (Controle interno da reação) (Tabela 3).

Tabela 3. Componentes da reação de RT-PCR e volumes utilizados no preparo do Mix.

Componentes da reação de RT-PCR		
1	Água (destilada deionizada, tratada com DEPC e autoclavada)	17 µL
2	2 X <i>Mix reaction</i>	25 µL
3	<i>Reverse primer</i> viroide	1 µL
4	<i>Forward primer</i> viroide	1 µL
5	SuperScript® III RT/Platinum® <i>taq</i> Mix	2 µL
6	RNA extraído com <i>Rneasy Plant Mini Kit</i>	4 µL
Volume total		50 µL

Tabela 4. Primers utilizados na reação de RT-PCR

Primer *	Sequência 5'-3'	Tamanho dos produtos (pb)	Posição	Referências
CEVd-R	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	371	78–98	Gross <i>et al.</i> (1982)
CEVd-F	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG		99–119	
CBLVd-R	TTCGTCGACGACGACCAGTC	234	86–104	Ashulin <i>et al.</i> (1991)
CBLVd-F	CCCTTCACCCGAGCGCTGCTT		188–208	
HSVd-R	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	302	59–82	Sano <i>et al.</i> (1988)
HSVd-F	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC		83–105	
CVd-III-R	CGTCACCAACTTAGCTGCCTTCGT	269	91–112	Sieburth <i>et al.</i> (2002)
CVd-III-F	GTCTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCG		135–159	
CVd-IV-R	CCGGGGATCCCTCTTCAGGT	138	52–71	Puchta <i>et al.</i> (1991)
CVd-IV-F	GGTGGATACAACTCTTGGGTTGT		217–239	
UBQa-R	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC	194	571–590	Amy <i>et al.</i> (2004)
UBQ-F	GATCTTCGCCTTAACGTTGT		746–765	

Tabela adaptada de Wang *et al.*, 2008. * R – antisense primer F - sense primer. CEVd - *Citrus exocort viroid*; CBLVd- *Citrus Bent leaf viroid*; HSVd- *Hop stunt viroid*; CVd-III - *Citrus viroid-III*; CVD-IV- *Citrus viroid-IV*; UBQ- Ubiquitina.

Os microtubos contendo o volume de 50 µL foram inseridos no termociclador (MJ Research – PTC 200) seguindo de uma programação de: 50°C por 30 minutos; 94° por 2 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 68°C por 45 segundos; 68° C por 7 minutos e 4°C por 5 minutos.

4.5 Eletroforese

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X com a presença de brometo de etídio (10 mg/ ml), sendo aplicado 16 µL do produto do RT-PCR nas canaletas do gel e deixadas por 20 minutos em corrente elétrica de aproximadamente 88 volts. Os fragmentos amplificados separados por eletroforese foram visualizados através do transiluminador de luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas compatíveis com a altura esperada, foram consideradas positivas.

4.6 Sequenciamento

Foram selecionados produtos de RT-PCR de 11 amostras positivas para viroide pertencentes as cinco propriedades estudadas, para serem encaminhados a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Ciências de Saúde, Departamento de Genética, para a realização do sequenciamento. Os produtos de RT-PCR das amostras escolhidas foram purificados com o *PureLink® PCR Purification kit* (Invitrogen EUA), seguindo o protocolo conforme o fabricante, tendo volume final de 30 µL do produto da reação de PCR purificado. Os produtos purificados foram quantificados e submetidos à reação de sequenciamento através do *kit Big Dye Terminator Cycle v3.1* (Life Technologies). Foi utilizado nas reações de sequenciamento o termociclador C100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e realizados individualmente para cada *primer*. Para cada reação foi utilizado 1,5 µL de tampão (5x), 1 µL do iniciador (Big Dye), 1 µL de oligonucleotídeo (3,2 pmol), 2 µL de DNA purificado e água ultra pura livre de DNase, completando o volume final para 10 µL. As condições para a reação de sequenciamento consistiu de: 96°C a 1 minuto; 35 ciclos a 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos; 60°C por 4 minutos e 4°C por 30 minutos. Após a finalização do ciclo as amostras foram precipitadas, a placa no qual estavam os fragmentos a serem sequenciados foi inserida na centrífuga, a uma velocidade de 600 rpm, durante um minuto, para que os nucleotídeos livres fossem retirados. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 30

μL de isopropanol a 75% e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, cobertas em papel laminado. Após, as mesmas foram centrifugadas a 4.000 rpm, na temperatura de 4° C por 45 minutos.

Com a finalização dessa etapa, foi retirado o sobrenadante da placa, vertendo a mesma em papel-toalha apoiada em uma bancada. Em seguida a placa foi invertida em papel-toalha e centrifugado a 600 rpm, durante 1 minuto, terminado esse processo foi adicionado em cada poço 50 μL de etanol (75%) e novamente centrifugado a temperatura de 4°C a uma velocidade de 4.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado, utilizando o papel-toalha como descrito anteriormente, e a placa centrifugada a 600 rpm por 1 minuto. Terminado esse processo, a placa foi então colocada inserida em um termociclador a temperatura de 60°C, durante 10 minutos, ao abrigo de luz. A placa foi então mantida a -20°C, adequadamente selada e resguardada da luz, até a etapa de sequenciamento.

As amostras precipitadas, podem ficar armazenadas por até 30 dias. Por fim, amostras foram então inseridas em um aparelho sequenciador automático do departamento de Genética da UFRJ, ABI 3130XL (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, e assim gerar as sequências de DNA das amostras contidas em cada poço.

4.7 Análise das Sequências

As sequências são geradas através de métodos computacionais, fornecendo um gráfico em diferentes cores e picos (Eletroferograma) no qual representam os variados nucleotídeos marcados. A qualidade depende da altura do pico, quanto mais alto e agudo melhor, conseqüentemente maior probabilidade de a base registrada estar correta. Em seguida, as sequências obtidas com maiores scores de similaridade com a viroides foram editadas manualmente através do programa *Saq Man* (DNASar, Madson EUA), para a retirada dos picos baixos e sobrepostos. No final desse processo, as sequências foram alinhadas de forma que a porção final de uma sequência se sobreponha a porção inicial da outra, formando o que se chama *Contigs*, que são fragmentos mais completos. As sequências encontradas de cada amostra foram então comparadas com sequências de DNA disponíveis no *GenBank*, um banco de dados disponível na internet, com o uso da ferramenta *BLASTn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5. Dados gerais das propriedades estudadas da Região de Araruama/RJ e resultados encontrados

CLASSIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES	PROPRIEDADE	PORTA-ENXERTO	Nº AMOSTRAS COLETADAS	INCIDÊNCIA DOS SINTOMAS	SINTOMAS	TRATOS CULTUR AIS	IDENTIFICAÇÃO	SEQUENCIAMENTO	POSITIVO	IDADE DA PLANTA	ORIGEM DAS MUDAS	TAMANHO DA PROPRIEDADE (ha)
1	FAZENDA SÃO JORGE	LIMÃO-CRAVO	10	ALTA	Rachaduras acentuadas nos troncos, nanismo, clorose, amarelecimento nas folhas e spinastia.	Capina e poda	RT-PCR	HSVd**	CVD-III; HSVd	3 anos	RJ	100
2	FAZENDA MORRO GRANDE	CITRUMELO	3	BAIXA	Rachaduras leves nos troncos, clorose nas folhas.	Capina e poda	RT-PCR	-	CVD-III	12 anos	RJ	35
3	SÍTIO SÃO SEBASTIÃO	CITRUMELO/LIMÃO CRAVO	5	ALTA	Rachaduras bastante acentuadas nos troncos, nanismo e spinastia.	Capina e poda	RT-PCR	HSVd**	CVD-III; HSVd; CBLVd?* e CEVd	3 anos	RJ	1
4	SÍTIO SÃO BENEDITO	CITRUMELO/LIMÃO CRAVO	2	MÉDIA	Rachaduras nos troncos, nanismo, epinastia e amarelecimento das folhas.	Capina e poda	RT-PCR	-	CVD-III	3 anos	SP	2
5	SÍTIO NOSSA SENHORA	LIMÃO-CRAVO	2	BAIXA	Sintomas pouco aparente. Rachaduras pequenas.	Capina e poda	RT-PCR	-	CVD-III; CBLVd?*	10 anos	SP	22

* CBLVd a ser confirmado. ** Sequenciamento realizado somente do viroide HSVd.

5.1 Coleta das Amostras e Extração de RNA

Das 22 amostras coletadas na Região de Araruama/ RJ foram selecionadas duas plantas de cada propriedade estudada, exceto a propriedade 3, na qual foram avaliadas integralmente as amostras, para a extração de RNA.

5.1.1 Inoculação mecânica em *Gynura* sp.

Das dez amostras coletadas na propriedade 1 e inoculadas mecanicamente, nenhuma delas ocasionou sintomas em *Gynura* sp durante os dias em que foram observadas, geralmente essa planta apresenta sintomas da presença do viroide em pouco tempo, nesse caso não ocorreu nenhum indício de epinastia das folhas, rugosidade, nanismo, característico do viroide CEVd, sendo assim, não foi realizado a extração de RNA das mesmas.

5.1.2 Eletroforese em gel de agarose

Nas amostras selecionadas de citros oriundas de cinco propriedades da região de Araruama no Estado do Rio de Janeiro, através de eletroforese em gel de agarose, foram observadas a existência de bandas de produtos de PCR de tamanhos entre 269 a 371 pb, atribuídos a viroides.

ITO *et al.* (2002) e SERRA *et al.* (2008) descreveram em seus trabalhos que plantas cítricas normalmente são hospedeiras de sete espécies de viroides pertencentes a família *Pospiviroidae*, fato este revalidado em plantações de citros em Araruama (RJ) onde foram detectadas quatro espécies de viroides: CEVd; HSVd ; CBLVd ; CVd-III (Tabela 5).

