

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ALINE VANESSA SAUER

**Variabilidade genética e variação estacional de '*Candidatus Liberibacter
asiaticus*' em citros no Paraná**

MARINGÁ-PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO-2014

ALINE VANESSA SAUER

Variabilidade genética e variação estacional de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em citros no Paraná

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

MARINGÁ-PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO-2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

| | |
|-------|--|
| S255v | <p>Sauer, Aline Vanessa Variabilidade genética e variação estacional de '<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>' em citrus no Paraná, 2014. 128 f. : il., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014.</p> <p>1. '<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>' - Diversidade. 2. PCR em tempo real. 3. Sequências simples repetidas (SSR). 4. DNA - Método de extração direta. I. Nunes, William Mário de Carvalho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.</p> <p>CDD 22. ED.634.304098162 JLM0001642</p> |
|-------|--|

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE VANESSA SAUER

Variabilidade genética e variação estacional de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em citros no Paraná

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Agronomia pela comissão julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Dr. Marcos Antônio Machado
Instituto Agronômico de Campinas (IAC)

Dr. Edson Luiz Furtado
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Dra. Rúbia de Oliveira Molina
Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR)

Dr. Dauri José Tessman
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Dr. William Mário de Carvalho Nunes
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Local de defesa: Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), Bloco S09, *campus* Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR.

Ao meu pai, João Vanderlei Sauer de Assis, por ter sido mais que um pai nesse período,

A minha mãe, Ivone Sauer, todo amor e dedicação exemplar,

Aos meus irmãos Juninho e Bruninho, por compreenderem os momentos de ausência,

Dedico!

E a Jesus Cristo, meu Mestre e meu Eterno Amor,

Ofereço!

“É como está escrito: ‘coisas que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem o coração humano imaginou’ (Is 64,4), tais são os bens que Deus tem preparado para aqueles que o amam.”

I Corintíós 2, 9.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por generosamente segurar firme em minhas mãos durante este período de crescimento pessoal e profissional, me concedendo saúde e determinação na realização deste sonho e de sonhos que antes pareciam tão distantes.

Ao Espírito Santo por conduzir e proteger cada um de meus passos, dando-me sabedoria, força e alegria nos momentos difíceis, nos melhores e mais importantes anos da minha vida.

Ao Professor Dr. William Mário de Carvalho Nunes, por se dispor à orientar-me de modo exemplar neste importante período profissional, pelo incentivo, apoio, compreensão, ensinamentos transmitidos e amizade.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), em especial aos funcionários Dr. Carlos Alexandre Zanutto e José Alcides Remolli, pelo auxílio técnico neste trabalho e pela amizade.

A Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB), em especial ao Sr. José Croce Filho, pela ajuda na implantação dos experimentos.

Aos Srs. Ademir Ferrari e família, Antonio Pratinha, José Gilberto Pratinha e Waldemar Zanini Junior por gentilmente disponibilizarem suas propriedades na implantação de experimentos.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em especial aos Pesquisadores Dr. Marcos Machado e Dr. Helvécio D. Colleta Filho, por gentilmente permitirem a utilização de seus equipamentos e laboratórios, e à aluna Silvia O. Dorta pelo auxílio.

Aos Pesquisadores Dr. Mariano Cambra e Dra. Maria Lopéz, por me acolherem em seu país e se disponibilizarem em me receber em seu laboratório, pela orientação, ensinamentos transmitidos e amizade.

Ao Pesquisador Dr. Edson Bertolini, por me fazer sentir-se ‘em casa’ mesmo estando em ‘terras estrangeiras’, por todos os cuidados dispensados à mim, pela valiosa dedicação e orientação, pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

Ao Pesquisador Dr. Antonio Olmos, por prontamente se disponibilizar em fazer-me sentir-se ‘em família’ estando eu fora do meu país, por toda atenção e dedicação; por disponibilizar seu laboratório, pela orientação e incentivo, ensinamentos transmitidos e amizade.

Ao ‘Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias’ (IVIA) por permitir minha estadia em suas instalações, à todos seus funcionários, em especial à Mari Carmen Martinez, e alunos, em especial aos alunos visitantes Wagner Vicente Pereira (ESALQ) e Mariana Moraes Vidal (USP) pelo auxílio e amizade.

A Guillermo Pablo Bernet pelo auxílio nas análises dos dados e Eduardo Vidal, pela atenção e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos alunos e ex-alunos do NBA, e alunos da UEM: Aline M. G. Orbolato, Araceli Sgobero, Bruna R. Barbieri, Diego H. P. Catani, Elisangela Mendes, Heraldo Takao Hashiguti, Hudson Souza, Inaiara Souza, Jéssica L. Rodrigues, Larissa S. Soares, Paula T. R. Nocchi, Ricardo Braido, Thiago Baudraz, Vander M. Brumatti e Vinicius O. Correia, pelo auxílio na condução dos trabalhos, companheirismo e amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, em especial ao Professor Dr. Dauri José Tessman, pela ética e entusiasmo com os quais desempenha seu ofício, pelo apoio e incentivo, pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial aos Srs. Amaurídio A. J. Santana, Eduardo L. Generoso, José Braz e Paulo Vituri, pela dedicação e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas.

BIOGRAFIA

Aline Vanessa Sauer, filha de João Vanderlei Sauer de Assis e de Ivone Sauer, nasceu aos 23 de janeiro de 1985, na cidade de Bandeirantes-Paraná.

Obteve o título de Engenheira Agrônoma aos 15 dias do mês de dezembro de 2006, pela Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná (FALM/UENP).

Em 26 de fevereiro de 2010, obteve o título de Mestre em Agronomia, área de Proteção de Plantas com enfoque em Fitopatologia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-Paraná.

Em março de 2010, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá (UEM), com a modalidade Doutorado Sanduíche no Exterior, área de concentração Proteção de Plantas, com enfoque em Fitopatologia, com estágio de doutoramento no ‘Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias’ (IVIA), em Moncada, Valência-Espanha, para obtenção do título de Doutora.

Variabilidade genética e variação estacional de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em citros no Paraná

RESUMO

Huanglongbing se destaca como a doença mais importante da citricultura no mundo. A ausência de materiais genéticos resistentes torna seu manejo difícil e oneroso. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade entre isolados estritamente relacionados, monitorar a população de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em plantas de citros na Região Noroeste do Paraná, bem como validar um método de extração direto de DNA para detecção em PCR em tempo real. O estudo da variabilidade foi conduzido em plantas cítricas em pomar experimental (Maringá-PR), através do uso microssatélites associados com regiões contendo seqüências simples repetidas (SSR) da bactéria. A variação estacional da população bacteriana foi estudada em mudas de citros mantidas em casa de vegetação, em plantas de laranja doce em pomar experimental e plantas de lima ácida Tahiti em pomar comercial no município de Maringá-PR e em plantas de laranja doce em pomar comercial no município de Paranavaí-PR. A população bacteriana foi monitorada por PCR em tempo real através da coleta mensal de folhas sintomáticas a partir da detecção da bactéria na planta. Os métodos de preparação direto de amostra foram realizados com protocolo de detecção de PCR em tempo real com a utilização de sonda TaqMan®. A estrutura genética da população foi determinada incluindo 21 haplótipos agrupados em três grupos principais. O estudo revelou que a diversidade genética está presente na área desde o início da manifestação do HLB. Foram observadas diferenças significativas nos valores de Ct (*Cycle Threshold*) em amostras coletadas nas diferentes estações do ano e o outono foi a melhor época para a detecção da bactéria em plantas no campo. O método de extração direto foi validado e eficiente na detecção de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, demonstrando boa concordância com amostras cuja purificação de DNA foi realizada.

Palavras-chave: Diversidade de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. PCR em tempo real. Seqüências simples repetidas (SSR). Método de extração direta de DNA.

Genetic variability and seasonal variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus in Paraná

ABSTRACT

Huanglongbing stands out as the most important disease of citrus worldwide. The absence of genetic materials resistant makes its management difficult and costly. Thus, the aim of this study was to evaluate the variability among isolates closely related, monitor the population of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants in northwestern Paraná, and validate a method for direct extraction of DNA for real time PCR detection. The variability study was conducted in citrus plants in an experimental orchard (Maringá-PR) through the use of microsatellite regions associated with Simple Sequence Repeats (SSR) of the bacterium. Seasonal variation of the bacterial population was studied in citrus seedlings maintained in a greenhouse, in sweet orange plants in an experimental orchard, and Tahiti acid lime plants in a commercial orchard in Maringá, Paraná State, and still, sweet orange plants in a commercial orchard in Paranavaí, Paraná. The bacterial population was monitored by real-time PCR by collecting monthly symptomatic leaves from the detection of the bacterium in the plant. The methods of sample preparation were directly performed with detection protocol real-time PCR using TaqMan® probe. The population genetic structure was determined by including 21 haplotypes, grouped into three main groups. The research revealed that genetic diversity is present in the area since the beginning of the manifestation of HLB. There were significant differences in Ct (Cycle Threshold) in samples collected in different seasons, and autumn was the best time for detection of bacteria in plants in the field. The direct extraction method was validated and efficient to detect ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, showing similar agreement with samples whose DNA purification was performed.

Keywords: Diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. Real time PCR. Simple Sequence Repeats (SSR). Direct extraction method of DNA.

LISTA TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 Valores médios de Ct (<i>Cycle Threshold</i>) das estações do ano, obtidos por modelo linear misto para mudas de laranja doce em casa de vegetação | 633 |
| Tabela 2 Valores médios de Ct (<i>Cycle Threshold</i>) das estações do ano, obtidos por modelo linear misto para plantas das variedades laranja doce e lima ácida Tahiti em diferentes propriedades no noroeste do Paraná | 633 |
| Tabela 3 Distribuição dos sintomas de ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’ em plantas de citros monitoradas e protegidas contra reinfecção de <i>Diaphorina citri</i> (- sem sintomas; + sintomas localizados; ++ sintomas intensos; +++ sintomas intensos com amarelecimento intenso das folhas).. | 635 |

LISTA FIGURAS

- Figure 1 UPGMA dendrogram showing the genetic relationships of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates. Only bootstrap values > 30% are shown. 41
- Figure 2 Network diagram from eBURST analysis. The solid blue circle in the diagram indicates the predicted founder haplotype 12-11-8, and the solid yellow circles indicate the sub-founder haplotypes 13-11-8 and 13-11-7. A larger solid circle implies a higher number of isolates. 43
- Figura 1 Esquematização da divisão em setores (I, II, III, IV) da copa das plantas infectadas por ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, monitoradas e protegidas contra reinfecção de *Diaphorina citri*, para coleta mensal de material vegetal para avaliação da variação estacional de populações de *Huanglongbing* (HLB) por PCR em tempo real..... 60
- Figure 1 Comparison of purified DNA and spot procedures of sample preparation prior different real-time PCR protocols for detection of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in 358 adult citrus trees. A: purified DNA Coletta-Filho real-time PCR (DNA by C-F) *versus* spot of crude plant extract analyzed by the kit (spot kit), kappa index 0.766 ± 0.052 ; B: DNA C-F *versus* spot C-F, kappa index 0.719 ± 0.052 ; C: spot C-F *versus* spot kit, kappa index 0.600 ± 0.052 83

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | XVII |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Importância da citricultura no Brasil e no mundo | 3 |
| 2.2 Doenças de citros..... | 5 |
| 2.3 <i>Huanglongbing</i> (HLB) | 6 |
| 2.3.1 Sintomas | 7 |
| 2.3.2 Agente causal..... | 8 |
| 2.3.3 Variabilidade do agente causal | 10 |
| 2.3.4 Transmissão | 12 |
| 2.3.4.1 Transmissão por enxertia..... | 12 |
| 2.3.4.2 Transmissão por insetos vetores | 13 |
| 2.3.5 Diagnóstico..... | 14 |
| 2.3.6 Quantificação da bactéria | 16 |
| 2.3.7 Resistência..... | 18 |
| 2.3.8 Manejo e controle da doença..... | 18 |
| REFERÊNCIAS | 21 |

CAPÍTULO I

Multilocus microsatellite typing of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in a brazilian citrus orchard

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 33 |
| RESUMO..... | 34 |
| 1. INTRODUCTION | 35 |
| 2. MATERIALS AND METHODS..... | 36 |
| 2.1 Surveys for <i>huanglongbing</i> detection..... | 36 |
| 2.2 Plant material and DNA purification..... | 36 |
| 2.3 Real-time PCR for ‘ <i>Ca. Liberibacter</i> ’ species detection and identification | 37 |
| 2.4 PCR amplification of the three microsatellite loci of ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ | 37 |
| 2.5 Haplotypes and genetic diversity..... | 38 |
| 2.6 Genetic structure analysis | 38 |

| | |
|---|---------------------------------------|
| 3. RESULTS | 39 |
| 3.1 <i>Huanglongbing</i> diagnosis and ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ identification | 39 |
| 3.2 Microsatellite loci amplification and alleles determination | 39 |
| 3.3 Genetic diversity and genetic structure of the population | 39 |
| 4. DISCUSSION | 43 |
| 5. CONCLUSIONS | 45 |
| REFERENCES | 46 |
| SUPPLEMENTARY MATERIAL | ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.9 |

CAPÍTULO II

Variação estacional de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ em citros no Estado do Paraná

| | |
|---|------------|
| RESUMO | 55 |
| ABSTRACT | 56 |
| 1. INTRODUÇÃO | 577 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 588 |
| 2.1 Levantamentos e diagnóstico de <i>huanglongbing</i> | 588 |
| 2.2 Instalação do experimento..... | 59 |
| 2.2.1 Parcelas no campo | 599 |
| 2.2.2 Parcela em casa de vegetação | 60 |
| 2.3 Coleta de material..... | 60 |
| 2.4 Extração e quantificação de DNA | 61 |
| 2.5 PCR quantitativo..... | 61 |
| 2.6 Análises estatísticas | 622 |
| 3. RESULTADOS | 622 |
| 4. DISCUSSÃO | 666 |
| REFERÊNCIAS | 70 |
| ANEXOS | 73 |

CAPÍTULO III
Spot real-time PCR for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants

| | |
|---|------------|
| ABSTRACT | 76 |
| RESUMO..... | 77 |
| 1. INTRODUCTION | 78 |
| 2. MATERIALS AND METHODS..... | 80 |
| 2.1 Plant material..... | 80 |
| 2.2 Extract preparation and DNA purification | 80 |
| 2.3 Real-time PCR protocol..... | 800 |
| 2.4 Sample preparation by the spot procedure | 81 |
| 2.5 Comparison of DNA extraction and spot procedures of sample preparation..... | 811 |
| 3. RESULTS..... | 82 |
| 4. DISCUSSION..... | 844 |
| REFERENCES | 866 |
| ANNEX..... | 920 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, se apresenta como uma das mais devastadoras doenças da citricultura mundial por tornar as plantas rapidamente improdutivas e seus frutos impróprios para o consumo (Da Graça, 1991). Também afeta a qualidade da fruta para industrialização, reduzindo o teor de suco, aumento da acidez, grau Brix e relação entre acidez e °B (Ratio) (Bassanezi et al., 2009).

