

Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Raquel Luciana Boscarior-Camargo^{1*}, Mariângela Cristofani-Yaly¹,
Adriano Malosso¹, Helvécio Della Coletta-Filho¹ & Marcos Antonio Machado¹

RESUMO

O *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) é uma das mais devastadoras doenças de citros e tem como agente causal três espécies da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., capazes de infectar um grande número de espécies e variedades de citros. No entanto, grande parte do germoplasma de citros no Brasil carece de avaliações quanto à suscetibilidade ou resistência à bactéria do HLB. Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação da bactéria e o desenvolvimento de sintomas em seis espécies e variedades de citros, assim como em oito gêneros próximos, em experimentos conduzidos em casa de vegetação no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. Após infecção por borbulhas infectadas foi possível detectar a bactéria em todos os genótipos avaliados, embora com variação na quantidade de bactéria ao longo do tempo. Em genótipos como *Atalantia*, *Poncirus trifoliata* e *Citrus limettioides* (lima da Pérsia) há redução da taxa de multiplicação da bactéria, indicando certo grau de tolerância. Aparentemente não há relação entre a concentração da bactéria nos tecidos, presença e intensidade de sintomas. Estes, por sua vez, são variáveis entre os diferentes genótipos. Os resultados indicaram que, efetivamente, não há resistência genética à infecção de *Ca. Liberibacter* spp. dentro do grupo citros e gêneros afins.

Termos de indexação: *huanglongbing*, PCR em Tempo Real, *Citrus* e gêneros afins, resistência.

SUMMARY

Evaluation of different genotypes of citrus to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection

Huanglongbing (HLB, *greening*) is one of the most devastating diseases of citrus and it has as causal agents three species of the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., which are capable of infecting a large number of species and varieties of citrus. However, various accesses of the germplasm of citrus in Brazil have not yet been evaluated for susceptibility or resistance to the HLB bacterium. Thus, this study aimed to evaluate the multiplication of bacteria and the development of symptoms in six species and varieties of citrus and eight related genera. Trials were conducted in a greenhouse at Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. After infection with infected buds, the bacteria could be detected in all genotypes, although with variation in the amount of bacteria over time. The genotypes *Atalantia*, *Poncirus trifoliata* and *Citrus*

¹ Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Rod. Anhanguera, km 158, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis-SP

* Autor para correspondência: E-mail: raquel@centrodecitricultura.br

limettioides (sweet lime) showed a reduction in the bacteria multiplication rate, indicating some degree of tolerance. In fact, there is no relationship among the title of the bacteria in the tissues, presence and intensity of symptoms. On the other hand, they vary among the different genotypes. The results indicate that there is no genetic resistance to *Ca. Liberibacter* spp. infection within the citrus group and related genera.

Index terms: Huanglongbing, Real-Time PCR, *Citrus* relatives, resistance.

INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB, *ex-greening*) dos citros é atualmente uma das principais doenças nos pomares do Estado de São Paulo, constituindo significativo fator de redução de produtividade e qualidade de fruto a curto e médio prazos. Desde a confirmação do HLB no Brasil (Coletta-Filho et al., 2004) alguns avanços foram feitos no entendimento do patossistema, entre eles, a descrição de um novo variante da bactéria e de um fitoplasma associados à doença (Teixeira et al., 2005a; Teixeira et al., 2005b; Coletta-Filho et al., 2005), o diagnóstico da bactéria através de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), a biologia do vetor e da transmissão, o período de incubação da bactéria, a epidemiologia espaço-temporal da doença, a ineficiência da poda como método de controle, o efeito da temperatura sobre as duas bactérias que ocorrem no Brasil. Esses resultados contribuíram para o estabelecimento de critérios para erradicação de plantas sintomáticas e controle do vetor como métodos de manejo da doença.