O agente patogênico predominante foi o CVd-III, encontrado em quatro propriedades (Tabela 6.). A maioria das plantas cítricas apresentavam nanismo, Owens *et al.* (2000) demonstraram que onde existia a presença da variante CVd-III ocorreu redução na taxa de crescimento das árvores e em alguns casos sem induzir sintomas da doença, sendo assim há uma evidencia da influência desse viroide ocasionando nanismo em citros nas propriedades estudadas do Estado do Rio de Janeiro.

Nas análises dos produtos de RT-PCR, com *primers* específicos para cada um dos viroides, as amostras de plantas cítricas Limão ‘Cravo’ e ‘Citrumelo’ apresentaram os seguintes resultados: as propriedades 1, 2, 3 e 5 foram positivas para CVd-III (269 pb), sendo este agente predominante (Figura 6). Além do CVd-III, as duas amostras pertencentes a propriedade 3 apresentaram banda fraca para CEVd (Figura 11). Os agentes HSVd (Figura 7); CBLVd (Figura 8 e 9) e CVd-III (Figura 6.) foram positivos em uma mesma planta também da propriedade 3, ou seja, uma mesma planta estava infectada com mais de um agente da doença, possivelmente ocorreu uma infecção mista oriundas de mudas já contaminadas vindas de outros países e estados ou através de instrumentos de poda contaminados. Segundo Ito *et al* (2002) na ausência do CEVd, as plantas de citros infectadas por um conjunto de viroides podem apresentar sintomas semelhantes ao do CEVd confirmando assim, os sintomas causados em plantas de citros estudadas como rachaduras, nanismo em árvores em que não apresentavam o CEVd. Ito *et al* (2002) constataram que no Japão, a infecção mista por CEVd, HSVd e CVd-III foi a mais encontrada em limões e laranjas, o que também ocorreu, parcialmente, no Estado do Rio de Janeiro.

Na propriedade 5 (Figura 5) as plantas não apresentavam sintomas visíveis quando infectadas por viroides, o resultado da eletroforese mostrou que as amostras continham duas espécies o CVd-III e CBLVd, sendo, portanto, uma planta assintomática. As amostras das propriedades 01 e 03 apresentaram sintomas bastantes característicos de viroides nas plantas, como rachaduras no tronco, nanismo e epinastia (Figuras 2 e 3).

Não foi detectado no resultado de RT-PCR a presença do CVd-IV.

Tabela 6. Panorama dos viroides encontrados em plantas de citros em de limão da região de Araruama/RJ

PROPRIEDADE	PORTA-ENXERTO	SINTOMAS	CVd - III	HS Vd	CBL Vd	CE Vd	CVd - IV
1	LIMÃO CRAVO	FORTE	+	+	-	-	-
2	CITRUMELO	FRACO	+	-	-	-	-
3	CITRUMELO/LIMÃO CRAVO	FORTE	+	+	+	+	-
4	LIMÃO CRAVO	MÉDIO/FRACO	+	-	-	-	-
5	LIMÃO CRAVO	NENHUM	+	-	+	-	-

Sintoma: FORTE-presença marcante de rachadura no tronco, nanismo, epinastia. FRACO – rachaduras leves, nanismo pouco acentuado, presença ou não de epinastia nas folhas. NENHUM- sem sintomas aparentes, imperceptíveis nas plantas

Barbosa *et al.* (2005) em seu experimento mostrou que a transmissão de viroides pode ocorrer mecanicamente, através de instrumentos de poda, além do CEVd, outros patógenos como HSVd, CBLVd, CVd-III e CVD-IV também podem ser transmitidos por um mesmo instrumento e em condições de campo, sendo esta uma hipótese da presença de diferentes agentes em infecção mista, em todas as propriedades.

Associando os dados de sintomatologia com as do teste de RT-PCR foram identificadas rachaduras acentuadas nos troncos de citros, para a propriedade 1 quando HSVd, CVd-III e CBLVd foram combinados. Porém, Ito *et al.* (2002), constatou o aparecimento de leves estrias. Portanto não se pode afirmar que a combinação desses viróides provoca a presença apenas de rachaduras leves nas plantas.

Wei *et al.* (2017) descreveram em seu trabalho a ocorrência do viroide CBLVd em alguns países como Japão, Costa Rica, China entre outros, porém até o momento não havia sido descrita a presença dessa espécie no Brasil.

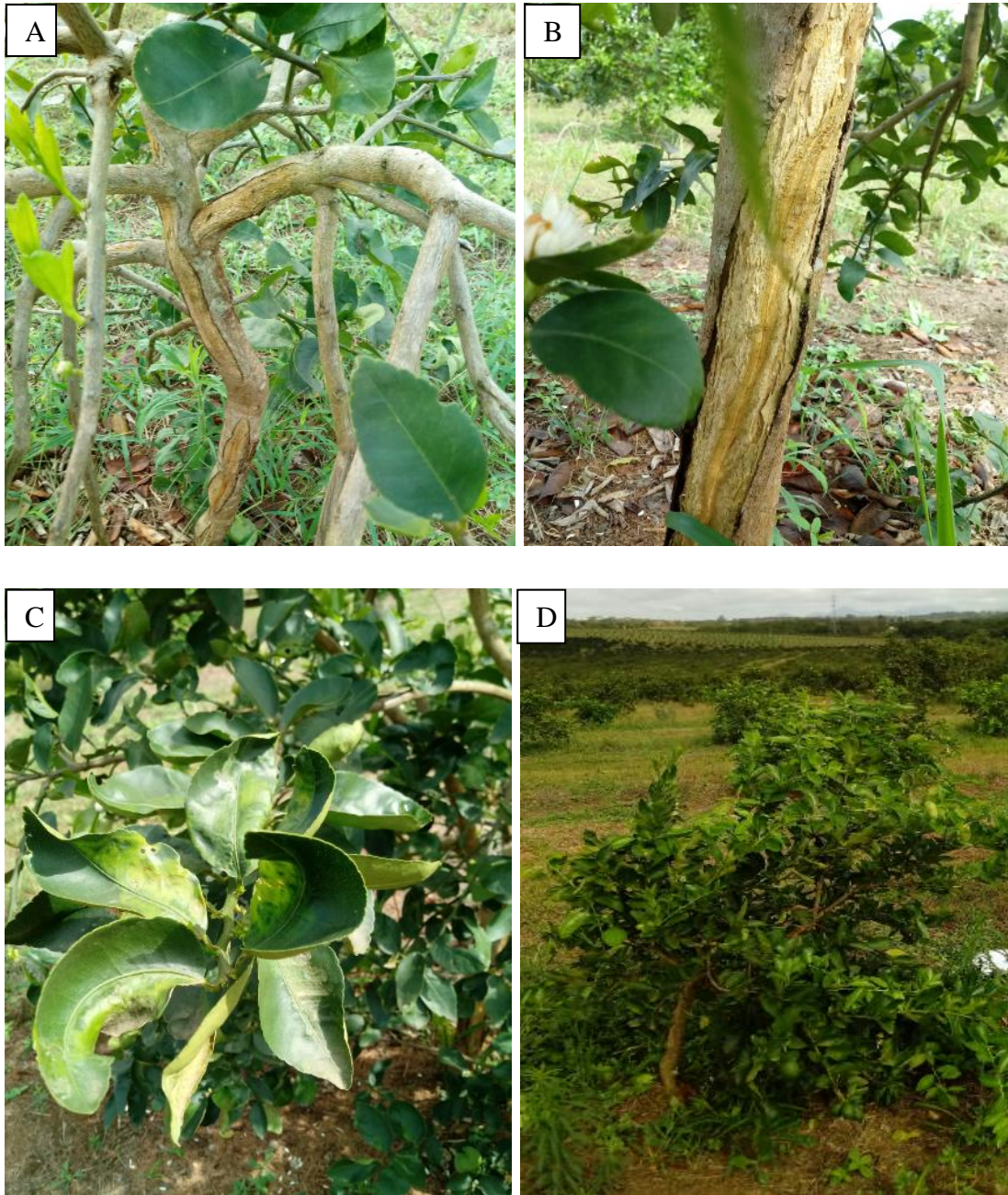


Figura 2. Plantas cítricas enxertadas com Limão ‘Cravo’, com suspeita da presença de viroides, pertencente a amostra da planta da propriedade 1 na região de Araruama (RJ). Em A e B, as plantas apresentam rachaduras no tronco, sintoma típico da doença. Na figura C observa-se que as folhas apresentam descoloração e epinastia, na figura D as árvores de citrus apresentavam nanismo. Fotos: Jocarstea A.B. Leone.

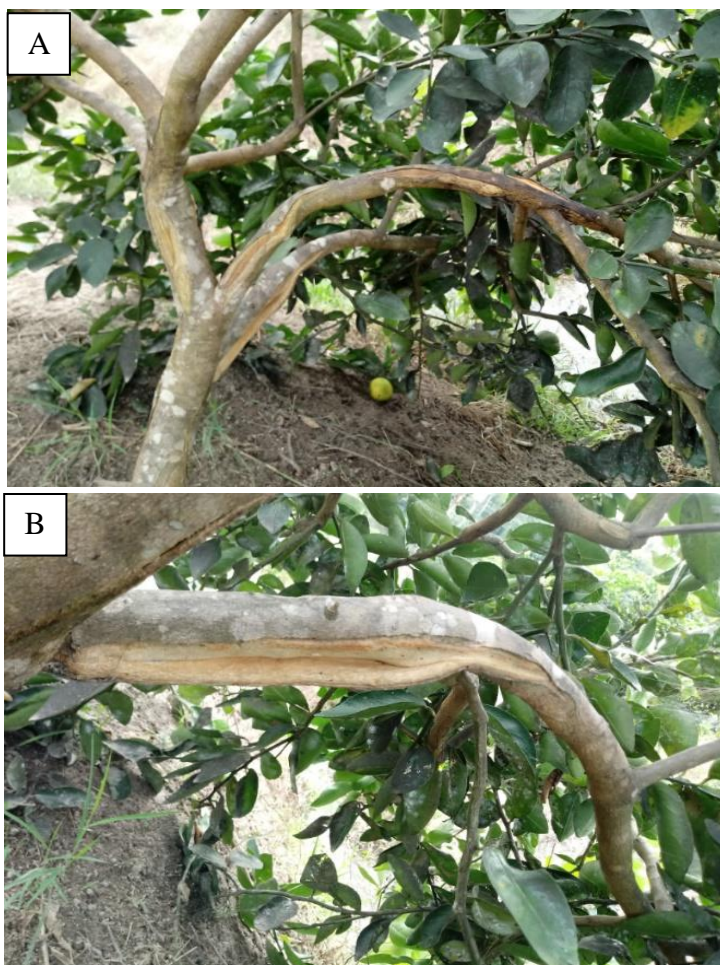


Figura 3. Sintomas de rachaduras forte em Limão ‘Cravo’ da propriedade 3 da região de Araruama (RJ). Figura A, mostra as rachaduras espalhadas por todo o tronco. Na imagem B, é possível observar o tamanho da fenda, característica essa de infecção ocasionada por viróide. Foto: Jocarstea A. B. Leone.

