

Ferramentas para diagnóstico de *huanglongbing* e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório

Helvécio Della Coletta Filho^{1*} & Eduardo Fermino Carlos²

RESUMO

Os sintomas associados ao *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) em plantas cítricas embora bastante conhecidos e muitas vezes inconfundíveis, em determinadas situações podem levar a enormes dúvidas. Neste sentido, métodos de diagnóstico, sejam eles baseados na reação da planta ou no agente intrinsecamente associado, se fazem necessários. Nesta revisão procurou-se apresentar uma compilação dos trabalhos disponíveis na literatura e relacionados ao diagnóstico de HLB ou detecção de seus agentes associados, as bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. Uma ampla listagem das sequências de iniciadores (*primers*) utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e disponíveis na literatura estão apresentados, bem como a caracterização visual dos sintomas da doença.

Termos de indexação: *greening*, *Candidatus Liberibacter* spp., citros, HLB, diagnose.

SUMMARY

Diagnosis of *huanglongbing* and detection of associated agents: from disease symptoms to laboratory tools

Symptoms associated with HLB (*huanglongbing*) in citrus plants, although well known and distinguishable in many cases, can under certain circumstances induce doubts on recognition of diseased trees. For this reason, diagnostic methods based either on the reaction of the plant or on the identification of the associated pathogen are necessary. In this review, we present a collection of publications related to HLB diagnostic and detection of its associated causal agents, the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. A list of primers used in PCR (Polymerase Chain Reaction) is made available, as well as the characterization of visual symptoms of the disease.

Index terms: *greening*, *Candidatus Liberibacter* spp., citrus, HLB, diagnosis.

¹Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Rod. Anhanguera, km 158, Caixa Postal 4, 13490-000 Cordeirópolis-SP

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

²Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, Londrina-PR

INTRODUÇÃO

Inicialmente, para qualquer anomalia que venha a ser observada em humanos, animais ou plantas, a conclusão sobre sua causa, seja ela de origem biótica ou abiótica, é precedida de prognósticos com objetivo de se chegar ao diagnóstico final, este, na grande maioria das vezes, suportados por exames laboratoriais. Para este diagnóstico inicial, pelo menos um dos cinco sentidos do ser humano, audição, tato, paladar, olfato ou visão, são utilizados. Logicamente que o paladar é um dos sentidos pouco empregados, assim como quando se trata de plantas a utilização de estetoscópio, otoscópios e outros aparelhos médicos não fazem sentido. Especificamente no caso de plantas, exames visuais e raramente de tato são os mais utilizados para se inferir sobre uma anomalia ocorrente. Tomando-se como exemplo o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, a ocorrência de lesões corticosas correspondentes nas duas faces do limbo foliar, circundadas por uma halo claro, normalmente amarelecido, geram lesões necessariamente salientes. Estas descrições de sintomas envolvem exames visuais (halos amarelecidos, lesões corticosas) e de tato (lesões salientes) que na grande maioria das vezes são decorrentes exclusivamente da doença denominada cancro cítrico (para maiores descrições dos sintomas acessar o endereço eletrônico <http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/>). Se ainda houver dúvidas quanto a especificidade destes sintomas, a bactéria pode ser facilmente isolada de tecidos doentes dentro de no máximo quatro dias e até reinoculada em plantas sadias para a reprodução dos sintomas que se tornam visíveis ao redor de cinco a sete dias em condições ótimas de temperatura e umidade (Amaral, 2003). Porém, a situação é bastante diferente quando a doença não tem sintomas iniciais específicos, e os mesmos só se tornam visíveis meses após a infecção, e seu agente causal não pode ser isolado e crescido em meio de cultura artificial. Essas são características inerentes ao *huanglongbing* (HLB) ou *greening* dos citros.

O nome *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) é a denominação oficial da doença, e será adotada neste trabalho pelo fato de ser cientificamente acordada. Portanto, o foco desta revisão será discutir sobre ferramentas e procedimentos de diagnóstico para *Candidatus Liberibacter* spp., bactéria associada ao HLB.

ETIOLOGIA DO HLB

Embora não seja o escopo desta revisão e sendo este assunto já abordado em outro trabalho desta edição, vamos aqui relatar brevemente os agentes associados a esta doença, suportados por fortes evidências circunstanciais, para que o leitor melhor se situe na sequência desta revisão. São conhecidas três formas diferentes de HLB: as formas africana, asiática e americana, onde três diferentes espécies de bactérias estão associadas a esta doença; *Ca. L. africanus* (Laf), *Ca. L. asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam). A não ser pela agressividade, onde a forma asiática mostra-se mais dominante que as formas africana e americana, sintomatologicamente não há como distingui-las acertadamente, o que só pode ser feito através de análises laboratoriais baseadas nos respectivos agentes associados. Maiores detalhes sobre cada variante e as respectivas publicações podem vistas em Bové (2006).

FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO

Didaticamente o diagnóstico de HLB pode ser feito com foco no hospedeiro (indicadores biológicos seguidos de observações sintomatológicas e indicadores bioquímicos) ou no agente causal (testes moleculares e serológicos, observações microscópicas). Nesta revisão vamos abordar todas estas possibilidades, dando maior ênfase aos testes moleculares uma vez que atualmente são os mais difundidos.

DIAGNÓSTICO COM BASE NO HOSPEDEIRO

Sem dúvida que observações visuais em busca de sintomas característicos da doença são o modo mais prático, barato, rápido, e conveniente para a diagnose de HLB e de qualquer outra doença, especialmente em condições de campo. A dificuldade nesses casos normalmente está relacionada ao grau de confiança geral no processo, pois o resultado é dependente da experiência do observador.

Os sintomas de HLB são percepções visuais das respostas fisiológicas das plantas afetadas, e se manifestam no limbo foliar, na brotação de ramos, no crescimento e amadurecimento dos frutos e no próprio desenvolvimento geral da planta. Em plantas doentes, o floema e o sistema fotossintético são afetados, desencadeando inúmeras alterações na planta.

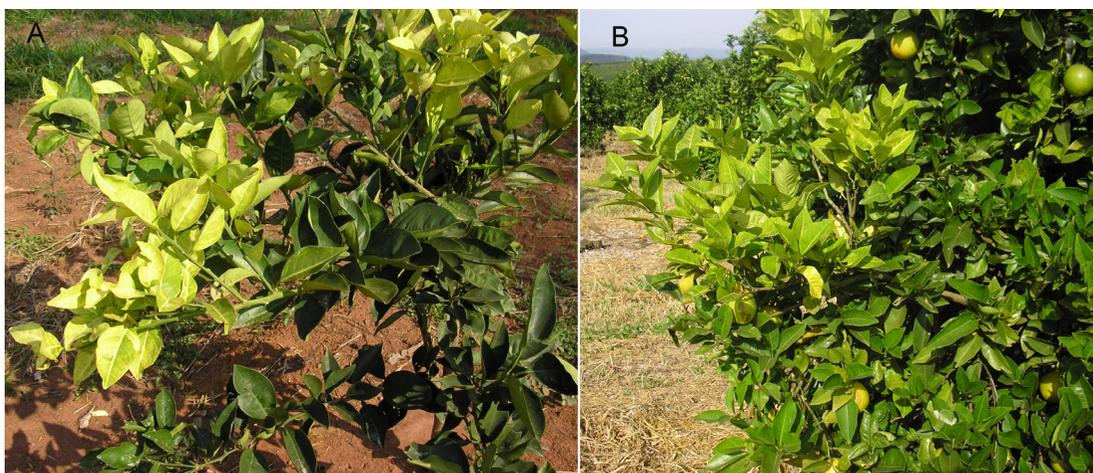


Figura 1. Sintomas gerais de *huanglongbing*: A) amarelecimento geral do ramo doente, B) contraste entre o verde normal dos ramos sem sintomas e o amarelo pálido dos ramos com ponteiros sintomáticos.

Em brotações novas, é muito comum um amarelecimento geral do ramo doente (Figura 1A). Entretanto, esse sintoma de clorose generalizada nos ponteiros não é específico para o HLB. Outros problemas também podem causar os mesmos sintomas, e portanto, esses ramos não devem ser usados isoladamente em diagnósticos visuais. Uma característica interessante desses ramos amarelados é que eles tendem a chamar muita atenção do observador (inspetor de campo). O contraste entre o verde normal dos ramos sem sintomas e o amarelo pálido dos ramos com ponteiros sintomáticos é muito notório mesmo à grande distância (Figura 1B). Isso pode levar o inspetor de campo a analisar essa planta suspeita com muito mais atenção, em busca de outros sinais da doença.

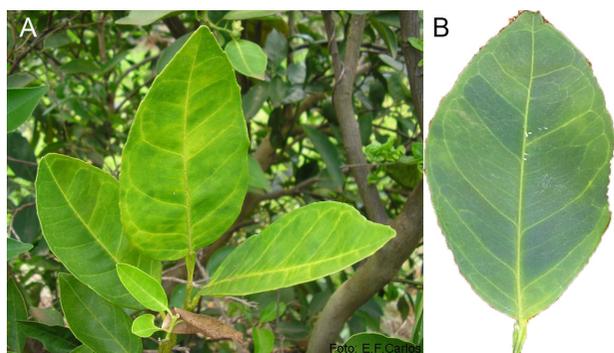


Figura 2. Detalhes de sintomas de *huanglongbing*: A) sintomas de HLB em folhas maduras dentro da copa. B) cloroses assimétricas típicas no limbo foliar, normalmente delimitadas entre as nervuras secundárias do limbo foliar de laranjeiras doce.

A ocorrência desses ramos amarelados em brotações novas é comum, mas não é obrigatória. Em muitos casos, os sintomas ocorrem dentro da copa, em brotações onde os ramos já estão maduros (Figura 2A). Nesses casos, encontrar o ramo sintomático é normalmente mais difícil, entretanto reconhecer os sintomas pode ser mais fácil, pelas características dos sinais nas folhas maduras. Essas mostram cloroses assimétricas no limbo foliar, como descrito em Bové (2006), Carlos (2007) e em outras revisões. Essas cloroses estão normalmente delimitadas entre as nervuras secundárias do limbo foliar e são bastante típicas para o reconhecimento de HLB no Brasil em laranjeiras doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (Figura 2B). Na Turquia e Estados Unidos (Califórnia) sintoma muito semelhante causado por outra doença denominada de enfezamento (*stubborn*) também causa cloroses assimétricas nas folhas. Mas no Brasil ainda não existem relatos dessa doença e, portanto, a avaliação em folhas maduras em busca de cloroses assimétricas é obrigatória no diagnóstico visual de HLB. É preciso entretanto ficar atento ao fato de que essas cloroses assimétricas são muito típicas em laranjeiras doce (*C. sinensis*), e em menor intensidade em outros citros, como tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) e outros. No caso específico da lima ácida Tahiti [*C. latifolia* (Yu.) Tanaka], que é suscetível ao HLB como qualquer outro citros comercial, esse critério (ocorrência de cloroses assimétricas) não deve ser usado isoladamente, pois Tahiti pode conter viróides, e outros problemas, que

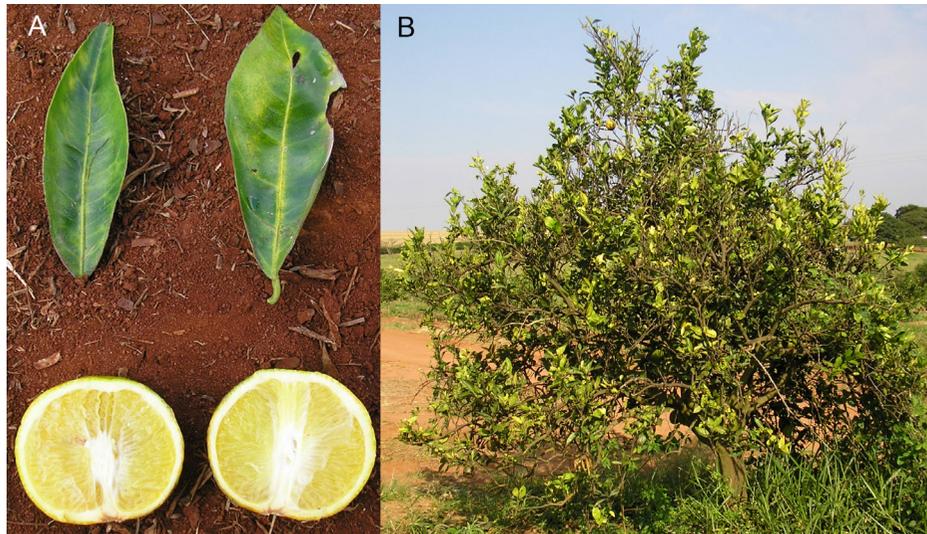


Figura 3. Sintomas de *huanglongbing*: A) frutos deformados, com necroses amarelo-escuro no albedo, e normalmente com a maioria das sementes abortadas, B) caso severo de HLB, planta com um menor desenvolvimento, seca de ponteiros, desfolhamento e queda de frutos.

também induzem sintomas praticamente idênticos aos do HLB em folhas, necessitando nesses casos de análises moleculares para o diagnóstico.

O HLB também induz alterações no crescimento e no amadurecimento dos frutos. Plantas com a doença possuem ramos sintomáticos que geram frutos deformados, com necroses amarelo-escuro no albedo, e normalmente com a maioria das sementes abortadas (Figura 3A). Plantas afetadas mostram manchas esverdeadas nos frutos, e isso é bem evidente na África do Sul (o que gerou o nome *greening*). Vale ressaltar também que na mesma planta afetada pode haver frutos e folhas sem sintomas em determinados ramos e sintomáticos em outros ramos. Em casos severos, toda a planta mostra sinais da doença (Figura 3B), que passa a apresentar um menor desenvolvimento geral em relação às sadias, além do aparecimento de seca de ponteiros, desfolhamento e queda de frutos.