Os sintomas da doença normalmente se iniciam em ramos isolados da planta, que se destacam por apresentarem coloração amarelada entre os ramos saudáveis. Com o passar do tempo, os sintomas progredem tornando toda a planta amarelada (Bové, 2006). As folhas se apresentam com aparência mosqueada, de coloração alternada entre tons de verde claro, verde escuro e amarelo, não apresentando delimitações entre as cores (Chung e Brlansky, 2005; Feichtenberger et al., 2005; Bové, 2006). Frutos sintomáticos são menores, defeituosos, assimétricos, com coloração externa irregular, podendo apresentar inversão da maturação. Internamente é possível observar sementes abortadas, deslocamento da columela conferindo assimetria ao fruto, além de maturação interna desuniforme e coloração marrom a castanho dos feixes vasculares (Bové, 2006).

A doença é causada por bactérias Gram-negativas de crescimento limitado aos vasos do floema (Jagoueix et al., 1996), denominada ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. e inclui as espécies ‘*Ca. Liberibacter africanus*’, ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. A espécie asiática ocorre na Ásia, Península Arábica, Brasil e Estados Unidos (Da Graça, 1991). Nas Américas, *Huanglongbing* foi relatada pela primeira vez no Brasil, no Estado de São Paulo em pomares de laranja doce em 2004 (Coletta-Filho et al., 2004) e no Estado do Paraná, a doença foi constatada em 2007 (Nunes et al., 2007). Em 2006 a doença foi detectada na Flórida, EUA (Bové, 2006). No território brasileiro a espécie asiática predomina desde 2008 (Lopez et al., 2009a).

Os vetores desta bactéria são duas espécies de psilídeos: *Diaphorina citri* e *Trioza erythrae*, sendo esta última apenas encontrada na África (Da Graça, 1991; Chung e Brlansky, 2005). *Cacopsylla citrisuga* foi recentemente relatado na China como portador da bactéria ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Cen et al., 2012). Borbulhas contaminadas originando mudas doentes constituem em eficaz meio de disseminação da doença à longas distâncias (Lopes et al., 2009b).

Todas as espécies de citros são afetadas pela doença que causa o rápido declínio das plantas. As variedades de laranjas doces (*Citrus cinenses* L. Osbeck) e tangerinas (*C. reticulata* Blanco) são mais susceptíveis à doença, enquanto os pomelos (*C. paradisi*) e limão rugoso (*C. jambiri*) se apresentam mais tolerantes (Tomimura et al., 2009). Não existem variedades completamente resistentes aos patógenos (Folimonova et al., 2009).

O estudo da diversidade genética de '*Ca. Liberibacter*' spp. pode auxiliar a comunidade científica ao elucidar dúvidas existentes sobre estas bactérias e seus mecanismos de patogenicidade (Deng et al., 2008). Microsatélites associados com regiões contendo seqüências simples repetidas (SSR) da bactéria, tem sido aplicados no estudo da variabilidade genética destes patógenos (Islam et al., 2012) oferecendo uma pontual diferenciação dos isolados (Kato et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' em citros na região Noroeste do Paraná e observar a variação estacional da população do patógeno nestas áreas, bem como avaliar um método direto de preparação das amostras para a detecção do patógeno por PCR em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da citricultura no Brasil e no mundo

O crescimento da produção mundial de frutas e verduras no mundo tem sido impulsionado pela notável expansão das regiões produtoras, principalmente na Ásia e especialmente na China. Em 2011, a produção de frutas em todo o mundo foi de aproximadamente 640 milhões de toneladas e o cultivo de citros se destaca como a principal atividade da fruticultura mundial (FAO, 2013a).

A citricultura está presente em mais de 120 países (FAO, 2013b) e sua introdução no Brasil está relacionada à história de seu descobrimento. As primeiras sementes de laranja doce foram introduzidas no Brasil pelos portugueses no início do século XVI entre os anos 1530 e 1540, no início de sua colonização, e se expandiram rapidamente por todo o país, devido às favoráveis condições climáticas encontradas (Donadio et al., 2005; Neves et al., 2011).

A citricultura brasileira representa um importante segmento da economia nacional, tanto em valor da produção, como na geração de empregos diretos e indiretos. O Brasil se destaca como o maior produtor de citros (FAO, 2013a), com uma produção estimada em torno de 20 milhões de toneladas de fruta fresca (FAO, 2013a; IBGE, 2013) e com área de cultivo estimada em aproximadamente 740 mil hectares para o ano de 2013 (IBGE, 2013). Ocupa o primeiro lugar na produção de laranja doce e a quinta posição na produção de limão e lima, sendo ainda considerado um dos principais exportadores (FAO, 2013a). Embora o Brasil seja responsável por 53% da produção mundial de citros (Neves et al., 2011) e o maior país em área cultivada, possui baixos valores de produtividade quando comparado à outros países com menores áreas de cultivo, porém, com alta produtividade. A produtividade brasileira em 2011 foi superior à 24 t/ha enquanto a produtividade dos EUA, por exemplo, foi de aproximadamente 32 t/ha em aproximadamente 255 mil hectares cultivados (FAO, 2013b).

Apenas 30% da produção nacional de laranjas se destinam ao consumo da fruta *in natura* e o restante da produção destina-se ao processamento industrial. O suco de laranja brasileiro é conhecido mundialmente por sua alta qualidade. A indústria brasileira é responsável por 60% da produção mundial e o Brasil consome apenas 2% do suco que produz, sendo os 98% restantes, exportado para diversas regiões do mundo. O suco brasileiro se destaca por sua competitividade, contribuindo com uma participação de 85% no mercado mundial (Neves et al., 2011; MAPA, 2013) e por se enquadrar como um dos

principais produtos brasileiros de exportação (Neves et al., 2001). Além da fruta para consumo *in natura* e do suco industrializado, a laranja ainda oferece outros importantes subprodutos como óleos essenciais, líquidos aromáticos e o bagaço de citros, que se destaca por seu agregado valor econômico, utilizado na alimentação animal, sobretudo na alimentação de ruminantes e gado leiteiro (MAPA, 2013).

A maior produção de citros se concentra no Estado de São Paulo, cuja produção corresponde a 74,9% da safra nacional (IBGE, 2013) e área de plantio de 465 mil hectares. Este Estado sempre se destacou por elevados números de ganhos em produtividade pela adoção de tecnologias de manejo. Porém, este cenário vem sofrendo constantes alterações devido às crises que o setor vem enfrentando nos últimos anos, como a diminuição da demanda suco pelo mercado externo, consequência da grande concorrência com outros tipos de bebidas e néctares de outras frutas disponíveis ao consumidor e devido aos aumentos nos custos de produção decorrentes de problemas fitopatológicos e escassez de mão-de-obra (Conab, 2013a; Neves et al., 2011).

O Paraná contribui com 5% da produção nacional de citros e possui apenas 3,4% da área cultivada no Brasil. O Estado do Paraná se destaca por apresentar produtividade superior ao Estado de São Paulo, apresentando rendimento médio de 33 t/ha na safra atual, contra 28,4 t/ha obtidos no Estado de São Paulo (IBGE, 2013). Na fruticultura paranaense, a citricultura corresponde à 56,6% da produção. A laranja se destaca por representar 45,2% da produção cítrica no Estado, seguida da tangerina que contribui com 10,4% do volume e do limão que representa apenas 1% do total da fruticultura. Estes números são proporcionais às áreas de cultivo e produção no estado, no qual a laranja ocupa 35,7 mil hectares que produziram 961,4 mil toneladas; a tangerina é cultivada em 9,3 mil hectares, foram colhidas 176,3 mil toneladas e os limões com área de 875 hectares, os quais proporcionaram 17 mil toneladas de frutas colhidas (SEAB, 2012). A citricultura paranaense concentra-se na região metropolitana de Curitiba, no norte do estado e principalmente no Noroeste do Estado do Paraná (Conab, 2013b) com destaque para os municípios de Paranavaí, Alto Paraná, Rolândia e Nova Esperança. O Estado conta com parcerias entre produtores e cooperativas, que industrializam o suco (Governo do Estado do Paraná, 2009).

2.2 Doenças de citros

No Brasil, as pragas e doenças de citros são consideradas as principais ameaças à citricultura. Na década passada, 40 milhões de árvores foram erradicadas devido às pragas e doenças, elevando a mortalidade de 4% para 5%, o que resulta em quase 80 milhões de caixas de citros perdidas ao ano (Neves et al., 2011). Recentemente a citricultura paulista, marcada na última década pela alta tecnologia empregada no manejo contra pragas e doenças dentre outras atividades que acarretaram ganhos de produtividade, vem enfrentando uma das piores crises no setor devido à diminuição da demanda de suco no mercado externo. Com isso, os produtores endividados pelos altos custos de produção decorrentes do aumento de problemas fitopatológicos e pelos baixos preços pagos por caixa da fruta, deixaram as frutas no pomar na intenção de evitar gastos. A presença de frutos remanescentes no pomar resultou em graves problemas fitossanitários nas plantas e a erradicação completa de alguns pomares, ocasionando a diminuição da produção na safra 2013/14. A cultura no triângulo mineiro, com exceção dos pomares com produção destinada à indústria, encontra-se em situação de abandono em função de problemas semelhantes aos enfrentados por citricultores paulistas, dentre eles a vulnerabilidade às doenças, devido aplicação inadequada de insumos agrícolas (Conab, 2013a).

A citricultura apresenta uma extensa lista de doenças que podem atingir qualquer parte da planta em diferentes épocas de cultivo e são causadas por diversos fitopatógenos, como fungos, vírus, viróides, bactérias, nematóides e até mesmo por agentes causais desconhecidos. A ocorrência de doenças ao longo da história da citricultura brasileira marcou o cenário de produção em diversas regiões e em distintas épocas, com grandes perdas de produção e produtividade (Feichtenberger et al., 2005).

Nos últimos anos, *huanglongbing* (HLB), cancro cítrico, mancha preta dos citros ou pinta preta (MCP), mancha marrom de *Alternaria* (MMA), clorose variegada dos citros (CVC) e morte súbita dos citros (MSC) se destacaram como as principais doenças da cultura dos citros e 39 milhões de árvores foram erradicadas devido à presença destas moléstias nos pomares dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, o que representou uma diminuição de cerca de 20% na safra de 2011 em comparação à safra anterior (Neves et al., 2011). Além das perdas econômicas, em conjunto com outros fatores, a ocorrência de doenças nos citros podem elevar os custos de produção, ameaçando a quantidade e a qualidade das frutas cítricas. Em geral, para o controle das doenças no campo faz-se uso do manejo integrado através de variedades resistentes, diversificação de variedades, uso de mudas e material de

propagação sadios, bem como o controle de plantas daninhas e rotação de defensivos agrícolas (Feichtenberger et al., 2005).

2.3 *Huanglongbing* (HLB)

Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, provavelmente teve sua origem no sul da China e inicialmente foi considerada como uma enfermidade de pouca importância para a cultura do citros (Da Graça, 1991; Bové, 2006). O nome dado à doença provém do Chinês (“Huang Long Bing”) e significa “doença do dragão amarelo” devido a sintomatologia das plantas infectadas (Bové 2006; Feichtenberger et al., 2005). A doença está presente em diversos países nos continentes asiático, africano, americano e Oceania (Da Graça, 1991; Bové, 2006).

As primeiras detecções da doença na América foram constatadas no Brasil (Coletta-Filho et al., 2004) e em seguida na Flórida, Estados Unidos (Halbert, 2005). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 2004, na região central do Estado de São Paulo, no município de Araraquara (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005b). Em 2005, determinou-se a existência da doença em pomares no Estado de Minas Gerais (Belasque et al., 2009) e somente em 2007, constatou-se a primeira detecção no Paraná, no município de Altônia (Nunes et al., 2007).

HLB se apresenta como uma das mais devastadoras doenças da citricultura mundial por tornar as plantas rapidamente improdutivas e seus frutos impróprios para o consumo (Feichtenberger et al., 2005). Também afeta a qualidade de suco para industrialização, reduzindo seu teor, bem como a concentração de sólidos solúveis totais por fruta, de grau Brix e a proporção de acidez, gerando o aumento da acidez do fruto (Bassanezi et al., 2009). A qualidade do suco é afetada mesmo em condições de plantas e frutos assintomáticos, apresentando maior teor de compostos amargos (Baldwin et al., 2010).

Os relatos dos danos econômicos gerados pela presença do HLB ressaltam sua importância, reafirmando-a como uma terrível ameaça à citricultura mundial. Nas Filipinas foram registradas, redução nas áreas de cultivo de até 75% devido à sua presença (Altamirano et al., 1976). Na década de 60, mais de três milhões de árvores foram destruídas na Indonésia (Tirtawidjaja, 1980). A doença também foi responsável pela morte de praticamente todas as árvores de tangerinas e laranja doce no sudoeste da Arábia Saudita (Bové, 1986). Mais de 65% das árvores foram severamente afetadas na Ilha Reunião (Aubert et al., 1996). Na África do Sul, áreas identificadas com alto nível de infecção registraram perdas de 30 à 100% em

pomares afetados (Schwarz et al., 1967). A redução da vida útil de pomares cítricos, área de produção e conseqüentes perdas financeiras foram registradas no norte da Tailândia (Roistacher, 1996; Koizumi et al., 1997). Na Flórida (EUA), o HLB é apontado dentro das estimativas de impactos totais na indústria de citros como um dos principais responsáveis pelas perdas registradas nas safras 2003/2004 (Hodges et al., 2004).

O HLB é uma das maiores preocupações dos citricultores brasileiros, por se tratar de uma doença que se alastrou extremamente rápido desde seu ponto de origem na região central do Estado de São Paulo até outras regiões do estado e do Brasil (Belasque et al., 2009; Neves et al., 2011). É relatado como um dos principais fatores influenciadores na produtividade média do Estado de São Paulo (Conab, 2013a). Em 2009, 24% dos pomares paulistas apresentaram no mínimo uma planta sintomática, estimando-se que em todo o estado, aproximadamente 1,9 milhão de plantas estavam infectadas (Belasque et al., 2009) e 4 milhões de plantas foram erradicadas (Belasque et al., 2010).

O aumento acelerado de áreas infectadas também foi observado no Paraná, onde em 2006 o Estado apresentava apenas um município com diagnóstico confirmado para a doença. Em 2008, a doença evoluiu para 29 municípios e em 2010, a doença foi detectada em 54 municípios do Paraná (Nunes et al., 2010). Atualmente o Paraná possui 155 municípios produtores de laranja e destes, 89 já possuem diagnóstico positivo para a presença da doença. Atribui-se que 15% dos prejuízos na produção paranaense, estimada em aproximadamente 735 mil toneladas, seja devido à progressão do HLB (Adapar, 2013).

2.3.1 Sintomas

Os sintomas do HLB caracterizam-se principalmente por ramos com folhas apresentando coloração amarelada, geralmente isolados na planta. As folhas apresentam-se com aparência mosqueada, de coloração alternada entre tons de verde claro, verde escuro e amarelo, não apresentando limites definidos nas tonalidades (Bové, 2006; Feichtenberger et al., 2005, Chung e Brlansky, 2005). O mosqueamento das folhas é observado em todas as plantas infectadas pela doença, independente da espécie de bactéria, hospedeiro e condições ambientais (Bové, 2006). Os ramos sintomáticos podem ainda exibir folhas curvadas com engrossamento e escurecimento das nervuras, e menor tamanho (Belasque et al., 2009). É comum o surgimento de sintomas de deficiência de zinco, induzidos pelo patógeno. Neste caso, as folhas apresentam clorose internerval, folhas de tamanho reduzido e redução de outros nutrientes (Feichtenberger et al., 2005). Com o desenvolvimento da doença, pode

ocorrer intensa desfolha, seca, morte de ponteiros e a progressão dos sintomas em toda a copa (Feichtenberger et al., 2005; Belasque et al., 2009) devido ao estresse causado pela menor densidade de massa de raízes observado em plantas doentes (Graham et al., 2013).

Os frutos sintomáticos são menores, defeituosos, assimétricos, com coloração externa irregular, podendo apresentar inversão da maturação. Internamente é possível observar sementes abortadas, deslocamento da columela conferindo assimetria ao fruto, além de maturação interna desuniforme e coloração marrom a castanho nos feixes vasculares (Bové, 2006). Ocorre queda prematura dos frutos, que aumenta proporcionalmente a severidade da doença, fator que contribui para a significativa redução na produção e os frutos sintomáticos afetam a qualidade do suco (Bassanezi et al., 2008; Bassanezi et al., 2009).

As plantas infectadas nem sempre exibem rapidamente seus sintomas, devido ao prolongado período de latência da doença, o que pode favorecer a rápida disseminação do patógeno no campo (Manjunath et al., 2008). A doença não provoca a morte imediata das plantas, tornando-as debilitadas e improdutivas ao longo do tempo (Belasque et al., 2009).

2.3.2 Agente causal

O HLB é causado por uma bactéria Gram-negativa de crescimento limitado ao floema (Garnier et al., 1984), não cultivável, pertencente à subdivisão das alfa-proteobactérias (Jagoueix et al., 1994), denominada '*Candidatus Liberibacter*' spp. '*Ca. Liberibacter*' inclui três espécies causadoras do HLB: '*Ca. Liberibacter asiaticus*' agente patogênico da doença em países da Ásia e das Américas, '*Ca. Liberibacter africanus*' responsável por causar a doença na África e '*Ca. Liberibacter americanus*', uma das causadoras da doença nas Américas, especialmente no Brasil (Jagoueix et al., 1994, Jagoueix et al., 1997; Coletta-Filho et al., 2005; Teixeira et al., 2005a).

'*Ca. Liberibacter asiaticus*' foi detectada no Brasil em 2004 (Coletta-Filho et al., 2004). '*Ca. Liberibacter americanus*' foi descrita pela primeira vez em 2005, no Brasil, e inicialmente esta espécie foi considerada predominante nos pomares do estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2005; Teixeira et al., 2005a; Bové, 2006). Com o passar do tempo houve redução na frequência de '*Ca. Liberibacter americanus*' e a forma asiática passou a prevalecer nos campos brasileiros, caracterizando diferenças biológicas entre as espécies (Bové, 2006; Lopes et al., 2009b; Coletta-Filho et al., 2010a). As diferenças de temperatura e diferentes taxas de transmissão natural podem ser fatores contribuintes para a irregular distribuição das espécies no estado (Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b).

‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ possui tolerância às altas temperaturas e os sintomas se desenvolvem bem entre 25 ° a 32 °C (Garnier e Bové, 1983; Gottwald et al., 2007), podendo se multiplicar a partir dos 17 °C (Gasparoto et al., 2012). ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ são sensíveis ao calor, com temperatura ideal de desenvolvimento abaixo dos 30 °C (Garnier e Bové, 1983; Gottwald et al., 2007; Bové, 2006; Lopes et al., 2009b), porém a espécie americana apresentou desenvolvimento ótimo de sintomas aos 24 °C (Gasparoto et al., 2012) e pode ocorrer em uma mesma planta com a forma asiática da doença (Coletta-Filho et al. 2005). A espécie africana geralmente é detectada em localidades que estão acima de 700 m de altitude (Gottwald et al., 2007).

A bactéria foi cultivada em meio artificial (Sechler et al., 2009) porém, como não há novos relatos do seu cultivo *in vitro* e do cumprimento dos postulados de Koch, o patógeno continua recebendo o prefixo ‘*Candidatus*’ (Murray e Schleifer, 1994).

Estas bactérias podem se associar à outros agentes patogênicos como espécies de *Phytophthora* spp., potencializando danos ocasionados às plantas (Graham et al., 2013). Uma subespécie da bactéria foi relatada na planta *Calodendrum capense*, e as análises filogenéticas revelaram que esta espécie possui uma estreita relação com a forma africana da doença, e foi denominada ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ subsp. *capensis* (Garnier et al., 2000).

As espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ possuem diferentes espécies de plantas hospedeiras, tais como espécies de plantas com potencial ornamental utilizadas na arborização urbana, as quais funcionam como fonte de inóculo em áreas próximas ao cultivo de citros. *Murraya* spp. (murta) é hospedeira da bactéria e do inseto vetor. Embora com baixa incidência do patógeno, fator que dificulta a detecção do mesmo, esta planta é capaz de abrigar as espécies americana e asiática (Da Graça 1991; Walter et al, 2012). A espécie arbustiva *Murraya exotica* (falsa murta) pode hospedar as formas asiática e americana da doença, porém com menor taxa de multiplicação do patógeno e maior tempo para exibição dos sintomas (Lopes et al., 2010). *Severinia buxifolia* (severínia) hospeda a espécie asiática além de funcionar como abrigo para o inseto vetor (Hung et al., 2001).

Outros agentes patogênicos podem ser os responsáveis por desenvolver sintomas semelhantes aos do HLB, como os fitoplasmas ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ (Chen et al., 2009) e ‘*Ca. Phytoplasma phoenicium*’ (Teixeira et al., 2008). Estes organismos possuem mecanismo de patogenicidade semelhantes aos de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. com crescimento limitado aos vasos do floema e por isto, são capazes de ocasionar sintomas semelhantes aos desencadeados pelas espécies bacterianas (Bové et al., 2008). ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ ou ‘*Ca. Phytoplasma*

phoenicium' podem ser encontrados infectando uma mesma planta de citros com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Teixeira et al., 2008; Chen et al., 2009).

2.3.3 Variabilidade do agente causal

O conhecimento das informações genômicas de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' é considerado uma importante ferramenta para compreender a interação entre este patógeno, seus vetores e hospedeiros, além de poder elucidar a origem do patógeno e auxiliar na busca por medidas de controle (Duan et al., 2009; Katoh et al., 2011). Diante de uma enfermidade de importância epidemiológica mundial como o HLB, o estudo da diversidade genética auxilia no esclarecimento de muitas dúvidas existentes sobre o patógeno (Deng et al., 2008).

A variabilidade genética de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' tem sido alvo de grupos de estudos em diversas localidades do mundo onde a doença se apresenta como problema no cultivo de citros (Adkar-Purushothama et al., 2009; Furuya et al., 2010; Katoh et al., 2011; Liu et al., 2011; Coletta-Filho et al., 2005; Bastianel et al., 2005; Magomere et al., 2009; Ding et al., 2009, Tomimura et al., 2009). Diferenças encontradas em uma mesma região do DNA podem servir como ferramenta de monitoramento da enfermidade presente no campo, possibilitando ainda observar possíveis relações entre diferentes hospedeiros de citros e seus cultivares, com a sequência genômica da bactéria (Tomimura et al., 2009). Através da sequência do genoma é possível observar genes e fatores que contribuem para a virulência da bactéria, sua capacidade de metabolizar açúcares e observar ainda a existência de genes que possibilitam a absorção de nutrientes do floema, causando deficiência de zinco local (Duan et al., 2009).

Baseados nas sequências da região 16S e nas regiões intergênicas 16S/23S do rDNA, as análises filogenéticas de isolados de diferentes regiões de cultivo na China, revelaram que as sequências obtidas destas regiões são altamente conservadas e obteve-se de 98,5 a 100% e 99,7 a 100% de similaridade, respectivamente (Ding et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados quando esta metodologia foi empregada em isolados de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' de diferentes hospedeiros no sudeste asiático, os quais apresentaram 100% de identidade (Tomimura et al., 2009) e para isolados do Japão, Filipinas, Indonésia e Tailândia (Subandiyah et al., 2000). Alta homogeneidade também foi encontrada em isolados de toranja em Guandong na China, quando comparadas com amostras da Tailândia e Nepal (Deng et al., 2008) em isolados de tangerina do Brasil e EUA (Gupta et al., 2012).

Utilizando PCR-RFLP, isolados de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' apresentaram altos níveis de identidade em um mesmo local de amostragem (Bastianel et al., 2005). A análise de seqüências genéticas de prófagos de '*Ca. Liberibacter asiaticus*', demonstram a possibilidade de uma origem comum de isolados de duas diferentes províncias na China, os quais revelaram pequena variabilidade genética entre as estirpes bacterianas (Liu et al., 2011). Com base em polimorfismos de um único nucleotídeo da região 16S do rDNA e em genes de proteínas ribossômicas, como a proteína β operon, avaliou-se a diversidade genética de isolados da espécie asiática no sul da Índia e inesperadamente encontrou-se um alto nível de heterogeneidade entre as amostras, detectadas em regiões caracterizadas por diferenças climáticas (Adkar-Purushothama et al., 2009).

Microssatélites associados com regiões contendo seqüências simples repetidas (SSR) são considerados ideais como marcadores genéticos de plantas, mapeamento físico, estudos populacionais e identificação varietal, por fornecerem grande quantidade de dados e ao mesmo tempo facilidade na sua identificação (Morgante e Olivieri, 1993). Estes marcadores têm sido empregados no estudo de diferentes patógenos de distintas culturas para melhor distinguir genótipos (Carimi et al., 2010; Attanayake et al., 2012), bem como tem sido empregados no estudo da diversidade de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Islam et al., 2012) conferindo uma diferenciação de isolados mais precisa (Katoh et al., 2011).

Através dos marcadores moleculares pode-se estimar a diversidade genética e analisar a estrutura populacional de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' de uma região, além de captar maiores e precisas diferenças entre os isolados (Katoh et al., 2011). A identificação de marcadores moleculares para comparar isolados de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' na Ásia e na América do Norte, possibilitou identificar maior variabilidade no continente asiático, de onde provavelmente se difundiu o HLB para o continente americano (Chen et al., 2010).

Em Guandong, China, no estudo de seis diferentes regiões de cultivo de citros observou-se alta homogeneidade entre os isolados, e sugerindo que não há diferenças entre os mesmos, devido a proximidade de sua origem de disseminação (Deng et al., 2008). Desde a descrição da doença, a diversidade genética da bactéria e seus resultados distintos, são considerados um dos maiores desafios aos pesquisadores (Chen et al., 2010).

A estreita relação entre isolados de uma mesma ilha no Japão, e a alta variabilidade entre isolados de distintas ilhas localizadas no Japão, Taiwan e Indonésia foi observada através de microssatélites. O uso de microssatélites possibilitou estudar nestas áreas o provável local de introdução da doença e a homogeneidade entre isolados de uma mesma área devido à recente ocorrência do patógeno no local (Katoh et al., 2011). O uso de seqüências

repetidas em tandem, técnica semelhante ao uso dos microssatélites, permitiu diferenciar a população bacteriana de Guandong na China com amostras coletadas na Flórida (Chen et al., 2010).

A preocupação dos pesquisadores em estudos de diversidade genética de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ em amplas áreas ou ainda em condições intercontinentais tem sido descrita na literatura (Adkar-Purushothama et al., 2009; Islam et al., 2012). Não há relatos anteriores descritos na literatura sobre estudos da diversidade genética da doença em microregiões produtoras de citros, como o caso do noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

2.3.4 Transmissão

2.3.4.1 Transmissão por enxertia

As bactérias podem ser transmitidas artificialmente, através de enxertia com borbulhas ou gemas contaminadas ou através da planta parasita trepadeira *Cuscuta* spp. (Garnier e Bové, 1983; Bové, 2006). Estes métodos de transmissão têm sido amplamente utilizados no meio científico para investigar a doença porque oferecem rapidez, facilidade e eficiência na transmissão do patógeno às plantas cítricas ou a hospedeiros alternativos (Lopes e Frare, 2008).

Após 4 à 5 meses da inoculação, as plantas de citros inoculadas por enxertia através de borbulhas contaminadas com ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ passam a exibir os sintomas da doença nas folhas, frutos deformados e sintomas semelhantes aos de deficiência de zinco, ferro e manganês (Lopes e Frare, 2008; Lopes et al., 2009b). No inverno, as taxas de transmissão experimentais são maiores, porém as taxas de sobrevivência dos tecidos das plantas enxertadas são menores (Lopes e Frare, 2008). A planta *S. buxifolia* também demonstrou ser capaz de transmitir a bactéria por enxertia, e a detecção ocorre apenas 2 à 3 meses após a inoculação (Hung et al., 2001).

A porcentagem de transmissão para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ varia entre 54,7 a 88%, enquanto as taxas observadas para a ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ são menores e variam entre 10 à 45,2%. Para a forma americana da doença, as taxas de transmissão por enxertia em limões, tangerinas ou citrumelos (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) são menores (2 à 25%) que as observadas em laranja doce e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (31,2 à 65%) (Lopes et al., 2009b).

2.3.4.2 Transmissão por insetos vetores

As bactérias causadoras do HLB podem ser transmitidas por diferentes espécies de artrópodes, conhecidos como psilídeos (Hemíptera: Psyllidae e Triozidae). O psilídeo é um inseto que mede de 3-4 mm e que possui corpo levemente achatado quando visualizados lateralmente. Sua principal característica é posicionar-se num ângulo de 45 ° com a superfície na qual ele se alimenta (Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005). Podem ser os responsáveis pela introdução da bactéria causadora do HLB em diversos locais do mundo, como na China e nas Ilhas Reunião (Gottwald et al., 1989).

O ciclo de vida destes insetos pode durar de 15 à 47 dias independente do hospedeiro, e está diretamente relacionado à temperatura, fator que influencia na sobrevivência e nos estágios de desenvolvimento (Halbert e Manjunath, 2004; Nava et al., 2010). Estes insetos necessitam um período de 15 a 30 minutos para aquisição da bactéria ao se alimentar da planta contaminada e o período de incubação leva de 14 a 21 dias até a transmissão para novas plantas (Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005). A relação entre patógeno e vetor é do tipo propagativa e circulativa (Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005). As ninfas são mais propensas à aquisição da bactéria do que insetos adultos, e quando adquirem o patógeno, se tornam mais eficazes na transmissão da bactéria, do que aqueles que adquirem somente na fase adulta, pela maior quantidade do patógeno presente no corpo do inseto (Pelz-Stelinski et al., 2010). A transmissão ovariana e a transmissão sexual são outros importantes mecanismos de transmissão que ocorrem em pequenas taxas, porém são eficazes na complementação destes mecanismos (Grafton-Cardwell et al., 2013).

Trioza eritrea Del Guercio (Hemíptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Sternorrhyncha: Psyllidae) são as principais espécies de psilídeos transmissoras do HLB. Estas espécies são vetoras da bactéria ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ na África e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ na Ásia, respectivamente (Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005). No Brasil, *D. citri* é a espécie vetora de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e de ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (Teixeira et al., 2005a). Por ser vetor do agente causal do HLB, *D. citri* atualmente é a praga mais importante da citricultura mundial e se tornou alvo de inúmeras pesquisas pela rápida disseminação da doença nas Américas (Grafton-Cardwell et al., 2013).

A espécie africana *T. eritrea* é sensível às altas temperaturas e alta umidade relativa do ar, adaptando-se melhor às condições de clima mais frio, em locais que exibem temperaturas

abaixo de 30 °C. *D. citri*, é tolerante ao calor e suporta temperaturas acima de 30 °C (Bové, 2006).

Recentemente, o psilídeo *Cacopsylla citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae) foi relatado na China como portador da bactéria ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, que foi detectada em ninfas e insetos adultos desta espécie (Cen et al., 2012). No Butão, a forma asiática da doença foi encontrada em adultos do psilídeo *D. comunis* Mathur (Hemiptera: Liviidae). Até então na Ásia, os patógenos somente haviam sido descritos em *D. citri* (Donovan et al., 2012).

Os hospedeiros preferenciais de *D. citri* são plantas da família Rutaceae e a planta *Murraya paniculata*, conhecida popularmente como murta. Os psilídeos encontrados na murta apresentam títulos extremamente baixos da bactéria (Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005; Walter e Hall, 2012). Os psilídeos podem estar presentes nos frutos e desta forma são disseminados a longa distância através do transporte da fruta *in natura* para o processamento, mesmo na ausência de material vegetativo (Halbert et al., 2010).

2.3.5 Diagnóstico

Sintomas visuais e indexação biológica foram os métodos pioneiros utilizados na diagnose de HLB (Miyakawa, 1980; Roistacher, 1991). Em seguida, foram desenvolvidos outros sistemas de detecção utilizando quimiofluorescência (Schwarz, 1968), microscopia eletrônica (Saglio et al., 1971), ensaio imuno enzimático (teste ELISA) com anticorpos monoclonais (Gao et al., 1993) e hibridização ‘*dot-blot*’ (Villechanoux et al., 1992). No final de 1980 foi possível diferenciar pela primeira vez a espécie asiática da espécie africana, a partir do desenvolvimento de sondas específicas para hibridização de DNA ‘*spot-blot*’, baseada na seqüência β operon da bactéria (Villechanoux et al., 1992).

Embora trabalhosa e demorada, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) se tornou uma das técnicas mais confiáveis na detecção da bactéria nas décadas de 70 e 80 (Garnier e Bové, 1996) e foi recentemente utilizada para demonstrar a presença de células bacterianas no tegumento de sementes de citros e em tubos crivados vasos do floema (Hilf et al., 2013).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), considerada um método rápido e preciso no diagnóstico da doença, foi utilizada como método de detecção pouco tempo após a caracterização do agente causal do HLB (Jagoueix et al., 1996; Hung et al., 1999). A PCR baseada na seqüência do DNA ribossomal (rDNA) 16S, através de três diferentes iniciadores

sintéticos possibilitou diferenciar as espécies africana e asiática (Jagoueix et al., 1996). Afim de tornar o diagnóstico mais sensível, desenvolveu-se outro protocolo de detecção por PCR através da amplificação de genes de proteínas ribossomais e da observação do tamanho do produto amplificado do DNA (Hocquellet et al., 1999a). No Brasil, a PCR também foi utilizada para distinguir a doença nas suas formas asiática e americana, através da amplificação da região 16S do rDNA (Teixeira et al., 2005a). ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. pode ser diagnosticada com exatidão no inseto vetor da doença através de PCR convencional, tanto em insetos adultos como nas ninfas em diferentes estágios (Hung et al., 2004).

RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) é um recurso utilizado no isolamento de fragmentos do DNA genômico para a detecção de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. e de bactérias não cultiváveis, permitindo o isolamento de genes adicionais (Hocquellet et al., 1999b). *Nested* PCR, também é utilizado no diagnóstico de HLB com iniciadores sintéticos específicos. A técnica *nested* PCR apresenta alta sensibilidade e precisão quando comparada com a PCR convencional, permitindo a detecção específica de níveis muito baixos do DNA bacteriano mesmo em condições assintomáticas (Ding et al., 2005).

A PCR em tempo real ou PCR quantitativo (RT-qPCR) inclui-se como um dos métodos mais sensíveis utilizados para a detecção das bactérias que causam HLB. Nesta técnica, através de sondas e iniciadores sintéticos específicos baseados na variação das sequências da região 16S do rDNA é possível diagnosticar com precisão, as diferentes espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. (Li et al., 2006; Tatineni et al., 2008). Diferentes iniciadores sintéticos específicos e diferentes sondas têm sido desenvolvidos e empregados na detecção de HLB (Hocquellet et al., 1997; Wang et al., 2006; Ananthkrishnan et al., 2013). Por meio da qPCR, a detecção de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. pode ser realizada no inseto vetor em suas diferentes fases e torna-se possível detectar a doença antes do desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro (Manjunath et al., 2008).

A PCR em tempo real oferece sensibilidade até 1000 vezes maior que a PCR convencional (Teixeira et al., 2008) e constitui importante ferramenta na identificação e detecção precoce de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. (Li et al., 2007). No entanto, métodos convencionais de purificação de DNA tornam o processo trabalhoso e demorado (Olmos et al., 1996). No diagnóstico de HLB, os métodos de extração diretos se caracterizam pela não purificação dos ácidos nucléicos e também, pela simplicidade, sensibilidade, robustez e alta aplicabilidade em testes de quarentena, além de se equiparar ao método de extração convencional (Fujikawa et al., 2013).

Os métodos diretos de extração de DNA: ‘Spot’, ‘Tissue-print’, diluição e ‘Squash’, permitem a análise do material vegetal sem a purificação dos ácidos nucleicos, agilizam o processo de diagnóstico através da qPCR, evitam contaminações do material a ser analisado e permitem analisar grandes números de amostras, possibilitando uma rápida e sensível detecção do patógeno (Olmos et al., 1996; Bertolini et al., 2008; Capote et al., 2009; Bertolini et al., 2010; De Boer e López, 2012). Os sistemas diretos ‘Tissue-print’ e ‘Spot’, além de permitirem a preparação direta do material no campo, permitem o armazenamento das amostras à temperatura ambiente por prolongado período de tempo sem afetar a qualidade da amplificação (Olmos et al., 1996).

2.3.6 Quantificação da bactéria

As técnicas de quantificação de patógenos foram aperfeiçoadas para obtenção de valores e diagnósticos precisos. Estas técnicas foram simplificadas ao longo do tempo para melhor compreender os mecanismos de virulência de patógenos, desenvolver estratégias eficientes de manejo e avaliar habilidades de infecção de insetos vetores (Bach et al., 2002; Alvarez, 2004).

Vários métodos têm sido utilizados na quantificação e na detecção das espécies bacterianas causadoras de HLB. A qPCR tem sido uma das ferramentas mais empregadas neste tipo de estudo com diferentes sondas e iniciadores sintéticos específicos por diferentes grupos de pesquisa (Li et al., 2006; Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b; Teixeira et al., 2008). A sonda TaqMan baseada na região 16S do rDNA foi desenvolvida para qPCR, considerada vantajosa por sua alta sensibilidade (Li et al., 2006). A utilização deste tipo de sonda aliada à esta técnica, permite a determinação dos títulos bacterianos nos diferentes tecidos vegetais: pecíolos foliares, tecidos e membranas dos frutos, raízes e folhas (Li et al., 2009).

A qPCR e o uso de etídio de monoazide (EMA qPCR) é capaz de quantificar precisamente ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, diferenciando as células viáveis das inviáveis (Trivedi et al, 2009). A utilização de propídio monoazide (PMA) com o propósito de remover células inviáveis de isolados da espécie asiática de plantas e de psilídeos proporciona à análise qPCR maior rapidez e exatidão na quantificação (Hu et al., 2013). A PCR competitiva (cPCR) quantifica a bactéria de forma precisa detectando diferenças significativas nos títulos do patógeno em diferentes espécies cítricas (Kawabe et al., 2006), porém este método não foi comparado à outros métodos de quantificação.

A detecção de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' pode ser dificultada pelos baixos títulos que geralmente a bactéria apresenta em seus hospedeiros, especialmente em plantas assintomáticas com infecções latentes (Trivedi et al., 2009; Hu et al., 2013). A quantificação do patógeno é considerada uma importante ferramenta na epidemiologia da doença (Lopes et al., 2009b) para auxiliar em estudos sobre a movimentação do patógeno, sua proliferação e distribuição nos tecidos vegetais (Kawabe et al., 2006; Tatineni et al., 2008).

A severidade da doença não possui correlação com os sintomas exibidos por plantas infectadas (Folimonova et al., 2009). Porém, a quantidade do agente patogênico está diretamente relacionada com a expressão dos sintomas (Coletta-Filho et al., 2010b). Para a expressão de sintomas do HLB requer-se uma quantidade mínima da bactéria nos vasos do floema, e esta informação é obtida através da quantificação e do monitoramento populacional bacteriano na planta. Este fator é considerável no controle da doença que envolve sua identificação e a eliminação de plantas infectadas (Lopes et al., 2009b). Em folhas assintomáticas, a quantidade da bactéria é significativamente mais baixa, ao contrário de folhas sintomáticas e folhas jovens, nas quais podem se encontrar alta população bacteriana (Trivedi et al., 2009).

A distribuição irregular de '*Ca. Liberibacter*' spp. pode ser observada juntamente com irregularidades na quantidade do patógeno distribuída na planta. As mais altas concentrações de '*Ca. Liberibacter*' spp. são encontradas em folhas sintomáticas (Tatineni et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Folimonova et al., 2009). Contudo, altas quantidades da espécie americana podem ser localizadas em folhas assintomáticas e os frutos sintomáticos são encontrados principalmente próximos à locais com altos títulos bacterianos na planta (Teixeira et al., 2008).

A redução do tamanho populacional bacteriano, bem como sua multiplicação, podem estar relacionadas diretamente com alterações nas condições de temperatura, afetando os títulos bacterianos (Lopes et al., 2009a). Os baixos títulos de '*Ca. Liberibacter americanus*' obtidos em plantas de citros enxertadas e os altos títulos obtidos com '*Ca. Liberibacter asiaticus*', podem explicar a prevalência da espécie asiática no Brasil e também a melhor probabilidade da disseminação desta espécie pelos insetos vetores (Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b).

Em folhas de murta que expressavam sintomas severos, os títulos bacterianos de '*Ca. Liberibacter americanus*' apresentou-se 100 vezes maior do que em folhas com sintomas leves (Teixeira et al., 2008). Embora em folhas sintomáticas de citros os títulos bacterianos sejam

maiores, as plantas de murta e os insetos vetores coletados neste hospedeiro, apresentam níveis extremamente baixos do agente patogênico (Walter et al., 2012).

2.3.7 Resistência

Laranjas doces (*C. sinensis*), tangerinas (*C. reticulata*) e híbridos de tangerinas, bem como plantas de outros gêneros, como *Atalantia*, *Balsamocitrus*, *Calodendrum*, *Clausena*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Murraya*, *Poncirus*, *Severinia*, *Swinglea*, *Toddalia* e *Triphasia* são severamente afetadas. São moderadamente suscetíveis pomelo (*C. paradisi*), limão (*C. limon*), limão Cravo (*C. limonia*), calamondin (*C. madurensis*) e laranja azeda (*C. aurantium*). Limão Galego (*C. aurantifolia*), toranja (*C. grandis*) e híbridos de trifoliata (*P. trifoliata*) são mais tolerantes, não expressando a manifestação dos sintomas mesmo a bactéria sendo capaz de multiplicar-se nos tecidos vegetais (Da Graça, 1991; Feichtenberger et al., 2005; Folimonova et al., 2009).

A inexistência de variedades resistentes ou imunes ao HLB, aliadas ao fato de plantas infectadas rapidamente se tornarem improdutivas e o aumento dos custos de produção devido ao controle do inseto vetor, contribuem para a importância da doença (Feichtenberger et al., 2005). Estudos recentes têm sido desenvolvidos para identificar genes associados à tolerância de HLB e em resposta à infecção de '*Ca. Liberibacter asiaticus*', foram encontrados genes relacionados à defesa mesmo em hospedeiros suscetíveis, porém estes genes são insuficientes para inibir a reprodução e a disseminação do patógeno na planta (Albrecht e Bowman, 2012). Através da engenharia genética pode-se manipular os potenciais genes encontrados objetivando melhorar a tolerância e até mesmo a resistência ao HLB (Fan et al., 2012). Os genótipos de citros se agrupam em quatro diferentes categorias (sensível, crescimento reduzido, moderadamente tolerante e tolerante) que variam de acordo com os sintomas desenvolvidos pelo HLB e com a capacidade da planta hospedeira continuar seu desenvolvimento (Folimonova et al., 2009).

2.3.8 Manejo e controle da doença

HLB é considerada uma doença de difícil manejo por apresentar seu patógeno geralmente com distribuição setorizada na planta, prolongado período de latência e baixos títulos bacterianos, os quais dificultam a confirmação do diagnóstico por PCR convencional, permitindo assim, que o patógeno se dissemine através de psilídeos (Gottwald, 2010).

O manejo do HLB é dependente de três princípios básicos, os quais envolvem a prevenção e redução de inóculo no campo, alcançado pelo uso de material de plantio livre da doença, controle da população de psíldeos nos pomares e remoção de árvores infectadas logo após o surgimento dos primeiros sintomas (Da Graça, 1991; Halbert e Manjunath, 2004; Feichtenberger et al., 2005; Bové, 2006; Bové, 2012).

Os pomares devem ser inspecionados regularmente com inspetores treinados e auxílio de plataforma para melhor visualização dos sintomas. As plantas doentes bem como plantas hospedeiras do patógeno, particularmente as murtas, devem ser erradicadas imediatamente (Belasque et al., 2009). A poda de ramos sintomáticos tem sido relatada como ineficaz no controle de HLB no Brasil e em países asiáticos. Contudo, na África do Sul a prática vem sendo realizada em plantas acima de cinco anos que possuem menos da metade da copa sintomática, de modo que o produtor conviva com a doença no campo (Lopes et al., 2007; Feichtenberger et al., 2005).

Na Flórida, o uso de programas nutricionais melhorados para o controle dos efeitos nocivos da doença, foram amplamente empregados com base em aplicações foliares de micronutrientes, sais de fosfito e de salicilato. Entretanto, um estudo mais aprofundado revelou que estes produtos não influenciam nos títulos bacterianos, na produção e qualidade de frutos de árvores tratadas e não tratadas, gerando grande preocupação no setor, pelo aumento desenfreado da propagação da doença nos pomares de citros (Gottwald et al., 2012).

O controle do vetor pode elevar demasiadamente os custos de produção. O planejamento do controle do inseto vetor pode ser auxiliado através do uso de etiquetas adesivas amarelas para monitorar a população e ser executado através de aplicação de insetidas (Halbert e Manjunath, 2004). O controle biológico através do uso inimigos naturais, pode ser realizado com a introdução de himenópteros *Tamarixia* sp., porém o sucesso do manejo está relacionado à ausência de hiperparasitas na área de cultivo de citros (Feichtenberger et al., 2005). O controle biológico também pode ser efetuado através de fungos patogênicos à *D. citri*, como a espécie *Isaria fumosorosea*, que apresenta esporos patogênicos aos adultos do inseto vetor (Hoy et al., 2010).

Estirpes bacterianas das espécies *Paenibacillus validus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oleivorans* e *Serratia plymutica* presentes na rizosfera de plantas cítricas foram isoladas e identificadas como possíveis controladoras do HLB principalmente através do antagonismo direto ao patógeno. Estas bactérias têm o potencial de suprimir a forma asiática da doença, promovendo o crescimento vegetal através de um manejo sustentável (Trivedi et al., 2011).

O tratamento térmico contínuo por um período mínimo de 48 horas à 40 ° - 42 °C, pode suprimir ou eliminar '*Ca. Liberibacter asiaticus*' de mudas de citros cultivadas em condições controladas (Hoffman et al., 2013). Na produção de mudas através da cultura de meristemas a partir de brotos adultos de citros, a eliminação da bactéria em sua forma asiática é eficaz com o uso das técnicas de vitrificação e criopreservação (Ding et al., 2008).

REFERÊNCIAS

ADAPAR- BOLETIM INFORMATIVO [da] ADAPAR. O avanço do HLB é preocupante para o futuro da citricultura paranaense. Edição nº 07 - Curitiba, junho-julho/ 2013. p. 1-5. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/ATG/BoletimADAPARjul13.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2013.

ADKAR-PURUSHOTHAMA, C. R.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; RAMANAYAKA, J. G.; BIANCO, P. A. Genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 681-688, 2009.

ANANTHAKRISHNAN, G.; CHOUDHARY, N.; ROY, A.; SENGODA, V. G.; POSTNIKOVA, E.; HARTUNG, J. S.; STONE, A. L.; DAMSTEEGT, V. D.; SCHNEIDER, W. L.; MUNYANEZA, J. E.; BRLANSKY, R. H. Development of primers and probes for genus and species specific detection of '*Candidatus Liberibacter species*' by real-time PCR. **Plant Disease**, v. 97, n. 1, p. 1235-1243, 2013.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 185–186, 2012.

ALTAMIRANO, D. M.; GONZALES, C. I.; VINAS, R. C. Analysis of the devastation of leaf-mottling (greening) disease of citrus and its control program in the Philippines. In: 7th CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS. 1976. **Proceedings...** 1976. p. 22-26.

ALVAREZ, A. M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 339–366, 2004.

ATTANAYAKE, R.N.; PORTER, L.; JOHNSON, D.A.; CHEN, W. Genetic and phenotypic diversity and random association of DNA markers of isolates of the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* from soil on a fine geographic scale. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 28-36, 2012.

AUBERT, B.; GRISONI, M.; VILLEMIN, M.; ROSSOLIN, G. A case study of Huanglongbing (greening) control in Réunion. In: DA GRAÇA, J. V.; MORENO, P.; YOKOMI, R. K. 13th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 1996. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1996. p. 276-278.

BACH, H.-J.; TOMANOVA, J.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J.C. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 1, p. 235–245, 2002.

BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J.; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, A. G. Effect of *Liberibacter* Infection (Huanglongbing Disease) of

Citrus on Orange Fruit Physiology and Fruit/Fruit Juice Quality: Chemical and Physical Analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 1247–1262, 2010.

BASSANEZI R. B.; MONTESINO L. H.; AMORIM L.; GASPAROTO, M. C. G.; BERGAMIN FILHO, A. Yield reduction caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE OF HUANGLONGBING (IRCHLB). 2008. **Proceedings...** 2008. p. 270-273.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal Plant Pathology**, v. 125, n. 1, p. 565–572, 2009.

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. 1, n. 1, p. 6473–6478, 2005.

BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JR., R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A. R.; TANK JR., A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F. E. A.; MENEZES, G. M.; DRAGONE, J.; JANK JR., R. H.; BOVÉ, J. M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; DE LUIS, A.; VIDAL, E.; PÉREZ-PANADES, J.; CAMBRA M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 1, p. 177–188, 2008.

BERTOLINI, E.; GARCÍA, J.; YUSTE, A.; OLMOS, A. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, n. 1, p. 283–287, 2010.

BOVÉ, J.M. Greening in the Arab Peninsula: Towards new techniques for its detection and control. **FAO Plant Protection Bull**, v. 34, n. 1, p. 7- 14. 1986.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BOVÉ J. M.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A.J. Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008. Orlando. **Proceedings...** 2008. p.152-155.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 1, p. 465-467, 2012.

CAPOTE, N.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; VIDAL, E.; MARTINEZ, M.C.; CAMBRA, M. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.

CARIMI, F.; MERCATI, F.; ABBATE, L.; SUNSERI, F. Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among Sicilian grapevine cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 57, n. 1, p. 703–719, 2010.

CEN, Y.; ZHANG, L.; XIA, Y.; GUO, J.; DENG, X.; ZHOU, W.; SEQUEIRA, R.; GAO, J.; WANG, Z.; YUE, J.; GAO, Y. Detection of '*Candidatus liberibacter asiaticus*' in *Cacopsylla* (psylla) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 95, n. 1, p. 304-311, 2012.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, v. 99, n.1, p. 236-242, 2009.

CHEN, J.; DENG, X.; SUN, X.; JONES, D.; IREY, M.; CIVEROLO, E. Guangdong and Florida populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. **Phytopathology**, v. 100, n. 1, p. 567-572, 2010.

CHUNG K.R.; BRLANSKY R. H. 2005. Citrus Diseases exotic to Florida: Huanglongbing (citrus greening). Disponível em: <<http://polkhort.ifas.ufl.edu/documents/publications/Citrus%20Greening.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2013.

COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JR., J.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 1, p. 1382, 2004.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus Huanglongbing bacteria reveal a different "*Ca. Liberibacter*" strain associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 848-852, 2005.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F; LOTTO, L.L.; LUCIANE, F.C.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; MACHADO, M.A. Prevalence of *Candidatus Liberibacter* spp. in HLB-diseased Citrus Plants in São Paulo State, Brazil. In: 17th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 2010. **Proceedings...** 2010a. p. 110 a 115.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010b.

CONAB – COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2013a. Acompanhamento da safra brasileira – laranja, safra 2013/2014, segunda estimativa, agosto de 2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_14_40_40_boletim_laranja_2o_2013.pdf>. Acesso em: 19 agos. 2013a.

CONAB – COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2013b. Produção Brasileira de Citros, Safra 2005. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_05_15_25_00_brcitros2005..png>. Acesso em: 19 agos. 2013b.

DA GRAÇA, J.V. Citrus Greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109-36, 1991.

DE BOER, S. H.; LÓPEZ, M. M. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 197-218, 2012.

DENG, X.; CHEN, J.; FENG, Z.; SHAN, Z.; GUO, H.; ZHU, J.; LI, H.; CIVEROLO, E. L. Identification and characterization of the Huanglongbing bacterium in pummelo from multiple locations in Guangdong, P. R. China. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 513-518, 2008.

DING, F.; WANG, G.; YI, G.; ZHONG, J.; ZENG, J.; ZHOU, B. Infection of Wampee and Lemon by the Citrus Huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in China. **Journal of Plant pathology**, v. 87, n. 3, p. 207-212, 2005.

DING, F.; JIN, S.; HONG, N.; ZHONG, Y.; CAO, Q.; YI, G.; WANG, G. Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 241–250, 2008.

DING, F.; DENG, X.; HONG, N.; ZHONG, Y.; WANG, G.; YI, G. Phylogenetic analysis of the citrus Huanglongbing (HLB) bacterium based on the sequences of 16S rDNA and 16S/23S rDNA intergenic regions among isolates in China. **European Journal Plant Pathology**, v. 124, n. 1, p.495–503, 2009.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas, Instituto Agrônômico e FUNDAG, 2005. Cap. 1. p. 1-18.

DONOVAN, N. J.; BEATTIE, G. A. C.; CHAMBERS, G. A.; HOLFORD, P.; ENGLEZOU, A.; HARDY, S.; DORJEE; WANGDI, P.; THINLAY; OM, N. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina communis*. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2012.

DUAN, Y.; ZHOU,L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. W.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Obtained Through Metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 8, p. 1011–1020, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013. FAO Statistical Yearbook 2013 – World food and agriculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 12 agos. 2013a.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 13 agos. de 2013b.

FAN, J.; CHEN, C.; YU, Q.; KHALAF, A.; ACHOR, D. S.; BRLANSKY, R. H.; MOORE, G. A.; LI, Z. G.; GMITTER, JR. F. G. Comparative Transcriptional and Anatomical Analyses of Tolerant Rough Lemon and Susceptible Sweet Orange in Response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 11, p. 1396-1407, 2012.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANESI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR, J. Doenças de citrus. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, vol. 2, 2005, p. 239-269.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 1346-1354, 2009.

FUJIKAWA, T.; MIYATA, S.- I.; IWANAMI, T. Convenient detection of the citrus greening (Huanglongbing) bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by direct PCR from the midrib extract. **PLOS One**, v. 8, n. 2, p. e57011, doi:10.1371/journal.pone.0057011, 2013.

FURUYA, N.; MATSUKURA, K.; TOMIMURA, K.; OKUDA, M.; MIYATA, S.; IWANAMI, T. Sequence homogeneity of the *wserA-trmU-tufB-secE-nusGrpIKAJL-rpoB* gene cluster and the flanking regions of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates around Okinawa Main Island in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p.122–131, 2010.

GAO, S. M.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Production of monoclonal antibodies recognizing most Asian strains of the greening BLO by in vitro immunization with an antigenic protein purified from the BLO. In: MORENO, P.; DA GRACA, J. V.; TIMMER, L. W. 12th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 1993. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1993. p. 244-249.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, v. 73, n. 1, p. 1358-1363, 1983.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: 9th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 1984. **Proceedings...** v.17, 1984. p. J 15-24.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Distribution of the huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. In: 13th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 1996. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1996, 388-391.

GARNIER, M.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a liberibacter present in an 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**, v. 50, n. 1, p. 2119–2125, 2000.

GASPAROTO, M. C. G.; COLETTA-FILHO, H. D.; BASSANEZI, R. B.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Influence of temperature on infection

and establishment of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. **Plant Pathology**, v. 61, n. 1, p. 658-664, 2012.

GOTTWALD, T. R.; AUBERT, B.; ZHAO, X.- Y. Preliminary analysis of citrus Greening (Huanglongbin) epidemics in the People’s Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, v. 79, n. 1, p. 687-693, 1989.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress. doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV. 2007.

GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 119-139, 2010.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; IREY, M. S.; MCCOLLUM, T. G.; WOOD, B. W. Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. **Crop Protection**, v. 36, n. 1, p. 73-82, 2012.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2009. IBGE mostra expansão de 23,2% na produção de citros no Paraná. Disponível em: <<http://gov-pr.jusbrasil.com.br/noticias/412391/ibge-mostra-expansao-de-23-2-na-producao-de-citros-no-parana>>. Acesso em: 19 agos. 2013.

GRAFTON-CARDWELL, E. E.; STELINSKI, L. L.; STANSLY, P. A. Biology and management of asin citrus psyllid, vector of the Huanglongbing Pathogens. **Annual Review Entomology**, v. 58, n. 1, p. 413-432, 2013.

GRAHAM, J. H.; JOHNSON, E. G.; GOTTWALD, T. R.; IREY, M. S. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 97, n. 1, p. 1195-1199, 2013.

GUPTA, K. N.; BARANWAL, V. K.; HAQ, Q. M. Sequence Analysis and Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and 16S/23S Intergenic Spacer Region of Greening Bacterium Associated with Yellowing Disease (Huanglongbing) of Kinnow Mandarin. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2012.

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, n. 1, p. 330-353, 2004.

HALBERT, S. E. The discovery of Huanglongbing in Florida. In: 2nd INTERNATIONAL CITRUS CANKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP. 2005. Florida. **Proceedings**... Orlando: FLORIDA CITRUS MUTUAL, 2005. p. H-3.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L.; RAMADUGU, C.; BRODIE, M. W.; WEBB, S. E.; LEE, R. F. Trailers transporting oranges to processing plants move asian citrus psyllids. **Florida Entomologist**, v. 93, n. 1, p. 33-38, 2010.

HILF, M. E.; SIMS, K. R.; FOLIMONOVA, S. Y.; ACHOR, D. S. Visualization of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 103, n. 1, p. 545-554, 2013.

HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Production and evaluation of non-radioactive probes for the detection of the two ‘Candidatus Liberibacter’ species associated with citrus huanglongbing (greening). **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, n. 1, p. 433–438, 1997.

HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the b operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 1, p. 373–379, 1999a.

HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Isolation of DNA from the Uncultured ‘Candidatus Liberibacter’ Species Associated with Citrus Huanglongbing by RAPD. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 176–182, 1999b.

HODGES, A.; RAHMANI, M.; MULKEY, D. Economic impacts of the Florida Citrus Industry in 2003-04. University of Florida, **IFAS Extension**. Disponível em: <<http://www.fred.ifas.ufl.edu/economic-impact-analysis/pdf/FE63300.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

HOFFMAN, M. T.; DOUD, M. S.; WILLIAMS, L.; ZHANG, M.-Q.; DING, F.; STOVER, E.; HALL, D.; ZHANG, S.; JONES, L.; GOOCH, M.; FLEITES, L.; DIXON, W.; GABRIEL, D.; DUAN, Y.-P. Heat treatment eliminates ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ from infected citrus trees under controlled conditions. **Phytopathology**, v. 13, n. 1, p. 15-22, 2013.

HOY, M. A.; SINGH, R.; ROGERS, M. E. Evaluations of a Novel Isolate of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 93, n. 1, p. 24-32, 2010.

HU, H.; DAVIS, M. J.; BRLANSKY, R. H. Quantification of live ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ populations using real-time PCR and propidium monoazide. *Plant Disease*, v. 97, n. 1, p. 1158-1167, 2013.

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, 1999.

HUNG, T. H.; WU, M. L.; SU, H. J. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 183–189, 2001.

HUNG, T. H.; 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**, v. 53, n. 1, p. 96-102, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012. Indicadores IBGE, Estatística da produção agrícola, julho de 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201307.pdf>. Acesso em: 12 agos. 2013.