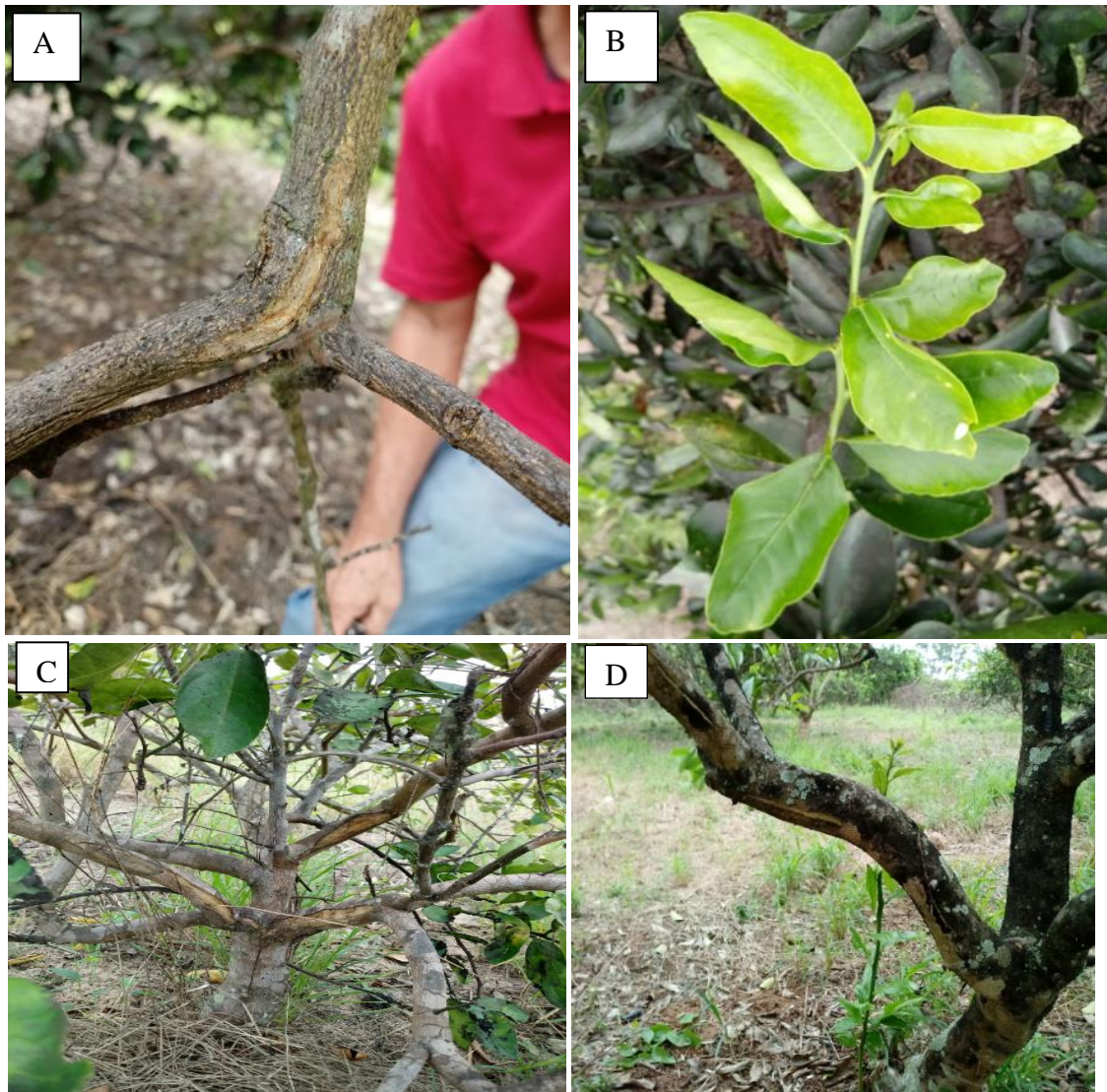


Figura 4. Na imagem A, representa a planta da propriedade 2, onde se observa um sintoma de rachadura menor, e na Figura B, sintomas fracos de epinastia nas folhas, onde foi encontrado o viroide CVD-III. Na Figura C, sintomas médios de rachaduras nos troncos, representando a propriedade 4, na figura D, sintomas fracos, quase imperceptíveis de rachaduras na propriedade 5, positivo para viróide. Foto: Jocarstea A. B. Leone.



Figura 5. Imagem de planta cítrica enxertada com Limão-cravo da propriedade 5 no Município de Araruama (RJ,) árvore sem sintomas aparente de doenças ocasionadas por viroide. Foto: Jocarstea A. B. Leone.

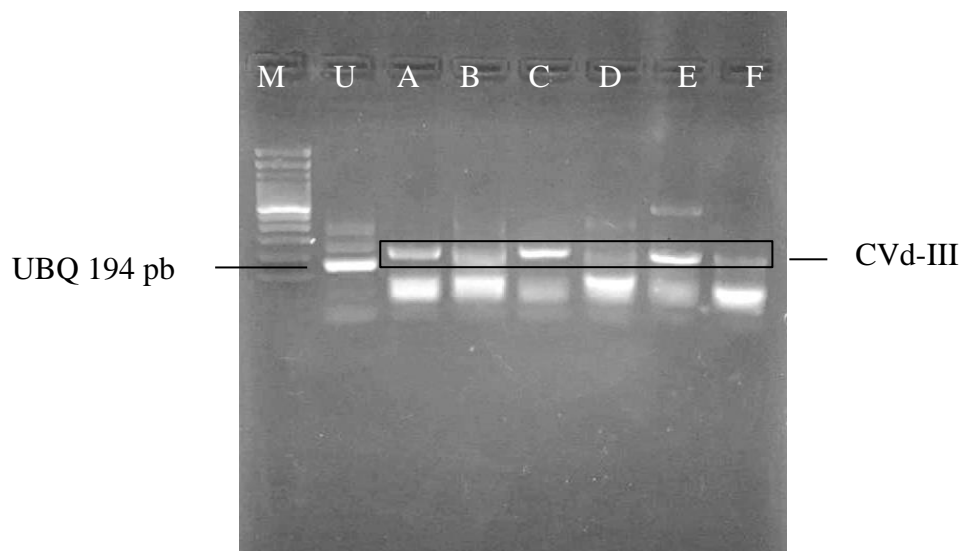


Figura 6. CVd-III. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CVd-III (269 pb). Amostra de folhas de citros das propriedades 1, 2, 3, 4, 5 identificadas no gel pelas letras em sequência A, B, C, D, E e F, sendo a letra F referente também a propriedade 1. M- marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher), na faixa identificada pela letra U está o *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em A, B, C, D, E – *amplicon* de 269 pb.

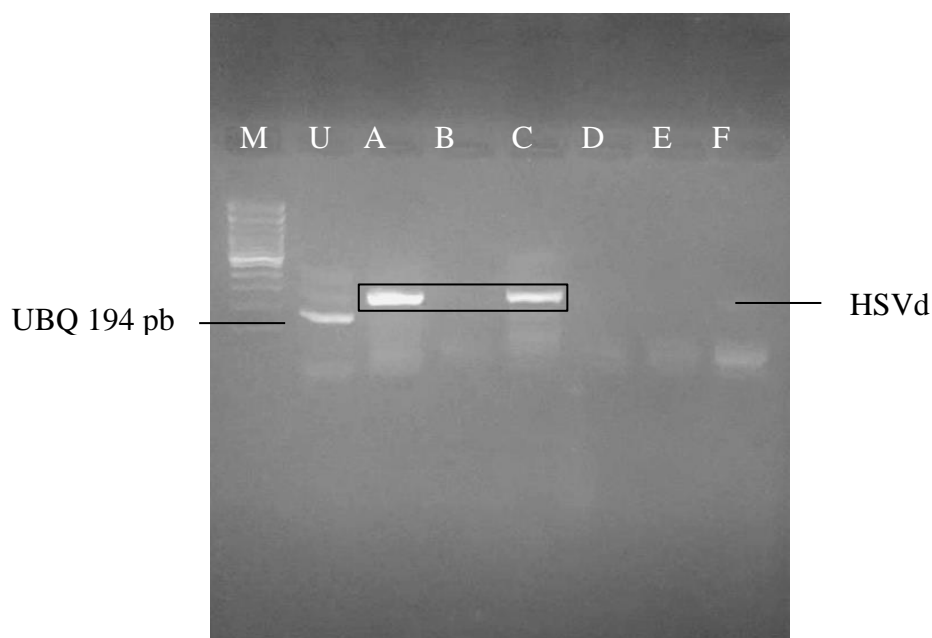


Figura 7. HSVd. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para HSVd (302 pb). Amostras de folhas de citros das propriedades 1, 2, 3, 4, 5 identificadas no gel pelas letras em sequência A, B, C, D, E e F, sendo a letra F referente também a propriedade M- marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo

Fisher), na faixa identificada pela letra U está o *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em A, C – *amplicon* de 302 pb, representando as propriedades 1 e 3.

