

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DISTRIBUIÇÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER
AMERICANUS E *Candidatus* LIBERIBACTER
ASIATICUS EM PLANTAS CÍTRICAS**

Michele do Carmo de Sousa
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Outubro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DISTRIBUIÇÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER
AMERICANUS E *Candidatus* LIBERIBACTER
ASIATICUS EM PLANTAS CÍTRICAS**

Michele do Carmo de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Outubro de 2009

Sousa, Michele do Carmo
S725d Distribuição de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas / Michele do Carmo de Sousa. -- Jaboticabal, 2009.
xiii, 53 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Nelson Arno Wulff, Janete Aparecida Desiderio Sena

Bibliografia

1. Citros. 2. *Greening*. 3. *Huanglongbing*. 4. PCR quantitativo
I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634.31:632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MICHELE DO CARMO DE SOUSA – nascida em 25 de março de 1981, no município de Araraquara - SP, filha de Maria do Carmo de Sousa. Bióloga, graduada em Bacharelado e Licenciatura Plena com ênfase em Ciências Ambientais pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em fevereiro de 2007. Fez estágio durante a graduação no Departamento Científico do Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS onde ingressou na área científica. Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal).

"È MUITO MELHOR ARRISCAR COISAS GRANDIOSAS, ALCANÇAR TRIUNFOS E GLÓRIAS MESMO EXPONDO-SE A DERROTAS, DO QUE FORMAR FILAS COM OS POBRES DE ESPÍRITO QUE NEM VIVEM MUITO, NEM SOFREM MUITO, PORQUE VIVEM NESSA PENUNBRA CINZENTA QUE NÃO CONHECE VITÓRIAS E NEM DERROTAS".

THEODORE ROOSEVELT

"... VOCÊ APRENDE QUE REALMENTE PODE SUPORTAR... QUE REALMENTE É FORTE, E QUE PODE IR MUITO MAIS LONGE DEPOIS DE PENSAR QUE NÃO SE PODE MAIS... E COMEÇA A APRENDER QUE NÃO SE DEVE COMPARAR COM OS OUTROS, MAS COM O MELHOR QUE PODE SER..."

"É NECESSÁRIO ABRIR OS OLHOS E PERCEBER QUE AS COISAS BOAS ESTÃO DENTRO DE NÓS, ONDE OS SENTIMENTOS NÃO PRECISAM DE MOTIVOS NEM OS DESEJOS DE RAZÃO. O IMPORTANTE É APROVEITAR O MOMENTO E APRENDER COM SUA DURAÇÃO, POIS A VIDA ESTÁ NOS OLHOS DE QUEM SOUBER VIVER".

PEDRO BIAL

*Nos momentos de angústia e desespero de minha vida, **Deus** me proporcionou força e coragem, nunca me desamparando perante os obstáculos e me ensinando com seu amor triunfal a ter sempre perseverança na vida...*

*A minha mamãe **Carminha**, minha vovó **Cida** e vovô **Antônio**, meus tios **Marco** e **Cris**, pelo amor, grande apoio, incentivo, força, ensinamento, orações, diálogo, exemplo de vida e por estarem sempre presentes em minhas vitórias. **AMO muito vocês!***

*Ao meu grande Amor **Gustavo**, pela paciência, pelo carinho, pela confiança depositada em mim, pelo grande incentivo, por seu amor e por fazer parte da minha vida...*

TE AMO muitão lindo!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por me fortalecer diante dos obstáculos.

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**, por me conceder oportunidades, por acreditar em mim, pela orientação e confiança, incentivo e amizade.

Ao meu co-orientador **Dr. Silvio Aparecido Lopes**, pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho, pelo meu crescimento, pelos ensinamentos, amizade e acima de tudo pela confiança.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, em nome do diretor do Departamento Científico Antônio Juliano Ayres, pela grande oportunidade de estágio durante a graduação e por sua grande confiança e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À UNESP/Jaboticabal, ao atual coordenador **Prof. Dr. Dilermando Perecin** ao ex-coordenador **Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula** e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação acadêmica.

Aos Membros componentes da comissão examinadora da dissertação: **Dr. Nelson Arno Wulff** e **Profa. Dra. Janete Aparecida Desiderio Sena**, pela contribuição das correções e sugestões aplicadas na defesa da dissertação.

Aos **funcionários** da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela disponibilidade na prestação de serviços.

Aos meus amigos **Guilherme F. Frare (Fungo)** e **Mateus Almeida Santos**, por me ajudarem na coleta do material vegetal, desenho do esquema das plantas e desenvolvimento das técnicas abordadas no trabalho, se disponibilizando para realização de meu trabalho de mestrado, o meu muito OBRIGADO!

Aos meus amigos do Departamento Científico do **FUNDECITRUS**: Fabrício Jaciani, Júlio, Elaine, Cláudia, Héder, Sidney, Gisele, Montesino, Denis, Teresa, Marcos, Priscila, Juliana, Ricardo, Roberta, Renata Tuniati, aos pesquisadores Diva, Nelson, Pedro, Marcel, Belasque, Renato, Marcelo, e a

todos os estagiários, pela preciosa amizade, ensinamentos, paciência e momentos de descontração. Adoro todos vocês!

Aos grandes amigos do **LGBBA** que conquistei ao longo do mestrado: Jú Rossi, Najara, Camila Davolos, Eliane, Daniele (depto. Tecnologia), Paula, Suzana, Gabriela, Jú Xavier, Janaína, Martinha, Jú Costa, Vivian, Larissa, Ana, Meire, Ivana, Aldo e D. Lúcia, pela grande amizade, momentos de alegria e muita força. Sentirei muitas saudades!!!

Aos meus grandes amigos e cúmplices da **república “Rancho das Ditas”**: Rachel, Andressa, Aline, Joseane, Patrícia (Kiti) e agregados: Robert e Rafa, AMO VOCÊS e muitoooo obrigada por tudo... VALEU! Sentirei saudades!!!

Aos meus grandes amigos da **graduação**: Fer Polverari, Sabrina (Sasa), Haroldo, Aline (Kbção), Dani (Poeira), Alexandre (Sem Noçaum), João (sofá) e Suelen (mentira) pela preciosa amizade, pela energia positiva sempre e pelos momentos de descontração. Amo vocês também!!

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Aplicada pela amizade e colaboração.

Em especial a minha **família**, pela colaboração, pelas preciosas orações, pelo incentivo, amor e por acreditarem nesse sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de mestrado.

“A Deus nada é tão difícil e as coisas que parecem ser impossíveis aos nossos olhos se tornam mais claras e óbvias, quando entregamos em suas mãos os caminhos de nossa vida...” Ore sempre nas dificuldades e nas felicidades!

A todos os meus eternos e sinceros agradecimentos.

VALEU PESSOAL!!!

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	XII
SUMMARY.....	XIII
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. HISTÓRIA DO “HUANGLONGBING” OU “GREENING”	04
2.2. BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO HLB - CANDIDATUS LIBERIBACTER SPP.....	05
2.3. TRANSMISSÃO DE CANDIDATUS LIBERIBACTER SPP.....	07
2.4. Sintomatologia.....	07
2.5. Controle.....	08
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1. Amostragem.....	09
3.2. Extração de DNA.....	10
3.3. Quantificação das amostras de DNA por espectrofotômetro.....	11
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR convencional - cPCR simples e cPCR duplo.....	12
3.5. PCR com primers universais da região do DNA ribossomal 16S (rDNA 16S).....	13
3.6. Nested PCR	13
3.7. PCR quantitativo (qPCR).....	14
3.7.1. Quantificação de DNA de <i>Ca. L. americanus</i> e <i>Ca. L. asiaticus</i> para construção da curva de calibração do qPCR (Curva padrão).....	15
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Coleta das amostras em plantas no campo.....	16
4.2. Resultados do cPCR simples, cPCR duplo e Nested PCR.....	19
4.3. Resultados do qPCR.....	21
4.4. Comparação de métodos de detecção e distribuição de liberibacter em plantas de citros afetadas por <i>Ca. L. americanus</i>	23

4.5. Comparação de métodos de detecção e distribuição de liberibacter em plantas de citros afetadas por <i>Ca. L. asiaticus</i>	34
V. CONCLUSÃO.....	47
VI. REFERÊNCIAS.....	48

Distribuição de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas

RESUMO – A severidade dos sintomas provocados pelo *Huanglongbing* (HLB) ou *Greening*, a rápida progressão na incidência de plantas afetadas nos pomares e o fato de esta doença afetar indistintamente todas as variedades comerciais de citros, contribuíram para este estudo que visou conhecer o padrão de colonização da bactéria *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) em plantas cítricas. O PCR convencional é o teste atualmente utilizado na diagnose. Apesar de ser uma técnica reconhecidamente sensível, para o caso do HLB tem sido apenas confirmatório, ou seja, somente permite detecção da presença da bactéria em amostras de folhas sintomáticas. Surgiram aprimoramentos da técnica de PCR, como é o caso do *Nested* PCR e o PCR quantitativo (qPCR), demonstrado neste trabalho ser o método empregado mais sensível que o PCR convencional. Assim, através deste estudo pode-se concluir que Las e Lam se concentraram prioritariamente nas partes com sintomas de HLB das plantas de campo, naturalmente inoculadas e infectadas por liberibacter, se diferenciando na média do número estimado de cópias de liberibacter por grama de folha de plantas afetadas, sendo Las com 5,63 contra 5,01 em plantas afetadas por Lam (título bacteriano). A proporção de amostras positivas para Lam foram de 21 (19%) contra 12 (11,2%) amostras positivas para Las. A maior parte das amostras foi negativa para ambas as liberibacters (96 – Las e 90 – Lam). O pequeno acréscimo nos resultados positivos obtido pelo método de qPCR, aliado ao seu alto custo, não justifica a substituição do PCR convencional por este método na diagnose laboratorial do HLB, ficando restrito somente a pesquisa.

Palavras chave: citros, *Greening*, *Huanglongbing*, PCR quantitativo.

“Distribution of *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* on citrus plants”

SUMMARY - The degree of severity of the symptoms developed by *Huanglongbing* (HLB) or Greening, the fast incidence of diseased plants at different orchards and the fact that this phytopathogen affects various commercial citrus varieties have contributed to the proposition of the present work, that aimed to know the colonization pattern developed by the bacteria *Candidatus Liberibacter americanus* (LAM) and *Candidatus Liberibacter asiaticus* (LAS) on citrus plants. The conventional PCR is the current used assay to detect HLB. Besides being a sensitive and specific technique it is currently seen and a molecular technique that confirms the already symptomatic leaves of diseased plants. Improvements of the PCR technique named the *Nested* PCR and the quantitative PCR is described in this work as the most sensitive to detect the phytopathogen prior to the development of the symptoms disease. So, based on the results obtained in this work it was possible to conclude that LAS and LAM concentrate showed a tendency to appear mostly on parts of the plants exhibiting symptoms and that are already infected by these bacteria, showing difference when mean number of copies of liberibacter per g of leaf of infected plants, with LAS value of 5.63 as compared to 5.01 for LAM on plants with LAM detectable symptoms (high bacterial titer). The ratio of LAM positive samples was 21 (19%) against 12 (11.2%) positive for LAS. The majority of the samples were detected as negative for both bacteria (96% for LAS and 90% for LAM). The small increase on the positive results obtained when qPCR was used and considering its present high analysis cost, this type of PCR is not seen as adequate to diagnose LAM or LAS.

keywords: citrus, *Greening*, *Huanglongbing*, quantitative PCR.

I. INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de frutas cítricas, com uma área cultivada de aproximadamente um milhão de hectares. Sua produção chega em torno de 18,8 milhões de toneladas/ano. O Estado de São Paulo conquistou nas últimas décadas a posição de principal pólo mundial da produção de citros e movimentou R\$9 bilhões por ano, e é responsável por 72% da área cultivada no país, gerando mais de 500 mil empregos diretos e indiretos (IBGE - Censo 2004).

O Brasil é o maior exportador de suco concentrado de laranja do mundo, dominando 50% do mercado mundial. São Paulo e Flórida dominam a produção mundial, sendo um caso raro quando se trata de *commodities* agrícolas (BELASQUE Jr. et al., 2009). Para se ter uma estimativa de valores em 2005, o país exportou 1.777.599 toneladas, gerando 1,1 bilhões de dólares. O Brasil detém hoje 40% da produção mundial de laranja e 59% do processamento dessa fruta, mas vários fatores interferem nesses dados, como por exemplo, problemas climáticos, de mercado e fitossanitários, observados em diversos momentos ao longo dos últimos anos (ROSSETTI, 2001).

Os problemas fitotécnicos e fitossanitários que surgem, têm sido confrontados, mostrando que a pesquisa e a citricultura em geral têm sido parceiras nessa luta constante que é o que garante o grande sucesso dessa atividade, importante fonte de divisas para o nosso país (ROSSETTI, 2001).

Atualmente a citricultura brasileira passa por um dos seus momentos mais difíceis. Somado aos tradicionais problemas fitossanitários que além de reduzir muito a produtividade da laranjeira, as doenças e pragas fazem o custo de produção aumentar consideravelmente. Destacam-se algumas doenças de grande importância como: o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC), a morte súbita (MSC), a pinta preta e recentemente o “Huanglongbing” (HLB), palavra chinesa que significa “doença do ramo amarelo”, assim chamado na China, ou “greening” identificado assim na África. Esta doença é considerada a mais severa e importante de citros do mundo. Embora os membros da Organização Internacional de Virologistas dos Citros – IOCV (“International

Organization of Citrus Virologists”) tenha proposto, em 1995, o nome oficial de “Huanglongbing”, a doença é mundialmente mais conhecida como “Greening”, nome dado na África do Sul por causa da maturação desuniforme dos frutos nas plantas afetadas.