O uso de indicadores biológicos (plantas) foi o primeiro teste de diagnóstico desenvolvido para HLB. Neste caso, materiais de plantas suspeitas são enxertados em plantas indicadoras suscetíveis, sendo as laranjas doce as preferidas (McClellan & Oberholzer, 1965) e recomendadas por apresentarem os sintomas mais característicos da doença (Folimonova et al., 2009). Outras espécies cítricas como tangerina Ponkan e tangelo Orlando (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.)

também são recomendadas como indicadores do HLB para indexação biológica (da Graça, 1991). A inoculação deverá ser preferivelmente feita com borbulha ou com um fragmento de 2 a 3 cm de ramo cortado longitudinalmente ao meio, sempre retirados de ramos com suspeita da doença da planta a ser indexada. Mesmo retirando-se materiais de ramos suspeitos os resultados de transmissão podem ser variáveis sendo dependentes da espécie de *Liberibacter* (Las é mais facilmente transmitida que Lam e Laf) (Schwarz, 1970; Lopes & Frare, 2008; Coletta-Filho et al., 2010) e das condições ambientais (Las é mais tolerante a altas temperaturas que Laf e Lam (Bové et al., 1974; Lopes et al., 2009). Portanto, para que a eficiência de transmissão seja satisfatória, as mesmas devem ser feitas em condições de temperatura não superior a 30°C para Las e preferencialmente não superior a 24°C para Lam e Laf, assim como a manutenção das plantas devem obedecer às temperaturas acima mencionadas.

Outra espécie de planta fora do gênero *Citrus* que pode ser utilizada como indicador biológico é a vinca ou boa-noite (*Catharanthus roseus* L.) (Garnier & Bové, 1983; Ke et al., 1988). A transmissão da planta suspeita (citros) para a indicadora (vinca) é feita através de uma planta parasita conhecida como cuscuta (*Cuscuta* sp.). Após estabelecida, os ‘fios’ da cuscuta devem ficar ligando a planta doadora com a receptora

pelo menos por 6 semanas, sendo então retirado da planta receptora para que o parasitismo da cuscuta não prejudique a planta teste. O grande inconveniente de se utilizar a vinca como indicadora para HLB é a não especificidade dos sintomas. A presença de zonas cloróticas entre as nervuras do limbo foliar, o amarelecimento e o estreitamento do limbo foliar, o encurtamento de internódios, e o ramo apical com fluxo de crescimento reduzido podem ser confundidos com os sintomas descritos para *Xylella fastidiosa* (Monteiro et al., 2001) infectando vinca.

O ácido gentísico (AG) é um composto fenólico presente naturalmente em baixas concentrações em plantas, mas que ocorrem em concentrações elevadas quando as plantas ou ramos destas estão acometidos de algum tipo de doença. Schwarz (1965) relatou a ocorrência de um composto fluorescente azul-violeta em extratos de plantas com HLB visualizado em cromatografia de papel. Posteriormente, este composto fluorescente foi identificado como ester glicose de GA (Feldman & Hanks, 1969) e então sendo consistentemente encontrado em altas concentrações em extratos de albedo de laranjas doce com sintomas de HLB, mas também em amostras de plantas de laranjas doce com *stubborn* (Schwarz, 1968). Apesar de consistente em laranjas doce, este marcador é menos consistente em tangerinas, limões [*C. limonia* (L.) Burm. f.] e pomelos (*C. paradisi*) em que plantas sintomáticas para a doença apresentaram baixos valores de GA, sendo portanto consideradas negativas (McClean et al., 1969). Menos desejável ainda para diagnóstico, estes marcadores apresentam reações inespecíficas em que plantas não infectadas ou infectadas com outros patógenos, como o *Citrus Tristeza Virus* (CTV), apresentaram altos valores de GA, ou seja, geram resultados positivos, inviabilizando seu uso como ferramenta de diagnóstico (Hooker et al., 1993).

Schneider (1968) observou que em folhas de laranjeira doce sintomáticas para HLB há um acúmulo de grânulos de amido, chegando a ser 6 vezes maior quando comparado a plantas sadias (Tetsuya, et al., 2007). Amido reage rapidamente com iodo resultando em uma coloração verde-escura a preta. Assim, pesquisadores principalmente do Japão vêm tentando adaptar esta reação iodo – amido como ferramenta de diagnose para HLB, sendo relatado até 90% de

concordância dos resultados entre os diagnósticos feitos por PCR e coloração como iodo, sem reações inespecíficas quando as plantas estão sob qualquer outro estresse (Onuki et al., 2002, Tetsuya, et al., 2007). No entanto esta técnica não é normalmente aceita em revistas com maior crivo editorial, e transcrevendo Wang et al. (2009), ‘este teste de iodo é somente um pouco melhor que a observação visual dos sintomas’.

DIAGNÓSTICO COM BASE NO AGENTE CAUSAL

Para superar as limitações dos testes de diagnose baseados no hospedeiro como a pluralidade e sazonalidade de sintomas e a ausência de marcadores bioquímicos específicos, vários métodos de detecção do agente causal foram e vem sendo desenvolvidos. Excelentes revisões abordando este assunto podem ser consultadas em Bové (2006) e Wang et al (2009).

A primeira observação de *mycoplasma like-organism* (como era denominado *Ca. Liberibacter* spp.) em floema de tecidos de citros infectados com HLB foi feita em 1970 através de microscopia eletrônica realizadas por Lafleche & Bové (1970). Seguiram-se outros trabalhos em que através de microscopia eletrônica o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. J.M. Bové confirmou a presença de *Ca. Liberibacter* em vários países dos continentes Africano e Asiático, inclusive na península Arábica (Bové, 2006). Mais recentemente a microscopia eletrônica foi utilizada como ferramenta adicional para confirmar a presença de Lam em tecidos de vinca (Tanaka et al., 2007) e de um outro patógeno (bactérias conhecidas como fitoplasma) encontrado em plantas com sintomas de HLB (Teixeira et al., 2008). Como ferramenta de diagnóstico a microscopia eletrônica tem se mostrado bastante trabalhosa, demandando muito tempo no preparo de amostras, e, devido à distribuição errática e baixa concentração de *Liberibacter* na planta, frequentemente muitas preparações do tecido infectado necessitam ser feitas para se visualizar uma única célula bacteriana.

A utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais para detecção de fitopatógenos tem sido amplamente utilizada para uma ampla gama de patógenos e seus hospedeiros, devido ao seu baixo custo e rapidez na execução dos testes. Não sendo

necessariamente impeditivo, mas o cultivo do patógeno em meio de cultura artificial é requerido para se produzir bons anticorpos. Porém, ainda não é dominado o cultivo das espécies de *Liberibacter* associados ao HLB o que tem limitado a obtenção de bons anticorpos e vários outros estudos. Utilizando extratos de floema de plantas de vinca infectadas com diferentes fontes de *Liberibacter*, Garnier e colaboradores (Garnier et al., 1991; Gao et al., 1993) desenvolveram anticorpos monoclonais contra os isolados de *Liberibacter* obtidos da África, China e Índia. Estes anticorpos reconheceram apenas o isolado do qual o mesmo foi obtido, sendo, portanto, altamente específico para ser utilizado em diagnóstico geral para HLB, ou seja poderia gerar resultados falsos negativos. Mais recentemente, com a disponibilidade do sequenciamento completo de Las (Duan et al., 2009) ampliou-se a possibilidade de se obter regiões genômicas potenciais para síntese de peptídeos ou expressão homólogos de proteínas para serem utilizadas na produção de anticorpos.

Em busca de alternativas para o diagnóstico de HLB, no início de 1990 o grupo de pesquisadores do INRA (Bordeaux, França), liderados por J.M. Bové e M. Garnier começaram a trabalhar buscando sequências genômicas de *Liberibacter* para utilização como alvos para sondas (hibridização) ou para desenho de iniciadores (*primers*) a serem utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR havia sido então recém descoberta por Mullis & Faloona (1987), iniciando-se uma nova fase na identificação e diagnóstico de patógenos, principalmente os não cultiváveis como *Liberibacter*, além é claro, de uma vasta área de pesquisa na biologia molecular. Usando plantas de vinca infectadas com Las, Villechanoux et al., (1992) obtiveram por clonagem randômica um fragmento de 2.6 kbp (kilo-pares de base) que quando usado como sonda (In-2.6) em Southern Blot, ou dot-hibridização sob condições de alta temperatura (estringência) reconheceu Las em tecido de planta infectada, assim como Laf quando usado em temperatura de estringência menor. Com o sequenciamento, este fragmento foi identificado como um cluster de genes *rp1KAJL-rpoBC*, que codificam para as proteínas ribossomais K, A, J, e L, e para as subunidades beta da RNA polimerase (Villechanoux et al., 1993). Embora posteriormente Hocquellet et al. (1997) tenham produzido sondas não radioativas para

detecção de Las (In 2.6) e Laf (AS 1.7), a sensibilidade destas em ensaios de hibridização foi baixa, similar às observações em microscopia eletrônica, portanto não recomendadas para testes de diagnóstico em larga escala. No entanto, o grupo de pesquisa acima mencionado dispunha das sequências genômicas parciais de alguns genes de Las e Laf (Villechanoux et al., 1993) e nessa época a PCR como ferramenta de multiplicação *in vitro* do DNA já estava consolidada, iniciando-se então a fase de diagnóstico de *Liberibacter* através da PCR.

A PCR COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO DE LIBERIBACTER DE CITROS

PCR convencional

A utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico para patógenos de plantas, seus princípios metodológicos, vantagens e desvantagens, assim como a detecção dos produtos da PCR foi objeto de várias revisões (Henson & French, 1993; Louws et al., 1999; Schaad & Frederick, 2002). Esta revisão terá como foco os trabalhos relacionados à detecção de *Ca. Liberibacter* associadas ao HLB que utilizaram da PCR e suas derivativas como ferramenta de diagnóstico. Todas as informações sobre a origem e a sequência dos *primers*, tamanho do fragmento gerado, especificidade, entre outras estão na Tabela 1.

O primeiro conjunto de *primer* desenvolvido para diagnóstico de *Liberibacter* foi baseado na região 16S do gene RNA ribossomal - rRNA (Jagoueix et al., 1996). Os *primers* OI1/OI2c amplificam Las e Laf gerando um produto de 1160 pb, enquanto que os *primers* OI2c/OA1 amplificam um fragmento de 1500 pb específico para Laf. No caso do fragmento de 1160 pb, a distinção entre Las e Laf é dada pela digestão enzimática através da enzima *XbaI*, em que dois fragmentos (640 pb e 520 pb) são característicos de Las e três (520pb, 506 pb e 130 pb) resultam de amostras infectadas com Laf.

Paralelamente, Tian et al. (1996) desenvolveram um par de *primers* (OL1/OL2) que amplifica um fragmento de 563 pb do gene 16S rRNA de Las, o que tornou desnecessário a digestão com enzima de restrição para distinguir Las e Laf, que além de demandar tempo, onera o custo do diagnóstico. A estes seguiram-se outros

Tabela 1. Primers encontrados na literatura para diagnóstico de *Ca*. *Liberibacter* spp. dos citros através de PCR convencional

Primer	Sequência 5'-3'	Fragmento (pb)	Especificidade ¹	Referência
O11	GCGCGTATCCAATAACGAGCGGCA	1160	Las e Laf ²	Jagueix et al., 1996
O12c	GCCTCGGACTTCGCAACCCAT			
O12c	GCCTCGGACTTCGCAACCCAT	1500	Laf	Jagueix et al., 1996
OA1	GCGCGTATTTTATACGAGCGGCA			
OL1	TCTGTTTTCTTCGAGGTTGGTGAG	563	Las	Tian et al., 1996
OL2	ACCGCAAAGACTCCTTACCAGGAAG			
A2	TATAAAGGTTGACCTTTTCGAGTTT	703	Las	Hocquellet et al., 1999
J5	ACAAAAGCAGAAAATAGCACGAAACAA	669	Laf	
Las 266_F	CACCGAAGATATGGACAACA	226	Las	Hung et al., 1999
Las 266_R	GAGGTTCTTGTGGTTTTTCTG			
GB1	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	1027	Lam	Teixeira et al., 2005
GB3	CCAACTTAATGATGGCAAATATAG			
LSg2f	TTAAGTTAGAGGTGAAATCC			
LSg2r	CAACTTAATGATGGCAAATA	545	Lam	Coletta-Filho et al., 2005
rp1-FIP	GCAATGCCGAGGATCAATGCCTTGCTTAAAGAGCGGTGCTACG	LAMP ³	Las	Okuda et al., 2005
rp1-BIP	TATGCCTAATGGCACGGGGTAAGCTTTCATCCGCCCTTCGA			

¹Las - *Ca*. *L. asiaticus*, Laf - *Ca*. *L. africanus*, e Lam - *Ca*. *L. americanus*

²Las e Laf são genotipados através de digestão enzimática com *Xba*I. Vide texto para maiores detalhes

³LAMP - Loop-mediated isothermal amplification (para maiores detalhes ver texto).

trabalhos onde *primers* específicos para Las e Laf, para serem utilizados em PCR convencional, foram desenvolvidos. Hocquellet et al (1999) estabeleceram um protocolo para diagnóstico de *Liberibacter* a partir das sequências do operon *rpIKAJL-rpoBC*, em que os *primers* A2 e J5 amplificaram um fragmento de 703 pb para Las e 669 pb para Laf. Ainda em 1999, Hung e colaboradores desenvolveram um outro par de *primer* (226-*primer pair*) específico para Las e que amplifica um fragmento de 226 pb do 16S rRNA desta bactéria.

Até então, por volta de 2004, relatos de HLB estavam restritos aos continentes Asiático e Africano, península Arábica e Oceania, com ocorrência das espécies asiática e africana de *Liberibacter*. Porém, a partir de 2004, o HLB foi relatado na América, primeiramente no estado de São Paulo (Brasil), com a descrição de uma nova espécie de *Liberibacter* associada (*Ca. Liberibacter americanus*), inicialmente diagnosticada pelos *primers* GB1/GB3 (Teixeira et al., 2005) e posteriormente confirmada por Coletta-Filho et al. (2005) pelos *primers* LSg2f/LSg2r. Ambos os conjuntos de *primers* têm como alvo sequenciar o gene 16S rRNA da bactéria, assim como a grande maioria dos demais descritos para Las ou Laf, presentes na Tabela 1, com exceção do A2 e J5.

Um outro método similar ao PCR convencional foi empregado por Okuda et al. (2005) para diagnóstico de Las, utilizando-se de *primers* desenhados para reconhecer o *cluster* de genes *nusG-rpIKAJL-rpoB* (Tabela 1). Porém ao invés de utilizarem a enzima *taq* DNA polimerase e alternâncias de temperatura para a replicar *in vitro* o DNA alvo, estes autores utilizaram a *Bst* DNA polimerase, uma enzima que replica *in vitro* o DNA em condições isotérmicas (65°C / 1 hora), após desnaturação a 95°C. Este método é conhecido como *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) e, segundo aqueles autores, este método apresentou sensibilidade semelhante à PCR convencional para diagnóstico de Las.

Comparado a outros testes de diagnóstico acima descrito, a PCR tem como característica as maiores especificidade e a sensibilidade. Porém, muitas vezes somente a PCR, aqui denominada de PCR convencional, não é suficientemente sensível para diagnosticar a presença de *Liberibacter* nos hospedeiros (plantas e psilídeo), principalmente no início da infecção.

Nested-PCR (N-PCR)

É geralmente aceito que a *Nested-PCR* (N-PCR) tem maior especificidade, dada pelo uso de dois conjunto de *primers* e sensibilidade (aumento do número de cópias do DNA molde na primeira etapa de amplificação), que a PCR convencional. Em geral, tem sido amplamente utilizado em diagnósticos de fitopatógenos com baixa população nas plantas, como algumas espécies ou estirpes de vírus e fitoplasmas, por exemplo. O princípio da N-PCR é gerar através de *primers* externos da primeira amplificação um número de moléculas que possam servir como alvo para os *primers* num segundo ciclo de amplificação (Figura 4).

Os primeiros *primers* desenhados para N-PCR para diagnóstico de *Liberibacter* mostraram um

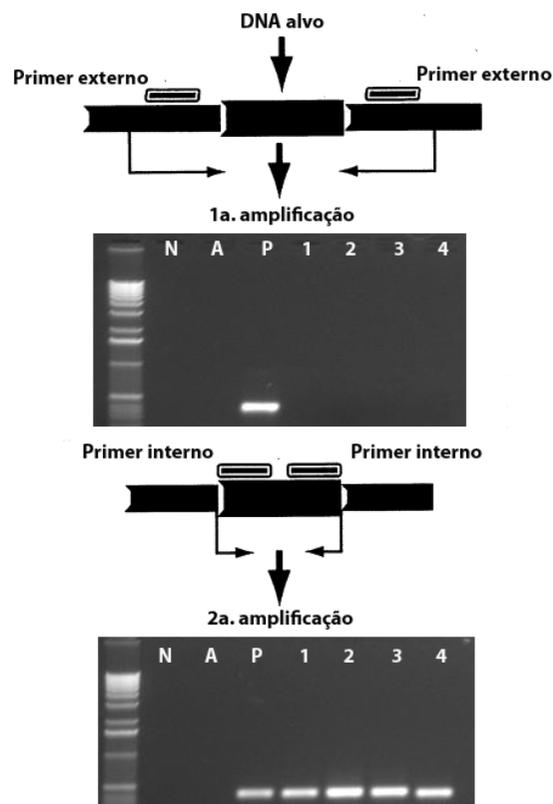


Figura 4. Esquema ilustrativo da N-PCR: os *primers* externos são usados num primeiro ciclo de amplificação, e os internos num segundo ciclo, de onde normalmente pode-se visualizar em gel de agarose os produtos amplificados. N= controle negativo, A= água autoclavada, P= controle positivo, 1 a 4 = amostras com baixa concentração do DNA alvo.

Tabela 2. *Primers* encontrados na literatura para diagnóstico de *Ca. Liberibacter* spp. dos citros através de N-PCR

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Fragmento (pb)	Especificidade ¹	Referência
CN265	TGGGTGGTTTACCATTCAGT	448	Las e Laf ²	Harakawa et al., 2000
CN266	CGCGACTTC GCAACCCAT			
Las-I-F	CGATTGGTGTCTTTGTAGCG	170	Las	Lin et al., 2010
Las-I-R	AACAATAGAAGGATCAAGCATCT			
Las-O-F	CGGTGAATGTATTAAGCTGAGGCGTTCC	470	Las	Lin et al., 2010
Las-O-R	ACCCACAACAAAATGAGATACACCAACAACCTC			

¹Las - *Ca. L. asiaticus*, Laf - *Ca. L. africanus*, e Lam - *Ca. L. americanus*

²Las e Laf são genotipados através de digestão enzimática com *Xba*I. Vide texto para maiores detalhes.

aumento significativo na sensibilidade da detecção de Las e Laf (Harakawa et al., 2000). Na primeira amplificação estes autores utilizaram a combinação dos *primers* OI1/OI2c/OA1 (vide Tabela 1) seguindo-se a amplificação com os *primers* CN265 e CN266 (Tabela 2), com a diferenciação entre as espécies de *Liberibacter* através de digestão enzimática do produto da PCR pela enzimas de restrição *Xba*I. Uma outra estratégia para N-PCR é utilizar-se de *primers* (fD1/rD1) conhecidos como universais para o gene 16S rRNA da grande maioria das espécies de bactérias (Weisburg et al, 1991) para a primeira amplificação, seguindo-se de *primers* já conhecidos e específicos para o gene 16S rRNA de *Ca. Liberibacter*, na segunda amplificação. Adotando esta estratégia Deng et al. (2007) observaram a presença de Las em uma espécie de planta nativa na Ásia (*Clausena lansium* Skeels), o que não foi possível através da PCR convencional devido à baixa concentração da bactéria naquelas amostras.

Seguindo-se a mesma estratégia, Teixeira et al. (2008) utilizaram os *primers* bactéria-universais fD1/rD1 na primeira amplificação seguindo-se a segunda amplificação com os *primers* GB1/GB3 específicos para Lam (vide Tabela 1). Segundo estes autores a N-PCR apresentou uma sensibilidade semelhante à estimada para a PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), técnica que será discutida posteriormente, sendo ambas 1000 vezes mais sensível que a PCR convencional.

Ainda abordando a N-PCR como ferramenta de diagnóstico para *Liberibacter*, Benyon et al. (2008) desenvolveram *primers* para N-PCR baseados em três regiões genômicas de Las (16S rDNA, *beta-operon* e *outer membrane protein-OMP*). Embora os autores não tenham publicado as sequências destes *primers*,

afirmaram que independente do gene de origem, o conjunto de *primers* propiciou detecções 20–30% superiores às obtidas por RT-qPCR em amostras de psilídeos obtidas de campo. Esta maior sensibilidade proporcionada pelo N-PCR também a torna mais suscetível a ocorrência de falsos positivos, ou seja, contaminações. Isto se deve ao fato da N-PCR ser composta de duas etapas em que uma alíquota do produto da primeira amplificação é usado como alvo (*template*) para a segunda reação, processo conhecido como N-PCR em dois tubos.

Uma das maneiras para minimizar este problema é realizar a N-PCR em apenas um único tubo, onde os *primers* para a primeira e segunda amplificação estão juntos e o tubo será aberto somente no final do processo. Pensando nisto Lin et al. (2010) publicaram a sequência de dois conjunto de *primers* para N-PCR para serem utilizados em um único tubo (Tabela 2), que, quando usados em associação com PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), proporcionaram amplificações semelhantes a N-PCR convencional, ou seja, N-PCR em dois tubos.

PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A RT-qPCR como ferramenta de quantificação de DNA foi primeiramente descrita por Heid et al., (1996). Resumidamente, o método utiliza-se da atividade nucleásica da *Taq* polimerase na região terminal 5' para a clivagem de uma sonda hibridizada ao DNA alvo durante a fase de extensão da PCR. A sonda é marcada com dois corantes fluorescentes, um que emite (*reporter*) e outro que capta (*quencher*) a fluorescência (energia), liberando-a somente quando a

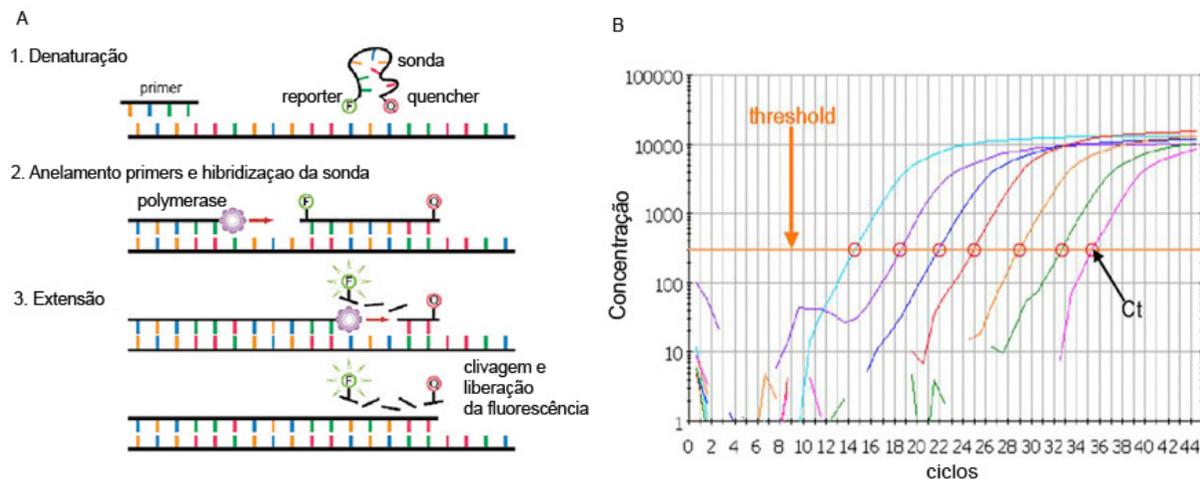


Figura 5. Esquema ilustrativo da PCR quantitativa em tempo real baseada no sistema TaqMan®Superscript: A) ilustração da liberação da emissão de fluorescência pelo *reporter* após clivagem pela Taq-DNA polimerase durante a PCR, B) ilustração do conceito Ct (*cycle threshold*). Para maiores detalhes consultar o texto.

sonda é clivada durante a extensão da PCR, ou seja, quando houver anelamento dos *primers* e sondas ao DNA alvo. Neste caso a fluorescência é captada por um detector, quantificando-a. Se não houver amplificação, não há clivagem da sonda e a fluorescência do *reporter* fica presa ao *quencher* (Figura 5), que a dissipa sob outra forma não quantificável para o sistema. Este sistema que utiliza-se de *primers* e sondas é conhecido como TaqMan® sendo que o primeiro equipamento para detecção através deste sistema foi desenvolvido pela Applied Biosystems - ABI (<http://www.appliedbiosystems.com>). A este sistema e equipamentos seguiram-se outros, tendo uma ampla revisão no artigo de Schaad & Frederick (2002). Estes autores ressaltam que para fins de diagnóstico o sistema TaqMan® seria o mais recomendado por apresentar maior especificidade, uma vez que além do anelamento dos *primers* há a necessidade da hibridização da sonda ao DNA molde para que ocorra a PCR. Independente do sistema a ser adotado o resultado final do RT-qPCR é expresso em valores de Ct (*threshold cycle*), que representa o número de ciclos da PCR onde a emissão do fluoróforo *reporter* atinge um valor arbitrário (*threshold*), acima do qual as amostras são consideradas positivas.

O primeiro conjunto de *primers* e sondas para RT-qPCR, para *Liberibacter* de citros, foi descrito por Li et al. (2006). Utilizando-se do sistema TaqMan®

estes autores desenvolveram os conjuntos de *primers* (HLBas, HLBAf, HLBam e HLBr) e sonda (HLBp), específicos ao gene 16S rRNA das espécies Las, Laf e Lam de *Liberibacter*. Nestes conjuntos, as sequências do *primer* reverso (HLBr) e a da sonda (HLBp) foi comum para as três espécies de *Liberibacter*, sendo que a especificidade da PCR foi dada pelos *primers* direto (*forward*) (Tabela 3). Os *primers* HLBas, HLBr e sonda (HLBp) foram usados em trabalhos posteriores para estudos de quantificação, detecção e distribuição de Las em plantas (Li et al., 2007; Li et al., 2008; Tatineni et al., 2008; Li et al., 2009) e em psilídeos (Manjunath et al., 2008).

Neste mesmo período, e também utilizando-se do sistema TaqMan®, Wang et al. (2006) desenharam e validaram um conjunto de *primers* (CQULA04F/CQULA04R) e sonda (CQULAP10), baseado nos genes *rplJ* e *rplL* que codificam para a proteína ribossomal de Las (Tabela 3). Através deste sistema observaram que a população de Las na seiva do floema de plantas infectadas varia ao longo do ano, alcançando as maiores concentrações entre os meses de outubro a dezembro (outono) e as menores entre março e maio (primavera), para o Sul da China. Também usando o sistema TaqMan®, Carlos et al., (2006) disponibilizaram as sequências de *primers* e sondas para Las (As-84F/As-180R e As-111T), respectivamente *primers* e sonda, ambos conjuntos baseados na região 16S do

Tabela 3. *Primers* encontrados na literatura para diagnóstico de *Ca. Liberibacter* spp. dos citros através da RT-qPCR

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Fluorescência (<i>reporter</i> / <i>quencher</i>)	Especificidade ¹	Referência
HLBas	TCGAGCGCGTATGCAATACG		Las	Lin et al., 2006
HLBaf	CGAGCGCGTATTTTATACGAGCG		Laf	
HLBam	GAGCGAGTACGCAAGTACTAG		Lam	
HLBr	CTACCTTTTTCTACGGGATAACGCG			
HLBp	AGACGGGTGAGTAACGCG	FAM/BlackHole		
CQULA04R	CCAACGAAAAGATCAGATATTCCTCTA		Las	Wang et al., 2006
CQULA04F	TGGAGGTGTAAGGTTGCCAAA			
CQULAP10	ATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAG	FAM / TAMRA		
As-84F	TCACCGGCAGTCCCTATAAAGT		Las	Carlos et al., 2006
As-180R	GGGTTAAGTCCCGCAACGA			
As -111T	ACATCTAGGTAAAAACC	NED / MGB		
Las-I-F	CGATTGGTGTCTTGTAGCG		Las	Lin et al., 2010
Las-I-R	AACAATAGAAGGATCAAGCATCT			
Las-P	AATCACCGAAGGAGAAGCCAGCATTACA	FAM / MGB		
f-rplLas	CGCCCGTTTCCGTTGT		Las	Teixeira et al., 2008
r-rplLas	AGCCTCTTAAAGCCCTAAATCAG			
f-rplJAm	GGACAAGGGGATATTGGATAATGATG	SYBR Green		
r-rplJAm	ATTAAGAGTTCTAAGCAACCTGACAG		Lam	

¹Las - *Ca. L. asiaticus*, Laf - *Ca. L. africanus*, e Lam - *Ca. L. americanus*.

rRNA destas bactérias. Posteriormente Coletta-Filho et al. (2010), utilizando-se dos *primers* (As-84F/As-180R) e sondas (As-111T), estimaram que a taxa de multiplicação de Las em mudas inoculadas com borbulhas infectadas foi da ordem de 10.000 vezes num prazo de 200 dias. Os mesmos autores também determinaram que a população de Las em folhas com mosqueamento típico de HLB foi ao redor de 100 vezes maior que o observado em folhas nos sintomas iniciais da doença.