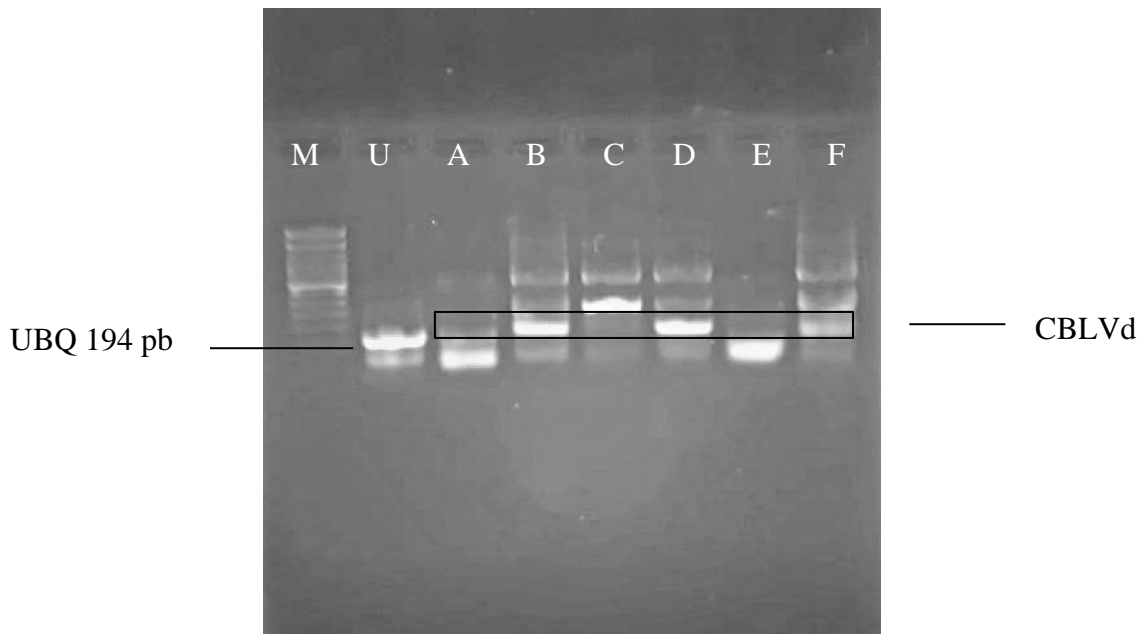


Figura 8. CBLVd. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 2 representada pela letra A; 3 = B, 4 = C, 5 = D, 2 = E e 3 = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb, representando as propriedades 3 e 5.

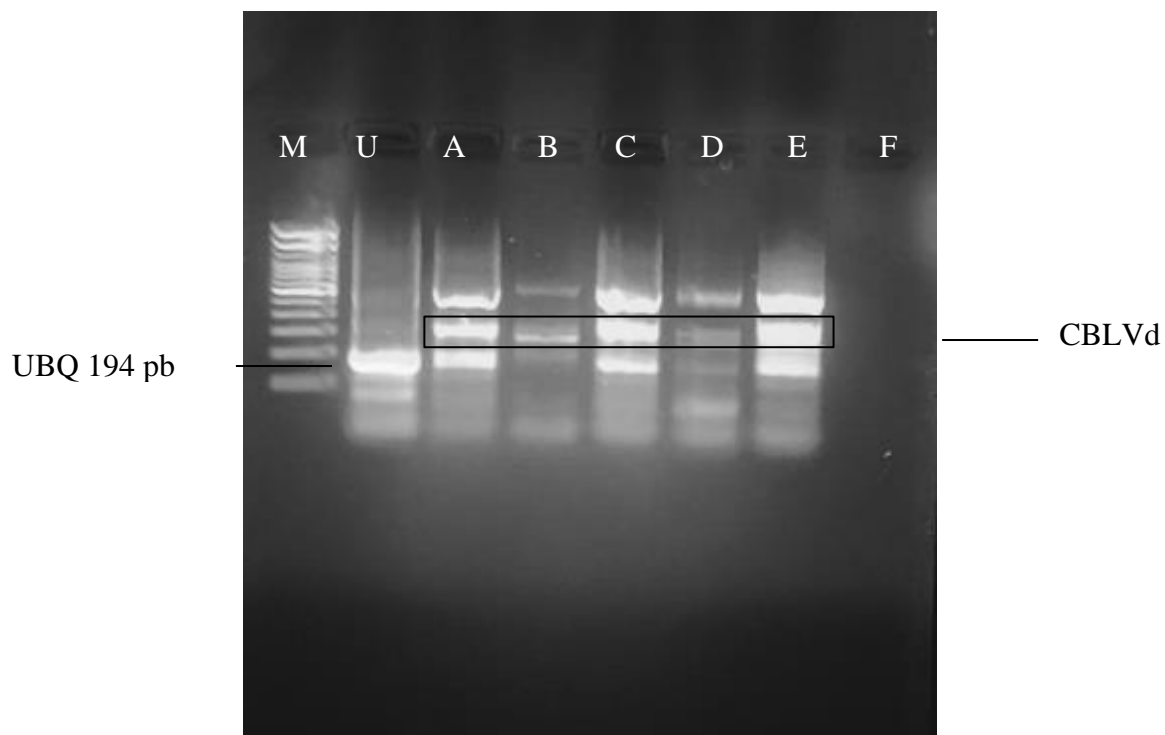


Figura 9. .CBLVd. Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 3 a amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B, 16 = C, 17 = D, 18 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U - *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb.

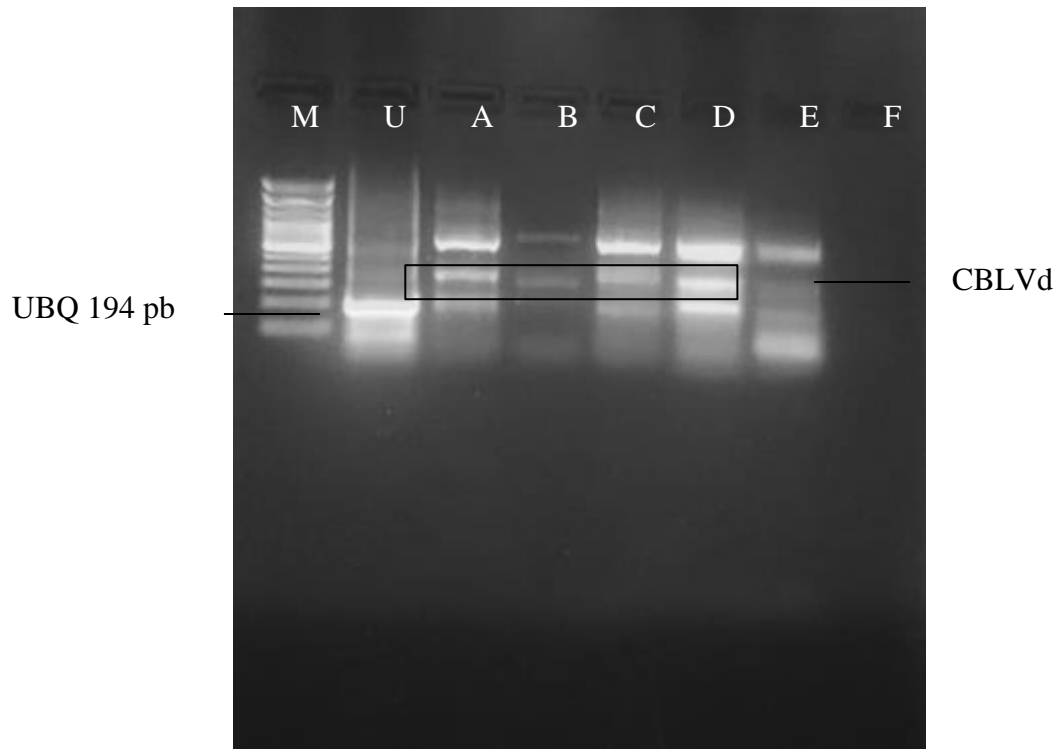


Figura 10. CBLVd. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CBLVd (234 pb). Amostras de citros das propriedades 3 e 5. A amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B; 16 = C; 21= D; 22 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U - *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 234 pb, representando as propriedades 3 e 5.

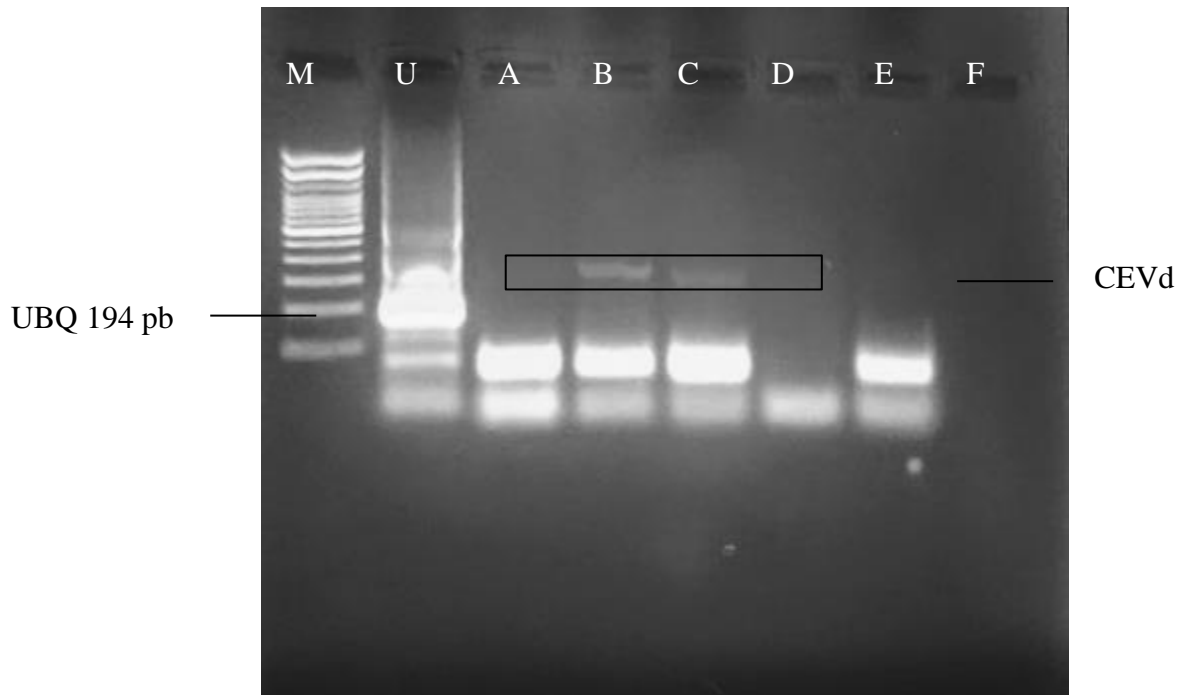


Figura 11. CEVd. Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para CEVd (371 pb). Amostras de citros da propriedade 3. A amostra classificada como 14 está representada pela letra A; 15= B, 16 = C, 17 = D, 18 = E e controle do ambiente = F. M - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher). U - *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em B, D e F – *amplicon* de 371 pb.