O HLB é associado a três espécies de bactérias Gram-negativas, denominadas *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) africanus*, *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) asiaticus* e a *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) americanus*, que são restritas ao floema das plantas infectadas e de difícil cultivo *in vitro* (DAVIS et al., 2008 e SECHLER et al., 2009). Até 2004, conhecia-se apenas duas espécies de liberibacter, a *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*. Estas duas espécies são transmitidas, respectivamente, pelos psíldeos *Diaphorina citri* (CAPOOR et al., 1967) e *Trioza erytreae* (McCLEAN, et al., 1965). Através de ferramentas da biologia molecular, como seqüenciamento e análise de parte do DNA da bactéria (região gênica e intergênica 16S - 23S), foi possível a identificação de uma terceira espécie no estado de São Paulo, a qual foi denominada *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) americanus* (TEIXEIRA et al., 2005), sendo o psíldeo *D. citri* o vetor da bactéria *Ca. L. americanus* (YAMAMOTO et al., 2006).

Plantas afetadas pelo HLB geralmente não apresentam bom desenvolvimento, com ramos amarelos e desfolha. Os frutos de árvores que apresentam sintomas são pequenos, deformados, contém sementes abortadas e queda precoce dos frutos pela maturação desuniforme.

O primeiro levantamento amostral realizado em setembro de 2004 apontou a presença do HLB em 3,4% dos talhões de citros de 45 municípios paulistas. Após quatro anos após a constatação da presença do HLB no Brasil, através da identificação dos sintomas nas plantas e testes moleculares específicos, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) uma Instrução Normativa nº53 (IN 53), divulgada no Diário Oficial em 17 de Outubro de 2008. Anteriormente a Instrução Normativa nº32, determinava a eliminação somente das plantas sintomáticas comprovadamente infectadas, já a IN 53 determina a eliminação das plantas sintomáticas e assintomáticas do mesmo talhão quando a incidência da doença é

superior a 28%. Além disso, a IN 53 também proíbe a produção de material propagativo de citros, nas áreas de ocorrência do HLB, quando não realizada em ambiente protegido; proíbe a produção, comércio e trânsito de plantas de *Murraya paniculata* nessas mesmas áreas; determina que citricultores façam, no mínimo, inspeções trimestrais para detecção de plantas com HLB e determina que sejam feitas amostras compostas, de 10% das plantas sintomáticas detectadas, para comprovação da infecção por HLB em pomares afetados pela doença (BELASQUE Jr. et al., 2009).

A diagnose do HLB é efetuada pela observação do sintoma típico de mosqueado, que consiste em clorose difusa do limbo foliar, e pela amplificação via PCR convencional (cPCR) de fragmentos dos genes ribossomais e do operon beta das bactérias associadas ao HLB. O teste de PCR convencional tem seu uso limitado apenas para confirmar ou não a presença de *Liberibacter* em amostras suspeitas em função de que o teste é capaz de detectar o patógeno em tecidos sintomáticos (folhas com nervura amarelada e mosqueado) e em tecidos assintomáticos (associado ou não a deficiências minerais) (WULFF et al., 2006 e TEIXEIRA et al., 2008). Atualmente a busca por testes mais sensíveis e capazes de detectar a bactéria em tecidos assintomáticos é enorme, pelo simples fato da planta afetada ser uma grande fonte de inoculo na disseminação da doença nos pomares.

Através de um dos levantamentos amostrais de HLB feito no Estado de São Paulo desde o surgimento da doença, em Abril de 2008 pode-se estimar o número de plantas que apresentavam sintomas da doença. Pode constatar que em São Paulo a doença continua aumentando de forma acelerada e ocorre em todas as regiões citrícolas do Estado. A porcentagem de pomares infestados aumentou (18,6%) e constatou-se aproximadamente 1,15 milhões de plantas sintomáticas. No último levantamento realizado em Abril de 2009 novas regiões, pomares e plantas afetadas pela doença foram constatados. Nesse levantamento, foram detectados 24% dos pomares do Estado de São Paulo com ao menos uma planta sintomática e aproximadamente 1,9 milhões de plantas doentes (BELASQUE Jr. et al., 2009). Estima-se que o número de plantas com sintomas de HLB já tenha atingindo mais de 4 milhões em todo o Estado de São Paulo.

Devido à severidade da doença, os custos de produção aumentados, por ser uma doença que atinge todas as variedades comerciais de laranja doce ('Valência', 'Valência americana', 'Pêra', 'Natal', 'Hamlin', 'Westin', 'Lima Verde', 'Bahia', 'Bahianinha', 'Folha Murcha' e 'Shamouti'), tangerinas ('Ponkan' e 'Cravo'), lima da 'Pérsia', lima ácida 'Tahiti' e tangor 'Murcott', e considerando que o único manejo no momento é o controle do vetor com produtos químicos e erradicação das plantas doentes causando um grande impacto econômico, o trabalho teve por finalidade a busca de metodologias mais sensíveis e com mais especificidade baseados em PCR (PCR convencional simples e duplo, *Nested* PCR e o PCR quantitativo) na detecção do HLB em plantas naturalmente infectadas por este patógeno pelo inseto vetor (*Diaphorina citri* – psílídeo). Conhecer o padrão de colonização e título bacteriano de *Liberibacter* nas plantas cítricas, comparando a severidade das espécies estudadas a *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. História do “*Huanglongbing*” ou “*Greening*”

“Huanglongbing” é uma palavra de origem chinesa, que é designada pela copa das árvores afetadas que contém um ou mais ramos com folhas amarelas, que se destacam dos ramos normais, o que foi primeiramente chamada de doença do “dragão amarelo”. Esse nome foi proposto em homenagem ao Dr. Kung Hsiang Lin, pesquisador chinês, que relatou pela primeira vez a doença no sul da China em 1919 (BOVÉ, 2006), e em 1956, depois de décadas de estudo e convivência com o problema, demonstrou pela primeira vez, que se tratava de uma doença infecciosa que pode ser transmitida por inoculação de enxerto de citros para citros (BASSANEZI et al., 2006).

Tal doença pode ser também chamada de “Greening”, é considerado em muitos países a doença mais destrutiva de citros no mundo, pela severidade dos sintomas, a

queda de produção de frutos, aos elevados custos de inseticidas (principalmente os sistêmicos), o potencial de progressão da doença e por afetar todas as variedades comerciais de citros, independentemente do porta-enxerto ou da copa, havendo apenas diferenças de resistência e tolerância entre elas (AYRES, 2006).

A forma asiática (*Ca. L. asiaticus*) foi descoberta na Arábia Saudita enquanto que a forma Africana (*Ca. L. africanus*) no Yemen do Norte (BOVÉ & GARNIER, 1984). Ocorre em torno de 40 diferentes países. Hoje, as duas formas afetam seriamente os pomares de vários países da Ásia, África, Oceania, América do Sul, América do Norte e do Oriente Médio (BOVÉ, 2006). A doença é mundialmente mais conhecida como "Greening", nome dado na África do Sul por causa da maturação não uniforme dos frutos nas plantas afetadas.

A primeira constatação do HLB nos pomares brasileiros foi em março de 2004, quando alguns citricultores relataram ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) a manifestação de sintomas por eles desconhecidos, em várias plantas de pomares das regiões Centro e Sul do Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2006).

2.2. Bactérias associadas ao HLB – *Candidatus Liberibacter* spp.

Por mais de 60 anos ficou desconhecida a causa da doença. Em 1956, através de estudos do Dr. Kung Hsiang Lin, se confirmou o envolvimento de um agente infeccioso, que a princípio acreditou tratar-se de vírus, pois era o único agente conhecido transmissível por enxertia. Portanto a natureza viral de HLB foi dada como verdadeira por muitos anos. Posteriormente em 1970 (LAFLECHE & BOVÉ, 1970), através de análises microscópicas de tecido vegetal observada por Dr. Kung, que um agente bacteriano em vasos do floema foi associado à doença.

Após diversos estudos relacionados à doença, concluiu-se que, se trata de uma bactéria Gram-negativa, restrita ao floema, pertencente à subdivisão α do grupo das Proteobactérias (JAGOUEIX et al., 1994). Seus parentes mais próximos sendo

membros do subgrupo $\alpha 2$. O nome trivial *Liberibacter* (do latim líber = casca e bacter = bactéria) foi dado para organismos neste novo subgrupo.

Até meados de 2004, conheciam-se apenas duas espécies de *Liberibacter*, a *Ca. L. asiaticus* e a *Ca. L. africanus*. Através do uso de ferramentas da biologia molecular, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais (fD1 e rP1) foram utilizados em DNA de citros de folhas com sintomas e uma nova espécie de *Liberibacter* foi descoberta: *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L) americanus*. Na comparação filogenética baseado na região 16S rDNA, a nova espécie *Liberibacter* não agrupou-se dentro do grupo “asiaticus/africanus”, mas formou uma ramificação separada. Além disso, para a seqüência de 16S rDNA, a seqüência “africanus”, “asiaticus” e “americanus” na região intergênica (IR) e gênica do 16S rDNA e o 23S rDNA, tem sido também comparado entre eles. A comparação entre os DNAr 16S das formas asiática e africana mostrou que eles são 97,8% homólogos (JAGOUÉIX et al., 1994). Enquanto a seqüência de *Ca. L. africanus* e *Ca. L. asiaticus* compartilham 81,2% de identidade, a porcentagem de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. africanus* é de 72,2% já a identidade de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* é apenas 71,4% (TEIXEIRA et al., 2008). Para dada espécie de *Liberibacter*, a região intergênica é altamente conservada: dois variantes diferentes da mesma espécie têm 99% a 100% de seqüência idêntica. Porém, quando uma variante de uma espécie é comparada com uma variante de espécie diferente, a identidade de seqüência é abaixo de 76%. Estes resultados confirmam que “africanus”, “asiaticus” e “americanus” são três espécies diferentes de *Liberibacter* (TEIXEIRA et al., 2006).

Hoje as três espécies conhecidas são: *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) asiaticus* (forma asiática), *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) africanus* (forma africana) e a *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) americanus* (forma americana). *Ca. L. asiaticus* é o agente causal do HLB na Ásia, e também na Flórida, USA. *Ca. L. americanus* é o principal agente do HLB no Estado de São Paulo, Brasil, mas *Ca. L. asiaticus* também está presente (BOVÉ, 2006).

A presença de *Candidatus Liberibacter* spp. foi constatada primeiramente em citros e mais tarde em murta (*Murraya paniculata*) (LOPES et al., 2005).

2.3. Transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp.

O vetor do HLB o *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psilidea) é conhecido no Brasil desde 1942, quando o psílídeo foi descrito por Ângelo da Costa Lima, da escola Nacional de Agronomia do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Galo (ESALQ – USP) em 1960 encontrou pela primeira vez o psílídeo no Estado de São Paulo. Ele foi relatado como vetor da bactéria *Ca. L. americanus* (YAMAMOTO et al., 2006) e *Ca. L. asiaticus* (CAPOOR et al., 1967) no Estado de São Paulo onde a doença foi primeiramente constatada em meados de 2004.

A transmissão do vetor foi primeiramente demonstrada para o tipo africano de HLB (*Ca. L. africanus*), pelo psílídeo africano dos citros, o *Trioza erytraeae*. O psílídeo asiático dos citros o *Diaphorina citri*, foi encontrado também sendo o vetor do tipo asiático de HLB (*Ca. L. asiaticus*) no Brasil. Pesquisas demonstraram que *D. citri*, além de ser o vetor de *Ca. L. asiaticus*, é também o vetor da bactéria *Ca. L. americanus* (YAMAMOTO et al., 2006).

Através do processo de alimentação, o psílídeo de citros adquire o agente causal do HLB de fontes infectadas, sendo que o tempo mínimo de aquisição pode variar de 15 a 30 min para *D. citri* e 24 h para *T. erytraeae*. A transmissão do patógeno para árvores saudáveis, através da inoculação, pode ocorrer em menos de 1 hora para *T. erytraeae*. Períodos de latência relatados podem ser muito variáveis, de 24 h até 21 dias (LOPES, 2006), conduzindo para uma rápida epidemia de HLB se não houver uma medida de controle.

2.4. SINTOMATOLOGIA

Os sintomas de HLB, tanto para *Ca. L. asiaticus* como *Ca. L. americanus*, são virtualmente os mesmos e independe de onde ocorre a doença. Árvores afetadas apresentam folhas com manchas assimétricas e difusas, com áreas de cor verde

normal e outras com coloração verde-pálidas (típico mosqueado), que resultam no desenvolvimento de ramos amarelos (geralmente em brotação nova), o primeiro e principal sintoma característico da doença, com mais evidência no outono e inverno (LOPES, 2006). As árvores têm o seu crescimento afetado (param de crescer) e as folhas caem. Galhos afetados geram frutos bem menores e com forma assimétrica (tortos) contendo sementes abortadas de coloração marrom. Os frutos são pobremente coloridos, com a coloração começando no final do pedúnculo (coloração inversa), ao contrário de uma fruta normal, a partir do ápice (BOVÉ, 2006), e quando cortados longitudinalmente ao meio, observam-se diferenças na cor dos gomos, indicando maturação não uniforme dos mesmos (LOPES, 2006). Assim como as folhas, os frutos caem precocemente, com perda imediata da produção.

A rápida evolução dos sintomas provocados pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. pode tornar a planta totalmente improdutiva em 2 a 5 anos após o surgimento dos primeiros sintomas (BASSANEZI et al., 2006).

2.5. CONTROLE

Ainda não há medidas de controle que sejam efetivas e de baixo custo, nem mesmo existem métodos curativos, para o HLB. Desta forma, a prevenção da infecção das plantas, que uma vez afetadas são fontes de inoculo para outras plantas, é fundamental para o controle do HLB.

