



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO ZANONI BAGIO

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’
POR SEMENTES EM CITROS**

Londrina
2011

THIAGO ZANONI BAGIO

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’
POR SEMENTES EM CITROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Co-Orientador: Dr. Rui Pereira Leite Junior

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B145e Bagio, Thiago Zanoni.

Estudo da transmissão de '*Candidatus Liberibacter spp.*' por sementes em
citros / Thiago Zanoni Bagio. – Londrina, 2011.
48 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.

Co-orientador: Rui Pereira Leite Junior.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Frutas cítricas – Doenças e pragas – Teses. 2. Bactérias fitopatogênicas –
Teses. 3. Semente como transmissor de doenças das plantas – Teses. 4. Fitopatologia
– Teses. I. Canteri, Marcelo Giovanetti. II. Leite Júnior, Rui Pereira. III. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia. IV. Título.

CDU 634.3

THIAGO ZANONI BAGIO

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ POR
SEMENTES EM CITROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Rui Pereira Leite Junior
IAPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Dauri José Tessmann
UEM – Maringá – PR

Prof. Dr. Luzia Doretto Paccola-Meirelles
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Débora Cristina Santiago
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. João Tavares Bueno
UENP/FALM

Londrina, 17 de fevereiro de 2011.

“À minha família, exemplo de vida, por todo amor demonstrado”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por minha família maravilhosa e pelos dons concedidos a mim.

Àos meus pais, que amo incondicionalmente, Dalésio Volpato Bagio e Adelaide Zanoni Bagio. Obrigado por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a confiança para todas as horas.

Às minhas irmãs, Elisângela de Cassia Bagio da Silva, Graziela Zanoni Bagio, ao meu cunhado, Renato Fernandes Silva e sobrinhos Renan e Andrei, quero demonstrar todo o meu carinho.

Em especial, ao Professor Dr. Martin Homechin (*in memoriam*), pela inicial orientação, obrigado por todos os ensinamentos.

Ao, meu Orientador Professor Dr. Marcelo Giovanetti Canteri, pela disposição em me auxiliar e ensinar, dando sugestões e contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao meu Co-orientador Pesquisador do Instituto Agrônomo do Paraná, Dr. Rui Pereira Leite Junior, pela confiança, amizade, ensinamentos e, acima de tudo, paciência e estímulos para continuar seguindo.

Aos professores da comissão examinadora Dr. Dauri José Tessmann e Dr. Luzia Doretto Paccola-Meirelles pela presteza e disposição para as correções e valiosas contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização de bolsa.

À Professora Dr^a. Maria Isabel Balbi Peña pelas sugestões e conselhos dados para aprimoramento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Seiji Igarashi, pela amizade.

À Weda Aparecida Westin, secretária do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela paciência e amizade.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) que me concedeu espaço e permissão para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos Professores e Funcionários do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

À todos os meus Professores, da pós-graduação, obrigado por contribuírem para que meu sonho pudesse ser realizado.

À todos os meus professores da Universidade Estadual do Norte do Paraná – *Campus* Luiz Meneghel, pela paciência e grandes ensinamentos durante a minha graduação e em especial aos professores que me mostraram a fitopatologia com muito amor e dedicação, Dr. João Tavares Bueno, Dr. João Pereira Torres e Ms. Dirce Ribeiro de Moraes.

Em especial à Idenize Pedrina Orsini, pelas palavras de força, incentivo e consolo nos momentos em que precisei, pelo apoio físico e psicológico, pelo companheirismo, amizade, carinho e paciência durante todo esse tempo, obrigado por estar junto comigo em mais uma importante etapa da minha vida.

À família Orsini, em especial ao Reinaldo Orsini, Maria Aparecida Martins Orsini, Izabel Cristiane Orsini e Izael Cristiano Orsini, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À todos os amigos que conquistei ao longo de minha vida. Vocês são essenciais, e sempre estarão presentes em meu coração.

Agradeço de coração, a todos do laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, e do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agronômico do Paraná, pela ajuda e amizade.

Às Técnicas do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná, Eliana Alves Favaro, Vanessa Sugahara e Maria de Fátima pela ajuda e paciência.

E ao grande Israel Aurora, auxiliar de campo, 'braço direito do Laboratório', que me ajudou infinitas vezes, obrigado.

E aos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original".
Albert Einstein

"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."
Baltasar Gracián

BAGIO, Thiago Zanoni. **Estudo da Transmissão de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ por sementes em Citros.** 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é considerada a mais destrutiva doença da citricultura, e está disseminada nos principais países produtores de citros. O HLB está associado a bactérias limitadas ao floema, compreendendo ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. A disseminação desta bactéria ocorre naturalmente por meio de inseto vetor, no entanto uma planta sadia pode também ser contaminada pela utilização de material propagativo infectado. A disseminação da bactéria é um ponto chave para o manejo do HLB. Entretanto, poucos estudos foram realizados para determinar a possibilidade de transmissão da bactéria por sementes, sendo este aspecto de grande importância para a produção de mudas cítricas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a transmissão da bactéria ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ por sementes cítricas. Sementes de frutos coletados de plantas com HLB de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) dos cultivares Pêra Rio, Folha Murcha, IPR-73 e Shamouti, de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) do cultivar Ponkan e de porta-enxertos limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) foram testadas para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Plantas produzidas a partir dessas sementes também foram examinadas para presença da bactéria do HLB exceto para as espécies de porta-enxerto. Foram obtidas um total de 920 plantas que foram mantidas sob condições controladas. Após 5, 18 e 25 meses da semeadura, foram realizados testes moleculares para detecção da bactéria. Utilizando os *primers* A2/J5, a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ foi detectada em diferentes partes das sementes de todas as espécies testadas. Entretanto, esses resultados não foram confirmados quando utilizado os *primers* Oi1/Oi2c na PCR. Duas plantas de laranja doce do cultivar Folha Murcha foram diagnosticadas positivas para ‘*Ca. L. asiaticus*’ aos 18 meses, utilizando os *primers* A2/J5. Entretanto, essas plantas não apresentaram sintomas de HLB. Testes posteriores nessas mesmas plantas e também nas demais não apresentaram a presença da bactéria. Estes resultados indicaram a falta de evidências de transmissão por sementes de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Palavras-chave: Huanglongbing. Transmissão vertical. Endofíticos. HLB. *Citrus spp.*

BAGIO, Thiago Zanoni. **Estudo da Transmissão de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ por sementes em Citros.** 2011. 48 f. Dissertation (Master’s Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

HLB (HLB) is considered the most destructive disease of citrus, and is widespread in the major producing areas around the world. HLB is associated with the phloem limited bacteria, named ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. The spread of the bacteria occur naturally through insect vector, but a healthy plant can also be contaminated through infected propagative material. The spread of the bacteria is a key point for the management of HLB. However, limited studies have been conducted to determine the possibility of transmission of the bacteria through seeds. This aspect is of major importance for the production of citrus nursery trees. Thus, the objective of this study was to investigate the spread of the bacteria ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ through seeds of different citrus species. Seeds obtained from fruits collected from HLB infected plants of sweet oranges (*Citrus sinensis* Osbeck) Pêra Rio, Folha Murcha, IPR-73 and Shamouti, tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) Ponkan, and of the rootstocks Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) and Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) were tested for the presence of ‘*Ca. L. asiaticus*’. Nursery trees obtained from these seeds were also examined for the presence of the HLB bacterium. A total of 920 plants were obtained from different species and cultivars of citrus and they were kept under controlled conditions. The plants were tested 5, 18 and 25 months after sowing to detect the presence of the bacteria. By using the set of *primers* A2/J5, the presence of ‘*Ca. L. asiaticus*’ was detected in the different parts of the seeds of the tested citrus cultivars. However, these results were not confirmed when the set of *primers* Oi1/Oi2c were used to detect the HLB bacterium. Two sweet orange plants of cultivar Folha Murcha were diagnosed positive for ‘*Ca. L. asiaticus*’ at 18 months after sowing. However, the plants showed no symptoms of HLB. Further tests of these plants did not show the presence of bacterium. These results indicate the lack of evidence for seed transmission of ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Keywords: HuangLongbing. Vertical transmission. Endophytes. HLB. *Citrus* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Amostra de partes de sementes cítricas utilizadas no estudo. A: testa; B: endosperma mais embrião; C: tégma. 28
- Figura 2** – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em diferentes partes das sementes de laranja doce cultivar Valência com os *primers* A2/J5. Linha M: marcador 1 kb plus; linhas 1 e 2 amostras de testa (C); linhas 3 e 4 amostras de tegma (T); linhas 5 e 6 amostras de endosperma mais embrião(E); linha CP controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’; RS: coleta dos frutos em ramos sintomáticos; Ras: coleta dos frutos em ramos assintomáticos e Pt: coleta dos frutos aleatoriamente em uma planta sintomática. 31
- Figura 3** – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em diferentes partes das sementes de laranja doce cultivar Valência com os *primers* Oi1/Oi2c. Linha M: marcador 1 kb plus; linhas 1 e 2 amostras de testa (C); linhas 3 e 4 amostras de tegma (T); linhas 5 e 6 amostras de endosperma mais embrião(E); linha CP controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’; RS: coleta dos frutos em ramos sintomáticos; Ras: coleta dos frutos em ramos assintomáticos e Pt: coleta dos frutos aleatoriamente em uma planta sintomática. 31
- Figura 4** – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 18 meses após transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 16 amostras compostas; linha 16 controle positivo da reação para ‘*Ca. L. asiaticus*’. 32
- Figura 5** – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 18 meses após transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 5 amostras simples correspondentes da amostra composta B1; linhas 6 a 10 amostras simples correspondentes da amostra composta B18; linhas 11 a 15 amostras simples correspondentes a amostra composta B20;

linha 16 controle negativo da extração de DNA; Linha 17 controle negativo da reação; Linha 18 controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’;..... 32

Figura 6 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 25 meses após o transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 5 amostras simples correspondentes da amostra composta B1; linhas 6 a 10 amostras simples correspondentes da amostra composta B18; linhas 11 a 15 amostras simples correspondentes a amostra composta B20; linha 16 controle negativo da extração de DNA; Linha 17 controle negativo da reação; Linha 18 controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’;..... 33

Figura 7 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja dos cultivares Pera Rio, IPR-73 e Shamouti aos 5 meses após transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 29, 33 a 61, 65 a 81, 84 a 92, 96 a 112, 115 a 124, 127 a 143, 146 a 156, 159 a 175, 178 a 184 amostras compostas; linhas 31, 63, 82, 83, 95, 126, 158, 186 controle positivo da reação; linhas 114, 145 e 177 positivas da extração; linhas 30, 62, 93, 125, 157, 185 controle negativo da reação e amostras 32, 64, 113, 144, 176 negativas da extração para ‘*Ca. L. asiaticus*’ 34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A CULTURA DOS CITROS	15
2.2	HUANGLONGBING	16
2.3	‘ <i>Candidatus Liberibacter spp.</i> ’	17
2.4	TRANSMISSÃO	19
2.5	TRANSMISSÃO POR SEMENTE	21
3	ARTIGO: ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE ‘<i>Candidatus Liberibacter spp.</i>’ POR SEMENTES EM CITROS	23
	RESUMO	23
	ABSTRACT	24
	INTRODUÇÃO	24
	MATERIAL E MÉTODOS	26
	Obtenção de Sementes de Diferentes Cultivares Cítricas	26
	Semeadura e Obtenção de Plântulas Cítricas	26
	Detecção de ‘ <i>Candidatus Liberibacter sp.</i> ’ em Sementes	27
	Detecção de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’ em Plantas Cítricas	29
	Reação de Polimerase em Cadeia Para Detecção de ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’	30
	RESULTADOS	30
	Detecção em Sementes	30
	Detecção em Plantas	31
	DISCUSSÃO	35
	CONCLUSÕES	38
	AGRADECIMENTOS	39
	REFERÊNCIAS	39
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é um dos setores de maior importância do agronegócio brasileiro. O sistema agroindustrial cítrico brasileiro movimentava nove bilhões de reais por ano, gerando mais de 400 mil empregos diretos e 1,2 milhões de empregos indiretos (NEVES; JANK, 2006).