5.2 Análise das Sequências

Todos os amplicons foram sequenciados sendo as sequências obtidas (Figura 12) comparadas com as sequências existentes no banco de dados GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

A sequência obtida da amostra da propriedade 1 possui 300 nucleotídeos apresentou 99% de identidade com o HSV isolado PTZ57R/T (Nº de acesso KY654683.1 – Figura 13).

Figura 12. Sequência nucleotídica oriunda do sequenciamento de amostra pertencente a propriedade 1. A marca em vermelho representa o *Primer R – Primer Reverse* e em verde o primer F- *Primer Forward*

>HSVD

```

GGCAACTCTtCtAGAATCCAGC GAGAGGCGTAGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCT
GGAGTAGAGGCTTCTTGCTTCGAAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTTACCT
TCTCCTGGCTCTTCGAGTGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTTCGTCTT
CCAACCTGCTTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCT
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCaTGGgCAAGCAAAGAAAAACAAGGCAGGGA
GGAG ACTTACCTGAGAAGGAGCCCCGG
    
```

Figura 13. Sequência genômica do viroide HSVd isolado PTZ57R/T.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
532 bits (288)	2e-147	296/299(99%)	3/299(1%)	Plus/Plus
Query	5			ACTCTTCT-
AGAATCCAGCGAGAGGCGTAGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAG	63			
Sbjct				1
ACTCTTCTCAGAATCCAGCGAGAGGCGTAGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGA				
G	60			
Query	64			GCTTCTTGCTTCG-
AAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTTACCTTCTCCTGGCTCTT	122			
Sbjct				61
GCTTCTTGCTTCGTAAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTTACCTTCTCCTGGCTCTT				
120				
Query				123
CGAGTGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTTCGTCTTCCAACCTGCTTTTTGTCT				
182				
Sbjct				121
CGAGTGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTTCGTCTTCCAACCTGCTTTTTGTCT				
180				
Query				183
ATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCTCTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGC				
242				

|||||

Sbjct

181

ATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCTCTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGC
240

Query 243 ATGGGCAAGCAAAGAAAAACAAGGCAGGGAGGAGACTTACCTGAGAA-
GGAGCCCCGG 300

|||||

Sbjct

241

ATGGGCAAGCAAAGAAAAACAAGGCAGGGAGGAGACTTACCTGAGAAAGGAGCCCCG
G 299

Segundo Flores *et al.* (2005), as variantes desse viroide apresentam entre 294 a 303 pb, assim pode-se afirmar que a sequência encontrada é compatível ao viroide HSVd (espécie tipo) pertencente à família *Pospiriviridae* do gênero *Hostuviroid*. Até o momento, esse estudo relata a primeira ocorrência de HSVd em citros no Estado do Rio de Janeiro.

Para os viroides considerados positivos observados em eletroforese, não foi possível a leitura das sequencias do CEVd, CBLVd e CVD-III devido ao baixo rendimento no sequenciamento.

EIRAS (2006) descreve em seu trabalho a presença de CEVd e HSVd infectando duplamente videiras no Estado de São Paulo, portanto é necessário cuidado prévio quanto ao plantio de uvas no Estado do Rio de Janeiro, pois o viroide HSVd é facilmente disseminado por instrumentos de poda e através de mudas, sendo muitas vezes vindas do Estado de São Paulo.

Até o momento, no Estado do Rio de Janeiro não havia estudos ou trabalhos associados a identificação de viróides em plantas cítricas.

O RT-PCR mostrou-se bastante eficaz no diagnóstico de viroides em citros, além de ser uma ferramenta confiável para a identificação desses agentes ser um método de rápida aplicação.

A disseminação de viróides pode estar correlacionada ao porta-enxerto Limão ‘Cravo’ e Citrumelo contaminado, devido à diversificação de patógenos encontrados numa mesma planta. Ou que a incidência dessa doença no estado do Rio de Janeiro, pode ocorrer através do transporte de mudas contaminadas oriundas de outros estados, como o Estado de São Paulo.

Programas de certificação devem ser instalados para auxiliar na prevenção e disseminação de viroides em plantas cítricas e outras frutíferas no Estado do Rio de Janeiro bem como no país.

É necessário o controle da disseminação de viroides no Estado do Rio de Janeiro, conscientizando os produtores sobre a doença, transmissão e formas de controle.

A fiscalização da entrada de mudas no país deve ser mais rígida e implantar métodos de identificação de agente quarentenários evitando assim a disseminação de viroides não existentes no Brasil.

Pesquisas devem ser realizadas quanto à ocorrência e distribuição geográfica dos viroides (por exemplo, HSVd, CEVd, CVd-III e CBLVd) nas áreas de cultivo de citros no Estado do Rio de Janeiro e demais estados produtores do Brasil.

É importante que na hora da compra de mudas, as mesmas sejam de preferência sejam oriundas de viveiros certificados e que a mesma seja de locais onde não ocorra a presença desses viróides.

O presente trabalho além de ser inédito no Estado do Rio de Janeiro, contribuiu para a detecção e diagnose pela primeira vez da presença dos viróides CEVd, CBLVd, CVd-III e HSVd em plantas cítricas enxertadas em Limão Cravo ou Citrumelo na região.

6 CONCLUSÃO

Os métodos moleculares como RT-PCR, foram eficientes para a identificação de viróides sendo possível a identificação destes em curto espaço de tempo.

Os *primers* específicos utilizados para os viroides funcionaram sendo possível a identificação de quatro espécies de viroides em plantas cítricas na Cidade de Araruama, Estado do Rio de Janeiro.

Foram encontrados quatro viroides CVd-III, HSVd, CBLVd; CEVd em infecção simples ou mista, nas propriedades estudadas, sendo que o CVd-III apareceu em todas as amostras.

O viroide CVd-IV não foi encontrado em nenhuma das cinco propriedades.

O viroide CBLVd até o momento não foi identificado no Brasil, pesquisas devem ser realizadas para a confirmação deste.

No resultado do sequenciamento do isolado PTZ57R/T (Nº de acesso KY654683.1), houve 99% de similaridade com o viroide HSVd oriundo da propriedade 1 da Região de Araruama no Estado do Rio de Janeiro.

E através dessa pesquisa foi possível a construção de *kit* denominado *KIT HSVIROIDE*, para a detecção do viróide HSVd em plantas cítricas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, M. S. da.; FRANÇA, N. O.; FILHO, W. S. S.; PASSOS, O. S.; GIRARDI, E. A. Desempenho inicial da laranjeira ‘Pera’ sobre porta-enxertos híbridos trifoliata. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/111736/1/Desempenho-inicial-da-Laranjeira-Pera-TRA3354-DESEMPENHO-INICIAL-DA-LARANJEIRA-PERA-SOBRE-PORTA-ENXERTOS.pdf>>. Acesso: em 28 de novembro de 2018.
- AMY, M. B., IGOR, A. Y., & STEVEN, H. S. Validating internal controls for quantitative plant gene expression. studies. **BMC Plant Biology**, 4, 14, 2004.
- ANDRADE, R. A. de.; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** – SP, v.25, n.1, p. 134-136, 2003.
- ASHULIN, L., LACHMAN, O., HADAS, O., & BAR-JOSEPH, M. Nucleotide sequence of a new viroid species, Citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel.
- BARBOSA, C. J. A. Exocorte da lima ácida ‘Tahiti’. **EMBRAPA mandioca e fruticultura. Citros em foco**. n. 35, 2010.
- BARBOSA, C. J.; PINA, J. A.; PÉREZ-PANADÉZ, J.; BERNARD, L.; SERRA, P.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Mechanical transmission of citrus viroids. **Plant Disease**. 89: 749-754, 2005.
- BARTOLINI, I.; SALAZAR, L.F. Viroids in South America. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing,. p. 265-267, 2003.
- BASSANEZI, R. B.; FILHO, A. B.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, v. 93, n. 4, 2003.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; SÁ, J. F.; ATAÍDE, E.M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 36-45, jul/ago. 2014.
- BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L. Vírus e viroides quarentenários para o Brasil, diagnose e perspectivas futuras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 21: 226-286, 2013.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. F. Porta-enxertos para a citricultura paulista. **Boletim Citrícola**. UNESP/FUNEP/EECB. n. 1, 1997.

CARNEIRO, P. A. P.; LOPES, P. S. N.; OLIVEIRA, N. C. C. de.; FERNANDES, L. A.; MELO, B. de. Produção de porta-enxerto de limão cravo, em resposta á adubação organomineral. **Bioscience Journal**, v. 27. n.3, p, 427-432, Uberlândia/MG, 2011.

CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H.; YOUTSEY, C. O. Rootstocks for Florida citrus. **Gainesville: institute of Food and Agricultural Sciences**. University of Florida. p. 92, 1993.

CHILDS, J. F. L. The cachexia disease of Orlando tangelo. **Plant Disease Reporter**, 34:295-298, 1950

CHO, W.; K. JO, Y. JO, KYOUNG-MIN. KIM, KOOK-HYUNG. A current overview of two viroids that infect chrysanthemums: Chrysanthemum stunt viroid and Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. **Viruses**, v. 5, p. 1099-1113, 2013.

CONAB. Boletim hortigranjeiro julho/2018. Companhia Nacional de Abastecimento. 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>>. Acesso em: 05 ago 2018.