O controle apenas é preventivo e baseado, no Estado de São Paulo, em três recomendações: (1) eliminação da fonte de inoculo por remoção de árvores afetadas; identificações destas árvores são baseadas nos seus sintomas, e requer que vários levantamentos sejam feitos a cada ano; (2) tratamentos químicos para diminuir a população do inseto vetor; e (3) uma eliminação total de *Murraya paniculata*, o hospedeiro preferido de *D. citri*, e também hospedeiros nos dois agentes de HLB no Estado de São Paulo: *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* (BOVÉ, 2006).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) na Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Jaboticabal – SP e no laboratório do Departamento Científico do Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. As plantas foram selecionadas previamente com análise por meio da técnica PCR convencional duplo (cPCR duplo), sendo possível identificar qual planta estava infectada por *Ca. L. americanus* ou por *Ca. L. asiaticus*.

Foram selecionadas oito plantas de uma propriedade citrícola no município de Avaré – SP, da variedade “Valência” americana em porta enxerto “Limão Cravo”, com aproximadamente cinco anos. Foram coletadas amostras foliares de três ramos principais oriundos dos troncos principais da planta (pernadas), sendo uma perna sintomática e duas pernadas assintomáticas. Foram coletadas aproximadamente 27 amostras por planta, sendo que em apenas uma planta (planta B) foram coletados quatro ramos secundários da perna sintomática (12 amostras), atingindo um montante de 219 amostras. Da perna sintomática foram coletadas amostras dos três ramos principais (superior, mediano e inferior), e medidas as distâncias das inserções dos ramos medianos e inferiores em relação ao topo dos ramos superiores. Coletou-se aproximadamente 10 folhas por amostra de um total de nove amostras por perna (exceto a planta B que foi coletado 12 amostras do ramo sintomático da perna sintomática). Nas duas pernadas assintomáticas foi seguido o mesmo procedimento.

As folhas coletadas foram lavadas, armazenadas em saco de plástico, identificadas e acondicionadas à 4º C para preservar a qualidade das folhas até o processo de extração de DNA. A identificação e descrição das amostras encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 1. Identificação e descrição das amostras coletadas das 8 plantas de citros com 5 anos de idade do município de Avaré – SP, variedade Valência americana sobre limão Cravo.

Amostra	Rua	Planta	Pernadas	Ramo*	Bactéria detectada
01 – 27	32	A	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. asiaticus</i>
28 – 57	38	B	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. americanus</i>
58 – 84	51	C	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. americanus</i>
85 – 111	82	D	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. americanus</i>
112 – 138	21	E	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. americanus</i>
139 – 165	36	F	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. asiaticus</i>
166 – 192	36	G	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. asiaticus</i>
193 – 219	46	H	1, 2, 3	S, M, I	<i>Ca. L. asiaticus</i>
Total: 219					Total: 8 plantas

*S: ramo superior, M: ramo mediano, I: ramo inferior.

O pecíolo foliar e a nervura central das folhas foram usados para o processo de extração de DNA, sendo as amostras submetidas aos seguintes testes: reação de cPCR simples (usando os *primers* de *Ca. L. americanus* e *asiaticus* separadamente), cPCR duplo (usando os *primers* *americanus* / *asiaticus* juntos na mesma reação), *Nested* PCR e o PCR quantitativo ou qPCR.

3.2. Extração de DNA

Amostras de DNA foram extraídas de nervuras e pecíolos das folhas pelo método envolvendo CTAB, modificado de Murray & Thompson (1980). Meio grama de tecido vegetal fresco foi picado em papel toalha com auxílio de uma lâmina, reduzindo o tecido em pequenos fragmentos e colocados em tubos eppendorf de 2 ml, sobre os quais foi adicionado 1.0 ml do tampão de extração (CTAB 0,053 M, NaCl 1,4 M, PVP 10000 2%, Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,25 M pH 8,0, adicionando β -mercaptoetanol, em uma proporção de 0,2%). A seguir todas as amostras foram incubadas em banho-maria à 65°C por 3 horas, com uma agitação por inversão a cada 30 minutos. As amostras foram então submetidas à centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804R) por 5 min. á

956g á 22°C, e 800 µl do sobrenadante obtido transferido para um novo tubo eppendorf de 2 ml. Posteriormente foi adicionado 800 µl de clorofórmio:isoamilálcool (24:1), e a fase aquosa (700 µl) obtida por centrifugação á 20817g por 5 min. a 22°C, transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 ml. Essa fase da extração (clorofórmio:isoamilálcool) foi repetida por duas vezes. O DNA foi então precipitado pela adição de 0,6 volumes (420 µl) de isopropanol e incubação a -20°C por 30 min. As amostras foram centrifugadas á 20.817g durante 20 min. para formação do *pellet*, o qual foi lavado duas vezes com etanol 70% e centrifugado á 20817g por 10 min. A seguir, o DNA foi desidratado por 3 min em *speed-vac* e ressuspenso em 50 µl de tampão (TE) Tris 10:1 EDTA, pH 8,0.

3.3. Quantificação das amostras de DNA por espectrofotômetro

As amostras de DNA foram previamente diluídas em água ultra-pura (1/100) e quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, para padronização da concentração do DNA. Após a padronização, as amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% para visualização e análise da qualidade dos mesmos. As amostras foram também submetidas à quantificação por meio do aparelho *Nanodrop*. As amostras que resultaram em valores da proporção A_{260}/A_{280} inferiores a 1,8 quando avaliadas pelo *Nanodrop* foram submetidas novamente a lavagens e purificações. A média em ng/µl de DNA das amostras foi de 670,64 ng/µl. As amostras foram diluídas á 100 ng/µl para padronização dos testes aplicados.

Para o cálculo da quantidade de DNA por grama de tecido foliar que compreende nervura central e pecíolo, foi feito a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade DNA por } \mu\text{l} \times \text{Fator de diluição} = \text{Quantidade DNA/g de tecido foliar}$$

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR convencional - cPCR simples e cPCR duplo

Para a detecção de *Ca. L. americanus* e ou *Ca. L. asiaticus* foram realizadas as reações de PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GB1 (5' AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT 3') e GB3 (5' CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG 3') específicos para *Ca. L. americanus* que permite amplificação de 1.027 pares de bases (pb) da região 16S do DNA ribossomal (TEIXEIRA et al., 2005), Oi1 (5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA 3') e Oi2c (5' GCC TCG GCA CTT CGC AAC CCA T 3') para *Ca. L. asiaticus* que amplificam um segmento de 1160 pb da região 16S do DNA ribossomal (JAGOUEIX et al., 1994) e RPLA2 (5' TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT 3') e RPLJ5 (5' ACAAAGCAGAAATAGCACGAACAA 3') para *Ca. L. asiaticus* que amplificam um segmento de 703 pb da região beta operon (HOCQUELLET et al., 1999).

As reações de cPCR simples e cPCR duplo foram feitas em 40 µl contendo 0,5 mM de cada *primer* (cPCR simples – *primers* GB1 e GB3 ou Oi1 e Oi2c usados separadamente e cPCR duplo – *primers* GB1, GB3 e Oi1, Oi2c juntos na mesma reação), 0,2 mM de dNTP, 0,5 mM de MgCl₂, Tampão 1X, 1,5U de *Taq* polimerase e 1 µl de DNA genômico das plantas em estudo (diluídos previamente a uma concentração de 100 ng/µL). As reações foram realizadas no termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) e para as amplificações utilizaram-se os ciclos:

- *Ca. L. americanus* (*primers* GB1 e GB3) utilizou-se 34 ciclos de 94°C por 45 s, 62°C por 45 s, 72°C por 1 min e 4°C por tempo indeterminado.

- *Ca. L. asiaticus* (*primers* Oi1 e Oi2c) 35 ciclos de 92°C por 45s, 72°C por 90 s e 4°C por tempo indeterminado.

- *Ca. L. americanus/asiaticus* (cPCR duplo) 34 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 45 s, 72°C por 90 s, seguindo-se de 72°C por 5 min e 15°C por tempo indeterminado.

Cada 20 µl dos produtos de PCR (*amplicons*) foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X (TAE 50X: Tris, Ácido acético glacial e EDTA) e corados com brometo de etídeo (0,1 µg/mL). A visualização dos

produtos de PCR foi feita em transiluminador UV e registrada pelo sistema de fotodocumentação.

3.5. PCR com *primers* universais da região do DNA ribossomal 16S (rDNA 16S)

As amostras de DNA obtidos no item 3.2 foram utilizados para o PCR com os *primers* universais fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rP1 (5' ACG GTT ACC TTG TTA CGA 3'), que amplificam a região do gene codificador do DNA ribossomal 16S (WEISBURG et al.,1991). A reação da PCR foi feita com um volume final de 40µl contendo 1X Tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada *primer* universal (fD1 e rP1), 1,5U de *Taq* polimerase e 5 µl de DNA genômico vegetal (a 100 ng/µl). Para amplificação utilizou-se um passo inicial de 94°C por 3 min e 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 90 s, e uma extensão final de 72°C por 7 min. Para confirmação da integridade da reação e para se evitar futuras contaminações, a reação foi verificada também por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, descrita no item 3.4.

3.6. *Nested* PCR

A partir da amplificação por PCR com os *primers* universais fD1 e rP1 (item 3.5), parte do produto de cada reação obtida foi utilizado para a *Nested* PCR, empregando-se agora os *primers* mais internos e específicos para cada espécie de liberibacter (*primers* da região 16S do rDNA). Estes *primers* Oi1 e Oi2c específico para *Ca. L. asiaticus* e GB1 e GB3 específico para *Ca. L. americanus*, ocupam uma posição interna no seguimento amplificado pelos *primers* universais fD1 e rP1.

Para a reação envolvendo o *Nested* PCR o produto da primeira reação de PCR foi utilizado na diluição 1:10 em água ultrapura. Das diluições, 2 µl foi utilizado na nova

reação de PCR. O preparo do mix com os *primers* internos Oi1/Oi2c e GB1/GB3, foram feitos como descrito anteriormente no item 3.4 (cPCR simples).

Essa etapa da diluição do produto de PCR com *primers* universais e posteriormente uma nova reação de PCR, agora com *primers* mais internos e específicos para cada tipo de liberibacter, foi feito em fluxo laminar esterilizado com luz UV, para evitar possíveis contaminações.

3.7. PCR quantitativo (qPCR)

A técnica de qPCR mostra-se bastante interessante, pois é uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que possibilita o monitoramento do processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa, com resultados em um tempo bem menor e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial das reações (NOVAIS et al., 2004).

Para os ensaios de qPCR, as amostras de DNA foram obtidas pelo método CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980) modificado, conforme descrito no item 3.2 e o DNA previamente diluído para uma concentração final de 100 ng/μl.

Para a amplificação via qPCR em Tempo Real foi utilizado o aparelho StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems) existente nas dependências do laboratório do Departamento Científico do FUNDECITRUS. Para a amplificação foi utilizado um Kit da Applied Biosystems® denominado SYBR® Green PCR Master Mix, que é um composto fluorescente que se liga entre a fita dupla de DNA, e com excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Durante os ciclos consecutivos do qPCR, a quantidade de DNA de fita dupla se eleva de maneira exponencial, monitorando o aumento da quantidade de fluorescência combinada à geração de *amplicons* durante os ciclos da fase exponencial (LUZ et al., 2004).

Para cada reação foi utilizado uma quantidade de 25 μl do mix: 1x master mix, 150 nM de cada primer de *Ca. L. asiaticus* f-*rp*LAS (5' CGC CCG TTT CCG TTG 3') e r-*rp*LAS (5' AGC CTC TTT AAG CCC TAA ATC AG 3') e *Ca. L. americanus* f-*rp*JAm (5'

GGA CAA GGG GAT ATT GGA TAA TGA TG 3') e *r-rpJAm* (5' ATT AAG AGT TCT AAG CAA CCT GAC 3') (TEIXEIRA et al., 2008) e 500 ng do DNA genômico. Para amplificação do DNA de ambas as liberibacters, o programa utilizado consistiu em 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s, 63°C por 60 s e para obtenção da curva de Melting a temperatura foi de 69°C para 95°C por 20 s. Cada amostra de DNA foi testada em duplicada para o cálculo da média das amostras e a análise dos dados foi feita no software do aparelho StepOne Plus da Applied Biosystems.

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (C_T), esse ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência de cada amostra (NOVAIS et al., 2004).

3.7.1. Quantificação de DNA de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* para construção da curva de calibração do qPCR (curva padrão).

Para validar o limite de detecção e a quantificação dos insertos (*amplicons*) de interesse, os plasmídeos contendo a inserção da seqüência alvo foram utilizados para obtenção da curva padrão (TEIXEIRA et al., 2008 e LOPES et al., 2009). Após as etapas de clonagem, seqüenciamento e confirmação pelo Blast, os plasmídeos contendo os *amplicons* (*Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*) foram então diluídos para uma concentração final de 10 ng/ μ l e mantidos à 4 °C até o momento do uso.

A curva padrão foi construída por intermédio de diluições seriadas e decimais dos plasmídeos. Foram empregadas 6 diluições em série da solução de DNA plasmidial a 10 ng/ μ L, contendo na primeira diluição utilizada na curva padrão 150 mil cópias do inserto e na última diluição 1,5 cópias do *amplicon* alvo.

Para o cálculo do título bacteriano (Log_{10}), ou seja, o número de células de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido foliar, foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Log}_{10} = \frac{(\text{Qtde DNA de liberibacter}/100 \text{ ng de DNA total} \times \text{Qtde DNA/grama de tecido foliar})}{100}$$

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta das amostras foliares de plantas de campo

Na quadras da propriedade em estudo, foram inicialmente selecionadas 25 plantas que apresentavam os sintomas típicos da doença em apenas um ramo, o qual se destacava dos outros pela coloração amarelada de suas folhas. Todas as plantas encontradas foram avaliadas por cPCR duplo. Das plantas que resultaram positivo para liberibacter, selecionou-se quatro infectadas por *Ca. L. americanus* (Lam) e quatro por *Ca. L. asiaticus* (Las) (Fig. 1), a maioria exibindo sintomas iniciais da doença, caracterizados por amarelecimento foliar com clorose difusa ou não, associado a sintomas leves de deficiência mineral.

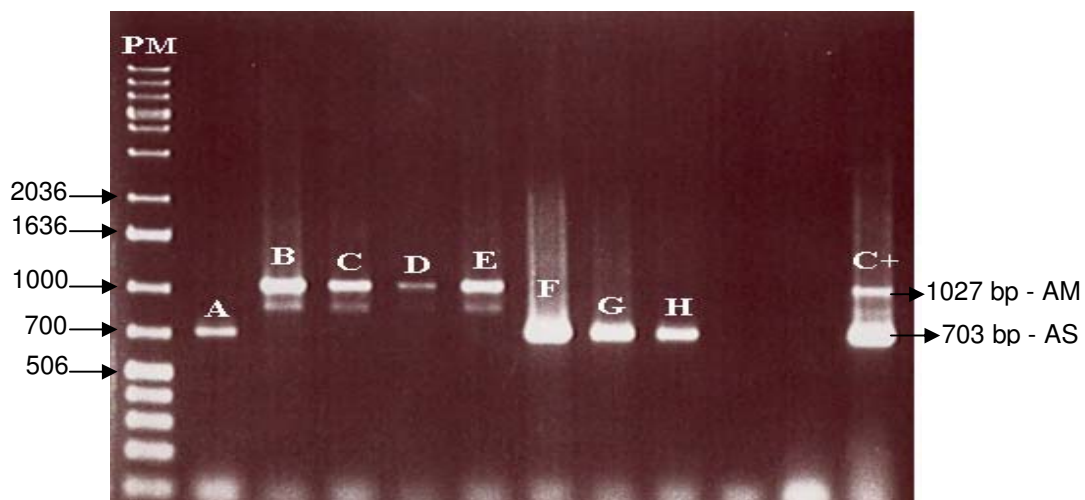


Figura 1. Eletroforograma em gel de agarose 1,2% em TAE [1X] com o resultado da primeira amplificação por cPCR duplo para selecionar as plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* (AS) e *Ca. L. americanus* (AM). Planta A=AS, B= AM, C= AM, D= AM, E= AM, F= AS, G= AS, H= AS. Os dois pares de *primers* utilizados foram GB1/GB3 (1027 bp) e RPLA2 e RPLJ5 (703 bp). PM= marcador de tamanho molecular de 1 kb, C+= controle positivo para ambas liberibacters (*Ca. L. asiaticus* – AS e *Ca. L. americanus* – AM).

A Figura 2 ilustra uma das oito plantas escolhidas e a Figura 3 mostra o corte oriundo dos troncos principais da planta (pernadas) assintomáticas e sintomáticas.



Figura 2. Foto da planta A infectada pela bactéria *Ca. L. asiaticus* em estágio inicial. Círculo em vermelho mostra o ramo superior apresentando sintoma típico de HLB.



Figura 3. Foto da planta A. Seta branca indica como foi a retirada da perna assintomática e perna sintomática para escolha dos ramos (superiores, medianos e inferiores), desenho da planta e coleta das amostras.

No total foram coletadas 219 amostras, sendo que cada amostra era composta de 10 folhas aproximadamente. As amostras foram lavadas, identificadas, fotografadas e armazenadas em saco plástico à 4°C (Fig. 4).



Figura 4. Amostras de folhas da planta A positiva para *Ca. L. asiaticus*. Círculo em vermelho ilustra a amostra 2 com sintoma visual de mosqueado leve, típico do HLB.

4.2. Resultados do cPCR simples, cPCR duplo e *Nested* PCR

A Figura 5 mostra fotos representativas das amostras de DNA amplificadas por cPCR simples e duplo e *Nested* PCR submetidas a eletroforograma em gel de agarose a 1,2%.

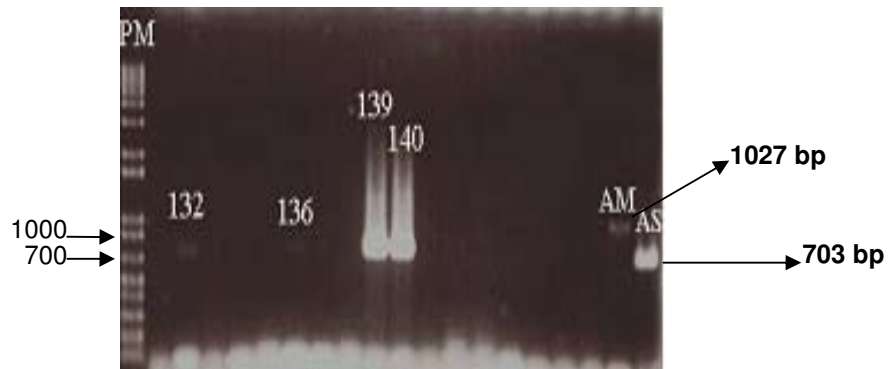


Foto A

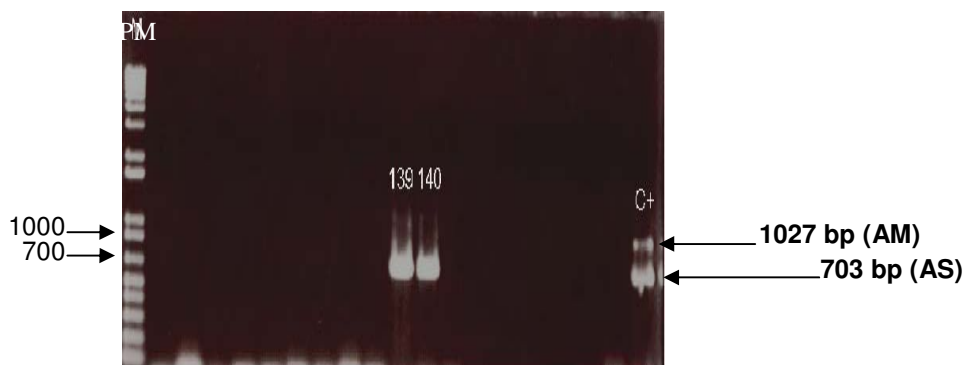


Foto B

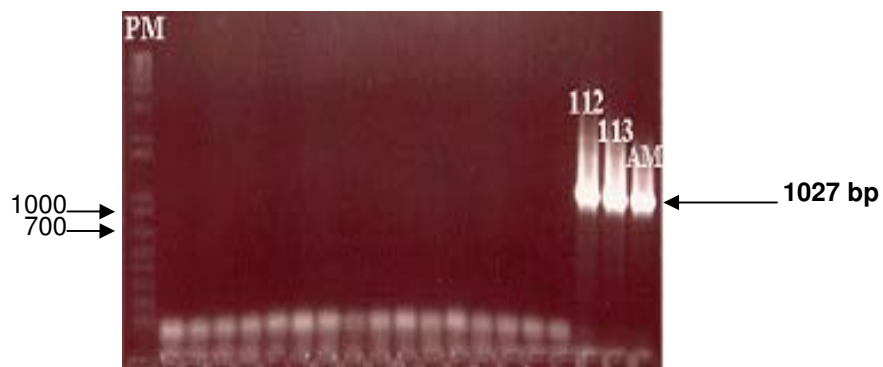


Foto C

Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose 1,2% em TAE [1X] com o resultado da amplificação de algumas amostras positivas por cPCR simples (Foto A), cPCR duplo (Foto B) e *Nested* PCR (Foto C). O par de *primers* utilizados para *Ca. L. americanus* (AM) foi o GB1 e GB3 (1027 bp) e para *Ca. L. asiaticus* (AS) foi o RPLA2 e RPLJ5 (703 bp) PM= marcador de tamanho molecular de 1 kb.

4.3. Resultados do qPCR

Para a quantificação de *amplicons* formados na reação, uma curva padrão de plasmídeos foi construída contendo insertos de liberibacter (Fig. 6). Se apenas os produtos específicos da PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico contendo as temperaturas de Melting de cada par de *primers* utilizado, para *Ca. L. americanus* essa temperatura é de 75,4°C e para *Ca. L. asiaticus* é de 77,4°C, essa temperatura mede onde a metade do produto da PCR está dissociada (desnaturado). Essa temperatura se difere pela concentração de CG e pelo comprimento dos oligonucleotídeos (Fig. 7). O ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (threshold) é chamado de Ct (Cycle Threshold) (Fig. 8).

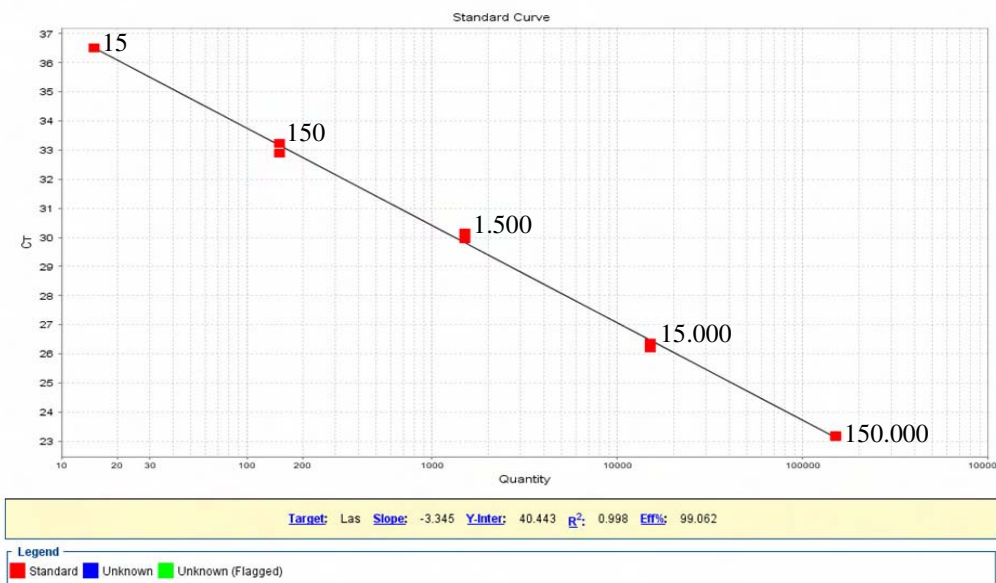


Figura 6. Curva de plasmídeos para padronização do título bacteriano das amostras. Quadrados em vermelho mostram os pontos formados a partir das diluições seriadas dos plasmídeos (150.000 bactérias equivalem a um Ct de 23 e para 15 bactérias o Ct foi de 36,5) com 99.06% de eficiência.

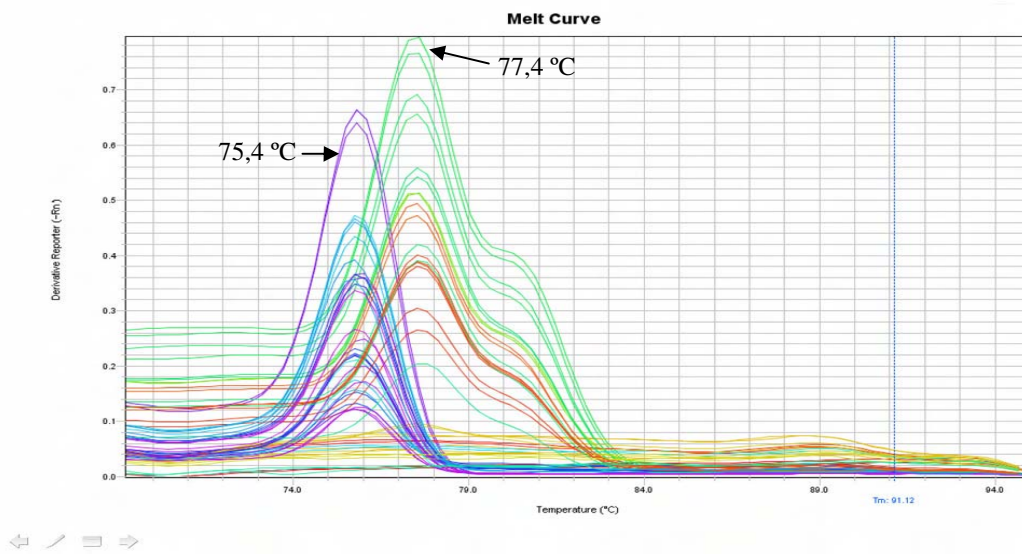


Figura 7. Curva de Melting específica de *Ca. L. americanus* (pico menor do gráfico 75,4 °C) e *Ca. L. asiaticus* (pico maior do gráfico 77,4 °C).

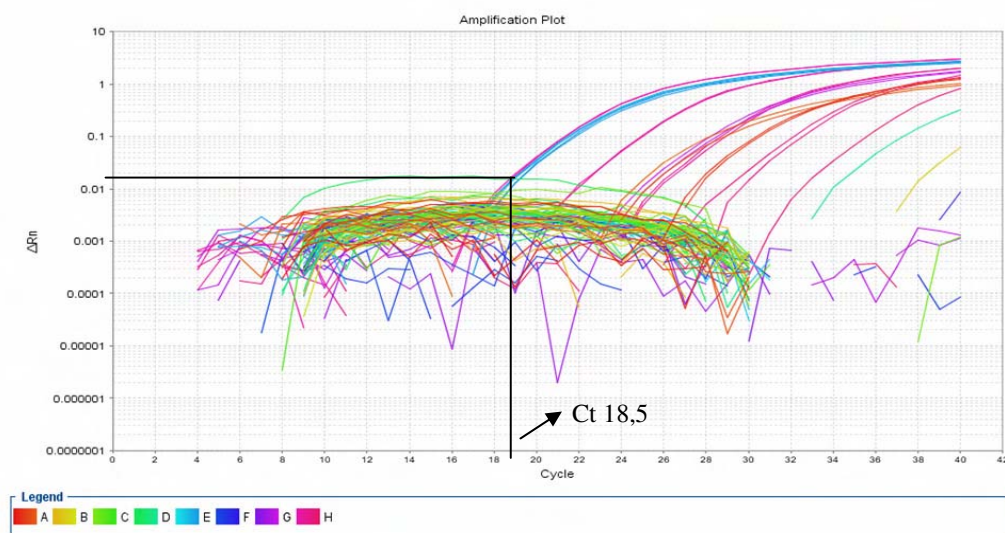


Figura 8. Amplificação de amostras submetidas ao qPCR. Traço mostra fase exponencial e o Cycle Threshold (Ct). Seta preta mostra o Ct no valor de 18,5 de uma das amostras.

4.4. Comparação de métodos de detecção e distribuição de liberibacter em plantas de citros afetadas por *Ca. L. americanus*.

São apresentados nas Figuras 9 a 12 e nas tabelas 2 a 9 correspondentes, os resultados das análises das 4 plantas de citros selecionadas no campo naturalmente infectadas por *Ca. L. americanus*.

Das 4 plantas afetadas por *Ca. L. americanus*, a planta B foi a única que apresentava sintomas em todos os ramos secundários da perna sintomática, conforme pode ser verificado na Figura 11 e tabelas 6 e 7. Por esse motivo, diferentemente das demais, foram coletadas amostras dos 4 ramos secundários da mesma.

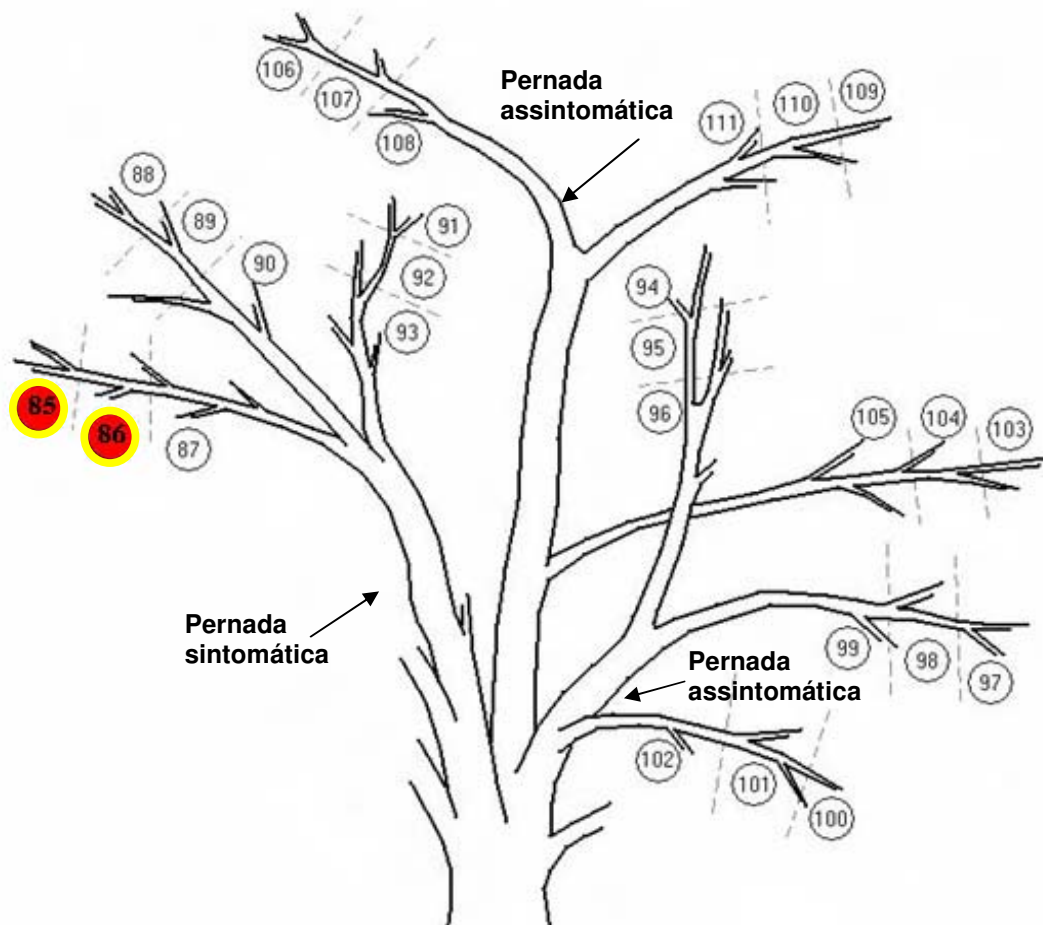


Figura 9. Esquema de planta D de citros infectada por *Ca. L. americanus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções dos ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (Tabela 2) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 2. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta D.

Planta D – <i>Ca. L. americanus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
85	+	+	+	27,74	5,63
86	+	+	+	31,23	4,42

Tabela 3. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta D (Fig. 9) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. americanus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nested PCR	PCR quantitativo	
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**
85	1	1	superior	sintomático	+	+	+	27,74	5,63
86			mediana	sintomático	+	+	+	31,23	4,42
87			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
88		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
89			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
90			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
91		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
92			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
93			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
94	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
95			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
96			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
97		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
98			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
99			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
100		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
101			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
102			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
103	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
104			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
105			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
106		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
107			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
108			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
109		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
110			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
111			inferior	assintomático	-	-	-	-	0

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta D a bactéria foi detectada somente no ramo sintomático havendo total concordância entre os métodos empregados. O título médio foi 5,02 log do número de liberibacter por grama de tecido (log Lam/g), concentrando-se no topo do ramo superior com 5,63 log Lam/g. Na posição mediana da mesma perna esse valor chegou a 4,42 log Lam/g. Provavelmente a infecção se deu originalmente no topo do ramo superior de onde a bactéria se movimentou via floema para a posição mediana do mesmo ramo.

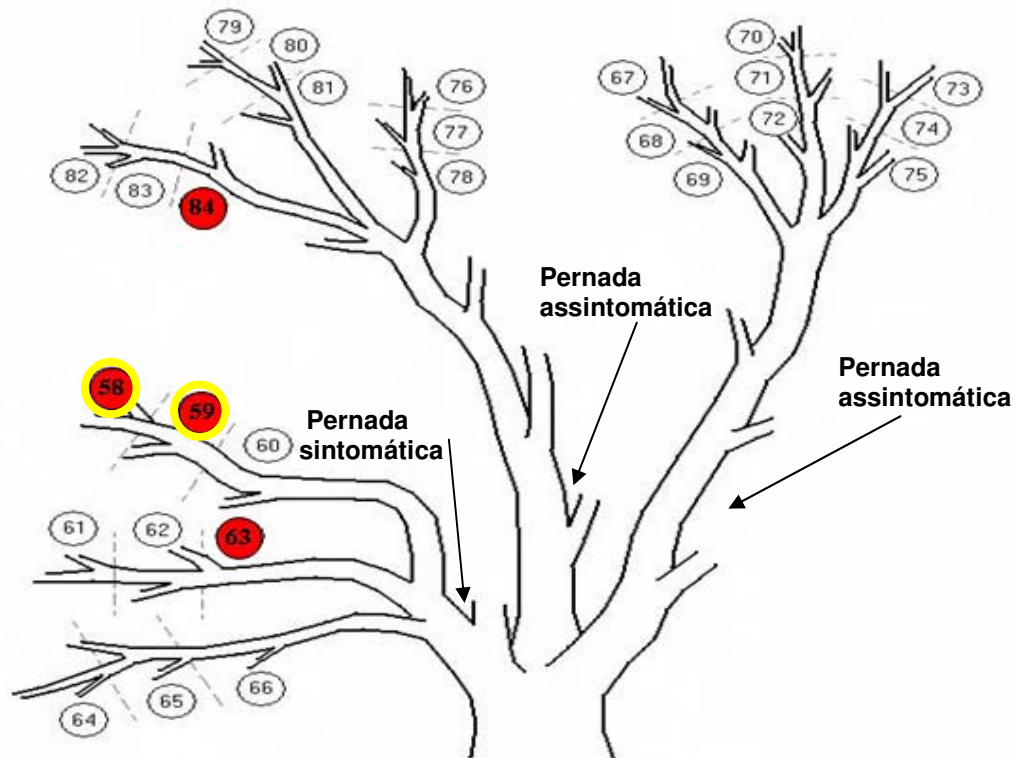


Figura 10. Esquema de planta C de citros infectada por *Ca. L. americanus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções dos ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (Tabela 4) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas para todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 4. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta C.

Planta C – <i>Ca. L. americanus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
58	+	+	+	30,40	4,77
59	+	+	+	34,32	3,68
63	-	-	+	-	0
84	-	-	-	33,92	3,77

Tabela 5. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta C (Fig. 10) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. americanus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nestcd PCR	PCR quantitativo		
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**	
58	1	1	superior	sintomático	+	+	+	30,40	4,77	
59			mediana	sintomático	+	+	+	34,32	3,68	
60			inferior	sintomático	-	-	-	-	0	
61		2		superior	assintomático	-	-	-	-	0
62				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
63				inferior	assintomático	-	-	+	-	0
64		3		superior	assintomático	-	-	-	-	0
65				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
66				inferior	assintomático	-	-	-	-	0
67	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
68			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
69			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
70		2		superior	assintomático	-	-	-	-	0
71				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
72				inferior	assintomático	-	-	-	-	0
73		3		superior	assintomático	-	-	-	-	0
74				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
75				inferior	assintomático	-	-	-	-	0
76	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
77			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
78			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
79		2		superior	assintomático	-	-	-	-	0
80				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
81				inferior	assintomático	-	-	-	-	0
82		3		superior	assintomático	-	-	-	-	0
83				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
84				inferior	assintomático	-	-	-	33,92	3,77

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

De maneira similar à planta D, a planta C houve também concordância dos métodos empregados, sendo positivo para o ramo superior e mediano e negativo para o ramo inferior sintomático. Duas amostras provenientes de ramos assintomáticos deram resultados positivos, uma com *Nested* PCR em ramo assintomático da mesma perna sintomática, e outra com qPCR em ramo assintomático de uma perna assintomática. Quanto ao resultado positivo obtido com *Nested* PCR, este foi confirmado em

repetições do teste feito com 100 e 500 ng/μl do DNA. Como esta amostra foi positiva somente com o *Nested* PCR, não foi possível calcular o título bacteriano. Com relação ao resultado positivo somente com o qPCR, também foram feitas repetições confirmando-se o resultado. Para este caso, o Ct e título bacteriano (33,92 e 3,77 log Lam/g) foi equivalente ao observado para o ramo sintomático da perna 1. Essa amostra estava a uma distância considerável da perna sintomática, tratando-se provavelmente do resultado de uma infecção secundária mais recente e independente da que se deu na perna 1.

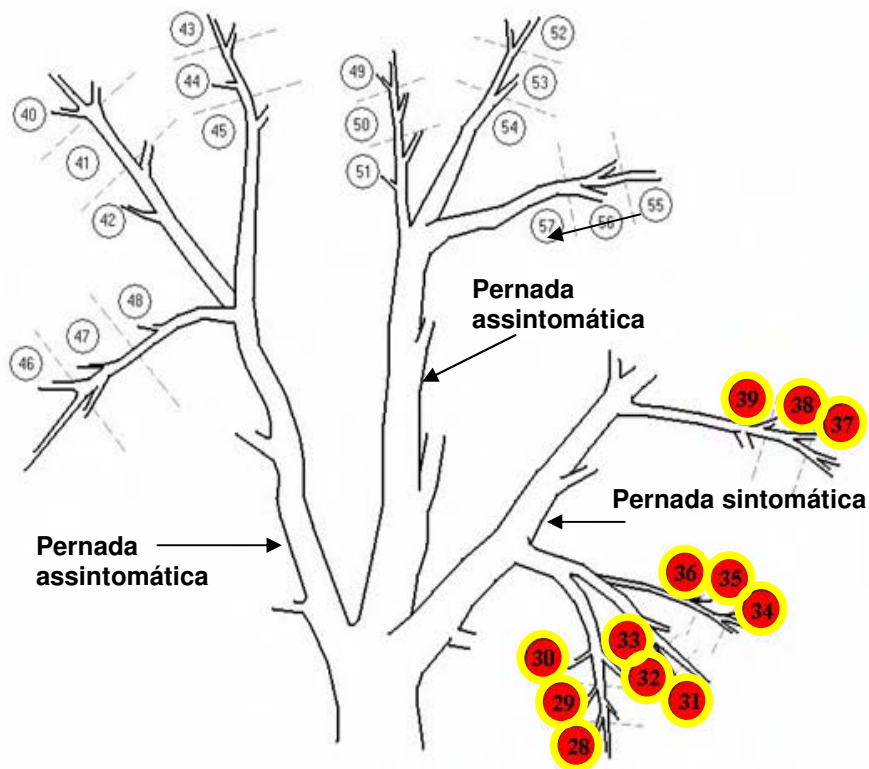


Figura 11. Esquema de planta B de citros infectada por *Ca. L. americanus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (Tab. 6) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 6. Resultado das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta B.