Entre as principais barreiras que ameaçam a citricultura brasileira estão as pragas e doenças, que comprometem grandes regiões produtoras. Dentre as doenças, destaca-se o Huanglongbing (HLB) que está associada a três espécies de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ (BOVÉ, 2006). O HLB foi identificado pela primeira vez no Brasil no Estado de São Paulo, no ano de 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004). Devido à sua rápida disseminação, atualmente, a doença encontra-se também presente nos estados de Minas Gerais e Paraná. Os sintomas em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) já são conhecidos, mas podem ser confundidos com outros de origem biótica e abiótica, como por exemplo aqueles causados por deficiências nutricionais e outras doenças dos citros. Os frutos sintomáticos são imprestáveis para a indústria de suco e para o comércio *in natura* (DAGULO et al., 2010).

A transmissão por insetos vetores é a forma principal de disseminação da bactéria do HLB nos pomares. Duas espécies de psílídeos são conhecidas como transmissores naturais da bactéria, *Trioza erytrae* Del Guercio responsável pela transmissão da espécie africana, ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, e *Diaphorina citri* Kuwayama transmissor das espécies asiática e americana da bactéria, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, respectivamente (DA GRAÇA, 1991).

A presença de inseto vetor aliado a um período latente em torno de 6 a 12 meses, torna difícil o controle desta doença. A utilização de mudas saudáveis, a eliminação imediata de plantas doentes e controle da população de psílídeos, consiste na base para o manejo do HLB (BELASQUE JR. et al., 2009). Estas práticas, quando bem executadas, ajudam a retardar o progresso da doença dentro do pomar e entre pomares vizinhos. Para maior eficiência deste manejo é importante que estas medidas sejam tomadas em nível regional (BELASQUE JR et al., 2009).

A transmissão da bactéria também pode ocorrer por enxertia de material vegetal contaminado em plantas saudáveis, e a eficiência desse tipo de transmissão varia com o ramo fonte, a estação do ano e com o tamanho do material a ser enxertado (LOPES et al., 2009b). Sendo assim, a utilização de borbulheiras protegidas para produção de mudas é de

suma importância para evitar a introdução do patógeno em áreas livre de HLB, bem como para não comprometer a vida útil de um pomar recém formado.

Os mecanismos vistos anteriormente são considerados os principais meios de disseminação da bactéria do HLB, porém, algumas bactérias e outros patógenos como fungos e vírus possuem a capacidade de infectar sementes e serem disseminados a longas distâncias por esse meio, podendo dessa forma, iniciar uma nova epidemia em locais diferentes (WALCOTT; GITAITIS; CASTRO, 2003). Ainda, pouco se sabe sobre a possibilidade de disseminação por sementes de '*Candidatus Liberibacter spp.*'. Entretanto, existem alguns relatos na literatura sobre esta possibilidade que datam da década de 1980 (TIRTAWIDAJAJA, 1981). Dados na literatura a respeito dessa transmissão da bactéria do HLB ainda são controversos (BENYON, et al., 2009; GRAHAM, et al., 2008; HARTUNG, HALBERT; SHATTERS, 2008).

O conhecimento sobre a transmissão de '*Candidatus Liberibacter spp.*' por sementes em citros é importante, principalmente em espécies cítricas utilizadas como porta-enxerto. As sementes são utilizadas na produção de mudas cítricas, e estas devem estar livres de qualquer patógeno, garantindo o sucesso do novo pomar. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de transmissão da bactéria '*Ca. Liberibacter spp.*' por sementes de citros oriundas de plantas com HLB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DOS CITROS

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, que reúne mais dois gêneros com importância econômica, *Fortunella* e *Poncirus*. Os citros são oriundos do sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do Centro da China ao Japão, e do Leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; SCORA, 1975; SOOST; CAMERON, 1975).

Plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelos portugueses durante a colonização no século XVI, em meados do ano de 1530 (HASSE, 1987). Entretanto, foi na década de 1980, com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas, que o país tornou-se o maior produtor mundial de citros. Em 2009, a área colhida chegou a 833.667 mil hectares, com uma produção em torno de 449,5 milhões de caixas de 40,9 kg (IBGE, 2010). A maior parte desta produção destina-se à indústria de suco concentrado no Estado de São Paulo.

A citricultura se tornou um dos setores mais produtivos e com maior potencial para crescimento dentro do agronegócio brasileiro. O Brasil detém 30% da produção mundial de laranja *in natura* e 59% do comércio de suco de laranja. O agronegócio citrícola movimentava nove bilhões de reais por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. O país exporta anualmente US\$ 1,2 bilhões de dólares em suco de laranja e participa com cerca de 80% do mercado mundial. Além disso, o consumo de citros vem crescendo a taxas entre 2% a 4% ao ano, sendo a última estimativa no aumento de produção de laranja no Brasil de 3,9% ao ano (IBGE, 2010; NEVES; JANK, 2006).

Entre as principais barreiras que ameaçam a citricultura, encontram-se problemas causados por pragas e doenças, que causam prejuízos aos produtores quando buscam a manutenção de bons rendimentos, basicamente pelo elevado custo para o controle fitossanitário (AMARO et al., 1997; AFONSO; SILVA, 1999; NEVES, 1999). Dragone et al. (2001) relatam que somente os gastos fitossanitários no manejo da Clorose Variegada dos Citros para a formação de um pomar nos quatro primeiros anos, podem representar 44,9% do investimento total.

O manejo do cancro cítrico no estado de São Paulo é baseado no programa de erradicação de plantas contaminadas. Há mais de cinquenta anos, desde a introdução do

seu agente causal (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) no Brasil em 1957, a erradicação de plantas doentes em São Paulo tem sido a prática empregada, com eliminação de todas as plantas do talhão quando a incidência for maior do que 0,5%, eliminação da planta contaminada além de todas as plantas num raio de 30 metros quando a incidência da doença for menor do que 0,5% (BELASQUE JR, et al., 2009). Seja pela erradicação ou pelo manejo integrado do cancro cítrico (LEITE JR; MOHAN, 1990), seu controle onera a produção de cítricos em todas as regiões onde está presente.

Apesar de ainda não existirem levantamentos oficiais dos custos para manejo do HLB, Sobrinho (2008) argumenta que algumas propriedades realizam pulverizações semanais para controle do psilídio, inseto vetor da bactéria, o que pode representar 40% do custo total de produção, apenas para conviver com a doença.

2.2 HUANGLONGBING

O “Huanglongbing” (HLB) tem sua origem no sudeste asiático, da mesma forma que seu principal hospedeiro, os citros. Os primeiros relatos científicos sobre o HLB foram registrados em 1919, os quais descrevem na China a doença do ramo amarelo “*yellow shoot*” dos citros (GOTTWALD et al., 2007). Desde então, esta doença recebeu diferentes denominações em diferentes regiões do mundo como Likubin (Taiwan), Leaf Mottling (Filipinas), Citrus Vein-Phloem Degeneration (Indonésia) e Greening (África do Sul) (BOVÉ, 2006).

O HLB é considerado uma das mais devastadoras doenças de citros de todo o mundo. No Brasil, a doença teve seu agente causal identificado primeiramente no Estado de São Paulo na região de Araraquara em 2004 (COLETTA FILHO et al., 2004). Contudo em 2008, o HLB alcançou todas as regiões citrícolas do estado de São Paulo, com aproximadamente 24% dos pomares com pelo menos uma planta afetada e incidência da doença em regiões como Araraquara e Araras, que compreendem 39% das plantas do Estado (BELASQUE JR et al., 2010).

No estado do Paraná, a primeira constatação da doença foi em 2006. Mesmo tendo sido tomadas medidas de controle como o manejo da população do psilídeo e a eliminação imediata das plantas doentes, o progresso do HLB no Estado não foi contido e já

se encontra em mais de 60 municípios, sendo predominante na região noroeste, onde se concentra a maior região citrícola do Paraná (NUNES et al., 2010).

O HLB se caracteriza por uma série de sintomas que podem ser confundidos com problemas bióticos e abióticos. Plantas aparentemente saudáveis, podem apresentar sintomas iniciais de HLB em ramos individualizados, destacando-se na copa verde folhas amareladas, com mosqueados assimétricos (manchas irregulares verde claras ou amarelas), e clorose internerval, que pode evoluir para sinais de deficiência de Zn, Ca, B e Mn (BOVÉ, 2006).

Frutos de plantas com HLB apresentam tamanho reduzido e formato assimétrico em relação ao eixo central, abortamento de sementes e coloração desuniforme. A planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos e seca dos ramos a partir da extremidade. Plantas infectadas com HLB tornam-se economicamente inviáveis em curto espaço de tempo chegando à morte em casos severos (BOVÉ, 2006).

2.3 ‘*Candidatus Liberibacter* spp.’

O agente causal do HLB, ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* spp., é uma bactéria fastidiosa e limitada ao floema da planta hospedeira. Foi definida como uma bactéria gram-negativa em 1984, por Garnier et al. (1984) e foi ainda caracterizado como um membro da subdivisão alfa de proteobactérias (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

As espécies de ‘*Candidatus Liberibacter*’ da Ásia e África são amplamente distribuídas (GARNIER et al., 1984; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). O tamanho da célula desta bactéria é de aproximadamente 930 nm de comprimento por 410 nm de largura com membrana e parede celular de formato irregular e com diferentes espessuras (SHOKROLLAH et al., 2010).

Os dois agentes causais do HLB, ‘*Ca. L. africanus*’ e ‘*Ca. L. asiaticus*’, podem ser distinguidos por sua sensibilidade à temperatura. Por ser considerada sensível a altas temperaturas, a espécie africana ocorre em regiões mais frias. Em condições de laboratório, os sintomas causados por ‘*Ca. L. africanus*’ são mais pronunciados sob temperaturas em torno de 22-24°C, e podem desaparecer em 27-32°C. A espécie asiática nos mesmos regimes de temperatura apresenta sintomas severos (BOVÉ et al., 1974), podendo manter expressão de sintomas em temperaturas de até 35°C (LOPES et al., 2009).

Em 2005, logo após os primeiros relatos de ‘*Ca. L. asiaticus*’ no continente americano, os resultados moleculares negativos em várias amostras com sintomas típicos de HLB, coletadas na região de Araraquara, São Paulo, levou à suspeita da ocorrência de uma nova espécie da bactéria. Esta nova espécie foi denominada de ‘*Ca. L. americanus*’, e é distinta das demais espécies por apresentar baixa similaridade genética (98.4% e 96.0%) quando comparadas com as espécies ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. africanus*’, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2005).

Embora nas plantas cítricas a presença de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ resulte em sintomas bastante evidentes, dados de literatura têm mostrado que esta bactéria apresenta distribuição bastante irregular e pode estar presente em baixas concentrações na planta (HUNG et al., 1999). Além do mais, a expressão dos sintomas da doença é lenta, podendo variar de 6 a 12 meses (HUNG et al., 2000).

As três espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ tem os citros como principal hospedeiro, e com ocorrência geográfica definida: ‘*Ca. L. asiaticus*’ ocorre em países asiáticos, como China, Japão, Índia, Filipinas e Vietnã, entre outros, e em países americanos, como Brasil, México, Cuba, Estados Unidos da América e diversos outros países da América Central e Caribe (COLETTA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005; MARTÍNEZ et al., 2009). O ‘*Ca. L. africanus*’ é encontrado em países africanos, como a África do Sul e o Zimbábue (BOVÉ, 2006). Por último, ‘*Ca. L. americanus*’ foi detectada até hoje somente no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005a).

Além de algumas plantas da família Rutacea e gêneros afins dos citros, ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ pode infectar e causar sintomas em outras espécies como *Microcitrus australasica*, *Swinglea glutinosa*, *Missionis atalantia*, *Clausena indica*, *Limonia acidissima*, *Balsamocitrus dawei*, *Aeglopsis chevalieria*, *Severinia buxifolia*, *Murraya paniculata*, *Catharanthus roseus* (vinca) e *Nicotiana xanthii* (tabaco), sendo as duas últimas constatadas apenas em condições de laboratório (ABDULLAH et al., 2009).

Recentemente, as três espécies de ‘*Candidatus Liberibacter*’ foram cultivadas utilizando o meio de cultura denominado Liber A (SECHLER et al., 2009). Esse cultivo foi confirmado por PCR em tempo real e seqüenciamento do DNA genômico. Esse foi o primeiro relato de cultivo *in vitro* das espécies ‘*Ca. L. asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ e ‘*Ca. L. americanus*’ (SECHLER et al., 2009).

A primeira técnica de identificação e confirmação do agente causal do HLB foi a microscopia eletrônica. Esta se baseou em duas características da bactéria, localização exclusiva nos vasos do floema e presença de parede celular (BOVÉ, 2006).

Ao longo dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos para a detecção e identificação dessas bactérias. Hocquellet et al. (1997) desenvolveram sondas não radioativas para esse fim. As espécies da Ásia e África podem ser diferenciadas pela sensibilidade à temperatura, hibridização de DNA, propriedades genômicas e sorológicas (BOVÉ, 2006).

Algumas regiões do genoma bacteriano têm sido utilizadas para estudar as diferentes espécies da bactéria do HLB, como a região intergênica 16S/23S, a qual apresentou 79,46% de homologia entre '*Ca. L. asiaticus*' e '*Ca. L. africanus*'. A partir destas regiões foram obtidos os *primers* Oi1 5' GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3' para espécie asiática, OA1 5' GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3' para espécie africana e Oi2c 5' GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT 3' para ambas as espécies, utilizados para detecção das duas espécies (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1997). Para a espécie '*Ca. L. americanus*' foi obtida uma seqüência a partir da região 16S rDNA intermediária à aquela obtida para detecção das espécies asiática e africana, que originou o par de *primers* GB1 5' AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT 3', e GB3 5'TATATTTGCCATCATTAAGTTGG 3' , específico para a espécie americana (TEIXEIRA et al., 2005).

Para a detecção das espécies '*Ca. L. asiaticus*' e '*Ca. L. africanus*', Hocquellet et al. (1999) desenharam os *primers* denominados A2 5' TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT3' e J5 'ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA', a partir das *rplA* e *rplJ* (β operon) de genes que codificam para proteínas ribossomais e amplificam 669 pb na espécie de '*Ca. L. africanus*' e 703 bp na '*Ca. L. asiaticus*', tornando possível à distinção entre essas espécies simultaneamente em apenas uma reação utilizando o mesmo par de *primers*.

2.4 TRANSMISSÃO

A transmissão de '*Ca. L. asiaticus*' ocorre naturalmente nos pomares por meio de insetos vetores, mas pode também ser transmitida por enxertia de material vegetal contaminado (BOVÉ, 2006), e contaminação por parasitismo vegetal de *Cuscuta* sp. (BENYON, et al., 2008).

A transmissão em condições naturais das espécies asiática e americana, no Brasil, tem sido feita pelo inseto *Diaphorina citri* Kuwayama. Antes da introdução da bactéria do HLB no Brasil, este inseto, endêmico em todas as regiões citricolas do país, não

representava problemas para a citricultura, devido aos baixos danos causados por sua alimentação feita nas brotações novas (SILVA et al., 1968).

A identificação do psíldeo africano *Trioza erythrae* Del Guercio e o psíldeo asiático *D. citri* Kuwayama como vetor do ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’, ocorreu nas Filipinas por Salibe e Cortez (1966), sendo este conhecido como meio primário de disseminação da doença no campo (OBERHOLZER; HOFMEYR, 1971). Sendo o primeiro vetor natural de ‘*Ca. L. africanus*’ na África, e o segundo vetor de ‘*Ca. L. asiaticus*’ sob condições naturais na Ásia e Américas (BOVÉ, 2006). Ambas as espécies transmitem os dois patógenos (LALLEMAND; FOS; BOVÉ, 1970). No entanto, ainda não se tem conhecimento se esta infecção pode ser simultânea (GARNIER et al., 2000).

A *D. citri* é um pequeno inseto medindo, quando adulto, cerca de 2 mm de comprimento, com coloração marrom-claro na fase jovem e manchado de escuro quando adulto, suas asas são transparentes com manchas pretas. As formas jovens são achatadas, pouco convexas e apresentam pernas curtas. As ninfas mais evoluídas possuem tecas alares geralmente largas, do lado do tórax, aumentando a largura do corpo (GALLO et al., 1988).

As informações sobre interações patógeno-vetor e características da transmissão encontradas na literatura em alguns casos são conflitantes. Provavelmente, estes conflitos se devem às diferenças entre as espécies e biótipos de vetores e também espécies da bactéria. Entretanto, na maioria dos casos, as informações indicam que este patógeno tem uma relação circulativa propagativa no inseto vetor (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974).

Adultos de *D. citri* são capazes de adquirir o patógeno de plantas infectada (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; ZHAO, 1981; XU, et al., 1987), no entanto o tempo de aquisição pode variar de 15 a 30 minutos (OBERHOLZER; HOFMEYR, 1955; CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974) ou de 5 a 7 horas (XU et al., 1987). Longos períodos de alimentação conferem ao inseto, alta infectividade (GRAÇA, 1991). Ninfas de *D. citri* a partir do quarto instar são capazes de adquirir e reter o patógeno até adultos, fase na qual são capazes de transmitir a bactéria imediatamente após a emergência (CAPOOR; VISWANATH, 1974; ZHAO, 1981), e por um período de 1 a 25 dias (XU et al. 1987).

O período de latência do patógeno no inseto pode variar de 24 horas (XU et al., 1987) até 21 dias (CAPPOR; RAO; VISWANATH, 1974). Hung et al. (2004) observaram um longo período de retenção da espécie asiática em adultos de *D. citri* após aquisição em plantas infectadas.

A taxa de transmissão por *D. citri* pode variar de 1 a 100% (XU et al., 1988), sendo que alguns trabalhos indicam que mesmo períodos curtos de alimentação são

suficientes para que ocorra a transmissão (RAYCHAUDHURI et al., 1972). Entretanto, outros autores indicam a necessidade de período mínimo de 5 horas de alimentação para a transmissão da bactéria (XU et al., 1987). A ocorrência de transmissão transovariana ainda não foi bem determinada. Existem relatos conflitantes na literatura (HALBERT; MANJUNATH, 2004)

Apesar da transmissão por inseto ser a mais próxima da realidade de campo, vários estudos, como reação do hospedeiro ao patógeno, gama de hospedeiros e agressividade do patógeno, métodos artificiais de inoculação tem sido utilizados devido à facilidade operacional e também à maior eficiência na transmissão. Lopes e Frare (2008) alcançaram eficiência de transmissão para '*Ca. L. americanus*' em torno de 25 a 65,2% quando utilizaram como fonte de inoculo, borbulhas de 4 cm de comprimento removidas de ramos sintomáticos no inverno e verão, respectivamente. Em contraste, a eficiência de transmissão de '*Ca. L. asiaticus*' por borbulhas é maior, e pode chegar a 88% (LOPES et al., 2009).

A transmissão da bactéria do HLB por inseto dificulta o controle da doença. A eliminação das plantas doentes e o manejo da população do inseto, nos pomares, consistem na base para o manejo desta doença.

2.5 TRANSMISSÃO POR SEMENTE

Há pouca informação na literatura sobre a transmissão de '*Ca. Liberibacter spp.*' pela semente. Tirtawidjaja (1981) relatou a ocorrência de mudas cloróticas e com mosqueado nas folhas provenientes de sementes obtidas de frutos afetados pela '*Citrus Vein-Phloem Degeneration*', considerada como sinônimo de HLB. O autor sugere a possibilidade de transmissão do patógeno pelas sementes.

Graham et al. (2008) observaram uma pequena porcentagem de mudas com resultado positivo para o '*Ca. L. asiaticus*', obtidas a partir de sementes de plantas com HLB. Foi utilizada a técnica molecular quantitativa de reação de polimerase em cadeia (qPCR) para detecção da bactéria. O patógeno também foi detectado em mudas cítricas formadas a partir de sementes de frutos sintomáticos de diferentes cultivares, embora a detecção da bactéria por PCR não tenha sido correlacionado com a manifestação dos sintomas da doença (HARTUNG et al., 2008).

Variações na taxa de transmissão da bactéria do HLB, na ordem de 2% até 41,7%, foram relatadas para mudas de diferentes espécies cítricas e afins como laranja doce (*C. sinensis*), pomelo (*C. maxima*) e trifoliata (*Poncirus trifoliata*) (BENYON et al., 2009). Estas variações se devem à técnica utilizada para detecção da bactéria, sendo ela PCR convencional, nested PCR ou PCR quantitativo (BENYON et al., 2009). Plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) inoculadas experimentalmente com ‘*Ca. L. asiaticus*’, utilizando *Cuscuta pentagona*, apresentaram mais de 53% de suas sementes amostradas com a presença da bactéria. Além disso, 80% das plantas obtidas a partir dessas sementes contaminadas apresentaram sintomas iniciais de HLB quando submetidas ao estresse nutricional (ZHOU, 2008).