CONAB. **Boletim hortigranjeiro**. v.4, n.7, Julho 2018. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeirosprohort/boletimhortigranjeiro/item/download/21185_a341ee80f366f3c16ceb73294d52cb1f>. Acesso em: 20 de agosto de 2018.

DANTAS, I. B. Condicionamento Fisiológico em sementes de Limão Cravo e Citrumelo “Swingle”, (Dissertação mestrado em fitotecnia) – **Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras**, p. 136, 2009.

DIENER, T. O. Potato tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. **Virology**, v. 43, p. 75-89, 1971.

DIENER, T. O.; RAYMER, W. B. Potato spindle tuber virus: a plant virus with of a free nucleic acid II. Characterization and partial purification. **Virology**, v. 37, p. 351-366, 1969.

DIENER, T.O. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. **Virus genes**, v. 11, p. 119-131, 1996.

DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S. Adensamento de plantio e anançamento de citros. **Boletim Citrícola**, FUNEP. p. 70, 2001.

DURAN-VILA, N.; FLORES, R. SEMANCIK, JS. Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. **Virology**, 150:75-84, 1986.

DURAN-VILA, N.; ROISTACHER, C. N.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; SEMANCIK J. S. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. **Journal of General Virology**, 69, 3069-3080, 1988.

EBRAHIMI-MOGHADAM, L.; ZAKIAGHL, M. ; JAFARPOUR, B. ; MEHRVAR, M. Identification of Experimental Herbaceous Host Range of *Citrus viroid V*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.20, p.1279-1291, 2018.

EIRAS, M.; SILVA, S. R.; STUCHI, E. S.; NATIVIDADE, M. L. P.; CARVALHO, S. A. Viroides em citros. **Tropical plant pathology**, v. 34, 5, p. 275-296, 2009.

EIRAS, M.; Silva, S. R.; Stuchi, E. S.; Targon, M. L. P. N.; Carvalho, S. A. Viróides e virusóides: relíquias do mundo de RNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 229-246, 2006.

ELENA, S. F.; DOPAZO, J.; DE LA PEÑA, M.; FLORES, R.; DIENER, T. O.; MOYAL, A. Phylogenetic Analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, p. 155-159. 2001.

EMATER RIO DE JANEIRO. Relatório por municípios do sistema ASPA/AGROGEO-ano 2017. Disponível em: <<http://www.emater.rj.gov.br/images/munic2017.htm>>. Acesso em: 28 de agosto de 2018.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>> ACESSO EM 05 de setembro de 2018.

FADEL, A. L.; MOURÃO FILHO, F. A. A. M.; STUCHI, E. S.; WULFF, N. A.; COUTO, H. T. Z. Citrus sudden death-associated virus (CSDaV) and citrus tristeza virus (CTV) in elevem

rootstocks for 'Valencia' sweet orange. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 4, Jaboticabal/SP, 2018.

FLORES, R.; DURAN-VILA, N. Viróides. In: **Phytoma España**, Paris, n.1, p.149-183, 1996.

FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; PALLAS, V.; SEMANCIK, J. S. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 2095-2102, 1985.

FLORES, R.; GAS, M. E.; MOLINA-SERRANO, D.; NOHALES, M.Á.; CARBONELL, A.; GAGO, S.; DE LA PEÑA, M.; DARÒS, J.A. Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. **Viruses**, Valencia/Spain. 1, p. 317-334, 2009.

FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A. E.; DARÒS, J.A.; DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto. v. 43, p. 117-139, 2005.

FUNDECITROS. Inventários de árvores e estimativa da safra do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro 2018/2019. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2018_05_21_Invent%C3%A1rio_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2018-20191.pdf> Acesso em: 29 de agosto de 2018.

FUNDECITROS. Sumário executivo. Estimativa da safra de laranja 20018/2019 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2018_09_05_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2018-2019.pdf>. Acesso em 29 de agosto de 2018.

GARNSEY, S. M.; RANGLES, J. W. Biological interactions and agricultural implications of viróides. **Viroids and viroid-like pathogens**, Boca Raton: CRC Press, p. 177, 1987.

GIGUÈRE, T.; RAJ ADKAR-PURUSHOTHAMA, C.; PERREAULT, J-P. Comprehensive secondary structure elucidation of four genes of the family Pospiviroidae. **PLOS ONE**, 9(6): e98655, v.9, 2014.

GIGUÈRE, T.; PERREAULT, JEAN-PIERRE. Classification of the Pospiviroidae based on their structural hallmark. **PLOS ONE**. 12(8): e0182536, 2017.

GILLINGS, M. R.; BROADBENT, P.; GOLLNOW, B. I. Biochemical indexing for citrus exocortis viroid. **Tenth ZOCV Conference**, p. 178-187, 1988.

GILLINGS, M. R.; BROADBENT, P.; GOLLNOW, B. I. Viroids in Australian citrus: relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. **Australian Journal Plant Physiology**, East Melbourne, v. 18, p. 559-570, 1991.

GIMENES-FERNANDES, N; BASSANEZI R. B. Doença de causa desconhecida em pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p. 93, 2001.

GIMENES-FERNANDES, N; BASSANEZI R. B. Doença de causa desconhecida em pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p. 93, 2001.

GOBATTO, D. Viroides em crisântemo: levantamento, identificação, caracterização, avaliação de fontes de resistência e desenvolvimento de métodos de diagnóstico. Dissertação (Mestrado em Sanidade Vegetal, segurança alimentar e o ambiente). **Instituto Biológico**, São Paulo, 2013.

GROSS, H. J.; KRUPP, G.; DOMDEY, H.; RABA, M.; JANK, P.; LOSSOW, C.; ALBERTY, H.; RAMM, K.; SANGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. **European Journal of Biochemistry**, v.121, p. 249-257, 1982.

HADAS, R.; BAR-JOSEPH, M.; SEMANCIK, J. S. Segregation of a viroid complex from a graft-transmissible dwarfing agent source for grapefruit trees. **Annals Applied Biology**, 115:515-520, 1989.

HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J. S. Viroids. **Collinswood: CSRIO**. p.370, 2003.

ICTV. Internacional committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 25 de maio de 2018

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA-IBGE. Indicadores IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola estatística da produção agrícola junho de 2018. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamentosistematicodaproducaoagricola.html?edicao=21697&t=downloads?>>. Acesso em: 05 de outubro de 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA-IBGE. Indicadores IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola estatística da produção agrícola junho de 2017. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamentosistematicodaproducaoagricola.html?edicao=21697&t=downloads>>. Acesso em: 05 de outubro de 2018.

ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K. A population of variants of a viroid closely related to citrus viroid-I in citrus plants. **Archives of virology**, v. 146, p. 2105-2114, 2000.

ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K.; ITO, T. Characterization of a new citrus viroids species tentatively termed citrus viroid OS. **Archives of virology**, v. 146, p. 975-982, 2001.

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**, 92: 542-547, 2002.

JUNIOR, D. M de.; NEGRINI, J. D. de.; FIGUEIREDO, J. O. de.; POMPEU JUNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. **Instituto Agrônômico de Campinas**. Disponível em em: < http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf> . Acesso em: 28 de agosto de 2018.

LIBERATO, E. M. S.; LEONEL, S.; MODESTO, J. H.; SOUZA, J. M. A.; GONÇALVES, B. H. L. Uso de reguladores vegetais na germinação das sementes de citrumelo ‘Swingle’. **Scientia Plena**, Botucatu/SP, v. 9, n. 10, 2013.

LIMA, J.E.O. de. Novas técnicas de produção de mudas cítricas. **Laranja**, Corderópolis, v.7, n.2, p. 463-468, 1986.

MATTOS JUNIOR, D. DE.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O. DE.; POMPEU JUNIOR, P. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf>. Acesso em 05 de setembro de 2018.

MODESTO, J. C.; RODRIGUES, J. D.; DE PINHO, S. Z. Efeito do ácido giberélico sobre o comprimento e diâmetro do caule de plântulas de limão 'cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, p. 332-337, 1996.

MORAIS, E. G de.; CORRÊA, R. M.; LEITE, D. A. P.; VAZ, G. H. B.; SILVA, K. P.; SILVA, C. A. da. Potencial do citrumelo como porta-enxerto na citricultura. Disponível em: <https://www.bambui.ifmg.edu.br/jornada_cientifica/2015/resumos/jornada/AGRONOMIA/19.pdf> Acesso em 25 de novembro de 2018.

MÜLLER, G. W.; TARGON, M. L. P. N. ; CARVALHO, S. A. DE ; SOUZA, A. A.; RODRIGUES, J. C. V. **Doenças de citros causadas por vírus e viróides**. Em: Dirceu Mattos Júnior; José Dagoberto De Negri; Rose Mary Pio; Jorgino Pompeu Júnior. (Org.). CITROS. 1ed. Campinas: **Instituto Agronômico/Fundag**, v. 1, p. 567-604, 2005.

MÜLLER, G.W.; NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S. A.; GIROTTO, L. F.; MACHADO, M. A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, v.23, p.371-386, 2002

MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JÚNIOR., D.; POMPEU JÚNIOR., J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, S. A.; GIROTTO, L. F. Morte súbita dos citros: uma nova doença cítrica no Brasil. **Conference the international organization of citrus virologists**, p.15, 2002.

NAVARRO, B.; FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11262-11267, 1997.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, R.; KALAKI, R. O Retrato da citricultura brasileira. **Markestrat**. 1. ed. 138 p. Ribeirão Preto: 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_MarcosFava.pdf>. Acesso em: 02 de agosto de 2018.

Nucleic Acids Research, v.19, n. 17, p. 4767, 1991.

OWENS, R. A.; FLORES, R.; DI SERIO, F.; LI, SHI-FANG.; PALLÁS, V.; RANGLES, J. W.; SANO, T.; VIDALAKIS, G. Viroids. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS,

E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds.). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: **Elsevier Academic Press**. p. 1221-1234, 2011.