Planta B – <i>Ca. L. americanus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
28	+	+	+	25,75	5,97
29	+	+	+	26,93	5,66
30	+	+	+	31,72	4,40
31	+	+	+	27,32	5,55
32	+	+	+	27,29	5,56
33	+	+	+	32,07	4,29
34	+	+	+	32,51	4,35
35	+	+	+	28,53	5,25
36	+	+	+	28,50	5,24
37	+	+	+	35,92	3,26
38	+	+	+	28,89	5,14
39	+	+	+	28,41	5,26

Tabela 7. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta B (Fig. 11) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. americanus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nested PCR	PCR quantitativo		
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**	
28	1	1	superior	sintomático	+	+	+	25,75	5,97	
29			mediana	sintomático	+	+	+	26,93	5,66	
30			inferior	sintomático	+	+	+	31,72	4,40	
31		2	superior	sintomático	+	+	+	27,32	5,55	
32			mediana	sintomático	+	+	+	27,29	5,56	
33			inferior	sintomático	+	+	+	32,07	4,29	
34		3	superior	sintomático	+	+	+	32,51	4,35	
35			mediana	sintomático	+	+	+	28,53	5,25	
36			inferior	sintomático	+	+	+	28,50	5,24	
37		4	superior	sintomático	+	+	+	35,92	3,26	
38			mediana	sintomático	+	+	+	28,89	5,14	
39			inferior	sintomático	+	+	+	28,41	5,26	
40	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
41			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
42			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
43		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
44			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
45			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
46		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
47			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
48			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
49		3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
50				mediana	assintomático	-	-	-	-	0
51				inferior	assintomático	-	-	-	-	0
52	2		superior	assintomático	-	-	-	-	0	
53			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
54			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
55	3		superior	assintomático	-	-	-	-	0	
56			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
57			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta B, os sintomas observados foram similares aos que caracterizam a doença no campo, ou seja, mosqueado foliar, desfolha próxima ao topo, nervuras salientes e amareladas. A maior extensão dos sintomas indica que nesta planta a infecção já se encontrava em estágio mais avançado que nas demais. Por causa disso, diferente das demais, foram coletadas amostras de quatro ramos secundários da

mesma. A bactéria foi detectada em todos os ramos sintomáticos, mas em nenhum dos ramos que não apresentava sintomas. Houve concordância total entre os métodos de detecção empregados. O título bacteriano foi em média 5,34 (ramo 1 sintomático); 5,13 (ramo 2 sintomático); 4,94 (ramo 3 sintomático) e 4,55 (ramo 4 sintomático). Ou seja, foi detectado 2,0, 4,0 e 4,4 vezes mais bactéria no ramo 1 em relação aos ramos 2, 3 e 4. Maior título foi observado na posição superior do ramo 1 (5,97 log Lam/g) e Ct de 25,75.

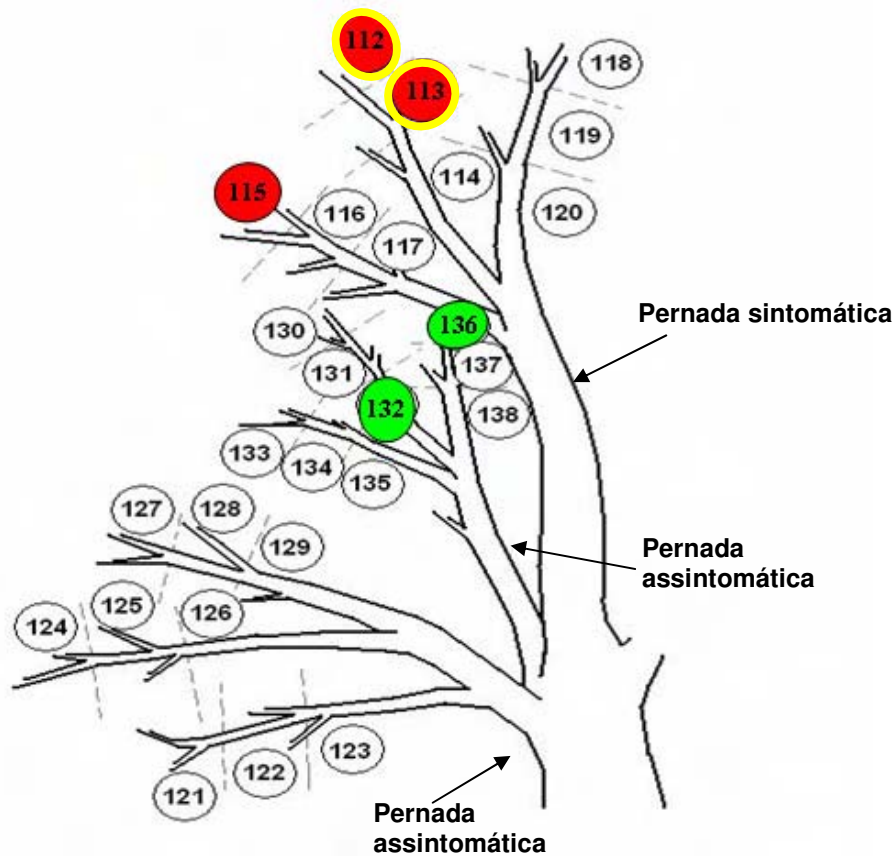


Figura 12. Esquema de planta E de citros infectada por *Ca. L. americanus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (Tabela 8) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam os sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Círculos em verde indicam amostras positivas para *Ca. L. asiaticus*. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 8. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta E.

Planta E – <i>Ca. L. americanus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
112	+	+	+	29,72	5,73
113	+	+	+	29,68	5,74
115	-	-	+	31,10	5,33
132	-	+	-	34,90	4,38
136	-	+	-	33,16	4,84

Tabela 9. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta E (Fig. 12) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. americanus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nested PCR	PCR quantitativo		
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**	
112	1	1	superior	sintomático	+	+	+	29,72	5,73	
113			mediana	sintomático	+	+	+	29,68	5,74	
114			inferior	sintomático	-	-	-	-	0	
115		2	superior	assintomático	-	-	+	31,10	5,33	
116			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
117			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
118		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
119			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
120			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
121	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
122			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
123			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
124		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
125			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
126			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
127		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
128			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
129			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
130	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
131			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
132			inferior	assintomático	-	+	***	-	34,90	4,38
133		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0	
134			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
135			inferior	assintomático	-	-	-	-	0	
136		3	superior	assintomático	-	+	***	-	33,16	4,84
137			mediana	assintomático	-	-	-	-	0	
138			inferior	Assintomático	-	-	-	-	0	

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

*** Amostras de planta infectada por *Ca. L. americanus* que foi positiva para *Ca. L. asiaticus* nos testes de dPCR e qPCR.

Na planta E, a distribuição irregular de Lam foi visível, estando presente em ramos sintomáticos e assintomáticos, em populações de 5,73 e 5,74 log Lam/g no ramo sintomático e de 5,33 no ramo assintomático da mesma pernada. É importante salientar que esta planta foi escolhida primeiramente por cPCR duplo, com resultado positivo somente para Lam em amostras coletadas do ramo sintomático. No entanto, quando

outras amostras foram analisadas, Las também foi detectada por cPCR duplo e qPCR em ramos assintomáticos da perna 3 assintomática, com média de 4,61 log Las/g. Isso evidencia exposição da planta por psílídeos infectivos portando individualmente ambas as liberibacters.

4.5. Comparação de métodos de detecção e distribuição de liberibacter em plantas de citros afetadas por *Ca. L. asiaticus*

As figuras 13 a 16 mostram o esquema das 4 plantas de citros selecionadas no campo naturalmente infectadas por *Ca. L. asiaticus* e as tabelas 10 a 17 são correspondentes aos resultados dos testes analisados em todas as amostras.

As 4 plantas afetadas por *Ca. L. asiaticus*, todas apresentavam o mesmo padrão de sintomas iniciais da doença, sendo apenas um ramo e uma perna com sintomas aparentes. Então as amostras seguiram o mesmo procedimento das plantas infectadas por *Ca. L. americanus*.

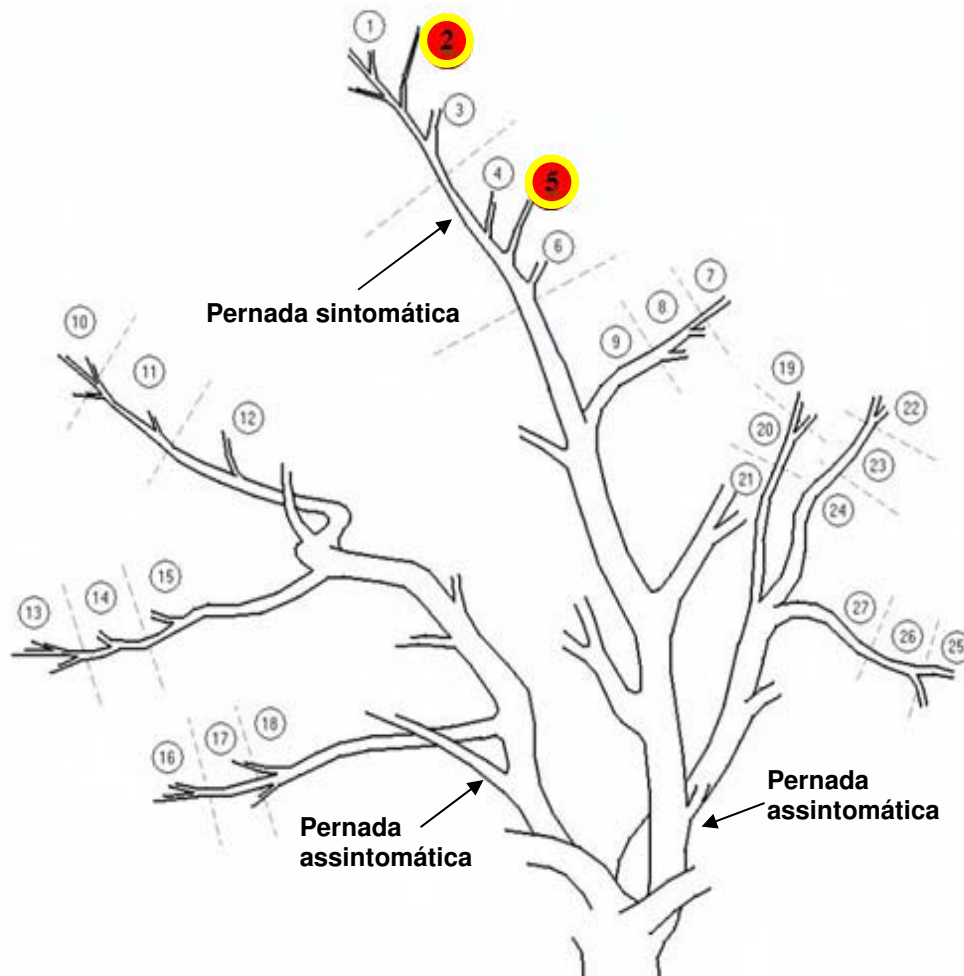


Figura 13. Esquema de planta A de citros infectada por *Ca. L. asiaticus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (Tabela 10) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 10. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta A.

Planta A – <i>Ca. L. asiaticus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
02	+	+	+	30,12	4,82
05	+	+	+	28,18	5,37

Tabela 11. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta A (Fig. 13) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. asiaticus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nested PCR	PCR quantitativo	
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**
01	1	1	superior	sintomático	-	-	-	-	0
02			mediana	sintomático	+	+	+	30,12	4,82
03			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
04		2	superior	sintomático	-	-	-	-	0
05			mediana	sintomático	+	+	+	28,18	5,37
06			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
07		3	superior	sintomático	-	-	-	-	0
08			mediana	sintomático	-	-	-	-	0
09			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
10	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
11			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
12			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
13		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
14			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
15			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
16		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
17			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
18			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
19	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
20			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
21			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
22		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
23			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
24			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
25		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
26			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
27			inferior	assintomático	-	-	-	-	0

*Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta A Las foi detectada somente na perna sintomática, nos ramos sintomáticos 1 e 2 na posição mediana, havendo concordância total entre os métodos de detecção empregados. A média do título bacteriano foi de 5,1 log Las/g. O título bacteriano do ramo 1 (4,82 log Las/g), localizado a 35 cm do ramo superior, foi 3,5 vezes menor que o título do ramo 2 (5,37 log Las/g) localizado em uma inserção mais abaixo, mais distante do ramo superior. Estas diferenças se devem provavelmente a inoculações da bactéria em diferentes épocas.

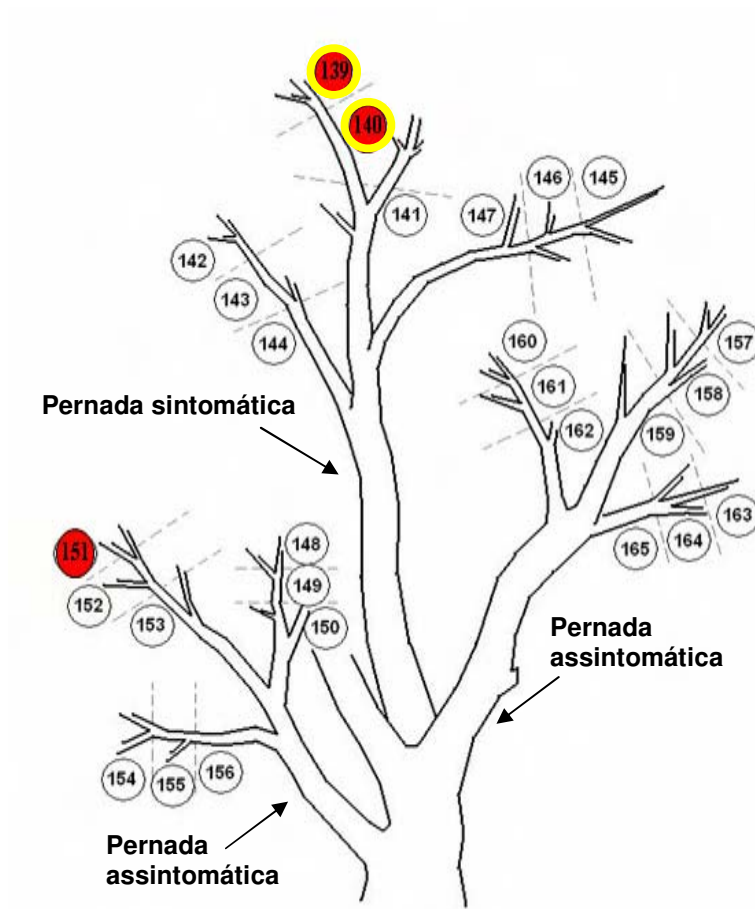


Figura 14. Esquema de planta F de citros infectada por *Ca. L. asiaticus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (tabela 12) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 12. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta F.