Mais recentemente Lin et al. (2010) desenvolveram um outro conjunto de *primers* (Las-I-F/Las-I-R) e sonda (Las-P) para Las, porém utilizando-se das sequências que codificam para o gene OMP. Estes autores mostraram que os *primers* e sondas com base no gene OMP apresentaram resultado semelhantes aos desenhados para amplificar o gene 16S rRNA (Li et al. 2006), com a vantagem de não ter como alvo uma

região genômica conservada como a 16S rRNA. Porém a multiplicidade de cópias deste gene, por exemplo Las tem 3 cópias no seu genoma (Duan et al., 2009), torna-a potencialmente mais sensível nos testes de diagnose.

Diferentemente dos trabalhos anteriores que utilizaram-se de TaqMan®, Teixeira e colaboradores (2008) utilizaram SYBR Green como fluoróforo para RT-qPCR na detecção e quantificação de Las e Lam. Os *primers* foram desenhados utilizando-se as sequências do cluster de genes rplKJL-rpoBC (β operon) de Las e Lam (Tabela 3). Utilizando-se deste sistema mostraram ser possível detectar, embora não frequentemente, até uma única bactéria num tubo de reação, resultado não obtido com a N-PCR para aquele ensaio. Wang et al. (2006) observaram também que o SYBR Green foi mais eficiente que o TaqMan® na detecção de *Liberibacter*, porém ressaltaram que a ausência da sonda no sistema SYBR Green pode levar a reações inespecíficas. Esse

sistema requer a realização da curva de dissociação para a validação dos resultados, especialmente quando a amplificação ocorre com valores altos de Ct, ou seja, em amostras contendo baixas concentrações do DNA alvo. No entanto, no sistema TaqMan® quando os valores de Ct são altos e próximos aos obtidos para os controles negativos, muitas vezes é necessário realizar as análises de componente dos fluoróforos para se tomar decisões mais coerentes quanto aos resultados.

COMENTÁRIOS GERAIS

Independentemente do método de diagnóstico baseado na PCR a ser adotado, além das preocupações dos ensaios propriamente dito, como especificidade de *primers* e sondas, utilização de controles negativos (DNA de plantas sabidamente saudáveis) e positivo (DNA de plantas sabidamente infectadas com o patógeno), assim como a qualidade do DNA a ser usado na PCR são de grande importância na acurácia e eficiência da amplificação. A utilização de extratos de plantas ou psilídeos não purificados, chamados de extratos crus (onde os tecidos destes hospedeiros são eluídos ou macerados em tampões, normalmente compostos por Tris, EDTA, SDS e proteinase K), diretamente na PCR tem levado a reações inconsistentes ou a uma baixa eficiência da PCR (Jagoueix et al., 1996).

A grande maioria dos trabalhos consultados para esta revisão adotaram a purificação do DNA através de protocolos convencionais conhecido como “método CTAB” (Murray & Thompson, 1980). Brevemente, após o tecido vegetal ser macerado em tampões ou triturado em nitrogênio líquido, a lise celular é feita com soluções contendo tampões, detergentes e sais, seguindo-se de extrações com clorofórmio: álcool isoamílico e precipitação do DNA com etanol. Outros trabalhos utilizaram-se de kits comerciais como Wizard (Promega) ou DNeasy (Qiagen) para purificação do DNA após maceração do tecido. Porém, independente do método de extração a ser adotado, o objetivo principal é obter DNA em quantidade e, principalmente, em qualidade adequadas a PCR, não carregando inibidores enzimáticos presentes em plantas e nas soluções de extração.

Em resumo, o diagnóstico de HLB somente baseado na sintomatologia pode levar a interpretações errôneas por avaliadores pouco experientes,

principalmente quando se trata de espécies cítricas que não as laranjas doce ou quando a infecção está no seu início. Também, os sintomas conhecidos como característicos irão se expressar somente muito tardiamente a infecção, o que poderá ser um desastre em locais (propriedades, estados ou países) onde a doença ainda não foi relatada.

Os métodos baseados na PCR hoje disponíveis tem sido usados com sucesso no diagnóstico de *Liberibacter*, sendo que os que se utilizam da N-PCR ou RT-qPCR, ou mesmo a combinação de ambos (Lin et al., 2010), tem se mostrado muito mais sensível que o PCR convencional. Preços comparativos entre as técnicas baseadas na PCR são bastante variáveis e dependem muito da qualidade dos reagentes utilizados na preparação do DNA e amplificações. Levando-se em consideração somente estes reagentes, de um modo geral, a razão entre os preços comparando-se PCR convencional, Nested PCR e PCR quantitativo em tempo real é da ordem de 1:2:5, respectivamente.

A grande maioria dos trabalhos hoje publicados tem como alvo uma estreita região genômica de *Liberibacter*, principalmente a 16S rRNA, β *operon* e DNA polimerase, as quais sendo conservadas entre as bactérias podem potencializar resultados falsos positivos. No entanto, com o sequenciamento de Las (Duan et al., 2009) e o com trabalhos intensificados em se obter novas sequências de Lam (Wulff et al., 2009) novos alvos para síntese de *primers* e sondas já estão, ou estarão disponíveis brevemente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à comissão editorial desta revista o convite para a redação deste artigo de revisão. H. D. Coletta-Filho é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral AM (2003) Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Comunicado Técnico 86, Embrapa, ISSN 0102-0099. Brasília, DF.
- Benyon L, Zhou L, Weathersbee A & Duan Y (2008) Nested PCR is essential for the detection of extremely low titer of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