O agente causal dessa doença, *Candidatus Liberibacter*, é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à subunidade alfa das Proteobacteria, sendo restrita ao floema (Jagoueix et al., 1994). Recentemente, as três espécies de *Ca. Liberibacter* spp. foram cultivadas com sucesso utilizando um meio denominado Liber A. Esse cultivo foi confirmado através da técnica de PCR em tempo real e sequenciamento, sendo o primeiro relato de cultivo das espécies *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* e *Ca. L. africanus* (Sechler et al., 2009).

A busca por resistência ao patógeno tornou-se imprescindível haja vista seu caráter extremamente danoso à cultura, resultando em enormes prejuízos em todas as regiões onde ocorre (Halbert & Manjunath, 2004). No entanto, não há formas de resistência descritas, seja em citros ou em gêneros próximos, o

que dificulta os trabalhos de melhoramento genético. Portanto, um grande desafio é encontrar uma forma de controlar a doença, através de resistência genética. Para isso torna-se necessário testar possíveis fontes de resistência em gêneros próximos a citros.

Até o momento, não há nenhuma fonte de resistência que possa ser utilizada no controle dessa doença, o que restringe, por ora, a utilização do controle genético. Apesar disso, abordagens de estudo de herança poderão trazer novas informações sobre a suscetibilidade diferencial entre genótipos de citros.

As Rutáceas são hospedeiras naturais das espécies de *Ca. Liberibacter* spp., sendo todas as espécies e cultivares de citros suscetíveis à infecção (Garnier et al., 1984), embora os sintomas desenvolvidos não sejam típicos e uniformes em todas elas. Laranjeiras doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], as tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) e híbridos de tangerineiras são os mais severamente afetados. Pomeleiros (*C. paradisi* Macfad.), laranjeiras azedas (*C. aurantium* L.) e limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm.f.] são moderadamente afetados. Limeira ácida Galego [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle], toranjeiras [*C. maxima* (Burm.) Merr.] e os trifoliatas [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], incluindo seus híbridos com citros, são considerados mais tolerantes (Manjunath et al., 2008).

Outras Rutáceas também são hospedeiras da bactéria e possuem o psilídeo como vetor, a saber: *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten., *Balsamocitrus dawei* Stapf, *C. maxima*, *C. hystrix* DC., *C. jambhiri* Lush, *C. nobilis*, *Clausena indica* (Dalzell) Oliv., *Cl. lansium* (Lour.) Skeels, *Microcitrus australasica* (F. Muell.) Swingle, *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson, *Atalantia missionis* (Wall. ex Wight) Oliv., *Limonia acidissima* L. [= *Feronia limonia* (L.)], kumquat (*Fortunella* spp.) e *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. (Hung et al., 2000; Hung et al., 2004).

Considerando a necessidade de determinar o grau de suscetibilidade genética à *Ca. L. asiaticus*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação da bactéria e o desenvolvimento de sintomas de HLB em oito genótipos de gêneros relacionados aos citros e em seis genótipos do gênero *Citrus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todo o material vegetal avaliado pertence ao Banco de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação de 2008 a 2009, em sacolas plásticas de 4 L contendo substrato Plantmax e irrigadas quando necessário. As borbulhas provieram de plantas comprovadamente livres da bactéria do HLB.

Foram realizados dois experimentos independentes. Em ambos foram realizadas a quantificação da bactéria por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e uma análise visual da evolução de sintomas foliares, representado pelo desenvolvimento de clorose e mosqueamento foliar ou outra anormalidade que esteja relacionada à infecção pela bactéria do HLB.

No primeiro experimento foram avaliadas plantas de *S. buxifolia*, *Microcitrus* spp., *F. margarita* (Lour.) Swingle, *Atalantia* spp., *P. trifoliata*, eremolemon Coachella [*Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swingle X *C. limon*], *Merope* M. Roem. spp. e *Micromellum tephrocarpa*, espécies estas de gêneros próximos de *Citrus*.

No segundo experimento foram avaliadas plantas de laranja Pêra IAC2 (*C. sinensis*), tangerineiras Ponkan e Cravo (*C. reticulata*), mexeriqueira do Rio (*C. deliciosa* Ten.), lima da Pérsia (*C. limettioides* Tan.), limeira ácida Galego *C. aurantifolia* e pomeleiro *Marsh seedless* (*C. paradisi*).

Seis meses após a enxertia em limoeiro Cravo (*C. limonia* Osb.), brotações vigorosas das plantas em avaliação foram sobre-enxertadas com duas borbulhas provenientes de plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*. A fonte de inóculo foi obtida a partir de ramos sintomáticos de laranja Pêra e a infecção pela espécie asiática foi confirmada através da técnica de PCR convencional. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com fotoperíodo natural e

temperatura ambiente $\pm 3^{\circ}\text{C}$ (Lopes et al., 2009). A quantificação da população de bactéria foi estimada a partir de curva padrão feita com amostras de DNA total das plantas infectadas. O método de extração de DNA utilizado foi baseado em Murray & Thompson (1980).

Em ambos os experimentos foram avaliadas seis plantas de cada genótipo. Cinco plantas foram inoculadas com borbulhas contendo *Ca. Liberibacter asiaticus* e uma planta controle foi inoculada com borbulha sadia. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas mensalmente para a sintomatologia apresentada, e bimestralmente por RT-qPCR, de acordo com Coletta-Filho et al. (2010).

A curva padrão do alvo baseou-se nas concentrações conhecidas do fragmento de rDNA 16S de *Ca. L. asiaticus* clonado (plasmídeo pGEM contendo um inserto de 1200 pb). Para a normalização dos dados, uma curva baseada em DNA de planta sadia (18S rDNA) foi construída. Dessa maneira, as curvas foram estabelecidas relacionando-se as concentrações conhecidas de DNA com os respectivos valores do limiar de fluorescência (*Ct - threshold cycle*) para cada diluição.

As análises de qPCR foram realizadas no “ABI PRISM 7500 Sequence Detection System” (“Applied Biosystem”) através do sistema “TaqMan”. As sondas desenvolvidas são referentes a uma região conservada do DNA ribossomal 16S, capaz de diferenciar a forma asiática de *Ca. Liberibacter* (Carlos et al., 2006). A sequência da sonda utilizada foi: 6-NEDACATCTAGGTAAAAACCMGBNFQ (var. *asiaticus*). Os iniciadores para *Ca. Liberibacter asiaticus* (Lsg1-AS-84F 5' TCACCGGCAGTC CCTATAAAGT 3' e Lsg1-AS-180R 5' GGGTTAAGTCCCGCAACGA) foram usados nas reações de qPCR (Carlos et al., 2006).

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR – Sistema de análise de variância v 5.0 (Ferreira, 2000) para os resultados expressos em valores de *Ct* (*threshold cycle*). Somente amostras com $Ct \leq 35$ foram consideradas positivas para a presença da bactéria. A concentração relativa de *Ca. L. asiaticus* com base em análises de reação em cadeia da polimerase com um conjunto de iniciadores específicos, será representada como sendo + + +, para as concentrações maiores e +, para as concentrações menores, mas definitivamente positiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados desde ausência completa de sintomas em *Micromellun* e *Severinia*, até folhas com manchas cloróticas ou clorose uniforme na lâmina foliar, e sintomas típicos como mosqueado e sintomas de deficiência mineral (Tabela 1). Baseado nos resultados de RT-qPCR e pela análise estatística realizada, foi possível agrupar as plantas em três categorias sendo “+++” as que continham maior concentração da bactéria e “+” as que apresentavam menor quantidade detectada (Tabela 1). Porém, não foi possível correlacionar quantidade de bactéria e presença de sintomas. Esta mesma observação foi relatada por Folimonova et al. (2009) em alguns genótipos de citros estudados.

As análises bimestrais de plantas dos oito gêneros (Tabela 2) confirmaram a presença da bactéria em

todas as repetições, mas com variação na concentração bacteriana ao longo do tempo. Essa variação, mais do que estar associada a uma resposta genética da planta, pode estar relacionada com diferenças no título inicial da bactéria nas borbulhas infectadas, uma vez que não é possível normalizar esse título.

Algumas plantas de gêneros como *Atalantia*, *Poncirus* e *Microcitrus* apresentaram uma redução na concentração inicial da bactéria após 12 meses da enxertia. Em função do longo período após enxertia (12 meses), é possível que essa resposta represente de fato uma resposta genética da planta que, nesse caso, poderia ser considerada mais tolerante que genótipos em que a taxa de multiplicação da bactéria é ascendente e crescente ao longo do tempo.

As diferentes espécies de citros avaliadas (Tabela 2) mostraram-se igualmente suscetíveis à bactéria, sendo

Tabela 1. Concentração estimada da bactéria *Ca. L. asiaticus* e desenvolvimento de sintomas em genótipos de *Citrus* e gêneros relacionados 12 meses após enxertia com borbulhas infectadas. Cordeirópolis, SP, Brasil

Genótipos	RT qPCR para <i>Ca. L. asiaticus</i>	Sintomas observados
Laranja Pêra IAC2	++	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
Tangerina Ponkan	+++	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
Tangerina Cravo	+++	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
Mexerica do Rio	+++	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
Lima da Pérsia	+	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
Lima ácida Galego	++	Folhas cloróticas, nervuras eram proeminentes e amarelas
Pomelo Marsh Seedless	++	Folhas com manchas cloróticas e sintomas de deficiência mineral
<i>Micromellum tephrocarpa</i>	++	Ausência de sintomas
<i>Merope</i> spp.	++	Folhas com clorose na nervura central e nas bordas
Eremolemon Coachella	++	Folhas com manchas verdes mais claras
<i>Atalantia</i> spp.	+	Folhas com manchas cloróticas ou de um verde mais claro e sintomas de deficiência mineral
<i>S. buxifolia</i>	+++	Ausência de sintomas
<i>Microcitrus</i> spp.	++	Folhas com manchas cloróticas e sintomas de deficiência mineral
<i>F. margarita</i>	++	Folhas com manchas cloróticas e sintomas de deficiência mineral
<i>P. trifoliata</i>	+	Nervuras proeminentes, clorose

+++ = Ct médio ≤ 18

++ = Ct médio ≥ 18 e ≤ 29

+ = Ct médio ≥ 29

Tabela 2. Ct médio aos 6 e 12 meses após enxertia com borbulhas infectadas com *Ca. L. asiaticus* em *Citrus* e gêneros relacionados. Cordeirópolis, SP, Brasil

Genótipos	Ct* médio	
	6 meses	12 meses
<i>P. trifoliata</i>	28,51Aa	30,13Aa
<i>Atalantia</i> spp.	28,44Aa	29,72Aa
Eremolemon Coachella	25,99Ab	23,28Bb
<i>Micromellum tephrocarpa</i>	25,82Ab	23,65Ab
<i>S. buxifolia</i>	25,45Ab	20,37Bc
<i>Microcitrus</i> spp.	23,93Ab	21,49Ab
<i>Merope</i> spp.	23,19Ab	23,23Ab
<i>F. margarita</i>	21,39Ab	21,12Ab
Lima ácida Galego	34,36Aa	23,44Bb
Lima da Pérsia	29,63Ab	28,83Aa
Laranja Pêra IAC2	24,84Ac	24,10Ab
Tangerina Ponkan	23,86Ac	18,21Ac
Pomelo <i>Marsh seedless</i>	22,56Ac	23,60Ab
Mexerica do Rio	20,69Ac	17,16Bc
Tangerina Cravo	19,40Ac	18,72Ac

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas e médias seguidas de letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste Scott-Knott.

que as tangerinas foram as espécies nas quais houve maior taxa de multiplicação da bactéria, com destaque para a Mexerica do Rio que apresentou concentrações três vezes maiores da bactéria que aquelas encontradas em tangerina Ponkan e Cravo. Em todas as plantas desses genótipos houve desenvolvimento de sintomas semelhantes a HLB, como cloroses setoriais ou generalizadas e sintomas de deficiência mineral (Zn e Mn). Na lima ácida Galego ocorreu também o desenvolvimento de sintomas diferenciados, como suberização e acentuada clorose de nervuras.

De maneira geral, os diferentes genótipos mantiveram a mesma concentração da bactéria (estimado através do Ct médio) aos 6 e 12 meses, exceto para a lima ácida Galego, Mexerica do Rio, eremolemon e *Severinia* onde houve um aumento da bactéria nesse período.

O sintoma típico de HLB em folhas, como mosqueamento (manchas de formas irregulares, verdes

claras ou amarelas) não foi observado em nenhum dos genótipos dentro do grupo do gênero *Citrus*, nem em plantas dos outros gêneros.

Nas comparações de desenvolvimento de sintomas, eficiência de transmissão por enxertia e da concentração estimada das bactérias *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* em plantas de laranjas Hamlin, Natal, Pêra e Valência foram observados que, apesar da alta concentração, folhas com mosqueamento e deficiência nutricional estavam ausentes, ou em número reduzido, em plantas inoculadas com a espécie asiática, dificultando o correto diagnóstico do HLB (Lopes et al., 2009). Como os sintomas da doença assemelham-se àqueles desenvolvidos por deficiência nutricional, o diagnóstico do padrão foliar pode não ser conclusivo. No entanto, as folhas apresentando tais sintomas podem ser boa opção para diagnóstico molecular da bactéria, principalmente na ausência de folhas com mosqueamento (Teixeira et al., 2008).

Desse modo foi possível confirmar que a multiplicação da bactéria é uma característica contrastante entre as espécies de citros e gêneros próximos, sendo reduzida em lima da Pérsia, *Poncirus* e *Atalantia*, sugerindo que essas espécies possam apresentar maior tolerância à bactéria do HLB. No entanto, não parece haver resistência genética à infecção de *Ca. Liberibacter* spp. dentro do grupo citros e gêneros afins. Observa-se, de modo geral, uma alta suscetibilidade em todas as variedades comerciais, sendo capazes de multiplicar a bactéria a altas taxas e com desenvolvimento de sintomas típicos da doença, mesmo em condições de casa de vegetação. Os dados obtidos referem-se à avaliação após enxertia com borbulhas infectadas, o que não corresponde ao patossistema em condições naturais, onde a transmissão pelo vetor é a forma predominante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carlos EF, Coletta-Filho HD, Targon MLPN & Machado MA (2006) Quantitative real time PCR based on Taqman probes to molecular detection of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" and "*Ca. L. americanus*". In: *Huanglongbing greening International Workshop*, Ribeirão Preto, p.81.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscariol-Camargo RL, Souza AA & Machado MA

- (2010) In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126(1): 53-60.
- Coletta-Filho HD, Takita MA, Targon MLPN & 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.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Jr J, Do Amaral AM, Muller GW & Machado MA (2004) First report of the causal agent of *huanglongbing* (“*Candidatus Liberibacter asiaticus* in Brazil”). *Plant Disease* 88: 1382.
- Ferreira DF (2000) Sistemas de análises estatísticas para dados balanceados. UFLA/DEX/SISVAR, Lavras, 145p.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S & Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to *huanglongbing* (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99(12): 1346-1354.
- Garnier M, Danel N & Bové JM (1984) The greening organism is a Gram negative bacterium. *Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Riverside*, p. 115-124.
- Halbert SE & Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-353.
- 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.
- Hung TH, Wu ML & Su HJ (2000) Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *Journal of Phytopathology* 148: 321-326.
- Jagoueix S, Bové JM & Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 379-386.
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes NG & Cambra M (2009) Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. *Phytopathology* 99(3): 301-306.
- 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): 287-389.
- Murray M & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- 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.
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ & Bove JM (2008) 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* 22: 139–150.
- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Danet L, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2005a) 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* 89:107.
- Teixeira DC, Saillard C, Ayres AJ, Eveillard S, Danet JL, Costa PI & Bové J (2005b) ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus *huanglongbing* (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1857-1862.