Planta F – <i>Ca. L. asiaticus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
139	+	+	+	21,26	7,28
140	+	+	+	21,50	7,21
151	-	-	-	32,51	4,50

Tabela 13. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta F (Fig.14) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. asiaticus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nested PCR	PCR quantitativo	
					Simplex	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**
139	1	1	superior	sintomático	+	+	+	21,26	7,28
140			mediana	sintomático	+	+	+	21,50	7,21
141			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
142		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
143			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
144			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
145		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
146			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
147			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
148	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
149			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
150			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
151		2	superior	assintomático	-	-	-	32,51	4,50
152			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
153			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
154		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
155			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
156			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
157	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
158			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
159			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
160		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
161			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
162			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
163		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
164			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
165			inferior	assintomático	-	-	-	-	0

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta F Las foi detectada em duas posições do mesmo ramo sintomático da perna sintomática onde houve concordância entre todos os métodos. Las também foi detectada na posição superior de um dos ramos de uma perna assintomática. A concentração bacteriana nos dois ramos sintomáticos foi de 7,28 e 7,21 log Las/g. A amostra que se localizava na perna que não apresentava qualquer sintoma de HLB, o título bacteriano foi inferior (4,5 log Las/g), provavelmente abaixo do limiar necessário

para induzir sintomas foliares. Houve na planta distribuição desigual das bactérias como ilustrado na figura 14.

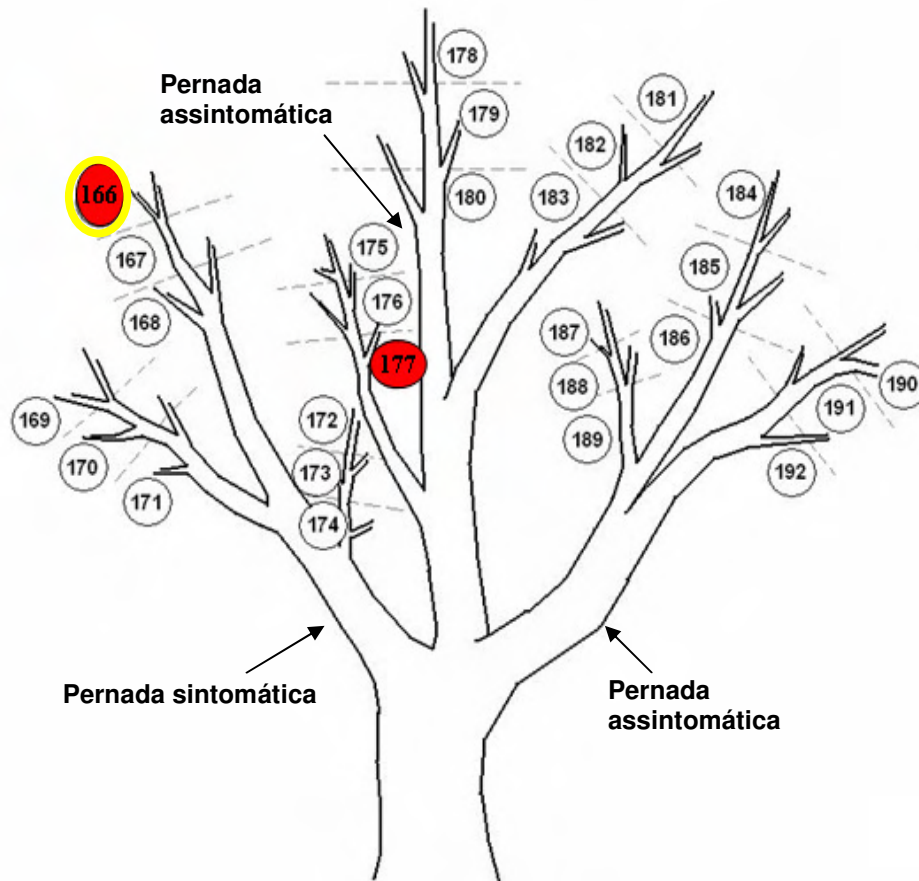


Figura 15. Esquema de planta G de citros infectada por *Ca. L. asiaticus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (tabela 14) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas de HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 14. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta G.

Planta G – <i>Ca. L. asiaticus</i>					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
166	+	+	+	24,88	6,65
177	-	-	-	31,08	4,93

Tabela 15. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta G (Fig.15) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. asiaticus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nestcd PCR	PCR quantitativo	
					Simples	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**
166	1	1	superior	sintomático	+	+	+	24,88	6,65
167			mediana	sintomático	-	-	-	-	0
168			Inferior	sintomático	-	-	-	-	0
169		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
170			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
171			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
172		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
173			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
174			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
175	2	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
176			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
177			inferior	assintomático	-	-	-	31,08	4,93
178		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
179			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
180			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
181		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
182			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
183			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
184	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
185			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
186			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
187		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
188			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
189			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
190		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
191			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
192			inferior	assintomático	-	-	-	-	0

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta G, Las foi detectada em um ramo sintomático por todos os métodos empregados com título bacteriano de 6,65 log Las/g. Las também foi detectada em amostra assintomática (amostra 177) por meio do qPCR (Ct 31,08), onde o título foi 50 vezes menor (4,93 log Las/g) que no ramos sintomáticos. Também neste caso, o título estava provavelmente abaixo do limiar necessário para expressão de sintomas foliares.

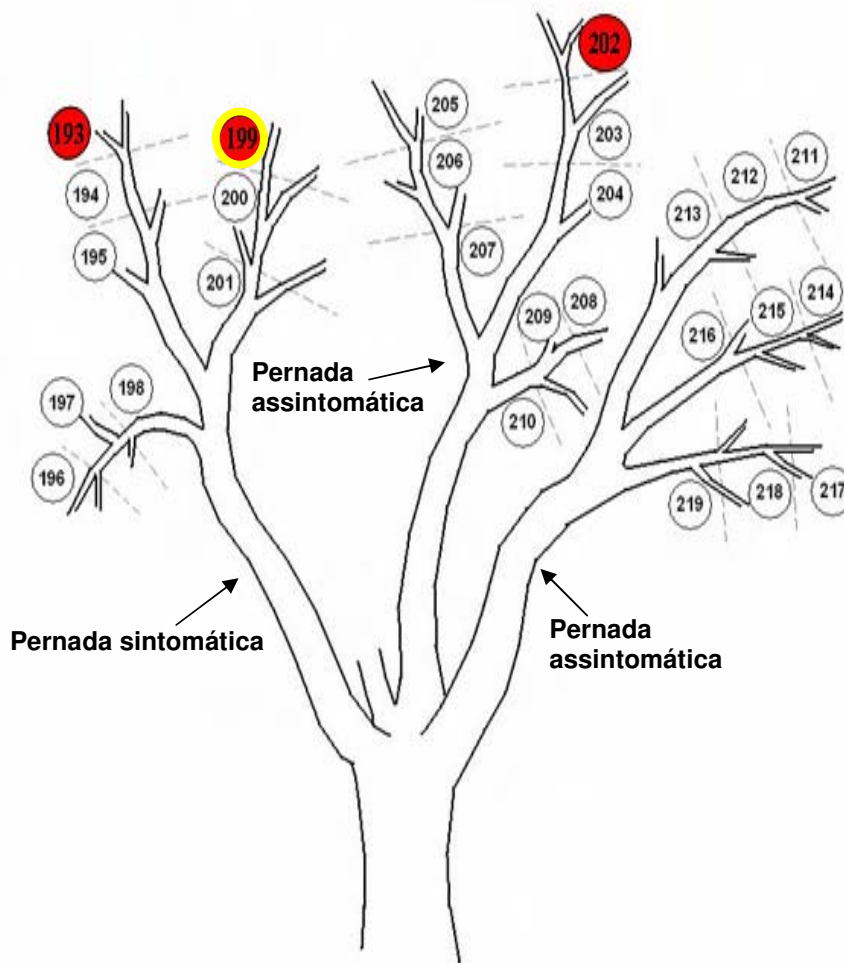


Figura 16. Esquema de planta H de citros infectada por *Ca. L. asiaticus*. Os valores indicam os números das amostras, coletadas em diferentes intervalos (distâncias entre inserções de ramos). Círculos em amarelo com preenchimento em vermelho indicam amostras que resultaram positivo por pelo menos um dos métodos de PCR empregados (tabela 16) e os círculos em amarelo, amostras que apresentavam sintomas iniciais do HLB. Os círculos em branco são amostras que foram negativas por todos os testes aplicados. Distâncias da figura sem escala.

Tabela 16. Resultados das análises de cPCR simples e duplo, *Nested* PCR e qPCR aplicados nas amostras da planta H.

Planta 03 – AS					
Amostra	cPCR simples	cPCR duplo	<i>Nested</i> PCR	qPCR Ct	qPCR Título
193	-	+	-	-	0
199	+	+	+	-	0
202	+	+	+	26,35	6,31

Tabela 17. Posicionamento e resultados das análises de PCR de amostras coletadas da planta H (Fig.16) de citros da variedade Valência sobre limão Cravo, com 5 anos de idade, afetada por *Ca. L. asiaticus*.

Amostra	Pern.	Ramo	Posição	Status	PCR convencional		Nestcd PCR	PCR quantitativo	
					Simple	Duplo		Ct* médio	Título Bacteriano**
193	1	1	superior	sintomático	-	+	-	-	0
194			mediana	sintomático	-	-	-	-	0
195			inferior	sintomático	-	-	-	-	0
196		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
197			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
198			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
199		3	superior	assintomático	+	+	+	-	0
200			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
201			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
202	2	1	superior	assintomático	+	+	+	26,35	6,31
203			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
204			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
205		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
206			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
207			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
208		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
209			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
210			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
211	3	1	superior	assintomático	-	-	-	-	0
212			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
213			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
214		2	superior	assintomático	-	-	-	-	0
215			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
216			inferior	assintomático	-	-	-	-	0
217		3	superior	assintomático	-	-	-	-	0
218			mediana	assintomático	-	-	-	-	0
219			inferior	assintomático	-	-	-	-	0

* Cycle Threshold (Ct) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação de PCR atinge o limiar da fase exponencial.

**Log10 do número estimado de células bacterianas por grama de tecido foliar.

Na planta H, Las foi detectada no ramo sintomático (amostra 193) por somente um dos métodos empregados (cPCR duplo). Detectou-se Las também em ramo assintomático (amostra 199) derivado da perna sintomática, neste caso por cPCR simples, cPCR duplo e *Nested* PCR, não sendo detectada por qPCR. Essas amostras (193 e 199) foram refeitas empregando se todos os métodos, com resultados idênticos

aos já observados. Las também foi detectada em outro ramo (amostra 202) agora de uma perna assintomática, onde houve concordância entre os quatro métodos usados no estudo. O título bacteriano desta amostra foi de 6,31 log do número estimado de cópias de liberibacter por grama de tecido (log Las/g), título relativamente alto em se tratando de amostra assintomática.

A dificuldade em se achar propriedades com plantas afetadas tanto por *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* foi o limitante para designação de quantas plantas iriam ser usadas neste experimento. A lei de erradicação de plantas doentes que atualmente está em vigor aqui no Estado de São Paulo é a Instrução Normativa nº 53 (IN 53), divulgada no Diário Oficial em 17 de Outubro de 2008, que determina para os citricultores a eliminação das plantas sintomáticas e assintomáticas do mesmo talhão quando a incidência da doença é superior a 28% (BELASQUE Jr. et al., 2009). Considerando a rápida expansão da doença e a inexistência de medidas curativas, é urgente a necessidade de se reduzir o inoculo do HLB (plantas doentes). A influência de pomares e propriedades com alto índices de plantas doentes que são potenciais fontes de inoculo, sobre propriedades nas quais medidas de controle são rigorosamente adotadas, resultam em prejuízos econômicos imediatos, e justifica, portanto, a ação governamental no intuito de eliminar essas plantas sintomáticas.

Nem sempre é possível identificar a presença da bactéria mesmo em plantas com sintomas de HLB, pois o comportamento e a movimentação das liberibacters dentro da planta afetada ainda é um desafio para os pesquisadores. As plantas que foram coletadas as amostras para a aplicação dos testes, eram de campo infectadas naturalmente pelo inseto vetor, sendo que os intervalos de tempo entre a inoculação da bactéria e o surgimento dos primeiros sintomas foram desconhecidos.

O aperfeiçoamento da técnica de extração de DNA de MURRAY & THOMPSON, 1980 modificado, foi um fator limitante na qualidade do DNA das amostras em estudo. Para a reação de PCR o DNA deve estar íntegro, pois a extração nos permite ter DNA total da planta e da bactéria em estudo.

Primers específicos para *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* foram construídos tendo como referência as diferenças genômicas entre as liberibacters, e então

baseados nestes INDELs, foram desenvolvidos e validados *primers* e sondas para qPCR (Li et al., 2006 e TEIXEIRA et al., 2008).

O *Nested* PCR requer uma segunda amplificação (*primers* específicos) do primeiro produto amplificado com *primers* universais (fD1/rP1) em tubos separados. Esta segunda amplificação dos produtos pode causar contaminação das amostras e o resultado pode acusar falsos positivos, fazendo com que este método de detecção fique arriscado e mais trabalhoso para o cotidiano e rotina de um laboratório de diagnose com uma demanda muito grande de amostras duvidosas. Mas se todos os cuidados forem tomados e a demanda de amostras for relativamente pequena, pode ser mais sensível que o cPCR, pois os *primers* utilizados na primeira amplificação são de uma região 16S do rDNA comum á plantas e bactérias e a segunda amplificação é de uma região mais interna com *primers* específicos para a bactéria *Ca. Liberibacter* spp.

Alguns trabalhos descrevem o uso da técnica de *Nested* – PCR, como é o caso descrito por X. DENG et al. 2007 e J. CHEN et al. 2007, que detectaram respectivamente através do *Nested* – PCR, em *Murraya paniculata* e amostras de citros, a *Ca. L. asiaticus*, usando *primers* universais e *primers* específicos para *liberibacter* como anteriormente descrito na reação de cPCR.