- from citrus and its vector psyllid *Diaphorina citri*. *Phytopathology* 98, S21. (<http://www.apsnet.org/meetings/2008/abstracts/a08ma71.htm>).
- Bové JM (2006) *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.
- Bové JM, Calavan EC, Capoor SP, Cortez RE & Schwarz RE (1974) Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South African *greening*, Indian citrus decline and Philippines leaf mottling diseases. Proc. 6th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, p.12-15.
- Carlos EF (2007) *Greening*: um grande desafio para a citricultura brasileira. *Citricultura atual* 57:16-18.
- Carlos EF, Coletta-Filho HD, Targon MLPN & Machado MA (2006) Quantitative real time PCR base on TAQMAN probes to molecular detection of *Ca. Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. *Anais Huanglongbing-Greening International Workshop, Ribeirão Preto, SP, Brazil*, p.81.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscaroli-Camargo RL, Souza AA & Machado MA (2010) In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. *Eur J Plant Pathol.* 126:53-60.
- Coletta-Filho HD, Takita MA, Targon MLPN & Machado MA (2005) Analysis of the 16S rDNA sequences from citrus-*huanglongbing* bacteria reveal a different "*Ca. Liberibacter*" strain associated to the citrus disease in Sao Paulo, Brazil. *Plant Disease* 89:848-852.
- Deng X, Zhou G, Li H, Chen J & Civerolo EL (2007) Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* from wampee (*Clausena lansium* Skeels) by nested PCR. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0419-01-BR.
- 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. *MPMI* 22:1011-1020.
- Feldman AW & Hanks RW (1969) The occurrence of a gentisic glucoside in the bark and albedo of virus-infected citrus trees. *Phytopathology* 59:603-606.
- 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* 99:1346-1354.
- Gao S, Garnier M & Bové JM (1993) Production of mono-clonal antibodies recognizing most strains of the *greening* BLO by in vitro immunization with an antigenic protein purified from the BLO. *Proceedings of 12th Conference IOCV, Riverside*. p.244-249.
- Garnier M & Bové JM (1983) Transmission of the organism associated with the citrus *greening* disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 73:1358-1363.
- Garnier M, Gao SJ, He Y, 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. *Proceedings of 11th Conference IOCV, Riverside*, p. 428-435.
- da Graça J (1991) Citrus *greening* disease. *Annu. Rev. Phytopathology* 29:109-136.
- Harakawa R, Marais J, Ochasan J, Manjunath KL, Febres VJ, Lee RF & Niblett CL (2000) Improved sensitivity in the detection and differentiation of citrus HLB bacteria from South Africa and the Philippines. *Proceedings of the 12th IOCV Conference IOCV, Riverside*, p.195-199.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Henson JM & French R (1993) The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31:81-109.
- Hocquellet A, Bové JM & Garnier M (1997) Production and evaluation of non radioactive probes for the detection of the two "*Candidatus Liberibacter*" species associated with citrus *huanglongbing* (*greening*). *Molecular Cellular Probes* 11:433-438.
- Hocquellet A, Toorawa P, 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 beta operon. *Molecular and Cellular Probes* 13:373-379.

- Hooker ME, Lee RF, Civerolo EL & Wang SY (1993) Reliability of gentisic acid, a fluorescent marker, for diagnosis of citrus *greening* disease. *Plant Disease* 77:174-180.
- Hung TH, Wu ML & Su H J (1999) Development of a rapid method for the diagnosis of citrus *greening* disease using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology* 147:599-604.
- 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.
- Ke S, Li, KB, Ke C & Tsai JH (1988) Transmission of the *huanglongbing* agent from citrus to periwinkle by dodder. *Proc. 10th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, p.258-264.*
- Lafleche D & Bové JM (1970) Structures de type mycoplasme dans les jennilles d'orangers atteints de la maladie du "greening". *C. R. Acad. Sci.* 270:1915-1917.
- Li W, Hartung JH & Levy L (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus *huanglongbing*. *J. Microbiol. Methods* 66:104-115.
- Li W, Hartung JS & Levy L (2007) Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "*Candidatus* Liberibacter species" associated with citrus *huanglongbing*. *Plant Disease* 91:51-58.
- Li W, Levy L & Hartung JS (2009) Quantitative distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus *huanglongbing*. *Phytopathology* 99:139-144.
- Li W, Li D, Twieg E, Hartung JS & Levy L (2008) Optimized quantification of unculturable *Candidatus* Liberibacter spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease* 92:854-861.
- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X & Zhao X (2010) A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus *huanglongbing*. *Journal of Microbiological Methods* 81:17-25.
- Lopes SA & Frare GF (2008) Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus* Liberibacter americanus'. *Plant Disease* 92:21-24.
- Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR & Bové JM (2009) Liberibacters associated with citrus *huanglongbing* in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. *Plant Disease* 93:257-262.
- Louws FJ, Rademaker JLW & de Bruijn FJ (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37:81-125.
- 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* 98:387-396.
- McClellan APD & Oberholzer PCJ (1965) *Greening* disease of the sweet orange: evidence that is caused by a transmissible virus. *South African J. Agric. Sci.* 8:253-276.
- McClellan APD, Schwarz RE & Oberholzer PCJ (1969) *Greening* disease of citrus in South Africa. *Proceedings First International Citrus Symposium, 3, Riverside, p.1421-1425.*
- Monteiro PB, Renaudin J, Jagoueix-Eveillard S, Ayres AJ, Garnier M & Bové JM (2001) *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* 85:246-251.
- Mullis FK & Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymology* 55:335-350.
- Murray MG & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.
- 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.
- Onuki M, Truc NTN & Hong LTT (2002) Useful histological method for distinguishing citrus yellowing leaves infected with *huanglongbing* from those caused by other factors. *Proceedings of Annual Workshop of JIRCAS. p.114-118.*

- Schaad NW & Frederick RD (2002) Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:250-258.
- Schneider H (1968) Anatomy of *greening* diseased sweet orange shoots. *Phytopathology* 58:1155-1160.
- Schwarz RE (1965) A fluorescent substance present in tissues of *greening*-affected sweet orange. *South Afr. Journal of Agric. Sci* 8:1177-1180.
- Schwarz RE (1968) Indexing of *greening* and exocortis thought fluorescent marker substances. Proc. 4th. Conf. IOCV. University of Florida, Press, Gainesville. p.118-124.
- Schwarz RE (1970) Seasonal graft-transmissibility and quantification of gentisoyl glucoside marker of citrus *greening* in the bark of infected trees. *Phytophylactica* 2:115-120
- Tanaka FAO, Coletta-Filho HD, Soares KCS, Spinelli MO, Machado MA & Kitajima EW (2007) Detection of the "*Candidatus* *Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatol. Brasileira* 32(6):519.
- Tatineni S, Sagara US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T & Wang N (2008) *In planta* distribution of '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- Teixeira DC, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Lopes SA, Bassanezi RB, Ayres AJ, Saillard C & Bové JM (2005) 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, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ & Bové 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, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi RB, Ayres JA, Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2008) A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus *huanglongbing* symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 9:977-984.
- Tetsuya T, Shinji K, Satoshi T, Kanami T, Atsushi O, Masaya N & Mika T (2007) Scratch method for simple, rapid diagnosis of citrus *huanglongbing* using iodine to detect high accumulation of starch in the citrus leaves. *Japanese Journal of Phytopathology* 73:3-8.
- Tian Y, Ke S & Ke C (1996) Polymerase chain reaction for detection and quantification of *Liberibacter asiaticus* the bacterium associated with *huanglongbing* (*greening*) of citrus in China. *Proceedings of 13th Conference IOCV, Riverside*, p.252-257.
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, Renaudin J & Bové JM (1993) The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus *greening* disease contains the nusG-rplKJL-rpoBC gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiology* 26:161-166.
- 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.
- Wang N, Li W, Irey M, Albrigo G, Bo K & Kim J (2009) Citrus *huanglongbing*. In: *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. Global Science Books. p.66-70.
- 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.
- Wulff NA, Eveillard S, Foissac X, Ayres AJ & Bové JM (2009) rRNA operons and genome size of '*Candidatus* *Liberibacter americanus*', a bacterium associated with citrus *huanglongbing* in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:1984-1991.