OWENS, R. A.; YANG, G.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; HAMMOND, R. W.; CANDRESSE, T.; BAR JOSEPH, M. Both point mutation and RNA recombination contribute to citrus viroid III sequence diversity. **Virus Genes**. 20:243-252, 2000.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. **Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag**, p. 61-104, 2005.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O. et al. (Ed.). Citricultura brasileira. 2. ed. Campinas: **Fundação Cargill**, v. 1, p. 265-280, 1991.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Citrumelos como porta-enxertos para a laranja 'Valência'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, n. 1, p. 105-107, 2011.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranja Pêra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 44, n. 1, p. 9-14, 2014.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Morte súbita dos citros: suscetibilidade de seleções de limão-cravo e uso de interenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1159-1161, Jaboticabal/SP, 2008.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S.; RESENDE, M. D. V. de. Avaliação genética de seleções e híbridos de limões cravo, Volkameriano e rugoso como porta-enxertos para laranjeiras Valência na presença da morte súbita dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 199-209, Jaboticabal/SP, 2003.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranja Pêra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 44, n. 1, p. 9-14, jan./mar. 2014.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para a laranja 'Valência'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.44, n/7, p.701-705, 2009.

POMPEU JÚNIOR, J.; LARANJEIRA, F. F.; BLUMER, S. Laranjeiras 'valência' enxertadas em híbridos de trifoliata. **Scientia Agricola**, v.59, n.1, p. 93-97, 2002.

PUCHTA, H., RAMM, K., LUCKINGER, R., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M., & SANGER, H. L. Primary and secondary structure of Citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. **Nucleic Acids Research**, v.19 (23), p. 6640, 1991.

RAKOWSKI, 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.

RAKOWSKI, A. G.; SZYCHOWSKI, J. A.; AVENA, Z. S.; SEMANCIK, J. S. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroid. **Journal of General Virology**, 75, p. 3581-3584, California/U.S.A, 1994.

REICHERT, I; PERLBERGER, P. Xyloporosis, the new citrus disease. **Agr. Exp. Sta. Rehovoth, Palestine Bulletin** 12:44, 1934

RODRIGUES, M. J. S.; LEDO, C. A. S.; GIRARDI, E. A.; ALMEIDA, L. A. H.; FILHO, W. S. S. Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 457-470. Jaboticabal/SP, 2015.

SANO, T., HATAYA, T., SHIKATA, E. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of Hop stunt viroid group. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 1. p. 347, 1988.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SIEBURTH, P. J., IREY, M., GARUSEY, S. M., SEMANCIK, J. S., LEVY, L., & HILF, M. E. The Use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. **Proceedings of the Fifteenth Conference on International Organization of Citrus Virologists**, Riverside, California, v. 15, p. 230–238, 2002.

SINGH, R. P.; READY, K. F. M.; NIE, X. Biology. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, p. 30-48, 2003.

T, HATAYA.; K, NAKAHARA.; T, OHARA.; H, IEKI.; T, KANO. Citrus viroid Ia is a derivative of citrus bent leaf viroid (CVd-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. **Archives of Virology**, 143: 971–980, 1998.

- TANGKANCHANAPAS, P.; JUENAK, H.; DE JONGHE, K. First reported occurrence of citrus bent leaf viroid and citrus dwarfing viroid on imported oranges from China and lime fruits from Cambodia. **Springer**, 29(3):416-417, 2018.
- TESSITORI, M.; MARIA, G.; CAPASSO, C.; CATARA, G.; RIZZA, S.; DE LUCA, V.; CATARA, A.; CAPASSO, A.; CARGINALE, V. Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III. **ScienceDirect**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769, p. 228–235, 2007.
- VERNIÈRE, C.; PERRIER.; DUBOIS, C.; DUBOIS,A.; BOTELLA, L.; CHABRIER, C.; BOVÉ, J. M.; DURAN VILA, N. Interactions Between Citrus Viroids Affect Symptom Expression and Field Performance of Clementine Trees Grafted on Trifoliolate Orange. **Phytopathology**, 96(4):356-68, 2006.
- WANG, J.; BOUBOURAKAS, I. N.; VOLOUDAKIS, A. E.; AGORASTOU, T.; MAGRIPIS, G.; RUCKER, T. L.; KYRIAKOPOULOU, P. E.; VIDALAKIS, G. Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. **European Journal of Plant Pathology**. 137:17–27, 2007.
- WANG, X.; ZHOU, C.; TANG, K.; ZHOU, Y.; LI, Z. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal Plant Pathology*. 124:175-180, 2009.
- WEI, Y.; YASIR, K.; LING, I. L.; GANESAN, K. Citrus bent leaf viroid. **Pentanika Journal of Scholarly Research Reviews**. 3 (3): 31-40, 2017.

8 ANEXOS

Protótipo de Kit diagnóstico de *Hop stunt viroid*

KIT HSVIROIDE

Uso pretendido

O Kit HSVIROIDE produzido para fins de diagnóstico do *Hop stunt viroid* (HSVd) foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular deste viróide a fim de impedir sua disseminação no país.

O viróide HSVd pode incidir em espécies da família das *Cucurbitaceae* (pepino-*Cucumis sativus* L.); *Rosaceae* (Ameixa - *Prunus salicina* Lindley; pêssego - *Prunus persica* Batsch), *Vitaceae* (Uvas – *Vitis vinera* ‘Carbenet Sauvignon’; *V. Labrusca* ‘Niagara Rosada’, *Rutaceae* (‘Limão Cravo’- *Citrus limonia* L. Osbeck; Tangelo ‘Orlando’) entre outros.

O Kit HSVIROIDE oferece através do Teste de RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*), um método diagnóstico sensível de detecção do viróide acima referenciado sendo que os iniciadores (*primers*) utilizados no Teste de RT-PCR baseiam-se em regiões do genoma do viróide conservadas e podem detectar tal viróide em espécies vegetais ainda não identificadas no país.

Armazenamento

O Kit HSVIROIDE deve ser armazenado a -10°C

A mistura de iniciadores (*primers*) liofilizados reconstituído em 200 µl de água (destilada, deionizada e autoclavada), livre de *RNAse*, é estável durante um ano quando armazenado a -10°C.

O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores (*primers*) reconstituídos não está documentado.

Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso.
- Usar sempre luvas de látex descartáveis

- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra.
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *RNase* durante o procedimento.
- O *Kit HSVIROIDE* foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para se obter êxito nos resultados.

Reagentes

- Agarose para Biologia Molecular
- Água destilada, deionizada, tratada com DEPC e esterilizada
- *Beta*-mercaptoetanol
- Brometo de Etídio
- Dietil Pirocarbonato de Sódio (DEPC)
- Etanol 70%, 95%
- Gelo
- *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Thermo Fischer)
- Nitrogênio Líquido
- *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil)
- Tampão TAE

Materiais e Equipamentos

- Agitador Magnético (*Vortex*)
- Almofariz e Pistilo
- Autoclave
- Balança Analítica
- Caixa de Isopor
- Caneta *Pillot*
- Capela de Exaustão Química
- Cuba de Eletroforese e Acessórios
- Deionizador de Água

- Destilador de Água
- Fonte de Eletroforese
- Freezer
- Geladeira
- Jaleco
- Luvas de Látex
- Máquina de Gelo
- Martelo
- Microcentrifuga
- Microondas
- Micropipeta (P20, P200, P1000)
- Papel Alumínio
- Papel Toalha
- Pinça
- Ponteiras para micropipeta (P20, P200, P1000)
- Recipiente para Nitrogênio Líquido
- Tambor com Nitrogênio Líquido
- Tesoura
- Termociclador
- Transiluminador de Luz Ultravioleta
- Tubos de Polipropileno de 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml

Descrição:

Princípio do Procedimento:

- Lise das células vegetais da amostra, precipitação seletiva do RNA Total com os produtos do *RNeasy Plant Mini Kit* e amplificação seletiva do RNA genômico através do teste de RT-PCR com o kit *SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*.

Procedimento detalhado:

Para executar este procedimento é indispensável o uso de luvas e jaleco, assim como, a leitura prévia de todo o procedimento a ser adotado.

8.2.1. Determinação

- 1 - Assinalar, pelo analista (AN), no formulário específico que acompanha a amostra (por exemplo, **REG-72.RT-PCR**) a presença ou ausência de sintoma na mesma
- 2 - Colocar luvas descartáveis, fazer assepsia da mesma e da bancada de trabalho com etanol 70%
- 3 - Amostras de vegetais são obtidas e pesadas, em balança analítica, nas seguintes proporções: 0,100 g para amostras tenras (**Folhas**) sendo depositadas em almofariz
- 4 – Separar e verificar os frascos a serem utilizados do *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil), bem como, os tubos de polipropileno (previamente marcados com o número da amostra) a serem utilizados.
- 5 - Coletar o nitrogênio líquido em recipiente adequado e, adicionar o mesmo sob a amostra no almofariz. Em seguida, pulverizar a amostra com o auxílio do pistilo. Adicionar, imediatamente após a pulverização da amostra, com o auxílio de micropipeta P1000, **450 µl** de tampão RLT (**OPCIONAL** - acrescido de 4,5 µl de *Beta*-mercaptoetanol) a amostra pulverizada e, transferir, com o auxílio do pistilo, a amostra pulverizada para tubo de polipropileno de 1,5 ml previamente marcado com o número da amostra. Fechar o tubo, misturar o conteúdo pela agitação vigorosa em *Vortex* por 30 segundos
- 6 - Abrir o tubo, transferir o lisado para coluna lilás (*QIAshredder*) do *kit*, colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Fechar o tubo de polipropileno e depositar na microcentrifuga
- 7 – Centrifugar a 16100 x g (13170 rpm) por dois minutos. Descartar a coluna lilás (*QIAshredder*), transferir o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml com o auxílio de micropipeta P1000
- 8 - Adicionar 0,5 volumes de etanol 95% gelado (mantido no freezer na faixa de temperatura de -35°C a 0°C), com o auxílio da micropipeta P1000 e, misturar gentilmente pela inversão do tubo
- 9 - Transferir o volume (até 650 µl), com o auxílio da micropipeta P1000, para a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Depositar o tubo de polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado
- 10 - Se necessário repetir a etapa 9 com o volume excedente aos 650 µl
- 11 - Adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 700 µl de tampão RW1 a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Depositar o tubo de

polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado

12 - Reusar o tubo de polipropileno com a coluna rosa (*Mini Spin Column*)

13 - Adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 500 µl de tampão RPE a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Depositar o tubo de polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado

14 - Adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 500 µl de tampão RPE a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Depositar o tubo de polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 2 minutos. **OPCIONAL** - Transferir a coluna rosa (*Mini Spin Column*) para tubo de polipropileno (*Collection Tube*) de 2 ml, depositar o tubo de polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 16100 x g (13170 rpm) por um minuto para secar a membrana.