O qPCR se limita a amplificação de apenas um par de *primers*, ou seja não é ideal para multiplex (utilização de vários pares de *primers*), sua utilização requer alta habilidade técnica e suporte, sendo que o equipamento usado é de custo elevado. Por outro lado a confirmação de amostras positivas se dá pela amplificação específica pela análise da curva de Melting e quantificação das bactérias por meio da curva padrão dos plasmídeos. O uso de SYBR Green facilitou a técnica, pois tem um custo mais baixo em relação ao uso de sondas TaqMan que são de difícil desenho e um custo elevado.

Comparando as porcentagens de resultados positivos obtidos pelos métodos de PCR empregados observou-se que, em ramos sintomáticos, os métodos foram mais efetivos em detectar Lam do que Las. cPCR simples e cPCR duplo permitiram detecção de Lam em 85,7% e *Nested* PCR e qPCR em 95,2% das amostras sintomáticas de plantas afetadas por Lam, enquanto que cPCR simples, *Nested* PCR e qPCR permitiram detecção de Las em 27,8% e cPCR duplo em 33,3% das amostras

sintomáticas de plantas afetadas por Las. Em plantas afetadas por Lam, o *Nested* PCR e o qPCR permitiram detecção da bactéria em duas amostras nas quais a bactéria não foi detectada pelos outros métodos. Em plantas afetadas por Las o método mais efetivo foi o cPCR duplo, detectando a bactéria em uma amostra não detectada pelos outros métodos. Tendo em vista que em ramos afetados por Las a concentração de bactérias foi em média neste (5,63 log Las/g) e em outros estudos (LOPES, et al., 2009) maior do que em ramos afetados por Lam (5,01 log Lam/g), os resultados obtidos para ramos sintomáticos foram surpreendentes. Uma das razões para isto pode ter sido a dificuldade em identificar corretamente os sintomas foliares em plantas afetadas por Las. Em condições experimentais em outros estudos já conduzidos anteriormente e em determinadas épocas do ano em condições de campo, o mosqueado foliar normalmente associado ao HLB é mais difícil de ser visualizado em plantas afetadas por Las do que em plantas afetadas por Lam (LOPES et al., 2009).

O período de tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas da doença na planta, depende de vários fatores: do ambiente (temperatura), da idade, espécie e variedade da planta infectada, da concentração bacteriana na transmissão pelo inseto vetor, da espécie de liberibacter, da época do ano, entre outros fatores (BELASQUE Jr. et al., 2009).

Quando se compara os métodos em ramos assintomáticos, a situação se inverte. Maiores porcentagens de resultados positivos foram obtidas em plantas afetadas com Las do que em plantas afetadas por Lam. cPCR simples e duplo detectou Las em 2,2%, *Nested* PCR em 4,4% e qPCR em 5,6% das amostras afetadas por Las. Já em ramos assintomáticos de plantas afetadas por Lam, o cPCR simples e o cPCR duplo não detectou a bactéria em nenhuma amostra e o *Nested* PCR e qPCR em 2,2% das amostras, ou seja, em duas de um total de 90 amostras. Isso mostrou que os testes de *Nested* PCR e qPCR foram similares em sensibilidade em detectar Lam em tecidos assintomáticos, sendo que em duas amostras apenas o método de qPCR conseguiu detectar Lam que não foi detectada pelos outros métodos empregados. A maior sensibilidade do método *Nested* e qPCR era esperada tendo em vista resultados já publicados (TEIXEIRA et al., 2008; Li et al., 2006) e o fato de que estas técnicas ou

empregam duas etapas seqüenciais de amplificação do DNA, como é o caso do *Nested* PCR, ou um fluoróforo mais sensível, como é o caso do SYBR GREEN usado no qPCR.

No total, o número de amostras que resultaram em positivo para Lam foi 21 (19%) contra 12 para Las (11,2%). A maior parte das amostras foi negativa para ambas as liberibacter, ou seja, 90 para Lam e 96 para Las. As baixas porcentagens de amostras positivas revelam as plantas estavam em estágio inicial de infecção, com exceção da planta B afetada por Lam onde quatro ramos já exibiam desfolha além de folhas mosqueadas e amarelas.

O Ct médio das amostras de plantas afetadas por Las foi 28,39, mais baixo em relação ao Ct médio de amostras de plantas afetadas por Lam (29,86). A média do número estimado de cópias de liberibacter por grama de folha em plantas afetadas por Las foi 5,63 contra 5,01 em plantas afetadas por Lam. As maiores concentrações de Las do Lam em plantas infectadas naturalmente no campo corroboram estudos anteriores e ajudam a explicar o aumento desproporcional de plantas infectadas por Las tanto no tempo como no espaço (LOPES & FRARE, 2009).

TEIXEIRA e colaboradores 2008 também analisaram a distribuição e quantificação de *Ca. L. americanus* em planta sintomática, mas em estágio avançado de HLB. Esse trabalho mostrou que amostras de folhas que apresentavam mosqueados típicos da doença, a média de liberibacters por grama de tecido foi de $8,6 \times 10^6$. Concluiu também que a sensibilidade da técnica de qPCR utilizando o SYBR Green em amostras provenientes do campo é muito eficaz, sendo que o limite de detecção chegou a 10 liberibacters por reação.

Como descrito no trabalho de LOPES et al., 2009, as plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus*, porém assintomáticas a titulação bacteriana ficou entre 6,72 células por grama de tecido, já em amostras provenientes de plantas sintomáticas esse valor foi de 7,27 células por grama de tecido. Esse nível populacional pode estar relacionado com o limiar que aciona a expressão de sintomas do HLB em citros.

LOPES et al., 2009 cita também em seu trabalho que *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* se diferem em pelo menos três aspectos provavelmente inter-relacionados: concentração de células bacterianas que se acumulam em tecidos infectados, padrão

de sintomas de infecção e desenvolvimento do HLB, eficiência de infecção por enxertia e diferenças na multiplicação das liberibacters com relação á temperatura (*Ca. L. asiaticus* mais tolerante ao calor – 35 °C e *Ca. L. americanus* sensível ao calor – 24 °C).

O método abordado no trabalho e que foi mais sensível, apesar de que em poucas proporções (3 amostras apenas), foi o qPCR. As amostras detectadas somente pelo qPCR, eram provenientes de pernadas sadias e ramos assintomáticos. A média do titulo foi de 4,4 liberibacters por grama de tecido assintomático. Esta técnica promete ser um elemento valioso no diagnóstico precoce do HLB (Li et al., 2007).

V. CONCLUSÃO

Os quatro métodos empregados nas amostras de folhas sintomáticas e assintomáticas permitem-nos concluir que Las e Lam se concentram prioritariamente nas partes sintomáticas de plantas de campo naturalmente inoculadas e infectadas por liberibacter. A detecção feita em partes assintomáticas do mesmo ramo sintomático pode indicar movimento da bactéria via floema de um sítio inicial, para um secundário de infecção. As detecções feitas em partes assintomáticas de ramos assintomáticos podem indicar ocorrência de infecções que ocorreram em diferentes épocas visto que, neste estudo, se avaliou plantas mantidas no campo sem qualquer proteção, a não ser as aplicações de inseticidas feitas pelo produtor que, como se sabe, não são totalmente efetivas na proteção das plantas contra o acesso do inseto vetor. Porém não devemos afirmar que a PCR pode detectar liberibacter em amostras assintomáticas provenientes de plantas assintomáticas, isto se refere a amostragem (folhas coletadas) em plantas assintomáticas e não ao limite de detecção da PCR.

Atualmente o método laboratorial empregado na diagnose do HLB no Brasil tem sido o PCR convencional. Tendo em vista principalmente o custo dos reagentes e disponibilidade de equipamentos, o qPCR tem sido usado prioritariamente em pesquisa, já na Flórida o qPCR é uma ferramenta rotineira para diagnose de HLB.

O pequeno acréscimo no número de resultados positivos obtidos com o qPCR neste e em outro trabalho (TEIXEIRA et al., 2008), aliado ao seu alto custo já mencionado, não justifica a substituição do PCR convencional por este método na diagnose laboratorial do HLB.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Ribeirão Preto, Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos, 1997-2004. Contém informações institucionais, notícias e publicações. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 10 março de 2006.

AYRES, A. J. Situação Atual do HLB no Estado de São Paulo, Brasil. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S4] Araraquara: Fundecitrus, Departamento Científico, 2006

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. Epidemiologia do Huanglongbing em São Paulo. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S16] Araraquara: Fundecitrus, Departamento Científico, 2006.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; BUSATO, L. A.; STUCHI, E. S. Danos Causados pelo Huanglongbing na Produção e Qualidade de Frutos de Laranja em São Paulo. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S17] Araraquara: Fundecitrus, Departamento Científico, 2006.

BELASQUE JR. J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JR., R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas

sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Trop. plant pathol.** vol.34 n.3, 2009.

BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Citrus greening and psylla vectors of the disease in the Arabic Peninsula. **In Proc. 9th Conf. Intern. Organization Citrus Virologists**, p. 109-114. University of California, Riverside, 1984.

BOVÉ, J. M. História, Etiologia, Identificação no Campo, Transmissão e Distribuição Mundial do Huanglongbing: uma Destrutiva, Recém-Emergida, Doença Secular de Citros. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S1] France: Journal of Plant Pathology 88, 2006. p. 07-37.

BOVÉ, J. M.; TEIXEIRA, D. C.; EVEILLARD, S. J.; SAILLRD, D. Taxonomia e Filogenia do Agente Causal do Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter* spp. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S6] France: Journal of Plant Pathology 88, 2006. p. 07-37.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. Diaphorina citri Kuway., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian J. Agric. Sci.** v. 37, p. 572-576, 1967.

CHEN, J.; DENG, X.; ZHOU, G.; FENG, Z.; XU, J.; LIU, Q.; CIVEROLO, E. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from citrus Huanglongbing samples in China by nested conventional and real-time PCR. **Phytopathology** 96: S23

CIAPINA, L. P.; CARARETO, L. M.; LEMOS, E. G. M. A nested - PCR assay for detection of *Xylella fastidiosa* in citrus plants and sharpshooter leafhoppers. **Journal of Applied Microbiology**, p. 546-551, 2004.

DENG, X.; ZHOU, G.; LI, H. Nested-PCR Detection and Sequence Confirmation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from *Murraya paniculata* in Guangdong, China. **Plant Disease** v. 91 p. 1051, 2007.

FUNDECITRUS. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 10 ago. 2006.

GRAVENA, S. Huanglongbing – o Controle Biológico do Vetor no Estado de São Paulo, Brasil. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S22] Gravena Ltda – Serviços em Pesquisa, Consultoria e Treinamento, 2006.

HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 373-379, 1999.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.

CHEN, J.; DENG, X.; ZHOU, G.; FENG, Z.; XU, J.; LIU, Q.; CIVEROLO, E. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from citrus Huanglongbing samples in China by nested conventional and real-time PCR. **Phytopathology** 96: S23, 2007.

LAFLECHE, D.; BOVÉ, J. M. Mycoplasmes dans les agrumes atteints de greening, de stubborn ou de maladies similaires. **Fruits**, v. 25, p. 455-465, 1970.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Evaluation of Amplification Methods for Improved Detection of “*Candidatus Liberibacter Species*” Associated with Citrus Huanglongbing. **Plant Disease**, v. 91, p. 51-58, 2007.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods** 66: 104-115, 2006

LOPES, J. R. S. Vetor da Transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S14] Piracicaba: Esalq – LEF/Universidade de São Paulo, 2006.

LOPES S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J. Ineficácia da poda no controle do huanglongbing dos citros. **Fitopatologia Brasileira** 30: 64, 2005.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C. Plantas Hospedeiras de *Liberibacter* no Brasil. In: HUNGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S11] Araraquara: Fapesp Project 2005/00718-2

LOPES, S. A.; MARTINS, E. C.; FRARE, G. F. Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica** 31: p. 48-49, 2005

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft Transmission Efficiencies and Multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Citrus Plants. **Phytopathology**, v. 99, 2009.

LOPES, S. A. and FRARE, G. F. *Liberibacters* Associated with Citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Is Heat Tolerant, '*Ca. L. americanus*' Is Heat Sensitive. **Plant Disease**, v. 93, p. 257-262, 2009.

LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Volume 12, 2004.

McCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **S. Afri. J. Agric. Sci.**, v. 8, p. 297-298, 1965.

MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33^o ed., p. 10-13, 2004.

RODRIGUEZ, O; VIÉGAS, F.; POMPEU, J.; AMARO, A. A., **Citricultura Brasileira**, 2^o ed., v.1, Campinas: Fundação Cargill, 1991.

ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ/FUNDECITRUS, 2001. 207p.

SECHLER, A.; SCHUENZEL E. L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTINIKOVA, E.; STONE, A. L.;SCHNEIDER, W. L.; DAMSTEEGT, V. D.; SCHAAD, N. W. Cultivation of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’, ‘Ca. L. africanus’ and ‘Ca. L. americanus’ Associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, p. 480-486, 2009.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “Candidatus” Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A. J.; KITAJIMA, E. W. et al. First Report of a Huanglongbing – like Disease of Citrus in São Paulo State, Brazil, and Association of a New liberibacter Species, “Candidatus Liberibacter Americanus”, with the Disease. **Plant Disease**, v.89: p. 107, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, p. 139-150, 2008.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16s Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, nº 2, vol. 173, p. 697-703, 1991.

WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C. et al. Diagnose de Huanglongbing. In: HUANGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** [S7] Araraquara: Fundecitrus, Departamento Científico, 2006.

YAMAMOTO, P. T.; PAIVA, P. E. B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology** 30: p. 165-170, 2001.

YAMAMOTO, P. T.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C. Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* e *asiaticus* em *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). In: HUANGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 1, 2006, Ribeirão Preto. **Poster...**[P10] Araraquara: Fundecitrus, Departamento Científico, 2006.