Transmissão através de sementes tem sido demonstrada para vários tipos de bactérias fitopatogênicas, como por exemplo, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* em feijão (DARRASSE et al., 2007) e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melancia (WALCOTT et al., 2003). As sementes podem ser contaminadas externamente, como resultado de contato com bactérias presentes em tecidos sintomáticos (KAUFMAN; LEBEN, 1974), ou através de infecção dos tecidos internos (WALCOTT et al., 2003). Além disso, contaminações internas das sementes podem ocorrer por circulação sistêmica do patógeno pelo sistema vascular (AGARWAL; SINCLAIR, 1987; AGGOUR et al., 1989). Estudos sobre a distribuição de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em diferentes tecidos de citros demonstraram a presença do patógeno em casca de sementes e em outras partes de frutos das plantas infectadas, bem como em diferentes partes das flores (TATINENI et al., 2008). No entanto, a transmissão sistêmica de ‘*Ca. L. asiaticus*’ de frutos, para sementes, e o conseqüente desenvolvimento de mudas cítricas contaminadas continua a ser um aspecto ainda não esclarecido.

3 ARTIGO: ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE ‘*CANDIDATUS LIBERIBACTER SPP.*’ POR SEMENTES EM CITROS.

Thiago Zanoni Bagio^{1,2*}, Marcelo Giovanetti Canteri³, Rui Pereira Leite Jr.⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, PR. ²Bolsista CAPES. ³Docente, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, CP. 6001, Londrina, PR. ⁴Pesquisador, Instituto Agrônomo do Paraná, CEP: 86047-902, CP. 481, Londrina, PR * bagio.t.z@gmail.com

Resumo

Huanglongbing (HLB) é considerada a mais destrutiva doença da citricultura, e está disseminada nos principais países produtores de citros. O HLB está associado a bactérias limitadas ao floema, compreendendo ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. A disseminação desta bactéria ocorre naturalmente por meio de inseto vetor, no entanto uma planta sadia pode também se contaminada pela utilização de material propagativo infectado. A disseminação da bactéria é um ponto chave para o manejo do HLB. Entretanto, poucos estudos foram realizados para determinar a possibilidade de transmissão da bactéria por sementes, sendo este aspecto de grande importância para a produção de mudas cítricas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a transmissão da bactéria ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ por sementes cítricas. Sementes de frutos coletados de plantas com HLB de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) dos cultivares Pêra Rio, Folha Murcha, IPR-73 e Shamouti, de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) do cultivar Ponkan e de porta-enxertos limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) foram testadas para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’. Plantas produzidas a partir dessas sementes também foram examinadas para presença da bactéria do HLB, exceto para as espécies de porta-enxerto. Foram obtidas um total de 920 plantas que foram mantidas sob condições controladas. Após 5, 18 e 25 meses da semadura, foram realizados testes moleculares para detecção da bactéria. Utilizando os *primers* A2/J5, a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ foi detectada em diferentes partes das sementes de todas as espécies testadas. Entretanto, esses resultados não foram confirmados quando utilizado os *primers* Oi1/Oi2c na PCR. Duas plantas de laranja doce Folha Murcha foram diagnosticadas positivas para ‘*Ca. L. asiaticus*’, aos 18 meses utilizando os *primers* A2/J5. Entretanto, as plantas não apresentaram sintomas de HLB. Testes posteriores nessas plantas e nas demais não apresentaram a presença da bactéria. Estes resultados indicaram a falta de evidências de transmissão por sementes de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Palavra chave: Huanglongbing. Transmissão vertical. Endofíticos. HLB. *Citrus spp.*

Abstract

HLB (HLB) is considered the most destructive disease of citrus, and is widespread in the major producing areas around the world. HLB is associated with the phloem limited bacteria, named ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. The spread of the bacteria occur naturally through insect vector, but a healthy plant can also be contaminated through infected propagative material. The spread of the bacteria is a key point for the management of HLB. However, limited studies have been conducted to determine the possibility of transmission of the bacteria through seeds. This aspect is of major importance for the production of citrus nursery trees. Thus, the objective of this study was to investigate the spread of the bacteria ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ through seeds of different citrus species. Seeds obtained from fruits collected from HLB infected plants of sweet oranges (*Citrus sinensis* Osbeck) Pêra Rio, Folha Murcha, IPR-73 and Shamouti, tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) Ponkan, of the rootstocks Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) and Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) were tested for presence of ‘*Ca. L. asiaticus*’. Nursery trees obtained from these seeds were also examined for the presence of the HLB bacterium. A total of 920 plants were obtained from different species and cultivars of citrus and they were kept under controlled conditions. The plants were tested 5, 18 and 25 months after sowing to detect the presence of the bacteria. By using the set of *primers* A2/J5, the presence of ‘*Ca. L. asiaticus*’ was detected in the different parts of the seeds of the tested citrus cultivars. However, these results were not confirmed when the set of *primers* Oi1/Oi2c were used to detect the HLB bacterium. Two sweet orange plants of the cultivar Folha Murcha were diagnosed positive for ‘*Ca. L. asiaticus*’ at 18 months after sowing. However, the plants showed no symptoms of HLB. Further tests of the plants did not show the presence of bacterium. These results indicate the lack of evidence for seed transmission of ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Keywords: HuangLongbing. Vertical transmission. Endophytes. HLB. *Citrus* spp.

INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB) é a mais destrutiva doença para a citricultura, e está presente nos principais países produtores de citros ao redor do mundo (BOVÉ, 2006). Esta doença está associada a três espécies de bactérias restritas ao floema, denominadas ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’.

Somente as espécies ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. americanus*’ estão disseminadas no Brasil, e foram identificadas pela primeira vez no Estado de São Paulo em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA, et al., 2005). Devido à sua rápida disseminação, atualmente, a doença encontra-se também presente nos estados de Minas Gerais e Paraná (BELASQUE JR et al., 2009). Os sintomas de HLB em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) já são conhecidos, mas podem ser confundidos com outros de origem biótica

e abiótica, como por exemplo, deficiências nutricionais e outras doenças dos citros (BOVÉ, 2006). Os frutos sintomáticos são imprestáveis para a indústria de suco e para o comércio *in natura* (DAGULO et al., 2010).

A transmissão por insetos vetores é a forma principal de disseminação da bactéria do HLB nos pomares. Duas espécies de psíldeos são conhecidas como transmissores naturais de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ *Trioza erythrae* Del Guercio é responsável pela transmissão da espécie africana (‘*Ca. Liberibacter africanus*’), e *Diaphorina citri* Kuwayama é transmissora das espécies asiática (‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’) e americana (‘*Ca. Liberibacter americanus*’) da bactéria (BOVÉ, 2006).

A existência de um inseto vetor aliado a um período latente em torno de 6 a 12 meses, torna difícil o controle desta doença. A eliminação imediata de plantas doentes, que são fontes de contaminação para o inseto, e o controle da população de psíldeos em níveis baixos consiste na base para o manejo do HLB (BELASQUE JR et al., 2009). Estas práticas, quando bem executadas, ajudam a retardar o progresso da doença dentro do pomar e entre pomares vizinhos. Para maior eficiência deste manejo é importante que estas medidas sejam tomadas em nível regional (BELASQUE JR et al., 2009).

A transmissão da bactéria também pode ocorrer por enxertia de material vegetal contaminado e a eficiência desse tipo de transmissão varia com o ramo fonte, a estação do ano e com o tamanho da borbulha a ser enxertada (LOPES; FRARE, 2008). Sendo assim, a utilização de borbulheiras protegidas e a própria produção das mudas em ambiente protegido são de suma importância para evitar a introdução do patógeno em áreas livres de HLB, bem como, não comprometer a vida útil de um pomar recém formado.

Os mecanismos vistos anteriormente são considerados os principais meios de disseminação da bactéria do HLB, porém, algumas bactérias e outros patógenos como fungos e vírus possuem a capacidade de infectar sementes e serem disseminados a longas distâncias. Dessa forma, a transmissão do patógeno por sementes pode iniciar uma nova epidemia em locais diferentes. Ainda, pouco se sabe sobre a capacidade de disseminação por sementes para ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’. Entretanto, existem relatos na literatura sobre esta possibilidade que datam da década de 80 (TIRTAWIDJAJA et al., 1981). Informações na literatura a respeito da possível transmissão da bactéria do HLB por sementes ainda são controversos (BENYON et al., 2009; GRAHAM et al., 2008; HARTUNG; HALBERT; SHATTERS, 2008).

O conhecimento sobre a transmissão de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ por sementes em citros é importante, principalmente em espécies cítricas utilizadas como porta-

enxertos. As sementes são utilizadas na produção de porta-enxertos para mudas cítricas, e estas devem estar livres de qualquer patógeno, garantindo o sucesso do novo pomar. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de transmissão da bactéria ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ por sementes de frutos cítricos oriundos de plantas com HLB.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de Sementes de Diferentes Cultivares Cítricas

Plantas com teste de PCR positivo para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ dos cultivares de tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), e das laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) dos cultivares Shamouti, Pera Rio, IPR-73 e Folha Murcha, e dos porta-enxertos limão Cravo (*Citrus limonia* Osback) e Citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) foram selecionadas e seus frutos foram coletados para extração das sementes. Para confirmação da presença da bactéria nas plantas fontes foram utilizados os *primers* A2/J5 específicos para as espécies ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. africanus*’, (HOCQUELLET et al., 1999) e GB1/GB3 específicos para ‘*Ca. L. americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005). Essas plantas foram selecionadas em diferentes pomares comerciais das regiões Norte e Noroeste do Paraná. Os frutos de tangerina Ponkan foram coletados separadamente, de ramos que apresentavam folhas com sintomas característicos da doença, sendo, os frutos sintomáticos ou não, e também de frutos de ramos aparentemente sadios de plantas doentes. Para as demais cultivares de laranja, todos os frutos da planta foram coletados sem distinção da sanidade do ramo. A extração das sementes dos frutos foi realizada manualmente. Posteriormente, as sementes foram secas a sombra, tratadas com fungicida (carbendazim + tiram na dose equivalente a 45+105 g i.a., respectivamente, por 100 kg de sementes) e armazenadas em câmara fria (5°C).

Semeadura e Obtenção de Plântulas Cítricas

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas perfuradas medindo 20 cm de largura 40 cm de comprimento e 10 cm de profundidade, contendo areia autoclavada. Após 35 dias, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos de plástico de 4 litros

contendo substrato Plantmax® e adubados com 8 g de Osmocote® (20-08-04). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação semi-climatizada, com temperatura média em torno de 24°C, com regas diárias. Para o manejo de pragas, foram realizadas aplicações quinzenais de inseticidas e acaricidas apropriados em sistema de rodízio para evitar resistência. Armadilhas do tipo adesiva, de cor amarela, com 450 cm² de superfície adesiva, foram penduradas a aproximadamente 1,5 m acima das plantas, com distribuição por toda a casa-de-vegetação. Os insetos capturados foram identificados visando adotar medidas para seu controle. Os produtos inseticidas utilizados foram abamectina (concentração de 180 g/l) na dosagem de 20 ml p.c. para 100 l de água; dimetoato (concentração de 500 g/l) na dosagem de 150 ml p.c. para 100 l de água; espiroclorfenol (concentração de 240 g/l) na dosagem de 20 ml p.c. para 100 l de água. e bifentrina (concentração de 100 g/l) na dosagem de 20 ml p.c. para 100l de água.