15 - Transferir a coluna rosa (*Mini Spin Column*) para tubo de polipropileno de 1,5 ml, adicionar com o auxílio da micropipeta P200, 50 µl de água (destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada) na coluna. Depositar o tubo de polipropileno na microcentrifuga e, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por um minuto

16 - Descartar a coluna rosa (*Mini Spin Column*), fechar o tubo de polipropileno contendo o filtrado. RNA extraído

17 - Identificar o tubo de polipropileno com o número da amostra e manter no freezer (na faixa de temperatura de 0°C a -35°C) até posterior uso no Teste de RT-PCR.

18 - Para o Teste de RT-PCR retirar, com o auxílio de micropipeta P20, do tubo de polipropileno marcado com o número da amostra, 4 µl do RNA extraído e proceder ao uso dos produtos constantes no *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* segundo instruções do fabricante e, tendo os *primers* específicos e condições de amplificação no termociclador para o vírus alvo registrado no formulário **REG-72.RT-PCR**

19 - Após a amplificação, no termociclador, da amostra de RNA proceder a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X contendo brometo de etídio e, posterior visualização em transiluminador de luz ultravioleta

20 - Registrar o resultado no formulário **REG-72.RT-PCR** associado ao *Kit HSVIROIDE*

21 - Guardar todo o material utilizado, limpar o local de trabalho e encaminhar os formulários ao **GT** (Gerente Técnico).

RESULTADOS

- O teste pode detectar isolados do viróide citado que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as seqüências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*, **EMBL** - *European Molecular Biology Laboratory*).
- Controles Positivos devem ter a massa molecular de seus respectivos *amplicons* indicada no formulário **REG-72.RT-PCR** e facilmente detectável após a eletroforese. A faixa de massa molecular do *amplicon* indicada no formulário tem relação com a origem do isolado de viróide amplificado.
- Controle Negativo (amostra sem a presença do RNA extraído) não deve apresentar qualquer amplificação.

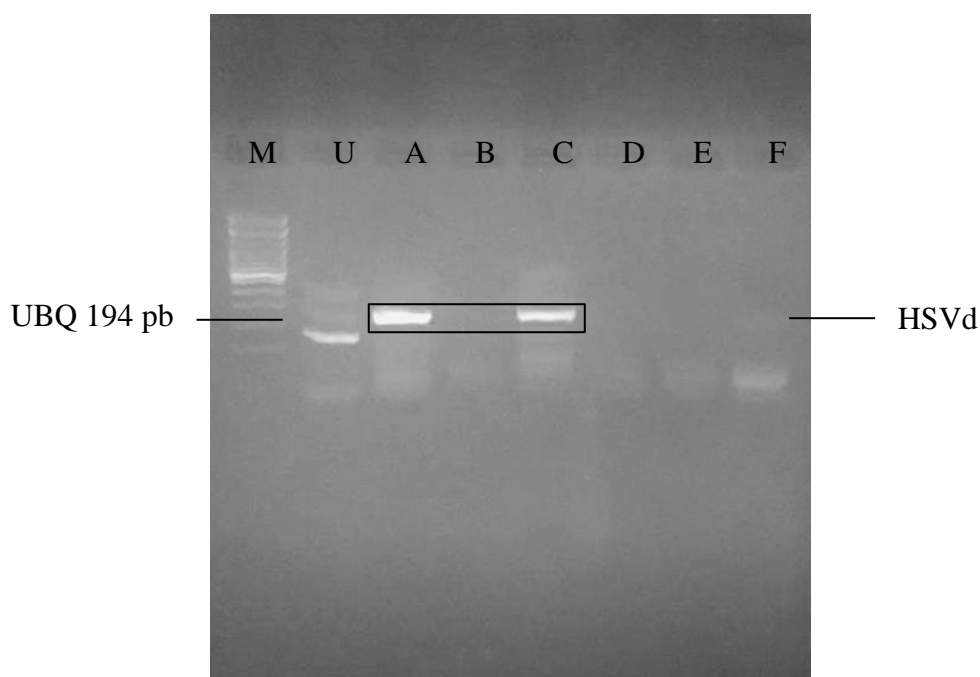


Figura 1. HSVd. Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para HSVd (302 pb). Amostras de folhas de citros das propriedades 1, 2, 3, 4, 5 identificadas no gel pelas letras em sequência A, B, C, D, E e F, sendo a letra F referente também a propriedade M- marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher), na faixa identificada pela letra U está o *amplicon* (194 pb) utilizado como controle, oriundo da extração de RNA associada a Ubiquitina (UBQ). Em A, C – *amplicon* de 302 pb, representando as propriedades 1 e 3.

Limitações

O que se segue é uma descrição de fatores que podem limitar o desempenho do teste ou interferir com os resultados de teste adequados.

- Os iniciadores (*primers*) liofilizados são estáveis durante 1 ano a partir da data de sua confecção, quando armazenados a -10°C.
- Recomenda-se a utilização da mistura de iniciadores (*primers*) reconstituída em um ensaio. Se forem realizados ensaios subsequentes, a mistura de iniciadores deve ser aliquotada e armazenada a -10°C. O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores reconstituídos não está documentado.
- O sucesso do Teste de RT-PCR depende da qualidade do RNA.

Kit HSVIROIDE

REG-72.RT-PCR n°:

DATA: / /

ENSAIO/ CÓDIGO DO PROCEDIMENTO

Título:

Ensaio n°:

Código do Procedimento:

AMOSTRA (MATRIZ)

Número da Amostra:

Sintoma (Especifique):

EXTRAÇÃO DE RNA

Data: / /

Responsável pela Extração de RNA:

Número de Repetição de Extração de RNA/ Amostra:

Código dos Equipamentos utilizados:

Reagentes e Soluções

ITEM	LOTE/ VALIDADE
<i>RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN BRASIL)</i>	
• Tampão RLT	
• Beta-mercaptoetanol (Opcional)	
• Tampão RW1	
• Tampão RPE	
Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada)	
Agarose (para Biologia Molecular)	
Tampão TAE	
Brometo de Etídio	

Controle Branco de Extração (CBE) (Tubo com Água somente): Presente () Ausente ()

Controle Endógeno de Extração (CEE) (Controle Interno para a verificação da Extração de RNA):
Presente () Ausente ()

REAÇÃO DE RT-PCR		
Data: / /		Responsável pela Reação de RT-PCR:
Número de Repetição de Reação de RT-PCR/ Amostra:		
Código dos Equipamentos utilizados:		
Reagentes e Soluções		
ITEM	LOTE/ VALIDADE	
Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada)		
<i>Forward Primer</i> ()		
<i>Reverse Primer</i> ()		
SuperScript® IV One-Step RT-PCR System with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase (Thermo Fisher)		
Agarose (para Biologia Molecular)		
Tampão TAE		
Brometo de Etídio		
Componentes da Reação:	Volume:	Quantidade de Amostra para o Gel:
1. Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada)µl	16 µl/ poço
2. 2 X <i>Mix Reaction</i>µl	
3. <i>Forward Primer</i> (.....sigla do <i>primer</i>)µl	
4. <i>Reverse Primer</i> (.....sigla do <i>primer</i>)µl	
5. SuperScript® IV RT/ Platinum® <i>Taq</i> Mixµl	
6. RNA extraído com <i>RNeasy Plant Mini kit</i>µl	
Volume Totalµl	Preparo do Ladder: 16 µl TAE 1X + 2 µl de DNA <i>Ladder</i> * + 2 µl tampão de Amostra
Controle Branco de Extração (CBE) (Tubo com Água somente): Presente () Ausente ()		() 1 kb <i>plus</i> DNA <i>Ladder</i>
Controle Endógeno de Extração (CEE) (Controle Interno para a verificação da Extração de RNA): Presente () Ausente ()		() 100 pb DNA <i>Ladder</i>
Controle Branco de Reação (CBR) de RT-PCR: Presente () Ausente ()		() 50 pb DNA <i>Ladder</i>
Controle Positivo (CP) (presença de RNA alvo) da Reação de RT-PCR: Presente () Ausente ()		() <i>Ultra Low Range</i> DNA <i>Ladder</i>
Controle Negativo (CN) (ausência de RNA alvo) da Reação de RT-PCR: Presente () Ausente ()		() Outro -.....

CICLO UTILIZADO NO TERMOCICLADOR

Data: / / **Responsável pela inserção da Reação de RT-PCR no Termociclador:**

Código dos Equipamentos utilizados:

Ciclos:

Tempo Total no Termociclador:

ELETROFORESE

Data: / / **Responsável pela Eletroforese:**

Código dos Equipamentos utilizados:

Reagentes e Soluções

ITEM	LOTE/ VALIDADE
Água (Destilada, deionizada e autoclavada)	
Agarose (para Biologia Molecular)	
Tampão TAE	
Brometo de Etídio	

Número	Descrição das Amostras
1	CBE
2	CEE
3	DNA <i>Ladder</i>
4	CBR
5	CP
6	CN
7	Produto de RT-PCR

Eletroforese em TAE	Resultado (<i>Amplicon</i>)	Código da Fotografia do Gel:
1X: Agarose - % (com Brometo de Etídio) Voltagem (volts) - 88 Tempo (minutos) – 20-25 minutos	Negativo () - Amostra número..... Positivo () - Amostra número..... <i>Amplicon (pb) -</i>	Não tirada ()

Local:	Responsável pela análise crítica e conferência dos Resultados (Rubrica):	Data: