

Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao *huanglongbing*

Diva do Carmo Teixeira¹, Nelson Arno Wulff^{1*}, Sílvio Aparecido Lopes¹, Pedro Takao Yamamoto¹, Marcelo Pedreira de Miranda¹, Marcel Belatto Spósito¹, José Belasque Júnior¹ & Renato Beozzo Bassanezi¹

RESUMO

Por causa de sua natureza destrutiva e rápida disseminação por um inseto, o *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) é tido como uma das mais ameaçadoras doenças dos citros. A descoberta dos agentes associados à doença ocorreu graças aos avanços da biologia. Hoje sabemos que o HLB está associado a bactérias de desenvolvimento restrito ao floema e ainda não disponíveis em cultura. Nos anos 90, através de técnicas moleculares, as bactérias do HLB foram caracterizadas como membros do grupo das alfa-proteobactérias e designadas *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Em 2004, uma terceira espécie foi caracterizada, *Candidatus Liberibacter americanus*. Recentemente, o HLB foi descrito no Brasil (2004), Estados Unidos da América (2005), Cuba (2007) e República Dominicana (2008), tendo ainda sido relatado no México, Belize, Jamaica e Porto Rico (2009). O DNA ribossomal 16S, a região intergênica entre o 16SrDNA e o 23SrDNA, além de genes do operon *rp/KAJL-rpoBC* foram usados em análises filogenéticas, permitindo avaliar o posicionamento das liberibacters frente a outros grupos de bactérias conhecidas. Do conhecimento de sequências gênicas também se obtiveram ferramentas para o desenvolvimento de protocolos de PCR, tornando possível a diagnose laboratorial do HLB. Esta revisão tem por objetivo levar informação a todos aqueles que lidam com o problema do HLB, sobre a importância dos trabalhos de pesquisa relacionados a sua biologia e etiologia, pois são a base do conhecimento necessário aos trabalhos de aplicação prática, na luta contra o HLB.

Termos de indexação: *greening*, Liberibacter, fitoplasma, diagnose.

SUMMARY

Characterization and etiology of the bacteria associated with huanglongbing

Due to its destructive nature and fast dissemination pattern by an insect vector, huanglongbing (HLB) is considered the most threatening citrus disease. The discovery of the associated agents was made possible due to the technological advancements obtained in Biology. We know today that HLB is associated to bacteria that grow specifically in the plant phloem and not in culture media. In the 1990s, through the use of molecular techniques, the HLB bacteria were characterized as members of the alpha-proteobacteria and designated *Candidatus*

¹ Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros 201, 14807-040 Araraquara-SP

* Autor para correspondência - E-mail: nelsonwulff@fundecitrus.com.br

Liberibacter africanus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. In 2004, a third species was characterized, *Candidatus Liberibacter americanus*. Recently, HLB was reported in Brazil (2004), United States of America (2005), Cuba (2007), Dominican Republic (2008), Mexico, Belize, Jamaica and Puerto Rico (2009). 16S ribosomal DNA, intergenic 16SrDNA-23SrDNA regions, in addition to genes of *rplK**AJL-rpoBC* operon were used in phylogenetic analysis, allowing the positioning of liberibacters in relation to other known bacteria. Gene sequences also allowed the development of PCR protocols for bacteria detection and disease diagnosis. This review aims to inform about the importance of the researches on biology and etiology, since they are the basis of the necessary knowledge for the appropriate management in the fight against this citrus disease.

Index Terms: greening, *Liberibacter*, phytoplasma, diagnosis.

INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB, *ex-greening*) é uma doença que afeta severamente a cultura dos citros, ameaçando sua viabilidade econômica. O HLB é conhecido na China há mais de cem anos, tendo sido relatado pela primeira vez por Reinking em 1919 com esse nome (*huanglongbing*) que significa “doença do ramo amarelo” (Reinking, 1919; Lin, 1956). Na África, uma doença com sintomas similares foi descrita em 1937, com o nome de *greening* (Van De Merwe & Anderson, 1937). Nos diversos países asiáticos onde ocorre, o HLB está associado à presença da bactéria *Candidatus (Ca.) Liberibacter (L.) asiaticus*, enquanto que na África, à presença de *Ca. L. africanus*. Nas Ilhas Reunião e Maurício foram detectadas as duas espécies (Garnier & Bové, 1996).

Ca. Liberibacter spp. são bactérias Gram-negativas (Garnier et al., 1984) pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (Jagoueix et al., 1994), e que recentemente tiveram seu cultivo em meio de cultura relatado (Davis et al., 2008; Sechler et al., 2009).

No Brasil o HLB foi relatado em 2004, estando inicialmente restrito a 35 municípios na região central do estado de São Paulo, onde *Ca. L. asiaticus* foi detectado em menos de 2% das amostras sintomáticas, ou seja, com sintomas de mosqueado. Os aproximadamente 98% das amostras sintomáticas restantes que inicialmente mostraram resultados negativos nas análises de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), estavam infectados por *Ca. L. americanus*, uma nova espécie de liberibacter identificada e caracterizada no final daquele ano (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a; Teixeira et al., 2005b; Teixeira et al., 2005c).

Hoje o HLB está disseminado nas maiores e principais regiões citricolas do estado de São Paulo, e também está presente nos estados de Minas Gerais e Paraná. Em 2009, a porcentagem de blocos ou talhões afetados foi de 33,1% no Centro, 36% no Sul, 10% no Oeste, 3,7% no Norte e 0,1% no Noroeste do estado de São Paulo. A incidência de árvores afetadas pelo HLB estava estimada em 0,9% no mesmo ano (Belasque Jr. et al., 2009). A proporção entre as espécies de liberibacters associadas ao HLB inverteu-se a partir de meados de 2006: em 2009 cerca de 96% das 11.000 amostras analisadas no Fundecitrus para a ocorrência de HLB estavam associadas à presença de *Ca. L. asiaticus*.

Ca. L. asiaticus é mais facilmente transmitida via enxertia de tecidos infectados para plantas cítricas do que *Ca. L. americanus* (Lopes et al., 2009b), e tolera temperaturas acima de 32°C enquanto a população de *Ca. L. americanus* diminui, podendo até desaparecer, nestas condições (Lopes et al., 2009a). As duas espécies também diferem na capacidade de multiplicação nos tecidos das plantas cítricas. *Ca. L. asiaticus* chega a atingir populações com título bacteriano em média 10 vezes maior que *Ca. L. americanus* (Lopes et al., 2009b).

No início de 2007, em algumas propriedades citricolas no Norte e Noroeste de São Paulo, até então livres do HLB, foi detectada a ocorrência de sintomas idênticos aos do HLB e após pesquisa na busca do agente responsável pelos sintomas observados, descobriu-se que os mesmos estavam associados à presença de um fitoplasma. Este fitoplasma foi caracterizado pelo sequenciamento do gene 16SrDNA e da região intergênica 16SrDNA-23SrDNA, cuja análise mostrou 99% de identidade com o “pigeon pea witches’-broom

phytoplasma” (fitoplasma que causa vassoura de bruxa no feijão guandu), do grupo 16SrDNA-IX (Teixeira et al., 2008c). Embora a ocorrência de fitoplasma em citros tenha sido relatada no Oriente Médio (*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*) como agente causal da “vassoura de bruxa” em lima ácida (*Citrus aurantifolia*) (Zreik et al., 1995), o fitoplasma associado aos sintomas do HLB é de um grupo filogenético distinto (Teixeira et al., 2008c). Em 2009, outro fitoplasma, porém do grupo 16SrDNA-I, foi associado ao HLB em amostras provenientes de diferentes localidades na China (Chen et al., 2009).

No continente americano, onde se situam os dois principais centros produtores de citros do mundo, Brasil (representado pelo estado de São Paulo) e Estados Unidos (representado pelo estado da Flórida), o HLB foi relatado em 2004 e 2005 respectivamente (Coletta-Filho et al., 2004, Halbert, 2005). Em 2007 foi confirmada a ocorrência do HLB em Cuba (Llauger et al., 2008, Pantoja et al., 2008, Luis et al., 2009), em 2008 na República Dominicana (Matos et al., 2009) e ainda há relatos de sua ocorrência no México (NAPPO - www.pestalert.org), Belize, Jamaica e Porto Rico (International Society for Infectious Diseases - www.promedmail.org), em 2009. No início de 2010, Saponari et al., relataram a ocorrência de *Ca. L. asiaticus* em laranja doce na Etiópia, o primeiro caso desta espécie na porção continental da África. Nesta revisão abordaremos aspectos relacionados à caracterização, detecção, etiologia e biologia das bactérias associadas ao HLB. Revisões mais extensas sobre o assunto podem ser encontradas em Bové et al., 2006, Da Graça, 1991 e Gottwald et al., 2007.

CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DOS AGENTES ASSOCIADOS AO HLB

A microscopia eletrônica foi até o ano de 1992 a única técnica de confirmação da presença das bactérias associadas ao HLB em uma planta (Garnier & Bové, 1996). A detecção destas por meio de reagentes específicos foi relatada em 1987, quando se obteve pela primeira vez anticorpos monoclonais preparados contra a forma asiática proveniente de Poona, na Índia. Entretanto, a despeito das similaridades morfológicas das bactérias observadas nas amostras com HLB provenientes de diferentes áreas geográficas, por

serem altamente específicos, estes anticorpos falharam na detecção de determinados isolados conhecidos na época (Garnier et al., 1987; Garnier et al., 1991). Resultados semelhantes foram obtidos por Korsten et al. (1993), quando foram testados vários isolados do HLB africano frente a anticorpos monoclonais obtidos a partir de isolados indiano, chinês e africano. Assim, até então, a distinção entre as formas de HLB sensível e tolerante ao calor (*Ca. L. africanus* e *Ca. L. asiaticus*, respectivamente) era o melhor indicativo da ocorrência de diferentes isolados da bactéria (Bové et al., 1974).

Como alternativa para os anticorpos monoclonais, foram desenvolvidas sondas de DNA (genes do operon ribossomal b *rpIKAJL-rpoBC*) a partir do isolado de Poona. Estas sondas foram capazes de detectar todos os isolados de *Ca. L. asiaticus* testados, oriundos de uma vasta área geográfica (Sudeste asiático, Índia e China), mas não o de *Ca. L. africanus* (Villechanoux et al., 1992). Desta maneira, este teste foi mais adequado na detecção de *Ca. L. asiaticus*. Além disso, este teste confirmou as diferenças biológicas entre os isolados asiáticos e o isolado africano, descritas acima (tolerância a altas temperaturas e reação parcial frente aos anticorpos monoclonais). Em 1995, Planet et al. relataram a obtenção de uma sonda de DNA correspondente aos genes *rpIKAJL-rpoBC* de *Ca. L. africanus* capaz de detectar especificamente os isolados daquele continente. A detecção específica de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* por meio de sondas, associada ao fato das bactérias oriundas de plantas sintomáticas da Ásia e África apresentarem, respectivamente, resistência e sensibilidade a altas temperaturas, serviram de base para a separação das bactérias em duas espécies. Faltavam, porém, estudos filogenéticos que comprovassem estas observações, o que foi conseguido com a obtenção do gene ribossomal 16S (16SrDNA) (Jagoueix et al., 1994; Jagoueix et al., 1996; Jagoueix et al., 1997), uma importante ferramenta para estudos filogenéticos (Woese et al., 1985; Weisburg et al., 1991). Tais estudos revelaram que as bactérias do HLB pertenciam à subdivisão alfa do grupo das proteobactérias (Jagoueix et al., 1994), um grupo filogenético contendo organismos patogênicos ou simbiotes de plantas. A caracterização da região intergênica 16SrDNA-23SrDNA de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* confirmou mais uma vez as diferenças entre as bactérias associadas ao HLB conhecidas até então (Jagoueix et al., 1997).

Seguindo-se os mesmos procedimentos usados para as espécies asiática e africana, a caracterização de *Ca. Liberibacter americanus* teve início com a obtenção, pela técnica de PCR, da sequência do 16SrDNA e região intergênica 16SrDNA-23SrDNA. (Teixeira et al., 2005a; Teixeira et al., 2005b; Teixeira et al., 2005c). Posteriormente, a caracterização dos genes ribossômicos *rplKAJL-rpoB* através da técnica de “chromosome walking” confirmou *Ca. L. americanus* como uma terceira espécie de liberibacter associada aos citros (Teixeira et al., 2008a).

O locus *rplKAJL-rpoB* foi estendido em *Ca. Liberibacter asiaticus* através de TAIL-PCR (“Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction”) (Okuda et al., 2005) e subsequentemente através de “chromosome walking” (Lin et al., 2008), usando isolados de diferentes localidades do Japão, Indonésia e China. Também por PCR foi obtida a sequência do 16SrDNA do isolado de *Ca. L. asiaticus* detectado no Brasil e estendido o locus *rplKAJL-rpoB* do isolado de *Ca. L. africanus* de Nelspruit (Teixeira et al., 2008a). A sequência dos genes 23SrDNA e 5SrDNA foi obtida para *Ca. L. asiaticus* (Doddapaneni et al., 2008) e para *Ca. L. americanus* (Wulff et al., 2009a).

A detecção de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* pela amplificação por PCR do locus *rplA-rplJ* (Hocquellet et al., 1999) é resultado da caracterização molecular de *Ca. Liberibacter spp.*, assim como o desenvolvimento da PCR em tempo real quantitativa empregando *primers* desenvolvidos com base na região do operon b de cópia única no genoma de liberibacter (Wang et al., 2006; Teixeira et al., 2008b).

A clonagem de produtos diferenciais de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Hocquelet et al., 1999) permitiu o sequenciamento de quatro fragmentos de DNA de liberibacter: 1) um fragmento de DNA de 662 pb (pares de base) de *Ca. L. africanus* que não apresentou similaridade com nenhuma sequência conhecida (CLIBASIA_03080); 2) um fragmento de DNA de 520 pb de *Ca. L. africanus* que apresentou uma “open read frame” (ORF) com 79% de similaridade a uma fosfoglucomutase de *Agrobacterium sp.* (CLIBASIA_05045); 3) um fragmento de DNA com 309 pb, o qual adicionou 24 aminoácidos à extremidade 3’ do “cluster” gênico *nusG-rplKAJL-rpoB* (CLIBASIA_00135); e 4) um fragmento de DNA de *Ca. L. asiaticus* com 1114 pb, com uma ORF com

similaridade à proteína de membrana externa (“omp” - “outer membrane protein”) (CLIBASIA_03315). Os respectivos genes na linhagem *Ca. L. asiaticus* psy62 estão identificados como CLIBASIA_ (Duan et al., 2009). A partir do fragmento de 1114 pb foi feita a determinação do locus “omp” para de *Ca. L. asiaticus* através de “chromosome walking”, assim como para *Ca. L. africanus* (Bastianel et al., 2005). Este locus foi adicionalmente estendido a aproximadamente 5000 pb (Lin et al., 2008).

Estudos de diversidade genética para diversos isolados de *Ca. L. asiaticus* e o isolado de *Ca. L. africanus* foram feitos com base no gene 16SrDNA, na região intergênica 16SrDNA-23SrDNA e gene *omp* (Subandiyah et al., 2000; Bastianel et al., 2005). Estes estudos revelaram que os isolados de *Ca. L. asiaticus*, independente da origem, formam um “cluster” (agrupamento) distinto daquele que contém *Ca. L. africanus*. Entretanto, análises do gene *omp* (embora conservado entre as bactérias Gram-negativas, o gene exibe variações de sequência suficientes para estudo de diversidade) mostraram grupos menores dentro do “cluster” de *Ca. L. asiaticus*, representando variantes na espécie (Bastianel et al., 2005). Estas variações são SNPs (“Single-nucleotide polymorfisms”) ou polimorfismos pontuais na sequência de determinados genes, entre isolados de liberibacter da mesma espécie (Adkar-Purushothama et al., 2009).

A princípio, dentro de cada espécie de liberibacter há ampla homogeneidade genética, a qual certamente poderá ser mais bem explorada com o estudo genômico destas espécies (Duan et al., 2009; Wulff et al., 2009a). Tomimura et al. (2009) encontraram linhagens de *Ca. L. asiaticus* oriundas do Japão com diferenças marcantes quando comparadas com linhagens da Indonésia, Tailândia, Vietnã e Taiwan. Nos isolados do Japão não foi possível amplificar os genes relacionados à região da polimerase de DNA de bacteriófago. Este locus foi um dos primeiros a ser caracterizado em liberibacter (Villeanoux et al., 1993) e, portanto, ou não está presente nas linhagens do Japão analisadas ou apresenta uma divergência de sequência de DNA que impediu sua amplificação pela PCR. Aliás, as linhagens de *Ca. L. asiaticus* da Indonésia apresentam somente 91,9% de identidade nucleotídica neste locus com a sequência original do isolado *Ca. L. asiaticus* de Poona, sendo que uma diferença similar é encontrada

quando se compara esta região entre as linhagens *Ca. L. asiaticus* de Poona (Villechanoux et al., 1993) e *Ca. L. asiaticus* psy62 da Flórida (projeto genoma) (Duan et al., 2009). Empregando esta região para comparar linhagens de *Ca. L. asiaticus* do Sudoeste asiático, Tomimura et al (2009) separaram esta espécie em três grupos, com certa relação entre agrupamento e origem geográfica.

Por meio de PCR com *primers* específicos para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*, foi detectada a bactéria do HLB em uma planta ornamental, *Calodendrum capense*, na região do Cabo na África do Sul, que mostrava sintomas de mosqueado nas folhas. A bactéria foi caracterizada por meio da análise do gene 16SrDNA, da região intergênica 16SrDNA-23SrDNA e dos genes do operon *rpIKAJL-rpoBC* (Garnier et al., 2000). Análise filogenética mostrou que a liberibacter presente em *C. capense* diferia daquelas já caracterizadas para citros (Jagoueix et al., 1994), apresentando, entretanto, maior identidade com *Ca. L. africanus* sendo, por isso, caracterizada como subespécie *Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*.

Em murta-de-cheiro (*Murraya paniculata*) foi detectada a ocorrência de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* no Brasil em 2005 e 2006, respectivamente (Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2006). A caracterização genética evidenciou total identidade entre as liberibacters presentes em murta-de-cheiro com as que ocorrem em citros (Lopes et al., 2010, aceito para publicação).

Atualmente, a diagnose das bactérias causadoras do HLB é efetuada em larga escala pelo emprego da PCR. Os protocolos de detecção se baseiam na amplificação de dois loci genéticos: 1) 16SrDNA, inicialmente empregado para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* (Jagoueix et al., 1994; Jagoueix et al., 1996) e posteriormente para *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005b; Colleta-Filho et al., 2005) e 2) operon beta (genes *rpIKAJL-rpoBC*) que, devido a sua menor identidade nucleotídica entre as liberibacters, permitiu o desenvolvimento de *primers* e sondas mais específicos para detecção (Villechanoux et al., 1993; Planet et al., 1995; Okuda et al., 2005; Wang et al., 2006; Teixeira et al., 2008b). A detecção de *Ca. L. asiaticus* em psilídeos foi efetuada através de hibridização tipo “crush-blot”, permitindo a determinação da porcentagem de

psilídeos infectivos (Bové et al., 1993). Hung et al (2004) demonstraram ser possível a detecção de *Ca. L. asiaticus* em adultos e grupos de ninfas de 2º instar de *Diaphorina citri* através da PCR, e hoje tanto a PCR convencional como a PCR em tempo real quantitativa são amplamente empregadas para detectar liberibacter em psilídeos (Teixeira et al., 2005b; Teixeira et al., 2008b; Manjunath et al., 2008). A difusão do emprego da PCR na diagnose de patógenos é consequência da praticidade e robustez da técnica, aliados ao relativo baixo custo obtido ao longo da última década. Especificamente para patógenos fastidiosos, cultiváveis ou não, bactérias intracelulares e vírus, a PCR representa uma ferramenta indispensável na detecção (Hoorfar et al., 2004).

Recentemente foi obtida a sequência do genoma de *Ca. L. asiaticus* linhagem psy62 (Duan et al., 2009) o que abre inúmeras possibilidades de estudo, desde maior acurácia no posicionamento filogenético (análise multiloco), diagnose, identificação de proteínas e funcionalidade de genes preditos, até a comparação com outras bactérias e outras espécies de liberibacter. O tamanho do genoma de *Ca. L. asiaticus*, de 1,26 Mpb (mega pb), fica muito próximo da estimativa feita para o tamanho do genoma de *Ca. L. americanus* (Wulff et al., 2009a). Duan et al (2009), analisando o genoma de *Ca. L. asiaticus*, não encontraram genes envolvidos com os sistemas de secreção tipo II, III e IV ou seus efetores, genes de virulência, ou enzimas de degradação de parede celular de plantas, como celulasas, pectinases, xilanases e endonucleases. Ainda, análises do genoma não revelaram a existência de sistemas de secreção especializados, toxinas ou enzimas que pudessem se relacionar com processos de patogenicidade para *Ca. L. asiaticus* (com exceção do gene *tolC*), e assim, Duan et al (2009) associam o “comportamento” de *Ca. L. asiaticus* mais ao de um parasita que de um patógeno, no sentido de que os sintomas da doença surgem primariamente como resultado de um desequilíbrio no metabolismo da planta hospedeira, provocado pela diminuição ou interferência no transporte de fotossintetizados. Assim, o fato de não se encontrar no genoma de *Ca. L. asiaticus* os tradicionais sistemas de virulência e patogenicidade torna esta bactéria mais intrigante no que se refere à busca pela compreensão da interação planta-patógeno.

ETIOLOGIA DO HLB

Antes da adoção do termo chinês *huanglongbing* (doença do ramo amarelo) como nome oficial da doença, a mesma recebeu diversas denominações de acordo com o local de ocorrência dos sintomas como “Greening” (inversão de cores na fase de amadurecimento dos frutos) na África do Sul, “Dieback” (seca de ponteiros) na Índia, “Phloem degeneration” (necrose do floema ou degeneração do floema) na Indonésia, “Likubin” (declínio) em Taiwan e “Leaf mottling” (folha mosqueada) nas Filipinas (Bové, 2006).

Em 1956, Lin Kung Hsiang, professor da Universidade de Guangzhou na China, obteve sucesso na transmissão da doença por enxertia, provando ser a mesma de origem biótica ou infecciosa (Lin, 1956). Até final dos anos 60, o agente do HLB era considerado ser de origem viral. Entretanto, em 1970, Lafleche & Bové através de microscopia eletrônica, relataram a presença de um procarioto nos vasos do floema de plantas de laranja doce que apresentavam sintomas de HLB. Amostras obtidas de vários locais de ocorrência foram estudadas na década de 70 por meio de microscopia eletrônica e a presença de estruturas contendo um envelope de 25 nm (nanômetros) em espessura foi invariavelmente visualizada (Garnier et al., 1976). Pela impossibilidade de visualização da parede celular, inicialmente este procarioto foi chamado MLO (“Mycoplasma-Like Organism”), o que em português significa “organismo do tipo micoplasma”. Posteriormente, com a observação de parede, foi associado a uma bactéria e por isso denominado BLO (“Bacterium-Like Organism”), ou “organismo semelhante a bactéria” (Moll & Martin, 1974). Em 1980, Bové et al. propuseram o termo “gracilicute-like bacterium” em substituição a BLO como consequência do efeito positivo da penicilina em plantas afetadas pelo HLB, ou seja, da regressão dos sintomas, o que foi evidência para a presença de peptidoglicano (PG) e consequentemente para a classificação do organismo dentro do grupo Gracilicutes (Gram-negativas), onde estão as bactérias que possuem parede celular. Em 1984, por meio de estudos de microscopia eletrônica, identificou-se a membrana celular interna e externa nestes procariotos, o que possibilitou a caracterização definitiva como bactérias Gram-negativas. A presença de membrana externa e interna nas bactérias associadas

ao HLB, típica das bactérias Gram-negativas, permite a distinção de outros procariotos restritos ao floema, como os fitoplasmas e espiroplasmas, que não possuem parede, apresentando apenas uma membrana citoplasmática (Bové & Saglio, 1974; Garnier et al., 1984; Saglio et al., 1971).

Caracterizações adicionais vieram com o sequenciamento de regiões gênicas do “cluster” *rpmKAL-rpoBC* (operon ribossômico β), que mostrou que as bactérias do HLB possuíam a mesma estrutura gênica para este *locus* presente em Eubactérias (Villechanoux et al., 1993). A caracterização detalhada foi estabelecida com a obtenção do gene ribossômico 16S (16SrDNA) do isolado asiático de Poona (Índia) e africano de Nelspruit (África), o que colocou as liberibacters em um grupo distinto dentro do grupo das alfa-proteobactérias, dentro da ordem das rizobactérias (*Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Bortadella* spp. e outras) (Jagoueix et al., 1994; Jagoueix et al., 1996; Jagoueix et al., 1997).

Com a caracterização molecular e ferramentas apropriadas de detecção (sondas para hibridação e *primers* para PCR), a identificação de plantas com liberibacter deixou de ser efetuada somente pela laboriosa microscopia eletrônica de transmissão e um número maior de amostras pôde ser avaliado. Desta maneira, as liberibacters foram extensivamente associadas a plantas apresentando sintomas de HLB, sendo assim consideradas a causa primária da doença, mesmo que para confirmação da etiologia do HLB, seja necessário o isolamento e cultivo da bactéria (Sechler et al., 2009), para a conclusão dos postulados de Koch.

Três espécies de *Ca. Liberibacter* estão associadas ao HLB dos citros, *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*, sendo que as duas últimas ocorrem no Brasil (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a; Teixeira et al., 2005b; Teixeira et al., 2009). Antes de 2004, a ocorrência do HLB era descrita em três grandes áreas do mundo: subcontinente Indiano, Sudeste da Ásia e China; Sul e parte Leste da África; e Península Arábica (Villechanoux et al., 1992). Nos países asiáticos incluem-se: Camboja, China (incluindo Hong Kong), Filipinas, Indonésia, Japão, Laos, Malásia, Mianmar, Taiwan, Tailândia e Vietnã. Os países do subcontinente indiano com HLB incluem Bangladesh, Butão, Índia, Nepal e Paquistão; no oceano Índico encontra-se o HLB no Sri Lanka,

Ilhas Comoros, Madagascar, Ilhas Maurício e Reunião. Na África o HLB encontra-se em Burundi, Camarões, República da África Central, Etiópia, Quênia, Malauí, Ruanda, Somália, África do Sul, Suazilândia, Tanzânia e Zimbábue. Em 1999, a ocorrência do HLB também foi relatada em Papua Nova Guiné (Halbert & Manjunath, 2004). Na Península Arábica as duas formas da doença estão presentes: a forma asiática tolerante ao calor na Arábia Saudita e Irã e a forma africana sensível ao calor no Iêmen (Bové & Garnier, 1984; Faghihi et al., 2009). Nas ilhas Reunião e Maurício as duas espécies, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*, também estão presentes (Garnier et al., 1996).

As três espécies de *Ca. Liberibacter* que ocorrem nos citros podem ser transmitidas através de material vegetal infectado via enxertia, através de cuscuta (*Cuscuta* spp.) (Bové, 2006) e naturalmente, planta a planta, através de psilídeos. Experimentalmente, *Ca. Liberibacter* spp. foram transmitidas através da planta parasitária cuscuta (*Cuscuta campestris* ou *Cuscuta* spp.) para a vinca (*Cataranthus roseus*) (Garnier & Bové, 1983; Ke et al., 1993), para tabaco (*Nicotiana* spp.) (Garnier & Bové, 1983; Francischini et al., 2007) e tomate (Duan et al., 2008) assim como de murta-de-cheiro para citros (Zhou et al., 2007). Em vinca os sintomas são característicos, embora não sejam específicos, a bactéria atinge maiores concentrações e apresenta as mesmas características morfológicas em relação àquelas observadas em citros. Imagens obtidas sob microscopia eletrônica indicam que as bactérias associadas ao HLB têm morfologia filamentosa, com grande variação em comprimento e diâmetro, bem como formas arredondadas e estruturas que lembram morfológicamente a gemulação em leveduras (Garnier & Bové, 1983; Ke et al., 1993; Su, 2008).

A inoculação por meio de enxertia de tecidos é uma maneira de sobrepor a inoculação com o uso de culturas puras, dada a indisponibilidade de cultivo axênico de liberibacter. Foi também a primeira metodologia empregada para provar que o HLB era uma doença transmissível (Hsiang, 1956, citado por Bové, 2006). Estudos empregando enxertia têm incrementado nosso conhecimento a respeito do HLB e contribuído para associar a ocorrência da doença com a presença de liberibacter. A transmissão via enxertia de ramos sintomáticos foi extensivamente usada no Brasil obtendo-se sucesso de 10,0 a 23,3% na transmissão de

Ca. L. americanus e de 66,7 a 73,3% na transmissão de *Ca. L. asiaticus* (Lopes et al., 2009a).

Embora os estudos com enxertia possam responder diversas questões importantes relativas ao HLB, na natureza a transmissão por psilídeos é a maneira como o HLB é disseminado nos pomares. Duas são as espécies de psilídeos associadas à transmissão de *Ca. Liberibacter* spp., *Diaphorina citri* de ocorrência na Ásia e Américas e *Trioza erytreae* presente na África. A *D. citri* transmite as espécies asiática e americana de liberibacter (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006), enquanto *T. erytreae* transmite a espécie africana (McClellan & Oberholzer, 1965). A ocorrência de insetos vetores para as liberibacters é um fator adicional na associação destas com o HLB. A transmissão de bactérias por vetores é um processo extremamente específico e, portanto, é improvável que outro organismo esteja associado ao HLB e à transmissão por psilídeos (Pereira et al., 2007).

A despeito das tentativas de isolamento de liberibacter ao longo das décadas (Ghosh et al., 1971; Sodhi et al., 1973), os trabalhos que mais se aproximaram de tal feito somente foram publicados recentemente e também levam a associação de liberibacter com o HLB (Davis et al., 2008; Sechler et al., 2009). Em um trabalho extensivo de identificação de bactérias presentes no floema de citros com HLB, *Ca. L. asiaticus* foi a espécie preponderante (Tyler et al., 2009), sendo também preponderante em trabalhos de clonagem e análise do 16SrDNA procariótico (Sagaran et al., 2009).

Bactérias do gênero *Ca. Liberibacter* foram originalmente descritas como sendo incapazes de crescimento “in vitro” sob condições axênicas (Jogoueix et al., 1994; Hocquelett et al., 1999; Garnier et al., 2000; Teixeira et al., 2005c). Entretanto, recentemente foram publicados dois trabalhos que relatam a capacidade de crescimento limitado em meio de cultura, das liberibacter associadas ao HLB. Davis et al. (2008) relatam a detecção de *Ca. L. asiaticus* de citros com sintomas de HLB, em co-cultura com uma actinobactéria, onde a detecção foi possível com o uso de PCR e sequenciamento do produto dessa reação. No trabalho de Sechler et al. (2009) os autores obtiveram crescimento de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* em meio de cultura, e argumentam ter inoculado e recuperado os mesmos isolados de

plantas cítricas através de infiltração. Mais importante, afirmam terem reproduzido os sintomas de mosqueado, o que em teoria comprovaria os postulados de Koch para as liberibacters. Embora estes resultados sejam expressivos, contrapondo a concepção de *Candidatus Liberibacter* spp. como bactérias não cultiváveis, algumas observações são necessárias. Células de liberibacter usualmente observadas em citros e vinca infectados não foram observadas em ambos os trabalhos (Davis et al., 2008; Sechler et al., 2009). A similaridade do 16SrDNA observada é a menor relatada entre estes isolados e os dados disponíveis para *Ca. L. asiaticus* (Sechler et al., 2009). O número de plantas inoculadas por linhagem reduz-se a uma planta por repetição (Sechler et al., 2009), enquanto que os valores obtidos na PCR quantitativa não foram relatados. Embora não se deva considerar tais trabalhos como definitivos, são resultados importantes, pois estimulam outros grupos a repetirem os experimentos.

No Brasil, no final de 2007, foi confirmada a associação de um fitoplasma com plantas de citros exibindo sintomas típicos de HLB: folhas com mosqueado, frutos deformados, sementes abortadas e feixes vasculares da columela apresentando coloração alaranjada, evidenciando a degeneração de vasos do floema. Com base na caracterização do gene ribossomal 16SrDNA e região intergênica 16SrDNA-23SrDNA, verificou-se que este fitoplasma posiciona-se no grupo 16Sr-IX, exibindo 99% de identidade com o representante do grupo “Pigeon Pea Phytoplasma” (Teixeira et al., 2008c). Este grupo de fitoplasmas possui representantes de ocorrência na América, porém são pouco estudados quanto a características genéticas, vetores e gama de hospedeiros. Na América, fitoplasmas do grupo 16Sr-IX foram identificados nos EUA (Flórida), Jamaica, Porto Rico (“Pigeon pea witches’-broom phytoplasma” - PPWB), Costa Rica, Honduras, Salvador, Guatemala e Nicarágua (*Gliricidia sepium* relacionada com o PPWB) e Colômbia (“periwinkle phytoplasma”) (Kenyon et al., 1998; Duduk et al., 2008). O mesmo fitoplasma do HLB do grupo 16Sr-IX foi encontrado em crotalaria (*Crotalaria juncea*) com sintomas de vassoura de bruxa (Wulff et al., 2009b), podendo representar um reservatório deste fitoplasma. Em 2009, um fitoplasma similar ao *Candidatus Phytoplasma asteris* (grupo 16Sr-I) foi associado aos sintomas do HLB na China,

sendo encontrado isoladamente ou associado a *Ca. L. asiaticus* em plantas cítricas (Chen et al., 2009). Em ambos os casos, o vetor destes fitoplasmas não é conhecido. Convém ressaltar que estes dois fitoplasmas são distintos de *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*, um fitoplasma associado à vassoura de bruxa da lima ácida (*Citrus aurantifolia*), uma doença não relatada no Brasil (Zreik et al., 1995).

COMENTÁRIOS FINAIS

Até o momento, três liberibacters (*Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *Ca. L. americanus*) estão associadas ao HLB, e mais recentemente dois fitoplasmas foram também associados aos sintomas do HLB, um pertencente ao grupo 16SrDNA-IX e outro ao grupo 16SrDNA-I. As informações acumuladas ao longo dos anos sugerem a existência de uma associação causal entre liberibacter e HLB, apesar de outros organismos, como é o caso dos fitoplasmas, também estarem associados a sintomas idênticos aos do HLB em plantas cítricas. O estudo com fitoplasma esbarra nas mesmas dificuldades enfrentadas com liberibacter: são organismos fastidiosos, transmitidos por insetos vetores sugadores de seiva, que colonizam o floema e o corpo dos insetos e que não estão disponíveis em cultura axênica.

Considerando que todas as variedades de citros, em especial a laranja doce, principal foco da citricultura no estado de São Paulo, são suscetíveis ao HLB, e a ameaça que a doença representa à economia, não só da citricultura paulista, mas à citricultura mundial, é de fundamental importância que o adequado manejo da doença seja seguido, através da identificação e eliminação imediata das plantas infectadas, eliminando assim fontes de inóculo nos pomares. Estas medidas, associadas a outras que visem manter baixa população de insetos vetores e a utilização de mudas sadias, constituem, no momento, o “pacote” disponível para o controle do HLB (Belasque Jr. et al., 2009). Assim, podemos imaginar que o futuro da citricultura pode estar no desenvolvimento de plantas resistentes ao HLB ou repelentes ao inseto e, para isso, torna-se fundamental a agregação de novas frentes de pesquisa, que envolvam não só aspectos da caracterização e biologia desses microrganismos, mas também do vetor e da interação planta-patógeno-vetor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkar-Purushothama CR, Quaglino F, Casati P, Ramanayaka JG & Bianco PA (2009) Genetic diversity among "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. *Annals of Microbiology* 59 (4):681-688.
- Bastianel C, Garnier-Semancik M, Renaudin J, Bové JM & Eveillard S (2005) Diversity of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", based on the *Omp* Gene Sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6473-6478.
- Belasque Jr. J, Bergamin Filho A, Bassanezi RB, Barbosa JC, Gimenes Fernandes N, Yamamoto PT, Lopes SA, Machado MA, Leite Jr RP, Ayres AJ & Massari CA (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology* 34:137-145.
- Bové JM, Calavan SP, Capoor SP, Cortez RE & Schwarz RE (1974) Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 6th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.12-15.
- Bové JM & Saglio P (1974) Stubborn and greening: a review, 1969-1972. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 6th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.1-11.
- Bové JM, Bonnet P, Granier M & Aubert B (1980) Penicillin and tetracycline treatments of greening-disease-affected citrus plants in the glasshouse, and the bacterial nature of the prokariote associated with greening. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 8th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.91-102.
- Bové JM & Garnier M (1984) Citrus greening and psylla vectors of the disease in the Arabic Peninsula. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 9th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.109-114.
- Bové JM, Garnier M, Ahlawat YS, Chakraborty NK & Varma A (1993) Detection of Asian strains of the greening BLO by DNA-DNA hybridization in India orchard trees and Malaysian *Diaphorina citri* psyllids. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 12th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.259-263.
- Bové JM (2006) Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology* 88(1):7-37.
- Capoor SP, Rao DG & Viswanath SM (1967) *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37:572-576
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H & Civerolo E (2009) A Phytoplasma Related to "*Candidatus Phytoplasma asteri*" detected in Citrus showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99 (3):236-242.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Jr. J & Machado MA (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Disease* 88:1382.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Jr. J & Machado MA (2005) Analysis of 16S rDNA Sequences from Citrus Huanglongbing Bacteria Reveal a Different "*Ca. Liberibacter*" Strain Associated with Citrus Disease in São Paulo. *Plant Disease* 89(8):848-852.
- Davis MJ, Mondal SN, Chen H, Rogers ME & Brlansky RH (2008) Co-cultivation of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" with Actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease* 92:1547-1550.
- Da Graça JV (1991) Citrus greening disease. *Annual Review Phytopathology* 29:109-136.
- Doddapaneni H, Liao H, Lin H, Bai X, Zhao X, Civerolo EL, Irey M, Coletta-Filho H & Pietersen G (2008) Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*. *BMC Research Notes* 1:72 Doi:10.1186/1756-0500-1-72.

- Duan YP, Gottwald T, Zhou LJ & Gabriel DW (2008) First report of dodder transmission of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” to tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Disease* 92:831.
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y & Gottwald T (2009) Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8):1011-1020.
- Duduk B, Meja JF, Calari A & Bertaccini A (2008) Identification of 16SrIX group phytoplasma infecting colombian periwinkles and the molecular characterization on several genes. *Proceedings of the 17th International Organization for Mycoplasmaology Congress, Wunan, China.* p.83.
- Faghihi MM, Salehi M, Bagheri A & Izadpanah K (2009) First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. *Plant Pathology* 58:793.
- Francischini FJB, Oliveira KDS, Astua-Monge G, Novelli A, Lorenzino R, Matioli C, Kemper E & Da Silva ACR (2007) First report on the transmission of “*Candidatus Liberibacter americanus*” from citrus to *Nicotiana tabacum* cv. xanthi. *Plant Disease* 91:631.
- Garnier M, Latrille J & Bové JM (1976) *Spiroplasma citri* and the organism associated with likubin: comparison of their envelope systems. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 7th Conference IOCV, Riverside: University of California.* p.13-17.
- Garnier M & Bové JM (1983) Transmission of organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 73(10):1358-1363.
- Garnier M, Danel N & Bové JM (1984) The greening organism is a gram negative bacterium. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 9th Conference IOCV, Riverside: University of California.* p.115-124.
- Garnier M, Martin-Gros G & Bové JM (1987) Monoclonal antibodies against the bacteria-like organism associated with citrus greening disease. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 138:639-650.
- Garnier M, Gao SJ, He YL, Villechanoux S, Gandar J & Bové JM (1991) Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 11th Conference IOCV, Riverside: University of California.* p.428-435.
- Garnier M & Bové JM (1996) Distribution of the Huanglongbing (Greening) *Liberibacter* species in fifteen African and Asian countries. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 13th Conference IOCV, Riverside: University of California.* p.388-391.
- Garnier M, Jagoueix S, Toorawa P, Grisoni M, Mallessard R, Dookun A & Saumtally JC (1996) Both Huanglongbing (Greening) *Liberibacter* Species are present in Mauritius and Reunion. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 13th Conference IOCV, Riverside: University of California.* p.392-394.
- Garnier M, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, Le Roux HF & Bové JM (2000) Genomic characterization of a liberibacter present in a ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of “*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:2119-2125.
- Ghosh SK, Raychaudhuri SP, Varma A & Nariani TK (1971) Isolation and culture of mycoplasma associated with citrus greening disease. *Current Science* 40:299-300.
- Gottwald TR, Da Graça JV & Bassanezi RB (2007) Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress* Doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Halbert SE & Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhynchia: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87:330-353.
- Halbert SE (2005) The discovery of huanglongbing in Florida. In: *Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida Citrus Mutual, Orlando.* p.50.

- Hocquellet A, Bové JM & Garnier M (1999) Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes* 13:373-379.
- Hoorfar J, Wolffs P & Radstrom P (2004) Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *APMIS* 112:808-14.
- Hung TH, Hung SC, Chen CN, Hsu MH & Su HJ (2004) Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology* 53:96-102.
- Jagoueix S, Bové JM & Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3):379-386.
- Jagoueix S, Bové JM & Garnier M (1996) PCR detection of the two "*Candidatus Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50.
- Jagoueix S, Bové JM & Garnier M (1997) Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of "*Candidatus Liberibacter asiaticum*" and "*Candidatus Liberibacter africanum*", the two species associated with Citrus Huanglongbing (Greening) disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:224-227.
- Ke C, Ke S, Wu RJ, Yang H & Hsu PT (1993) Purification and serology of the organism associated with citrus Huanglongbing. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 12th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.220-223.
- Kenyon L, Harrison NA, Ashburner GR, Boa ER & Richardson PA (1998) Detection of a pigeon pea witches'-broom-related phytoplasma in trees of *Gliricidia sepium* affected by little-leaf disease in Central America. *Plant Pathology* 47:671-680.
- Korsten L, Sanders GM, Su HJ, Garnier M, Bové JM & Kotzé JM (1993) Detection of citrus greening-infected citrus in South Africa using a DNA probe and monoclonal antibodies. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 12th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.224-232.
- Lafleche D & Bové JM (1970) Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orange atteints de la maladie du "greening". *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 270:1915-1917.
- Lin H, Doddapaneni H, Bai X, Yao J, Zhao X & Civerolo EL (2008) Acquisition of uncharacterized sequences from *Candidatus Liberibacter*, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. *Molecular and Cellular Probes* 22:30-37.
- Lin KH (1956) Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathologica Sinica* 2:1-42.
- Llauger R, Luis M, Collazo C, Teixeira DC, Martins EC, Pena I, López D, Batista L, Prieto D, Riano R, Borroto A, Cueto J, Ayres J & Bové JM (2008) PCR detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with Citrus Huanglongbing in Cuba. *Tropical Plant Pathology* 33:S93.
- Luis M, Collazo C, Llauger R, Blanco E, Peña I, López D, González C, Casín JC, Batista L, Kitajima E, Tanaka FAO, Salaroli RB, Teixeira DC, Martins EC & Bové JM (2009) Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Journal of Plant Pathology* 91(3):709-712.
- Lopes SA, Martins EC & Frare GF (2005) Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. *Summa Phytopathologica* 31:48-49.
- Lopes SA, Martins EC & Frare GF (2006) Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em *Murraya paniculata*. *Fitopatologia Brasileira (Suplemento)* 31:303.
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes NG & Cambra M (2009a) Graft transmission efficiencies and multiplication of "*Candidatus Liberibacter americanus*" and "*Ca. Liberibacter asiaticus*" in citrus plants. *Phytopathology* 99:301-306.

- Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Marin DR & Bové JM (2009b) Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. *Plant Disease* 93:257-262.
- Lopes SA, Frare GF, Camargo LEA, Wulff NA, Teixeira DC, Bassanezi RB, Beattie GAC & Ayres AJ (2010) Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus Liberibacters. *Plant Pathology* (aceito para publicação).
- Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S & Lee RF (2008) Detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98(4):387-396.
- Matos L, Hilf ME & Camejo J (2009) First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Associated with Citrus Huanglongbing in the Dominican Republic. *Plant Disease* 93(6):668.
- McClean APD & Oberholzer PCJ (1965) Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *South Africa Journal of Agricultural Science* 8:297-298.
- Moll JN & Martin MM (1974) Comparison of the organism causing greening disease with several plant pathogenic gram-negative bacteria, rickettsia-like organism and mycoplasma-like organisms. *Colloque INSERM* 33:89-96.
- Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, Subandiyah S & Iwanami T (2005) Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease* 89:705-711.
- Pantoja M L, Cordero CC, Riveron RL, Peña Barzaga L, Hernandez DL, Blanco E, Casi JC, Batista Le Riverend L, Tanaka FAO, Salaroli RB, Martins E, Teixeira D, Kitajima E, Ayres J, Bové JM, Perez JL & Cueto JR (2008) Huanglongbing in Cuban Citriculture. Book of Program and Abstracts, 11th International Citrus Congress, Wuhan, China, 26-30 Oct. Abstract # 84, p.50-51.
- Pereira C, Prado JR, Alves KCS, Coletta-Filho, H & Lopes JRS (2007) Avaliação de diferentes hemípteros quanto à capacidade de aquisição e retenção de *Candidatus Liberibacter* spp. In: 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Pirassununga, SP. Resumos. p.2044
- Planet P, Jagoueix S, Bové JM & Garnier M (1995) Detection and characterization of the African citrus greening Liberibacter by amplification, cloning and sequencing of the *rplKAJL-rpoBC* operon. *Current Microbiology* 30:137-141.
- Reinking OA (1919) Diseases of economic plants in South China. *Philippine Agriculturist* 8:109-135.
- Saganan US, DeAngelis KM, Trivedi P, Andersen GL, Lu SE & Wang N (2009) Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using phylochip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1566-1574.
- Saglio P, Laffèche D, Bonissol C & Bové JM (1971) Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associées à la maladie du stubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. *Physiologie Végétale* 9:569-582.
- Saponari M, De Bac G, Breithaupt J, Loconsole G, Yokomi RK, & Catalano L (2010) First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Associated with Huanglongbing in Sweet Orange in Ethiopia. *Plant Disease* 94(4):482.
- Sechler A, Schuenzel EL, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone AL, Schneider WL, Damsteegt VD & Schaad NW (2009) Cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*”, and “*Ca. L. americanus*” Associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 99(5):480-486.
- Sodhi SS, Dhillon SS, Jeyarajan R & Cheema SS (1973) Isolation and characterization of mycoplasma like organisms associated with citrus greening disease. *Indian Journal of Microbiology* 13:13-16.
- Su HL (2008) Research and Health Management of Citrus Huanglongbing in Taiwan. In: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Orlando, USA. p.57-91.

- Subandiyah S, Iwanami T, Tsuyumu S & Ieki H (2000) Comparison of 16s rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant Disease* 84:15-18.
- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2005a) First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease. *Plant Disease* 89:107.
- Teixeira DC, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Lopes SA, Bassanezi RB, Ayres AJ, Saillard C & Bové JM (2005b) Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19:173-179.
- Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ & Bové J (2005c) “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1857-62.
- Teixeira DC, Eveillard S, Sirand-Pugnet P, Wulff A, Saillard C, Ayres AJ & Bové JM (2008a) The *tufB*-*secE*-*nusG*-*rplK**AJL*-*rpoB* gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1414-1421.
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins E, Wulff NA, Yamamoto PT, Eveillard-Jagoueix S, Ayres AJ & Bové JM (2008b) *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil: Distribution and quantification of the liberibacter in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR methods. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150.
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2008c) A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984.
- Teixeira DC, Wulff NA, Leite APR, Martins EC, Ayres AJ & Bové JM (2009) Identification, PCR detection and occurrence in São Paulo state, Brasil, of citrus huanglongbing-associated agents: *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus*, and the 16Sr group IX phytoplasma. *Tropical Plant Pathology* 34:S7.
- Tomimura K, Miyata SI, Furuya N, Kubota K, Okuda M, Subandiyah S, Hung TH, Su HJ & Iwanami T (2009) Evaluation of Genetic Diversity Among “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” isolates collected in Southeast Asia. *Phytopathology* 99(9):1062-1069.
- Tyler HL, Roesch LFW, Gowda S, Dawson WO & Triplett EW (2009) Confirmation of the Sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and Assessment of Microbial Diversity in Huanglongbing-Infected Citrus Phloem Using a Metagenomic Approach. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(12):1624-1634.
- Van De Merwe AJ & Anderson FG (1937) Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming in South Africa* 12:439-440.
- Villechanoux S, Garnier M, Renaudin J & Bové JM (1992) Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Current Microbiology* 24:89-95.
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, Renaudin J & Bové JM (1993) The genome of non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG*-*rplK**AJL*-*rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiology* 26:161-166.
- Wang Z, Yin Y, Hu H, Yuan Q, Peng G & Xia Y (2006) Development and application of molecular-based diagnosis for “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the causal pathogen of citrus Huanglongbing. *Plant Pathology* 55:630-638.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703.
- Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ & Fox GE (1985) A phylogenetic definition of the eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology* 6:143-151.

Wulff NA, Eveillard S, Foissac X, Ayres AJ & Bové JM (2009a) rRNA operons and genome size of “*Candidatus Liberibacter americanus*”, a bacterium associated with citrus huanglongbing in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1984-1991.

Wulff NA, Teixeira DC, Martins EC, Leite APR, Mariano AG, da Silva ACB, Augusto MLV, Ayres AJ & Bové JM (2009b) The 16Sr group IX phytoplasma associated with citrus Huanglongbing symptoms in São Paulo state, Brazil, has been detected in *Crotalaria* plants (*Crotalaria juncea*) *Tropical Plant Pathology* 34:S7.

Yamamoto PT, Felipe MR, Garbim LF, Coelho JHC, Ximenes NL, Martins EC, Leite APR, Sousa MC, Abrahao DP & Braz JD (2006) *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: *Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop*, Ribeirão Preto, SP, Brazil. p.96.

Zhou LJ, Gabriel DW, DuanYP, Halbert SE & Dixon WN (2007) First report of dodder transmission of huanglongbing from naturally infected *Murraya paniculata* to citrus. *Plant Disease* 91:227.

Zreik L, Carle P, Bové JM & Garnier M (1995) Characterization of the mycoplasma-like organism associated with Witches’- Broom disease of Lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, “*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*”. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:449-453.