As plantas foram mantidas nessas condições até o momento de retirada de amostras para extração de DNA.

Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter sp.*’ em Sementes

A detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em sementes foi realizada para as diferentes espécies cítricas, como laranjas doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) dos cultivares Valência, Pera Rio, Folha Murcha, Shamouti e IPR-73, tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) Ponkan, citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) e limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck).

As sementes foram separadas em testa, tégua e endosperma junto com embrião (figura 1), e examinadas pelo teste de PCR para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Cada espécie foi separada em lotes, e duas amostras de cada lote foram amostradas para estudo da presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ pelo teste de PCR. Cada amostra foi constituída por cinco sementes. As amostras também foram subdivididas quanto à sanidade do ramo, sendo divididas em frutos coletados de ramos sintomáticos para HLB (RS), frutos coletados de ramos assintomáticos para HLB (RAS) e frutos coletados de toda a planta com HLB (Pt), totalizando 90 amostras (tabela 1).

Tabela 1 – Sementes de diferentes espécies e cultivares cítricas e suas partes utilizadas para detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’

Espécie e Cultivar	Parte da Semente									Total de Amostras
	Testa			Tégma			Endosperma + Embrião			
	Pt*	RS	Ras	Pt	RS	Ras	Pt	RS	Ras	
Laranja Valência	2**	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Laranja Folha Murcha	2	-***	-	2	-	-	2	-	-	6
Laranja Pera Rio	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Laranja Shamouti	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
Laranja IPR-73	-	2	2	-	2	2	-	2	2	12
Tangerina Ponkan	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Citrumelo Swingle	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
Limão Cravo	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
Total de amostras	14	8	8	14	8	8	14	8	8	90

*Pt: Sementes obtidas de toda planta; RS: Sementes obtidas de ramos sintomáticos para HLB; Ras: Sementes obtidas de ramos assintomáticos para HLB; **Número de amostras examinadas; ***Amostras não avaliadas.

**Figura 1** – Amostra de partes de sementes cítricas utilizadas no estudo. A: testa; B: endosperma mais embrião; C: tégma.

O DNA foi extraído utilizando o procedimento descrito por Ausubel et al. (1992) com pequenas modificações. Cada amostra foi cortada em pequenos pedaços, colocada em 40 ml de tampão fosfato salino e agitada a 130 rpm a 28°C durante 24 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 2 ml de água Milli-Q autoclavada. A partir deste, 1 ml foi transferido para novos tubos de ultra-centrifuga de 1,5 ml e submetidos a centrifugação a 14.000 rpm durante 2 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 567 µl de tampão de lise TE (10mM Tris HCl, pH8 e 1mM EDTA, pH 8). Em seguida foi adicionado 30 µl de SDS 10% e 3 µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubado a 37°C durante 1 hora. Após incubação, foi adicionado 100 µl de 5 M NaCl e 80 µl de 10% CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) em 0,7 M NaCl e incubado a 65°C por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 780 µl de Cloroformio/álcool-isoamilico

(24:1), homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 600 µl do sobrenadante foi misturado a igual volume de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 14000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionado 0,6 volumes de isopropanol gelado e mantido por 1 hora a -20°C. O pellet formado foi lavado em etanol 70%, ressuscitado em 100 µL de TE (10 mM Tris HCl, pH 8 e 1 mM EDTA, pH 8) e armazenado à -20°C para posterior utilização.

Detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em Plantas Cítricas

Após o transplante das plântulas, foram realizadas coletas de amostras de tecidos após 5, 18 e 25 meses para extração de DNA, que foi utilizado em teste de PCR para detecção da presença da bactéria '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Primeiramente, foram coletadas amostras compostas por cinco plantas, sendo retirada uma folha madura ou uma secção de aproximadamente 1 cm² de casca do caule principal por planta. Posteriormente, se necessário, as plantas da amostra composta foram novamente examinadas de forma individual, contendo apenas uma planta por amostra.

A extração de DNA foi feita segundo o procedimento descrito por Murray e Thompson (1980). Pecíolos e nervura central de folhas maduras ou casca do tronco principal de plantas (500 mg) foram macerados em almofariz contendo tampão de extração CTAB mais 0,2% de β-mercaptoetanol. O conteúdo macerado foi transferido para tubos de 2 mL de capacidade e mantidos em banho-maria por 30 minutos a 65°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos. Aliquotas de 1 mL do sobrenadante foram transferidas para novos tubos e adicionado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Da fase aquosa, 0,9 mL foi recuperado em um novo tubo onde foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol gelado e mantido a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi duplamente lavado com 1 mL de etanol 70% e ressuscitado em 100 µL de água milli-Q para o armazenamento em freezer a -20°C e posterior utilização.

Reação de Polimerase em Cadeia Para Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

O DNA obtido de sementes e plantas foi utilizado para a detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ empregando a técnica convencional de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), sendo esta qualitativa de alta precisão e sensibilidade.

Para a reação de PCR e detecção da bactéria em plantas foi utilizado um par de *primers* (A2/J5) específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ (HOCQUELLET et al., 1999), sendo as duas espécies distinguidas pelo tamanho do fragmento de DNA amplificado. Para a primeira espécie é amplificado um fragmento de 703 pb, e para a segunda um fragmento de 669 pb (HOCQUELLET et al., 1999). Para reação de PCR e detecção da bactéria em sementes foi utilizado o par de *primers* A2/J5, e um novo PCR foi feito para confirmar os resultados utilizando o par de *primers* Oi1/Oi2c (JAGOEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

As amostras foram submetidas a duas amplificações de 35 ciclos de 92°C por 20 segundos para desnaturação, 62°C por 20 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão dos fragmentos de DNA. Posteriormente, o produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1% corado com 7 µL de brometo de etídio (10 mg/ml) para 100 mL de gel, para separação e visualização em luz ultra-violeta e fotodocumentação em sistema de captura de imagens L-PIX HE, Loocus Biotecnologia®.

RESULTADOS

Detecção em Sementes

Para detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em sementes, foram realizadas 90 reações de PCR, compreendendo amostras de diferentes espécies cítricas, como laranjas doce dos cultivares Valência, Folha Murcha, Pera Rio, IPR-73 e Shamouti, tangerina Ponkan, e porta-enxertos limão Cravo e citrumelo Swingle. As sementes foram extraídas de frutos coletados de ramos sintomáticos, assintomáticos e de ramos aleatório, em relação ao HLB. Quando utilizado o par de *primers* A2/J5, foi detectado a presença da bactéria em pelo menos uma de duas amostras nos diferentes tecidos da semente (testa, tégma e endosperma) para cada cultivar de laranja doce, tangerina, limão Cravo e citrumelo Swingle (Figura 2). Porém, quando os testes foram repetidos utilizando-se o par de *primers* Oi1/Oi2c (JAGOEIX;

BOVÉ; GARNIER, 1994), os resultados foram todos negativos para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Figura 3).

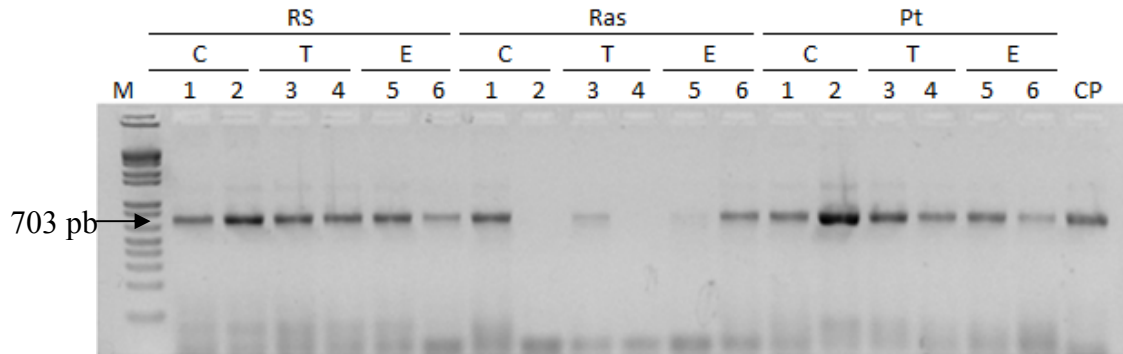


Figura 2 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em diferentes partes das sementes de laranja doce cultivar Valência com os *primers* A2/J5. Linha M: marcador 1 kp plus; linhas 1 e 2 amostras de testa (C); linhas 3 e 4 amostras de tegma (T); linhas 5 e 6 amostras de endosperma mais embrião(E); linha CP controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’; RS: coleta dos frutos em ramos sintomáticos; Ras: coleta dos frutos em ramos assintomáticos e Pt: coleta dos frutos aleatoriamente em uma planta sintomática.

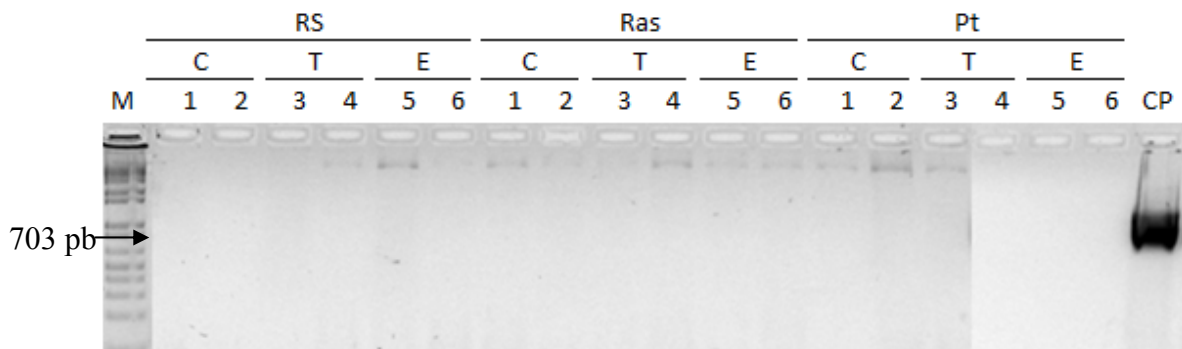


Figura 3 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em diferentes partes das sementes de laranja doce cultivar Valência com os *primers* Oi1/Oi2c. Linha M: marcador 1 kp plus; linhas 1 e 2 amostras de testa (C); linhas 3 e 4 amostras de tegma (T); linhas 5 e 6 amostras de endosperma mais embrião(E); linha CP controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’; RS: coleta dos frutos em ramos sintomáticos; Ras: coleta dos frutos em ramos assintomáticos e Pt: coleta dos frutos aleatoriamente em uma planta sintomática.

Detecção em Plantas

Para a detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em plantas, foram testadas um total de 184 amostras compostas de cinco plantas, totalizando 920 plantas, compreendendo diferentes espécies e cultivares de citros. Foram realizadas mais de 560 reações de PCR.

Plantas do cultivar de laranja doce Folha Murcha foram analisadas 18 meses após o transplantio. Dentre as 48 amostras compostas, compreendendo 240 plantas apenas uma amostra apresentou resultado positivo (Figura 4). As cinco plantas desta amostra foram examinadas individualmente e destas apenas duas plantas foram confirmadas por PCR como positivas para presença da bactéria (Figura 5). Entretanto, análises posteriores, aos 25 meses após sementeira, não confirmaram os resultados obtidos anteriormente (Figura 6).

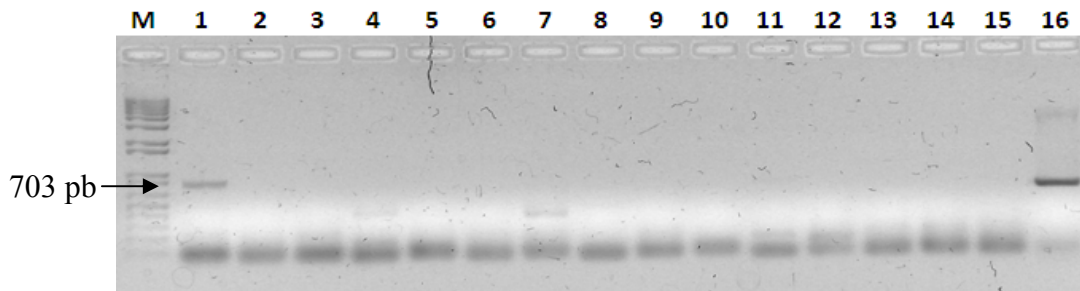


Figura 4 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 18 meses após transplantio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 16 amostras compostas; linha 16 controle positivo da reação para ‘*Ca. L. asiaticus*’.

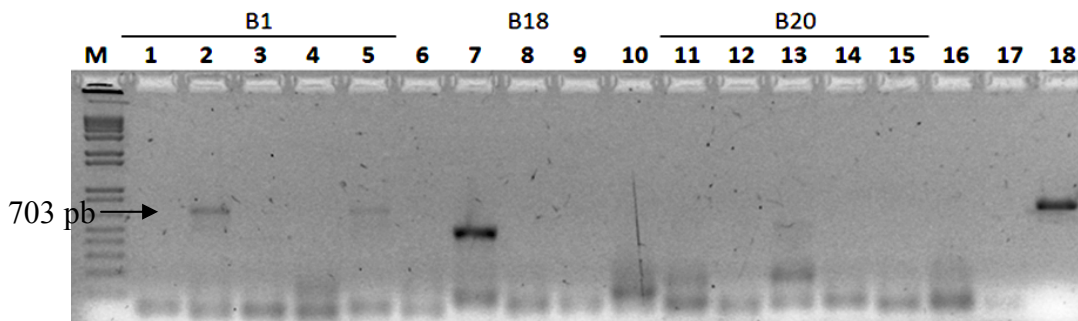


Figura 5 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 18 meses após transplantio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 5 amostras simples correspondentes da amostra composta B1; linhas 6 a 10 amostras simples correspondentes da amostra composta B18; linhas 11 a 15 amostras simples correspondentes a amostra composta B20; linha 16 controle negativo da extração de DNA; Linha 17 controle negativo da reação; Linha 18 controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’;

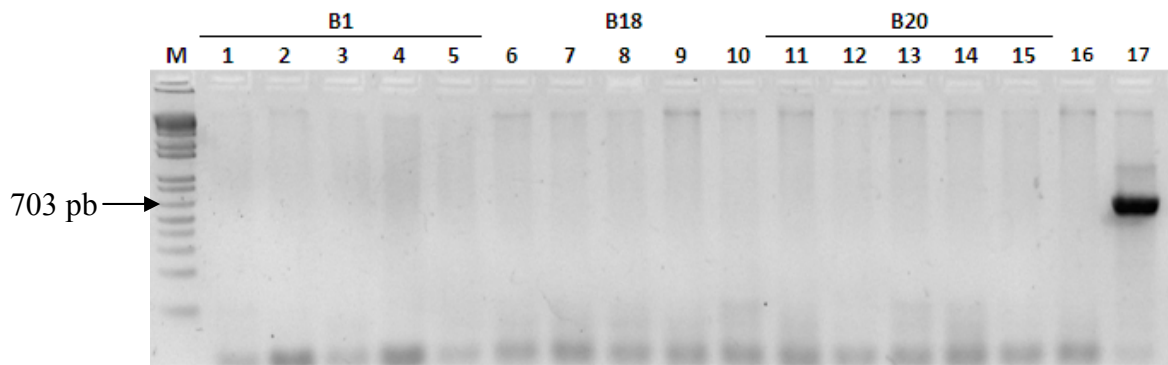


Figura 6 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja do cultivar Folha Murcha aos 25 meses após o transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus; linhas 1 a 5 amostras simples correspondentes da amostra composta B1; linhas 6 a 10 amostras simples correspondentes da amostra composta B18; linhas 11 a 15 amostras simples correspondentes a amostra composta B20; linha 16 controle negativo da extração de DNA; Linha 17 controle negativo da reação; Linha 18 controle positivo para ‘*Ca. L. asiaticus*’;

Para as demais espécies cítricas, laranjas doce dos cultivares Pera Rio, IPR-73 e Shamouti, as análises de PCR foram feitas cinco meses após o transplântio, com um total de 162 amostras compreendendo 810 plantas. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Figura 7). Além disso, nenhuma planta apresentou sintomas típicos de HLB, nem mesmo as plantas de laranja doce Folha Murcha aos 18 meses após sementeira.

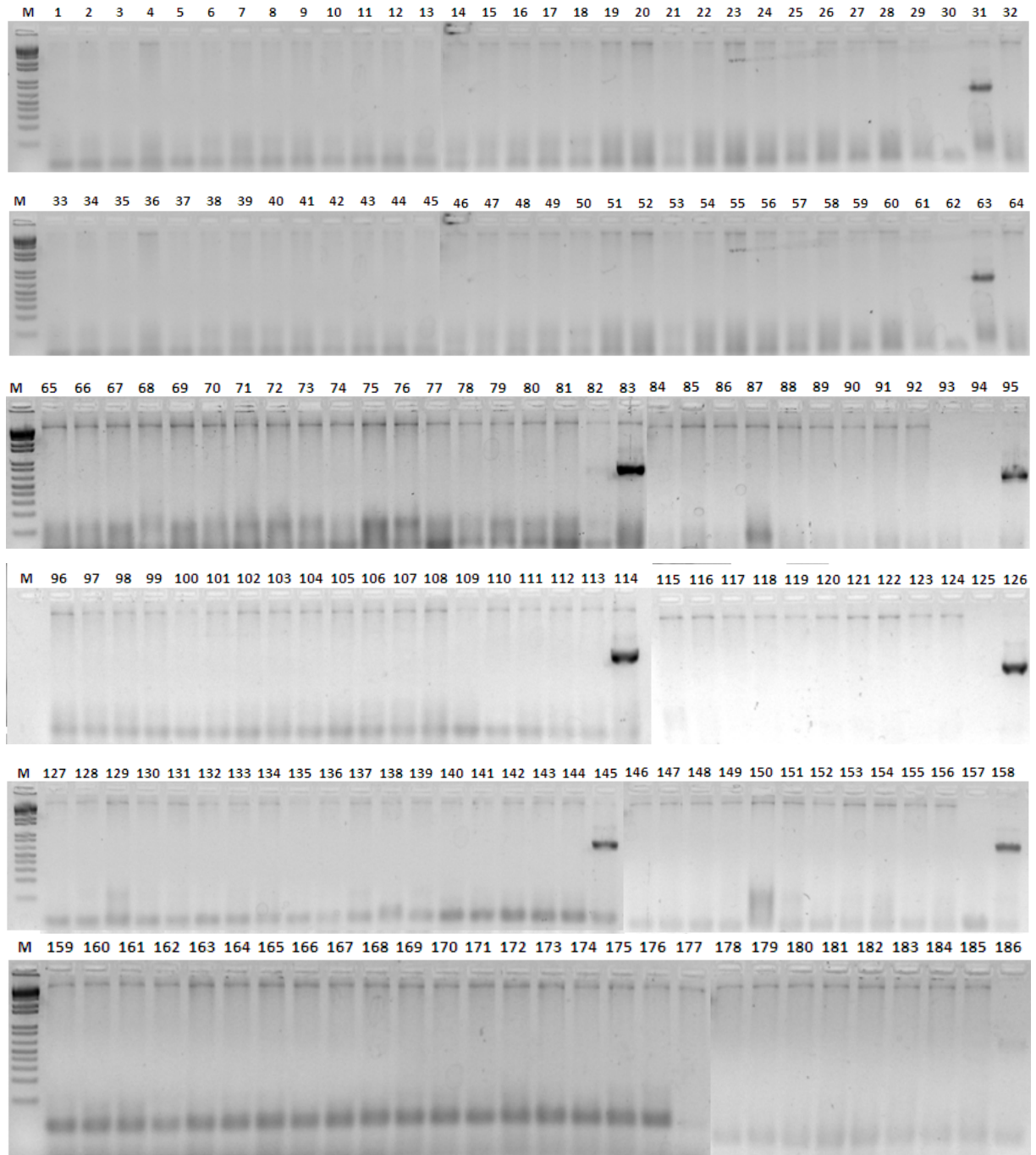


Figura 7 – Detecção de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plântulas de laranja dos cultivares Pera Rio, IPR-73 e Shamouti aos 5 meses após transplântio. Gel de agarose do produto da amplificação da PCR usando os *primers* A2/J5. Linha M: marcador molecular 1 kb plus.; linhas 1 a 29, 33 a 61, 65 a 81, 84 a 92, 96 a 112, 115 a 124, 127 a 143, 146 a 156, 159 a 175, 178 a 184 amostras compostas; linhas 31, 63, 82, 83, 95, 126, 158, 186 controle positivo da reação; linhas 114, 145 e 177 positivas da extração; linhas 30, 62, 93, 125, 157, 185 controle negativo da reação e amostras 32, 64, 113, 144, 176 negativas da extração para ‘*Ca. L. asiaticus*’.

DISCUSSÃO

O agente causal do HLB coloniza os vasos do floema do hospedeiro e é sistemicamente distribuído pela planta, podendo a partir de uma inoculação a 40-50 cm do solo, ser detectado no sistema radicular em aproximadamente 26 semanas (SHOKROLLAH et al., 2009; TATINENI et al., 2008). A bactéria pode ainda ser detectada em quase todas as partes da planta como raízes, nervura central de folhas, pedúnculo, columela, casca de semente, casca de tronco e inclusive em tecido floral, como pétalas, pistilos e estames de flores em ramos sintomáticos (TATINENI et al., 2008). A presença da bactéria em partes florais serve como indício de que existe a possibilidade da contaminação interna da semente, como por exemplo, o embrião.

Walcott; Gitaitis; Castro (2002) observaram transmissão por sementes de até 40% quando inocularam flores de melancia com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e *Pantoea ananatis*. Isto indica que as flores podem ser porta de entrada de micro-organismos para o interior das sementes, sendo o micro-organismo patogênico ou não à espécie hospedeira. Entretanto, estudos realizados para determinar a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em diferentes partes de uma planta infectada pela bactéria mostraram os tecidos embrionários e endosperma livres do patógeno (TATINENI et al. 2008). Zhou et al. (2008), relataram a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em sementes de Vinca (*Catharantus roseus*) inoculadas artificialmente por *Cuscuta pentagona*, em um estudo sobre a transmissão por sementes de ‘*Ca. L. asiaticus*’.

Os resultados do presente estudo utilizando o par de *primers* A2/J5 em teste de PCR, para diferentes tecidos de sementes de laranjas doce, dos cultivares Pera Rio, IPR-73, Shamouti, Folha Murcha, tangerina Ponkan, limão Cravo e citrumelo Swingle, mostraram que todas as partes das sementes como testa, tégma e endosperma mais embrião estavam infectadas por ‘*Ca. L. asiaticus*’, em pelo menos uma das repetições avaliadas (Figura 1). Entretanto não foi possível detectar a bactéria nas mesmas amostras quando foi utilizado o par de *primers* Oi1/Oi2c na PCR (Figura 2).

O par de *primers* A2/J5 foi desenhado a partir da região 16S rDNA, que codifica um gene para a produção de proteína ribossomal. Este par de *primers* foi testado para microorganismos patogênicos comuns a plantas cítricas, e foi observada alta especificidade para ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. africanus*’, com 95% dos testes realizados confirmados com os *primers* Oi1/Oi2c (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996). Entretanto, apesar de pouco freqüente a não confirmação da presença da bactéria do HLB com os *primers* Oi1/Oi2c pode ocorrer, da mesma forma o contrário também é verdadeiro (HOCQUELLET et al., 1999).

Além disso, os *primers* A2/J5 não foram testado para a presença de microorganismos endofíticos nas plantas cítricas (HOCQUELLET et al., 1999).

Sagaram et al. (2009) analisaram a diversidade microbiológica de plantas cítricas contaminadas com a bactéria do HLB, e observaram a presença constante de algumas bactérias endofíticas, em ramos sintomáticos para HLB, como *Phyllobacter*, *Dehalicoccoides*, *Brevundimonas* sp., *Sphingobacterium*, *Verrucomicrobia*, *Caulobacter* e *Syntrophobacter*. A maioria dessas bactérias são sabidamente transmitidas por insetos vetores (SAGARAM et al., 2009). Ainda não se sabe qual o envolvimento destas bactérias com o HLB (SAGARAM et al., 2009).

Os microorganismos encontrados por Sagaram et al. (2009) são diferentes dos relatados em plantas cítricas no Brasil. Microorganismos como *Curtobacterum flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp., *Nocardia* sp. e *Pantoea agglomerans* foram relatados em ramos com sintomas de CVC, sendo algumas destas bactérias antagônicas para a manifestação da doença. Entretanto, não se tem relatos desses endofíticos em associação positiva com patógenos de plantas (ARAÚJO et al., 2002).

A falta de testes para endofíticos comuns em plantas cítricas utilizando o par de *primers* A2/J5 pode indicar a falha destes na detecção específica de ‘*Ca. L. asiaticus*’ na presença de outros microorganismos. Isso foi observado nas análises das sementes, pois quando foram testadas diferentes partes das sementes de diferentes espécies cítricas com os *primers* A2/J5 (Figura 1) todas foram positivas, porém, o mesmo não foi confirmado com o uso dos *primers* Oi1/Oi2c (Figura 2). Entretanto estudos adicionais deverão ser realizados para esclarecer estes resultados.

Os resultados das análises de transmissão de ‘*Ca. L. asiaticus*’ de sementes para plantas mostraram duas plantas de laranja doce do cultivar Folha Murcha positivas para a presença da bactéria 18 meses após o transplântio, utilizando o par de *primers* A2/J5. A bactéria foi detectada em tecidos foliares e também em casca do troco das plantas. Em avaliações posteriores, aos 25 meses após o transplântio não foi detectada a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em tecidos foliares e de casca do tronco dessas mesmas plantas. Para as demais espécies avaliadas não foi detectado a presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ em plantas cinco meses após o transplântio das mesmas. Também não foram observados sintomas típicos de HLB em nenhuma das 920 plantas avaliadas durante todo o período deste estudo. Estas plantas ainda continuam sob observações.

Em relação aos resultados das análises de plântulas, os dados obtidos corroboram com os apresentados por Albrecht e Bowman (2009). Esses autores após

analisarem aproximadamente 680 plantas de diferentes espécies de porta-enxerto, detectaram apenas duas plantas com PCR positivo para presença de ‘*Ca. L. asiaticus*’ cinco meses após a semeadura o que corresponde a 0,3% de plantas infectadas. Entretanto, após 15 meses os mesmos resultados não se confirmaram (ALBRECHT; BOWMAN, 2009). Para confirmar esses resultados com porta-enxerto, foram realizadas análises de 900 plantas de laranja doce do cultivar Valencia onde foi obtido 0,7% de transmissão, porém novamente análises posteriores não confirmaram a presença da bactéria (ALBRECHT; BOWMAN, 2009). Outros autores como Benyon et al. (2010), Hartung et al. (2008) e Graham et al. (2008) também relataram resultados negativos na transmissão da bactéria do HLB para diferentes espécies cítricas.

Avaliando os efeitos do HLB nos frutos e sementes cítricas, Albrecht e Bowman (2009) observaram redução no peso e na porcentagem de germinação das sementes de frutos contaminados. Ainda neste estudo, os autores acompanharam visualmente aproximadamente 7000 mil mudas de porta-enxerto e laranja doce, e não observaram nenhum sintoma típico de HLB, em contraste às observações de Tirtawidjaja (1981). Destas 687 mudas de seis diferentes genótipos de porta enxerto e 431 mudas de laranja doce do cultivar Valência examinadas pelo teste de PCR e apresentaram resultados negativos para presença da bactéria (ALBRECHT; BOWMAN, 2009).

Hartung et al. (2010) trabalhando com aproximadamente 700 plantas de diversas espécies cítricas, oriundas de sementes de frutos contaminados com ‘*Ca. L. asiaticus*’, concluíram sobre a falta de evidências para a transmissão da bactéria por sementes. Os autores relatam ainda sintomas parecidos com HLB em plântulas de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e relacionaram os sintomas observados à variabilidade genética da espécie.

Barreiras morfológicas nas sementes limitam o acesso direto dos vasos condutores até o embrião. Por conta disso, bactérias restritas a estes tecidos eram tidas como não transmissíveis via semente, como por exemplo *Xylella fastidiosa*, uma bactéria restrita aos vasos do xilema e agente causal da Clorose Variiegada dos Citros (CVC). A bactéria da CVC causa uma importante doença dos citros e que foi recentemente detectada em casca e embrião de sementes de laranja doce com CVC. Ela também apresentou transmissão por sementes a uma taxa de 20 a 30%, dependendo do cultivar (LI et al., 2003). Um ponto a ser esclarecido é como ocorre este processo de transmissão, ou seja, a passagem da bactéria dos vasos do xilema da planta ‘mãe’ para o embrião da semente e posteriormente para os vasos da plântula.

Diferentes dos dados obtidos em estudos de transmissão de ‘*Ca. L. asiaticus*’ por sementes em espécies cítricas, Zhou et al. (2008) estudaram a transmissão da bactéria do HLB em Vinca (*Catharanthus roseus*), uma planta utilizada experimentalmente e não hospedeira natural da bactéria. Esses autores relataram transmissão por sementes de ‘*Ca. L. asiaticus*’ relativamente alta, em torno de 50 a 80% em plantas inoculadas artificialmente por *Cuscuta pentagona*.

A detecção de microorganismos em tecidos de plantas baseada na presença de seqüências de DNA é altamente sensível, porém não determinam a viabilidade da célula bacteriana. Isto é, a detecção da bactéria não indica que exista uma relação de parasitismo ou patogenicidade ativa. Além disso, falsos positivos podem resultar na contaminação cruzada (WALCOTT et al., 2003). Entretanto, Albrecht e Bowman (2009) consideraram em seus estudos de transmissão que a detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ durante os primeiros estádios de desenvolvimento das mudas, pode ocorrer por conta da contaminação por células bacterianas mortas, ou mesmo DNA presente nos tecidos das sementes durante o desenvolvimento da muda cítrica. Isto poderia justificar assim a detecção inicial da bactéria do HLB, seguido do desaparecimento desta bactéria com o passar do tempo. Porém, dados obtidos no presente estudo mostram detecção aos 18 meses após o transplante. Esta dúvida poderia ser solucionada empregando teste desenvolvido e sugerido por Trivedi et al. (2009), onde os autores quantificam as células viáveis de ‘*Ca. L. asiaticus*’ com auxílio de etídio monoazidico (EMA) que auxilia na diferenciação de células viáveis de inviáveis no teste de PCR em tempo real ou quantitativo PCR (qPCR).

CONCLUSÕES

A presença de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ é negativa em sementes de laranjas, tangerina, limão Cravo e citrumelo Swingle.

‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ não é detectado em mudas de diferentes espécies cítricas provenientes de sementes coletadas de frutos oriundos de plantas com HLB.

Existem evidências de transmissão por sementes de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em mudas de laranja doce do cultivar Folha Murcha.

Não são observados sintomas típicos de HLB em nenhuma das plantas de diferentes espécies cítricas avaliadas neste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor. Ao Instituto Agronômico do Paraná pela concessão da estrutura física e pessoal no desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and Huanglongbing effects on Citrus seeds and seedlings. **HortScience**, n.44, p.1967-1973. 2009.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.
- BELASQUE JR, J.B.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.3, 2009.
- BENYON, L.; ZHOU, L.; DUAN, Y.; MCCOLLUM, G; POWELL, C.; HALL, D.; IREY, M.; GOTTSWALD, T. Seed transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus without typical huanglongbing. **Phytopathology**, v.99, n.6, suppl., p.s11, 2009.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.7-37, 2006.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; DO AMARAL, A.M.; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.1382, 2004.
- DAGULO, L.; DANYLUK, M.D.; SPANN, T.M.; VALIM, M.F.; GOODRICH-SCHNEIDER, R.; SIMS, C.; ROUSEFF, R. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus Greening (Huanglongbing). **Journal of Food Science**. v.75, n.2, p.199-207, 2010.
- GRAHAM, J.H.; IREY, M.S.; DAWSON, W.O.; HALL, D.; DOAN, Y. Assessment of transmission of ‘*Liberibacter asiaticus*’ from seed to seedlings of 'Pineapple' sweet orange and Carrizo citrange. **International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, Florida, p. 174, 2008.

HARTUNG, J.S.; HALBERT, S.; SHATTERS, R. Can *Ca. Liberibacter asiaticus* be transmitted through citrus seed? In: **Proc. Intl. Res. Conf. on Huanglongbing**, Orlando, Florida, p. 166, 2008.

HARTUNG, J.S.; HALBERT, S.E.; PELZ-STELINSKI, K.; BRLANSKY, R.H.; CHEN, C.; GMITTER, F.G. Lack of evidence for transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through citrus seed taken from affected fruit. **Plant Disease**, v.94, n.10, p.1200-1205, 2010.

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

LI, W.B.; PRIA JR, W.D.; LACAVALA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, v.93, n.8, 2003.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Standford, v.8, n.19, p.4321-4325, 1980.

SAGARAM, U.S.; DEANGELIS, K.M.; TRIVEDI, P.; ANDERSEN, G.L.; LU, S.; WANG, N. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected citrus using PhyloChip Arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1566-1574, 2009.

SHOKROLLAH, H.; ABDULLAH, T.L.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Ultrastructures of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and its damage in huanglongbing (HLB) infected citrus. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.5897-5901, 2010.

TATINENI, S.; SHANKAR SAGARAM, U.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In plants distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, v.98, p.592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.173-179, 2005.

TIRTAWIDJAJA, S. Insect, dodder and seed transmissions of citrus vein phloem degeneration (CVPD). **International Society of Citriculture**. v.1, p.469-471, 1981.

TRIVEDI, P.; SAGARAM, U.S.; KIM, J.S.; BRLANSKY, R.H.; ROGERS, M.E.; STELINSKI, L.L.; OSWALT, C.; WANG, N. Quantification of viable ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in host using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **Europe Journal Plant Pathology**, v.124, p.553-563, 2009.

WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D; CASTRO, A.C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax oenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, v. 93, p-528-534, 2003.

ZHOU, L.; DUAN, Y.; GABRIEL, D.; GOTTWALD, T.R. Seed transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in periwinkle and dodder resulted in low bacterial titer and very mild disease in periwinkle. **Phytopathology**, v.98, n.6, suppl., p.s181. 2008

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em sementes e plântulas não foi confirmada utilizando o teste da PCR com os *primers* específicos para detecção da bactéria do HLB.

Existem evidências de que ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ possa ser transmitida por sementes cítricas, porém, estudos mais aprofundados deveram ser realizados. Novas ferramentas deverão ser empregadas para teste desta hipótese. As plantas utilizadas neste estudo deverão continuar sob ambiente protegido para observações futuras.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, T.L.; SHOKROLLAH, H.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.4007-4015, 2009.
- AFONSO, A.C.; SILVA, M.M. Laranja: custo de produção. In: ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA: **Agrianual 2000**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 1999. p.302-303.
- AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of Seed Pathology**, v.1. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1987.
- AGGOUR, A.R.; COYNE, D.P.; VIDAVER, A.K.; ESKRIDGE, K.M. Transmission of the common blight pathogen in bean seed. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.114, p.1002-1008, 1989.
- AMARO, A.A.; MAIA, M.L.; GONZALES, M.A. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: **Clorose Variegada dos Citros**. Bebedouro: Fundecitrus/E.E. Citricultura de Bebedouro, p.123-135, 1997.
- BASTIANEL, C.; GARNIER-SEMANCIK, M.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J.M.; EVEILLARD, S. Diversity of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*,' based on the *omp* gene sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p. 6473–6478, 2005.
- BELASQUE JR, J.; BARBOSA, J.C.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.1-9, 2010.
- BELASQUE JR, J.; FERNANDES, N.G.; MASSARI, C.A. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, 2009.
- BELASQUE JR, J.B.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.3, 2009.
- BENYON, L.; ZHOU, L.; DUAN, Y.; MCCOLLUM, G.; POWELL, C.; HALL, D.; IREY, M.; GOTTWALD, T. Seed transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus without typical huanglongbing. **Phytopathology**, v.99, n.6, suppl., p.s11, 2009.
- BENYON, L.; ZHOU, L.; DUAN, Y.; POWELL, C.; GOTTWALD, T.R. Improved detection of low-titer, non-lethal, seed transmitted *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus, Periwinkle and Dodder using nested PCR. **International Research of Citrus Huanglongbing**. Proceedings Dec, p.120-123, 2008.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.7-37, 2006.

BOVÉ, J.M.; CALAVAN, E.C.; CAPPOR, S.P.; CORTEZ, R.E.; SCHWARZ, R.E. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India Citrus Decline, and Philippines leaf mottling diseases. **6th Conference of International Organization of Citrus Virologists**, Richmond, p.12-15, 1974.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* kuwayama. **6th Conference of International Organization of Citrus Virologists**, University of California Richmond. p. 43-49, 1974

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JR., J.; DO AMARAL, A.M.; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing (*'Candidatus Liberibacter asiaticus'*) in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.1382, 2004

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.29, p109-136, 1991.

DARRASSE, A.; BUREAU, C.; SAMSON, R.; MORRIS, C.E.; JACQUES, M.A. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.203-215, 2007.

DRAGONE, D.S.; RAMOS, C.C.; MELARATO, M.; NEVES, E.M. Custo de formação de pomares em presença de Clorose Variegada de Citros: estudos de caso. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.1, p.39-48, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. Ceres, 1988. 649 p.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVE, J.M. The organism is a gram-negative bacterium. **9th Conference of the International Organization of Citrus Virologist**. Riverside, University of California, p.115–124. 1984.

GARNIER, M.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P.R.; ROUX, H.F.; BOVÉ, J.M. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in 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**, London, n. 50, p. 2119-2125, 2000.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, 2007.

GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29. p.109-136, 1991.

GRAHAM, J.H.; IREY, M.S.; DAWSON, W.O.; HALL, D.; DOAN, Y. Assessment of transmission of '*Liberibacter asiaticus*' from seed to seedlings of 'Pineapple' sweet orange and Carrizo citrange. **International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, Florida, p. 174, 2008.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v.87, p.330-353, 2004.

HALBERT, S.E. The discovery of huanglongbing in Florida. **Proceeding of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop**. Florida Citrus Mutual. Orlando, p.H- 3, 2005.

HARTUNG, J.S.; HALBERT, S.; SHATTERS, R. Can '*Ca. Liberibacter asiaticus*' be transmitted through citrus seed? In: **Proc. Intl. Res. Conf. on Huanglongbing**, Orlando, Florida, p. 166, 2008.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Edição de Duprat; Iobe Propaganda, 1987. 296p.

HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Production and evaluation of non radioactive probes for the detection of two '*Candidatus Liberobacter*' species associated with citrus huanglongbing (greening). **Molecular and Cellular Probes**, v.11, p.433-438, 1997.

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

HUNG, T.F.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. 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**, Oxford, n. 53, p. 96-102, 2004.

HUNG, T.H.; WU, M.L.; SU, H.J. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.599- 604, 1999.

HUNG, T.H.; WU, M.L.; SU, H.J. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.321- 326, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201010_5.shtm>. Acesso em: out. 2010.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloemlimited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systemic Bacteriology**, v.44, p.379-386, 1994.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. PCR detection of the two '*Candidatus liberobacter*' species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p.43-50, 1996.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberobacter africanum*', the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.224- 227, 1997.

KAUFMAN, P.H.; LEBEN, C. Soybean bacterial blight: Flower inoculation studies. **Phytopathology**, v.64, p.329-331, 2004.

LALLEMAND, J.; FOS, A.; BOVÉ, J.M. Transmission de La bacterie associe à la forme africaine de la maladie du greening de stubborn, ou dès maladies similaires. **Fruits**, Montpellier, v.25, p.455-465, 1970.

LEITE JR, R.P.; MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v.9, p.3-7, 1990.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. **Plant Disease**, v.92, n.1, p.21-24, 2008.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, v.93, p.257-262, 2009a.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft Transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, v.99, n.3, p.301-306, 2009b.

MARTÍNEZ, Y.; LLAUGER, R.; BATISTA, L.; LUIS, M.; IGLESIA, A.; COLLAZO, C.; PEÑA, I.; CASÍN, J.C.; CUETO, J.; TABLADA, L.M. First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with Huanglongbing in Cuba. **Plant Pathology**, v.58, p.389, 2009.

NEVES, E.M. Motivos de otimismo. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v.19, n.12, p.36-38, dez. 1999.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015. **Laranja**. São Paulo, 2006.

NUNES, W.M.C.; SOUZA DE, E.B.; LEITE JR, R.P.; SALVADOR, C.A.; RINALDI, D.A.; FILHO, J.C.; PAIVA, P.G. Plano de ação para o controle de huanglongbing no Estado do Paraná, Brasil. **Citrus Research & Tecnology**, v.31, n.2, p.169-177, 2010.

OBERHOLZER, P.C.J.; HOFMEYR, J.D.J.; The nature and control of clonal senility in commercial varieties of citrus in South Africa. **Bulletin**, Pretoria, p.46, 1955.

RAYCHAUDHURI, S.P.; NARIANI, T.K.; LELE, V.C. SINGH, G.R. Greening and citrus decline in India. **5th INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTIS**, Swaziland. p.35-37. 1972.

SALIBE, A.A.; CORTEZ, R.E. Studies on the leaf mottling disease of citrus in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v.14, p.141-144, 1966.

SCORA, R.W. On the history and origin of Citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.102, p.369-375, 1975.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, L.; COOKE, P.; THAVEECHAI, D.N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v.99, n.5, p.408-486, 2009.

SHOKROLLAH, H.; ABDULLAH, T.L.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Ultrastructures of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and its damage in huanglongbing (HLB) infected citrus. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.5897-5901, 2010.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores, Parte 2, insetos, hospedeiros e inimigos naturais**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968.

SOBRINHO, J.T. Greening (HLB) X plantio super adensado. **Espaço citrícola**, a citricultura on-line. Agosto, setembro e outubro, 2008, nº 35. Disponível em: <<http://www.espacocitricola.eng.br/artigos.html>>. Acesso em: 12 jun. 2009.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in Fruit Breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In plants distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, v.98, p.592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1857-1862, 2005.

TIRTAWIDJAJA, S. Insect, dodder and seed transmissions of citrus vein phloem degeneration (CVPD). **International Society of Citriculture**, v.1, p.469-471, 1981.

WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D.; CASTRO, A.C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax oenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, v.93, p-528-534, 2003.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

XU, C.F.; XIA, Y.H.; LI, K.B.; KE, C. Further study on the transmission of citrus huanglongbing by psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 10., Riverside. **Proceedings...** Riverside. p.24-32, 1987.

ZHAO, X.Y. Citrus yellow shoot disease (huanglongbing) - a review. **International Society of Citriculture**, Tokyo, p.466-467, 1981.

ZHOU, L.; DUAN, Y.; GABRIEL, D.; GOTTWALD, T.R. Seed transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in periwinkle and dodder resulted in low bacterial titer and very mild disease in periwinkle. **Phytopathology**, v.98, n.6, suppl., p.s181. 2008.