ISLAM, M.-S.; GLYNN, J. M.; BAI, Y.; DUAN, Y.-P.; COLETTA-FILHO, H. D.; KURUBA, G.; CIVEROLO, E. L.; LIN, H. Multilocus microsatellite analysis of ‘Candidatus

Liberibacter asiaticus' associated with citrus Huanglongbing worldwide. **BioMed Central Microbiology**, v. 12, n.39, p. 1-11, 2012.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus is a Member of the α Subdivision of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, 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, n. 1, p. 43-50, 1996.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Comparison of the 16S/23S Ribosomal Intergenic Regions "*Candidatus* Liberobacter asiaticum" and "*Candidatus* Liberobacter africanum," the Two Species Associated with Citrus Huanglongbing (Greening) Disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 1, n. 1, p. 224-227, 1997.

KATOH, H.; SUBANDIYAH, S.; TOMIMURA, K.; OKUDA, M.; SU, H.-J.; IWANAMI, T. Differentiation of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" Isolates by Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1910-1917, 2011.

KAWABE, K.; TRUC, N. T. N.; LAN, B. T. N.; HONG, L. T. T.; ONUKI, M. Quantification of DNA of citrus huanglongbing pathogen in diseased leaves using competitive PCR. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 355-359, 2006.

KOIZUMI, M.; PROMMINTARA, M.; LINWATTANA, G.; KAISUWAN, T. Epidemiological aspect of citrus Huanglongbing (Greening) disease in Thailand. **Jarq-Japan Agricultural Research Quartely**, v. 31, n. 3, p. 205-211, 1997.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "*Candidatus* Liberibacter species" associated with citrus huanglongbing. **Plant Disease**, v. 91, n. 1, p. 51-58, 2007.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 139-144, 2009.

LIU, R.; ZHANG, P.; PU, X.; XING, X.; CHEN, J.; DENG, X. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' from two citrus-growing provinces in China. **Plant Disease**, v. 95, n. 1, p. 431-435, 2011.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BARBOSA, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus* Liberibacter americanus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 1, p. 463-468, 2007.

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, n. 1, 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. 1, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; CAMARGO, L. E. A.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; BASSANEZI, R. B.; BEATTIE, G. A. C.; AYRES, A. J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology**, v. 59, n.1, p. 1044–1053, 2010.

MAGOMERE, T. O.; OBUKOSIA, S. D.; MUTITU, E.; NGICHABE, C.; OLUBAYO, F.; SHIBAIRO, S. Molecular characterization of '*Candidatus Liberibacter*' species/strains causing huanglongbing disease of citrus in Kenya. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.12, n. 2, p. 1- 14, 2009.

MANJUNATH, K. L.; HALBERT, S. E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R. F. Detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, v. 98, n. 1, p. 387-396, 2008.

MAPA – MINISTÉRIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2013. Citrus. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>>. Acesso em: 19 agos. 2013.

MIYAKAWA, T. Experimentally-induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, n. 1, p. 224-230, 1980.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, v.3, n. 1, p. 175-82, 1993.

MURRAY, R.G.E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic Notes: A Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 1, n. 1, p. 174-176, 1994.

NAVA, D. E.; GOMEZ-TORRES, M. L.; RODRIGUES, M. D.; BENTO, J. M. S.; HADDAD, M. I. L.; PARRA, J. R. P. The Effects of Host, Geographic Origin, and Gender on the Thermal Requirements of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Environmental Entomology**, v. 39, n. 2, p. 678-684, 2010.

NEVES, E. M; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, M. F. Citricultura Brasileira: Efeitos Econômico-Financeiros, 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 432-436, 2001.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2011. 139p.

NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; RINALDI, D. A. M. F.; CROCE FILHO, J.; AZEVEDO, M. L.; LEITE JR., R. P.; COLETTA-FILHO, H. D.; VICENTINI, S.; NUNES, M. J. C. Primeira constatação de Huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do

Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. 2007. Fitopatologia brasileira, v. 32, **Suplementos...** 2007. p.1094.

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

OLMOS, A.; DASI, M. A.; CANDRESSE, T.; CAMBRA, M. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 2192-2193, 1996.

PELZ-STELINSKI, K. S.; BRLANSKY, R. H.; EBERT, T. A.; ROGERS, J. M. E. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.

ROISTACHER, C. N. Greening: Techniques for Biological Detection of Specific Citrus Graft Transmissible Diseases. In: **Graft-transmissible diseases of citrus**. Rome: FAO. 1991. p. 35-45.

ROISTACHER, C. N. The economics of living with citrus diseases: Huanglongbing (Greening) in Thailand. In: Thirteenth Conference of International Organization of Citrus Virologists. 1996. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1996, p. 279-285.

SAGLIO, P.; D. LAFLECHE; BONISSOL, C.; BOVÉ, J.M. Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associées à la maladie du stubborn des argumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. **Physiology Vegetal**, v. 9, n. 1, p. 569-82, 1971.

SCHWARZ, R. E. Results of a greening survey on sweet orange in the major citrus-growing areas of the Republic of South Africa. **South African Journal of Science**, v. 10, n. 1, p. 471-476, 1967.

SCHWARZ, R.E. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. In: 4th Conference of International Organization of Citrus Virologists. 1968. W. C. Price, University of Florida, Gainesville. **Proceedings...** 1968. p. 118-124.

SEAB – SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. 2012. Fruticultura - Análise da conjuntura agropecuária, dezembro de 2012, DERAL- Departamento de Economia Rural. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf>. Acesso em: 19 agos. 2013.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E. L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A. L.; SCHNEIDER, W. L.; DAMSTEEGT, V. D.; SCHAAD, N. W. Cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*”, and “*Ca. L. americanus*” Associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 5, p. 480-486, 2009.

SUBANDIYAH S.; IWANAMI T.; TSUYUMU S.; IKKI H. Comparison of 16S RNA and 16S23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**, v. 84, n. 1, p. 15-18, 2000.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as

revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, v. 98, n. 1, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JR., 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, n. 1, p. 173-179, 2005a.

TEIXEIRA, D. C.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; DE JESUS JR., W. C.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; DANET, J. L.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. PCR Detection of the Two Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil. In: 16th CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 2005. **Proceedings...** 2005b. p. 432- 438.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus* Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 1, p. 139–150, 2008.

TIRTAWIDJAJA, S. Citrus virus research in Indonesia. In: 8th CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS. 1980. Riverside. **Proceedings...** 1980. p. 29-32.

TOMIMURA, K., MIYATA, S. -I., FURUYA, N., KUBOTA, K., OKUDA, M., SUBANDIYAH, S., HUNG, T. -H., SU, H. -J., IWANAMI, T. Evaluation of genetic diversity among ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ isolates collected in Southeast Asia. **Phytopathology**, v. 9, n. 1, p.1062-1069, 2009.

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 hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 1, p. 553-563, 2009.

TRIVEDI, P.; SPANN, T.; WANG, N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. **Microbial Ecology**, DOI 10.1007/s00248-011-9822-y, 2011.

VILLECHANOUX, S.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J. M. Detection of several strains of the bacterial-like organism of citrus greening disease by DNA probes. **Current Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 89-95, 1992

WALTER, A. J.; HALL, D. G.; DUAN, Y. P. Low incidence of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ in *Murraya paniculata* and associated *Diaphorina citri*. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 827-832, 2012.

WANG, Z.; YIN, Y.; HU, H.; YUAN, Q.; PENG, G.; XIA, Y. Development and application of molecular-based diagnosis for ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’, the causal pathogen of citrus huanglongbing. **Plant Pathology**, v. 55, n. 1, p. 630–638, 2006.

CAPÍTULO I

MULTILOCUS MICROSATELLITE TYPING OF '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' IN A BRAZILIAN CITRUS ORCHARD

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), the most destructive citrus disease, is associated with the phloem-limited α -proteobacterium ‘*Candidatus Liberibacter*’ species. Knowledge of the genetic structure and diversity in a population is key to control this disease. The present study analyzed the genetic variability of ‘*Ca. L. asiaticus*’ in a single and invaded orchard. The variability of three microsatellite markers located in three different genes was evaluated. A weak population genetic structure was determined including 21 different haplotypes, the majority of which were grouped into three major clusters. It was possible to identify diverse main stream haplotypes depending on the host citrus species and to identify the potential founder haplotype. The presence of strains that were collected in the beginning of the HLB manifestation and included in the primary clusters revealed that the genetic diversity was present from the beginning of the infection. The present study confirms the efficiency of microsatellite markers for analyzing the variability and evolution of isolates in newly infected areas.

Keywords: *Huanglongbing* (HLB). Simple sequence repeat (SSR). Founder haplotype.

RESUMO

Huanglongbing, a doença mais destrutiva do citros, está associada com espécies de ‘*Candidatus Liberibacter*’, uma α - Proteobacterium limitada ao floema. O conhecimento da estrutura genética e diversidade em uma população são fundamentais para o controle da doença. O presente estudo analisou a variabilidade genética de ‘*Ca . L. asiaticus*’ em um único e recentemente pomar invadido. A variabilidade de três marcadores microssatélites localizados em três diferentes genes foi avaliada. A estrutura genética populacional foi determinada incluindo 21 haplótipos diferentes, a maioria dos quais foram agrupados em três grandes grupos. Foi possível identificar diversos haplótipos principais, dependendo das espécies de citros e identificar o potencial haplótipo fundador. A presença de amostras coletadas no início de uma manifestação de HLB e incluídas nos grupos primários revelou que a diversidade genética esteve presente desde o início da infecção. O presente estudo confirma a eficiência de marcadores microssatélites para a análise da variabilidade e a evolução dos isolados em áreas infectadas.

Palavras-chave: *Huanglongbing* (HLB). Sequências simples repetidas (SSR). Haplótipo fundador.

1. INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB) is currently considered to be the most destructive citrus disease in citrus-producing countries (Bové, 2006). This disease causes rapid tree decline and fruit drop (Da Graça, 1996). It is associated with the phloem-limited α -proteobacteria ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’ (Bové, 2006; Wang e Trivedi, 2013). These bacteria are transmitted in a persistent, circulative manner by the citrus psyllid species *Trioza erythrae* and *Diaphorina citri* (Gottwald, 2010). Recently, the psyllid *Cacopsylla citrisuga* in China (Cen et al., 2012) has been identified as a new vector and *D. communis* in Bhutan was found to carry ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Donovan et al., 2012). HLB was described for the first time in Brazil in São Paulo state (Coletta-Filho et al., 2004), where ‘*Ca. L. asiaticus*’ has been prevalent since 2008 (Bové, 2012).

The availability of the full-length ‘*Ca. L. asiaticus*’ genome has improved the knowledge on this bacterium and provided insights into its pathogenesis (Duan et al., 2009). The understanding of the genetic structure and diversity of a population is a relevant tool to investigate the interaction between the pathogen, vectors and hosts. It could reveal the sources and track the spread of the pathogen, which, consequently, could aid in the management of the disease (Deng et al., 2008; Katoh et al., 2011). The 16S rRNA gene has been used to analyze the genetic diversity of ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Adkar-Purushothama et al., 2009) and the prophage gene frequency (Liu et al., 2011). However, closely related isolates in a population were not well discriminated by these methods. Recent studies using microsatellite DNA markers associated with hypervariable simple sequence repeat (SSR) have provided greater resolution for differentiating closely related isolates. Chen et al. (2010) applied the SSR strategy to characterize the variability in ‘*Ca. L. asiaticus*’ strains from Guangdong (China) and Florida (USA) using one repeat unit. However, an analysis using a single SSR locus could be insufficient to reveal the precise genetic diversity of ‘*Ca. L. asiaticus*’, especially in newly invaded areas. To overcome this issue, four loci were used by Katoh et al. (2011) to discriminate among isolates from Japan. Islam et al. (2012) designed and evaluated seven microsatellite markers from ‘*Ca. L. asiaticus*’ with samples from nine different countries in Asia, North America (Florida, USA) and South America (Sao Paulo, Brazil). Recently, Meneguim et al. (2011) analyzed the genetic diversity of ‘*Ca. L. asiaticus*’ isolates from Paraná, Brazil, where HLB was detected in 2007 (Nunes et al., 2007), using RFLP analyses and the sequencing of the β -operon ribosomal protein gene, and did not find any variability among isolates. In this study, we report the genetic variability among 70 ‘*Ca. L. asiaticus*’

isolates from an experimental orchard of adult citrus trees, where HLB was detected in 2010, including different species, located in Paraná-Brazil, using three of the polymorphic microsatellite markers developed by Islam et al. (2012); these markers had the highest haploid genetic diversity and the highest number of alleles. The present study is the first report analyzing the genetic variability of this pathogen in an invaded single orchard.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Surveys for *huanglongbing* detection

Visual inspections were performed during March and June every year, from 2009 to 2012, in an experimental orchard containing 2,500 citrus trees (including 2140 plants of *Citrus sinensis*, 152 plants of *C. reticulata*, 64 plants of *C. clementina*, 40 plants of *C. unshiu*, 24 plants of *C. deliciosa*, 24 plants of *C. reticulata* x *C. sinensis*, 16 plants of *C. reticulata* x *C. paradisi*, 16 plants of *C. unshiu* x *C. sinensis*, 8 plants of *C. paradisi*, 8 plants of *C. aurantium*, 8 plants of *C. aurantifolia* in the area), located in Iguatemi (FEI/UEM) Maringá-PR, Brazil (23° 25' S, 51° 57' O, 550 m altitude). The plant material was collected as specified below only from symptomatic trees. All confirmed HLB-infected trees by the identification of '*Ca. Liberibacter*' species using real-time PCR, were removed according to the Brazilian legislation (Order Num. 53, MAPA; D.O.U. 17/10/2008) for HLB eradication.

2.2 Plant material and DNA purification

Plants exhibiting symptoms, were collected ten leaves showing HLB symptoms from the canopy of each symptomatic tree at the experimental orchard. Extract from symptomatic leaves of each tree, were prepared from 0.5g of midribs and petioles by maceration with liquid nitrogen, stored in individual microtubes and were pooled for DNA purification. Total DNA was extracted by using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method described by Murray and Thompson (1980). The concentration and quality of the DNA was evaluated with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). All DNA samples were standardized to a concentration of approximately 10 ng/μl and stored at -20°C until use.

2.3 Real-time PCR for '*Ca. Liberibacter*' species detection and identification

The detection of '*Ca. Liberibacter*' species was performed by real-time PCR using the HLB/100 complete kit (Plant Print Diagnostics SL, www.plantprint.net, Valencia, Spain) based on Bertolini et al. (2010) (Spanish patent 201001157). Amplifications were performed in a StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction cocktail consisted of 1x Path-ID™ qPCR master mix (Ambion, CA, USA), 0.5 µM of each primer, 100 nM of the TaqMan probe and 3 µl of purified DNA in a total volume of 12 µl. The amplification protocol consisted of a denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 15 s and 64 °C for 1 min). Data acquisition and analyses were performed using the thermal cycler software. The default threshold set by the thermal cycler was slightly adjusted above the noise level onto the narrowest point of the linear part of the growth curve, according to manufacturer's instructions.

Identification of '*Ca. Liberibacter*' species was performed using three different real-time PCRs, following the previously described protocol and using the forward specific primers HLBas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBaf (5'-CGA GCG CGT ATT TTA TAC GAG CG-3') or HLBam (5'-GAG CGA GTA CGC AAG TAC TAG-3') in combination with the common reverse primer HLBbr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3) and the HLBp TaqMan probe (Li et al., 2006).

2.4 PCR amplification of the three microsatellite loci of '*Ca. L. asiaticus*'

The three SSR markers were located as follows: i) in the adenosine deaminases gene, with the nucleotide repeat sequence (5'-TAT TCT G-3') (SSR_A); ii) in the phosphohydrolases gene, containing the nucleotide repeat sequence (5'-CAG T-3') (SSR_C); and iii) in the transcriptional regulator gene, containing the repeat sequence (5'-CTT GTG T-3') (SSR_E). These markers were amplified by PCR according to Islam et al. (2012), with minor modifications. Briefly, the reaction consisted of 10 mM Tris-HCl, pH 8.9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 µM of each primer (LasSSR-A-f: 5'-CGC CTA CAG GAA TTT CGT TAC G-3', LasSSR-A-r: 5'-TCT CAT CTT GTT GCT TCG TTT ATC C-3'; LasSSR-C-f: 5'-CGA TTG TTG ATG AAT TAC C-3', LasSSR-C-r: 5'-GAA TAG AAG AAC CCT AAG C-3'; LasSSR-E-f: 5'-GAT CAG TAG TCT ATC ACC AC-3'; and LasSSR-E-r: 5'-TAC TGG AAA CAA ATG GAA TAC-3'), 250 µM dNTPs, 0.5 units of Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and 2 µl of DNA template in a total volume of 25 µl. A

MasterCycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) and the following PCR schedule was used: denaturation step at 95 °C for 2 min, 40 cycles of amplification, consisting of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 60 °C for 45 s and 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. Successful amplification was confirmed by 2% agarose gel electrophoresis with BrEt staining and UV visualization. The amplified products were purified using the UltraClean PCR Clean-up DNA purification kit (MoBio Lab. Inc., Carlsbad, CA, USA). The nucleotide sequences of purified amplicons were obtained using an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA) equipped with the 36 cm 16 capillary array filled with POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the DNA Sequencing Unit of the Institute for Plant Molecular and Cell Biology (IBMCP), Valencia, Spain, and the number of repetitions for each microsatellite was obtained.

2.5 Haplotypes and genetic diversity

The haplotypes were determined based on the combination of allelic data from the microsatellite loci. In this study, haplotypes are named as a string of three numbers delimited by a hyphen corresponding to the number of microsatellite repetitions for SSR_A, SSR_C and SSR_E, respectively. The genetic diversity was obtained using the plugin GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012).

2.6 Genetic structure analysis

The relationships among the isolates were obtained using Microsatellite Analyzer 4.05 software (http://i122server.vu-wien.ac.at/MSA/MSA_download.html); subsequently, Population 1.2.32 software (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>) was used to construct an UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance (Nei et al., 1983) and 1000 bootstraps. MEGA 5.1 software (<http://www.megasoftware.net>) was used to represent the tree graphically. To determine the relationships with no prior population assumptions, Structure 2.3.4 software was used (Pritchard et al., 2000), employing 15 independent iterations with K (number of clusters) between 1 and 15. The burn-in period was set to 20,000 iterations, using a run length of 200,000 Markov chain Monte Carlo repetitions. Structure harvester software (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>) was used to estimate K. eBURST 3 (<http://eburst.mlst.net>) was used to identify putative founder haplotypes.

3. RESULTS

3.1 *Huanglongbing* diagnosis and '*Ca. L. asiaticus*' identification

Yellow shoots with asymmetric blotchy-mottled leaves or other suspicious symptoms suggestive of *Huanglongbing* were visualized for the first time in the experimental orchard in 7 out of 2,500 trees during 2010. In the year 2011, 17 additional trees showing suspicious symptoms were identified and sampled. In the year 2012, the number of suspected infected trees increased to 46. All samples (70 in total) were analyzed by real-time PCR and were determined to be specifically infected by '*Ca. L. asiaticus*'.

3.2 Microsatellite loci amplification and alleles determination

Successful amplifications of the three microsatellite loci were achieved for the 70 samples. Amplicon sizes ranged from 298 to 319 bp for SSR_A, from 230 to 238 bp for SSR_C, and from 170 to 275 bp for SSR_E. Every locus was found to be polymorphic, and the number of alleles was 6 for SSR_A (from 9 to 14 repetitions of the microsatellite), 3 for SSR_C (from 9 to 11 repetitions) and 10 for SSR_E (2, 5, 7, 8, and 13 to 18 repetitions). Table 1 shows the host, cultivar, year of sampling along with the resulting fragment size and the number of SSR repetitions for each sample.

3.3 Genetic diversity and genetic structure of the population

The haploid genetic diversity scores per locus for SSR_A, SSR_C and SSR_E, were 0.659, 0.109 and 0.778, respectively. A total of 21 haplotypes were identified in the whole population. The UPGMA analysis identified three major groups (Figure 1). Major groups included isolates collected during all three years. Group 1 included the primary haplotype, 12-11-16 and contained the highest number of isolates and was present during all three years. Four other haplotypes, each identified in clusters of several isolates collected in 2011 and in 2012, were also present in group 1. Additionally, four haplotypes represented by single isolates collected in 2012 were included in group 1. Major group 2 included five haplotypes, with the primary haplotype, 13-11-8, including isolates collected in 2010 and 2012. One haplotype included one isolate collected in 2010, while the other haplotypes contained isolates from 2011 and/or 2012. Major group 3 in Table 1 contained three haplotypes, the primary one

being 11-11-8, which contained several isolates collected during 2010, 2011 and 2012. Two other single isolates with different haplotypes were also included in the group 3. There were four haplotypes which did not cluster in any of the three major groups. Haplotypes 10-11-14, 14-10-16, 13-9-16 and 13-10-13 isolates of the species *C. sinensis* were clustered separately. Samples of the same species and even cultivar, usually grouped within the same haplotype.

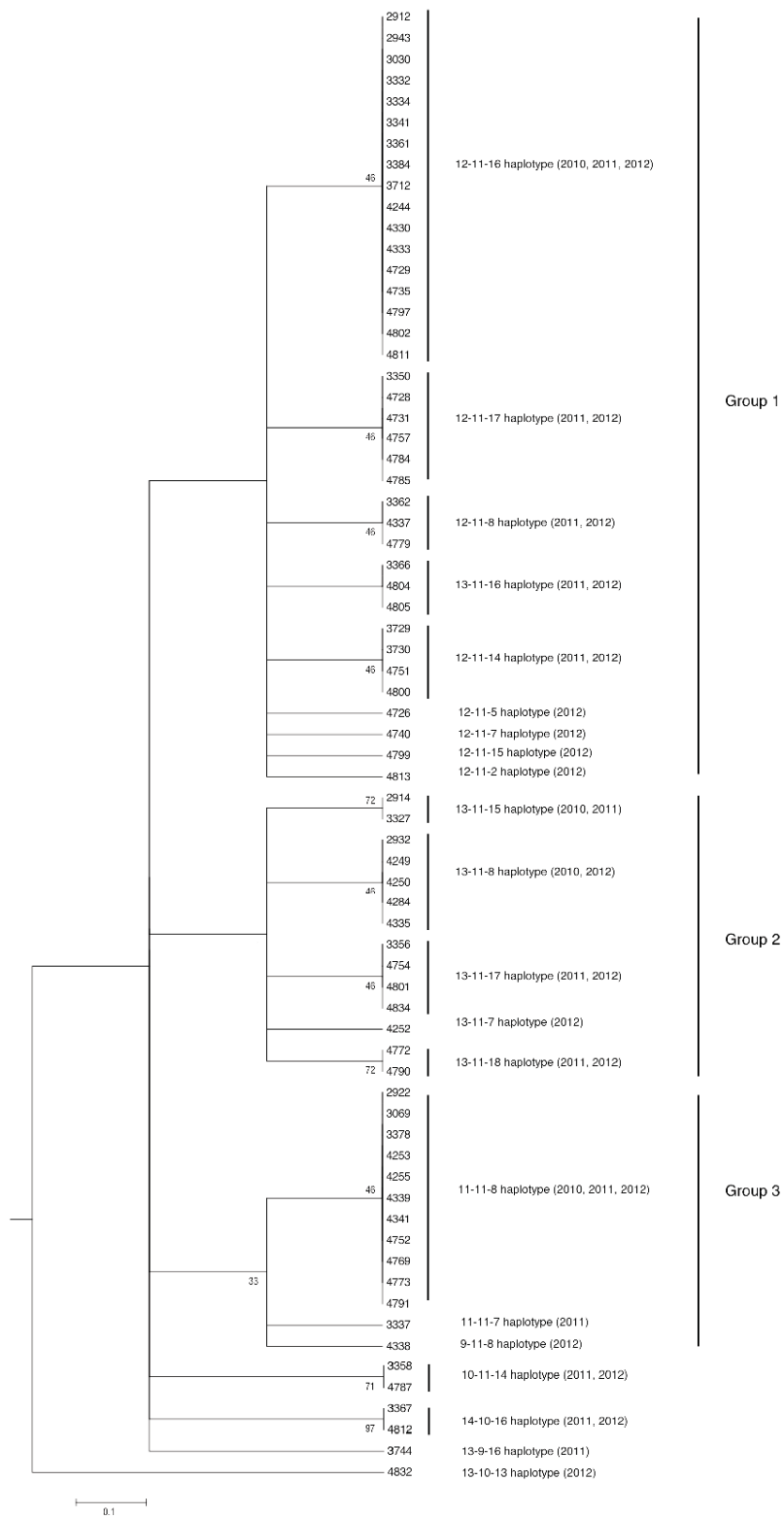


Figure 1 UPGMA dendrogram showing the genetic relationships of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates. Only bootstrap values > 30% are shown.

The results obtained with the computer program Structure, based on Bayesian modeling, suggested that two distinct populations were present (K=2). However, the minimum K that can be obtained with the statistic Delta K is 2, and all individuals in the analysis resulted in almost the same probability (surrounding 0.5) of belonging either population 1 or 2. In that case, the more reliable value of K has been described to be 1 (Evanno et al., 2005), because it is weak or non-existent population structure (Hubisz et al., 2009). eBURST analysis, using the 70 isolates and resampling for 1000 bootstraps, determined one group that included 19 haplotypes, while 2 haplotypes were singletons (13-10-13 and 14-10-16). The founder haplotype in the orchard was successfully predicted to be 12-11-8, and it was found in isolates collected from the *C. sinensis* and *C. unshiu* species. The diagram in Figure 2 shows the network with the two primary haplotypes, which included 40% of the isolates: 12-11-16, found in isolates from the *C. sinensis* and *C. reticulata* species; and 11-11-8, found in isolates from the *C. sinensis*, *C. reticulata* and *C. unshiu* species. In addition, two sub-founder haplotypes, 12-11-7 and 13-11-8 were suggested. The 12-11-7 sub-founder haplotype was only found in *C. sinensis* x *C. reticulata* hosts, the same as for its directly related haplotype 11-11-7, collected the year before. The second sub-founder haplotype was only found in isolates from the *C. sinensis* species.

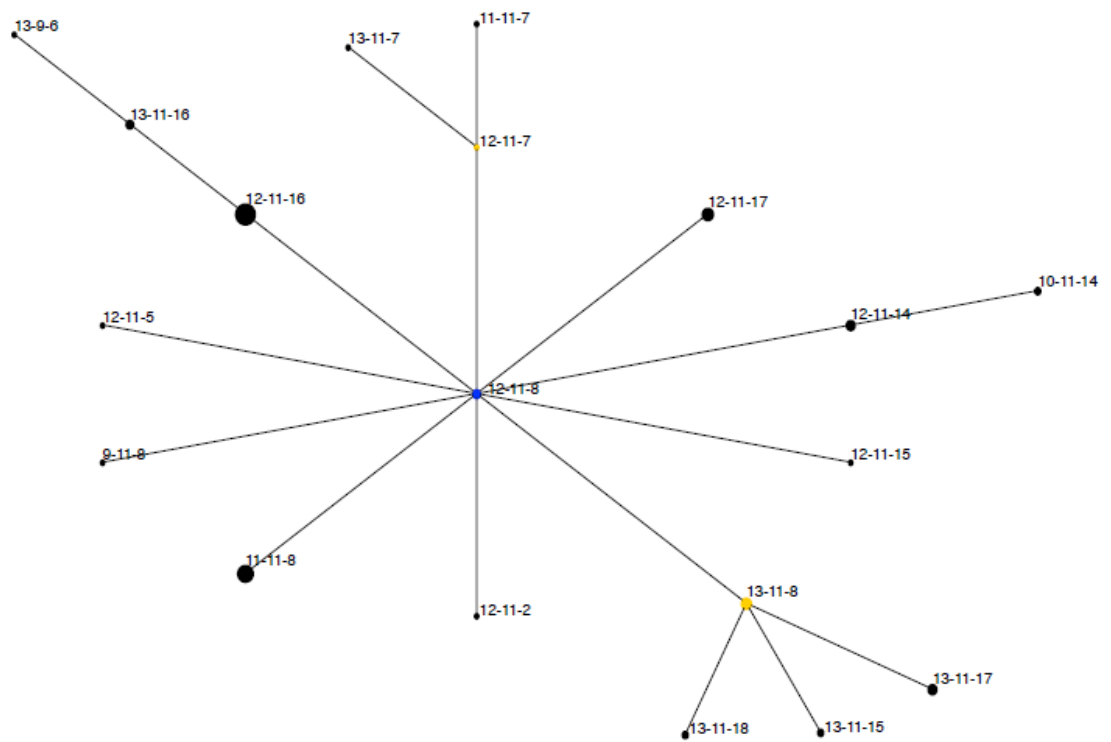


Figure 2 Network diagram from eBURST analysis. The solid blue circle in the diagram indicates the predicted founder haplotype 12-11-8, and the solid yellow circles indicate the sub-founder haplotypes 13-11-8 and 13-11-7. A larger solid circle implies a higher number of isolates.

4. DISCUSSION

The identification of ‘*Ca. L. asiaticus*’ as the invasive species present in the experimental orchard is in agreement with previous reports that have determined that this species is prevalent in Brazil (Bové, 2012). The variability of the isolates in the orchard was determined in the present analysis, in contrast with the previous studies of genetic diversity in the Paraná State (Meneguín et al., 2011) that using other approaches were not able to discriminate between closely related isolates.

The three multilocus microsatellite markers employed in the present study helped to identify pathogen introduction patterns and to predict the likely relationships among ‘*Ca. L. asiaticus*’ isolates found in the orchard. These data provided enough resolution for differentiating among closely related isolates, which was useful for tracking haplotypes and identifying invasive strains. The number of SSR alleles for the three markers was lower, as expected, compared with those reported by Islam et al. (2012) using a collection of isolates from nine countries, being 6 vs. 30, 3 vs. 15 and 10 vs. 17 for SSR_A, SSR_C and SSR_E,

respectively. However, the genetic diversity for SSR_E was surprisingly higher than that reported by Islam et al. (2012), being 0.778 vs. 0.587. This higher value for SSR_E was mainly due to the presence of one isolate with only 2 repetitions of the microsatellite, compared with 18 repetitions for others. SSR_A and SSR_C had predictably lower genetic diversities than those reported by Islam et al. (2012), being 0.659 vs. 0.881 (SSR_A) and 0.109 vs. 0.631 (SSR_C). Such lower levels of allelic and haploid genetic diversity observed in populations of '*Ca. L. asiaticus*' is consistent with the hypothesis that the populations of this bacterium have derived from recent introductions. Greater variability of '*Ca. L. asiaticus*' is observed in areas where the ancestral introduction of the pathogen, due to increased mutations rates, natural selection and population differentiation that occur over time (Islam *et al.*, 2012).

Twenty-one different haplotypes were identified in the experimental orchard. The genetic relationships among the isolates in the present study, as determined from the UPGMA based on Nei's genetic distance, resulted in three major groups of '*Ca. L. asiaticus*', which all included isolates collected from the first detections in 2010 through 2012. This result confirms that the genetic diversity was present at the origin of the infection. The haplotype 12-11-16, found in *C. sinensis* and *C. reticulata*, was the most prevalent and persisted during the entire experimental period. The haplotypes grouped separately, suggest potential cross-infection among isolates of '*Ca. L. asiaticus*'. These results may alert to the possible existence of levels of specificity among isolates of '*Ca. L. asiaticus*' and hosts of the same species but of different cultivars, as well as the need to know the levels of pathogen virulence. The potential for cross-infection can indicate the presence of specific hosts among the different species of citrus sampled, suggesting potential variability in aggressive behavior among different isolates of '*Ca. L. asiaticus*'. The variability found in isolates may suggest the existence of pathogenic specialization (Muniz *et al.*, 1998). The variability of the pathogen and the host, may induce the occurrence of host specificity among the isolates of the pathogen through cross-infection (Miguel-Wruck *et al.*, 2010).

Structure and eBURST analyses suggested a weak genetic population structure and provided further insights into the origin of '*Ca. L. asiaticus*' in the orchard. A founder haplotype, 12-11-8, was predicted and was only isolated from *C. sinensis* and *C. unshiu*. This result suggests that increasing the number of repetitions from 8 to 16 in the SSR_E microsatellite is a molecular marker for improving the fitness of the bacterium in *C. sinensis* and *C. reticulata* but hampering the adaptation to *C. unshiu*. This founder haplotype was not detected in 2010 but was detected in 2011 and 2012. Most likely, the founder haplotype was

present at the origin of the infection in symptomless trees during incubation period; as HLB-infected trees require from months to years to show symptoms. However, the results reported in this study confirm that the founder haplotype was not as well adapted to the environment as the haplotypes 12-11-16 (see above) and 11-11-8, which showed higher fitness. This latter haplotype, 11-11-8, was isolated from *C. sinensis*, *C. reticulata* and *C. unshiu*, which also suggests that 8 repetitions in SSR_E could be a molecular marker that improves the fitness in *C. unshiu* and that losing one repetition of SSR_A, decreasing from 12 to 11, could improve the fitness in *C. reticulata* and allows the infection of this host. In contrast, increasing the number of repetitions of SSR_A from 12 to 13 worsens the adaptation to *C. reticulata* and *C. unshiu*, and consequently, the sub-founder haplotype, 13-11-8 was, only isolated from *C. sinensis*. Haplotype 13-11-18, which was only isolated from *C. unshiu* and *C. reticulata* was derived from this sub-founder haplotype. The second sub-founder haplotype, 12-11-7, was only found in *C. sinensis* x *C. reticulata*, suggesting that the loss of one repetition in the third microsatellite from the founder haplotype (12-11-8) could be required for the bacterium to adapt to this hybrid. This pattern was also observed in haplotype 11-11-7 which can also infect the hybrid.

These results suggest that the bacterium is continuously trying different numbers of copies and combinations of the microsatellites to search for selective advantages, which are required primarily when there is a high diversity of hosts, vectors and environmental conditions that influence the populations.

5. CONCLUSIONS

The present study involved, for the first time, an analysis of the genetic diversity of 'Ca. L. asiaticus' in a single and recently invaded orchard. The analysis of 3 microsatellites located in 3 different genes allowed to discriminating among closely related isolates. The results revealed 21 haplotypes, grouped into three major clusters and probably with a weak population genetic structure. It was possible to identify the likely founder haplotype and deduce haplotypes with higher fitness for some citrus species in the orchard under study. The presence of isolates collected in the year 2010 in the three primary clusters revealed that the genetic diversity was present from the beginning of the infection.

REFERENCES

- ADKAR-PURUSHOTHAMA, C.R.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; RAMANAYAKA, J. G.; BIANCO, P. A. Genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 681-688, 2009.
- BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; SERRA, P.; LÓPEZ, M. M.; LOPES, S.; DURAN-VILA, N.; AYRES, J.; BOVÉ, J. M. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Valencia, Spain). **Direct procedure for specific detection of 'Ca. Liberibacter' spp. by immobilized targets and real-time PCR and kit for its detection**. Spanish patent 201001157. 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 1, p. 465-467, 2012.
- CEN, Y.; ZHANG, L.; XIA, Y.; GUO, J.; DENG, X.; ZHOU, W.; SEQUEIRA, R.; GAO, J.; WANG, Z.; YUE, J.; GAO, Y. Detection of '*Candidatus liberibacter asiaticus*' in *Cacopsylla* (psylla) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 95, n. 1, p. 304-311, 2012.
- CHEN, J.; DENG, X.; SUN, X.; JONES, D.; IREY, M.; CIVEROLO, E. Guangdong and Florida populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. **Phytopathology**, v. 100, n. 1, p. 567-572, 2010.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JR., J.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 1, p. 1382, 2004.
- DA GRAÇA, J.V. Citrus Greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109-36, 1991.
- DENG, X.; CHEN, J.; FENG, Z.; SHAN, Z.,; GUO, H.; ZHU, J.; LI, H.; CIVEROLO, E. L. Identification and characterization of the huanglongbing bacterium in pummelo from multiple locations in Guangdong, P. R. China. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 513-518, 2008.
- DONOVAN, N. J.; BEATTIE, G. A. C.; CHAMBERS, G. A.; HOLFORD, P.; ENGLEZOU, A.; HARDY, S.; DORJEE; WANGDI, P.; THINLAY; OM, N. First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina communis*. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2012.
- DUAN, Y. P.; ZHOU L. J.; HALL, D.G.; LI, W. B.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. W.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 1, p. 1011-1020, 2009.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 2611-2620, 2005.

- HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 1322–1332, 2009.
- ISLAM, M. -S.; GLYNN, J. M.; BAI, Y.; DUAN, Y. -P.; COLETTA-FILHO, H. D.; KURUBA, G.; CIVEROLO, E. L.; LIN, H. Multilocus microsatellite analysis of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing worldwide. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 39, p. 1-12, 2012.
- KATOH, H.; SUBANDIYAH, S.; TOMIMURA, K.; OKUDA, M.; SU, H. J.; IWANAMI, T. Differentiation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates by variable-number tandem-repeat analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 1910-1917, 2011.
- LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of '*Candidatus Liberibacter*' species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.
- LIU, R.; ZHANG, P.; PU, X.L.; XING, X.Q.; CHEN, J. C.; DENG, X. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from two citrus-growing provinces in China. **Plant Disease**, v. 95, n. 1, p. 431-435, 2011.
- MENEGUIM, L.; MARQUES, V. V.; MURATA, M. M.; BARRETO, T. P.; VAZQUEZ-SOUZA, G. V.; VILLAS-BOAS, L. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LEITE JR., R. P. Genetic diversity of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' isolates from Paraná State, Brazil. In: 2nd INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING. 2011. **Proceedings...** 2011. p. 24-29.
- MIGUEL-WRUCK, D. S.; OLIVEIRA, J. R.; DIAS, L. A. S. Especificidade de hospedeiro nas interações *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – brássicas. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 129-133, 2010.
- MUNIZ, M. F. S.; SANTOS, R. C. R.; BARBOSA, G. V. S. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 1, p. 177-179, 1998.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 1, p. 4321-4325, 1980.
- NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular-data. II. Gene-frequency data. **Journal of Molecular Evolution**, v. 19, n. 1, p. 153-170, 1983.
- NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; RINALDI, D. A. M. F.; CROCE FILHO, J.; AZEVEDO, M. L.; LEITE JR., R. P.; COLETTA-FILHO, H. D.; VICENTINI, S.; NUNES, M. J. C. Primeira constatação de Huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. 2007. Fitopatologia brasileira, v. 32, **Suplementos...** 2007. p.1094.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 1, p. 2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 1, p. 945-959, 2000.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus Huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>. 2013.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1 Host, cultivar, year of sampling and microsatellite loci features of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates collected from the experimental orchard.

| Sample | Host | Cultivar | Year | Amplicon size (bp) | | | Number of repetitions | | |
|--------|--|-----------------------------------|------|--------------------|--------|--------|-----------------------|-------|-------|
| | | | | Gene_A | Gene_C | Gene_E | SSR_A | SSR_C | SSR_E |
| 2912 | <i>Citrus sinensis</i> | Bahia | 2010 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 2914 | <i>Citrus sinensis</i> | Orama | 2010 | 312 | 238 | 261 | 13 | 11 | 15 |
| 2922 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell | 2010 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 2932 | <i>Citrus sinensis</i> | Ovale Mut Proc. 43 5/96 (S) | 2010 | 312 | 238 | 212 | 13 | 11 | 8 |
| 2943 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2010 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3030 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2010 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3069 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2010 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 3327 | <i>Citrus reticulata</i> | Osaceola | 2011 | 312 | 238 | 261 | 13 | 11 | 15 |
| 3332 | <i>Citrus sinensis</i> | Werley | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3334 | <i>Citrus sinensis</i> | Bahia | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3337 | <i>Citrus reticulata</i> x <i>C. sinensis</i> | DEKOPON | 2011 | 298 | 238 | 205 | 11 | 11 | 7 |
| 3341 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3350 | <i>Citrus sinensis</i> | Bahia | 2011 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 3356 | <i>Citrus sinensis</i> | Pardilhó (S) | 2011 | 312 | 238 | 275 | 13 | 11 | 17 |
| 3358 | <i>Citrus sinensis</i> | MORO 22 (B) | 2011 | 291 | 238 | 254 | 10 | 11 | 14 |
| 3361 | <i>Citrus sinensis</i> | Tarocco#11 (B) | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3362 | <i>Citrus sinensis</i> | Bahia | 2011 | 305 | 238 | 212 | 12 | 11 | 8 |
| 3366 | <i>Citrus sinensis</i> | Bahia | 2011 | 312 | 238 | 268 | 13 | 11 | 16 |
| 3367 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera Ovale | 2011 | 319 | 234 | 268 | 14 | 10 | 16 |

Table 1,
Cont.;

| | | | | | | | | | |
|------|------------------------|-----------------------------------|------|-----|-----|-----|----|----|----|
| 3378 | <i>Citrus sinensis</i> | Espanole | 2011 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 3384 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3712 | <i>Citrus sinensis</i> | Pêra | 2011 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 3729 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia | 2011 | 305 | 238 | 254 | 12 | 11 | 14 |
| 3730 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia | 2011 | 305 | 238 | 254 | 12 | 11 | 14 |
| 3744 | <i>Citrus sinensis</i> | Folha murcha | 2011 | 312 | 230 | 268 | 13 | 9 | 16 |
| 4244 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4249 | <i>Citrus sinensis</i> | Ovale Mut Proc. 43 5/96 (S) | 2012 | 312 | 238 | 212 | 13 | 11 | 8 |
| 4250 | <i>Citrus sinensis</i> | Ovale Mut Proc. 43 5/96 (S) | 2012 | 312 | 238 | 212 | 13 | 11 | 8 |
| 4252 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 312 | 238 | 205 | 13 | 11 | 7 |
| 4253 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4255 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4284 | <i>Citrus sinensis</i> | Folha murcha | 2012 | 312 | 238 | 212 | 13 | 11 | 8 |
| 4330 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4333 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4335 | <i>Citrus sinensis</i> | Ovale Mut Proc. 43 5/96 (S) | 2012 | 312 | 238 | 212 | 13 | 11 | 8 |
| 4337 | <i>Citrus sinensis</i> | Ovale Mut Proc. 43 5/96 (S) | 2012 | 305 | 238 | 212 | 12 | 11 | 8 |
| 4338 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 284 | 238 | 212 | 9 | 11 | 8 |
| 4339 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4341 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Campbell (B) | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4726 | <i>Citrus sinensis</i> | Orange Barlerin SRA 568 (B) | 2012 | 305 | 238 | 191 | 12 | 11 | 5 |
| 4728 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera EEL | 2012 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 4729 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera EEL | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |

Table 1,
Cont.;

| | | | | | | | | | |
|------|--|--------------------------------|------|-----|-----|-----|----|----|----|
| 4731 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera EEL | 2012 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 4735 | <i>Citrus reticulata</i> | Muscia | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4740 | <i>Citrus reticulata x C. sinensis</i> | DEKOPON | 2012 | 305 | 238 | 205 | 12 | 11 | 7 |
| 4751 | <i>Citrus reticulata</i> | Muscia | 2012 | 305 | 238 | 254 | 12 | 11 | 14 |
| 4752 | <i>Citrus reticulata</i> | Muscia | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4754 | <i>Citrus sinensis</i> | Valência Taquari | 2012 | 312 | 238 | 275 | 13 | 11 | 17 |
| 4757 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera EEL | 2012 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 4769 | <i>Citrus sinensis</i> | Diva | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4772 | <i>Citrus unshiu</i> | Tangerina Satsuma Miyakawawase | 2012 | 312 | 238 | 282 | 13 | 11 | 18 |
| 4773 | <i>Citrus unshiu</i> | Tangerina Satsuma Miyakawawase | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4779 | <i>Citrus unshiu</i> | Satsuma Okitsu SPA 29 | 2012 | 305 | 238 | 212 | 12 | 11 | 8 |
| 4784 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera Ovale | 2012 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 4785 | <i>Citrus sinensis</i> | Pera Ovale | 2012 | 305 | 238 | 275 | 12 | 11 | 17 |
| 4787 | <i>Citrus sinensis</i> | Laranja R.A.H. (Sb) | 2012 | 291 | 238 | 254 | 10 | 11 | 14 |
| 4790 | <i>Citrus reticulata</i> | Cravo | 2012 | 312 | 238 | 282 | 13 | 11 | 18 |
| 4791 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Frost | 2012 | 298 | 238 | 212 | 11 | 11 | 8 |
| 4797 | <i>Citrus sinensis</i> | Midsweet | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4799 | <i>Citrus sinensis</i> | Midsweet | 2012 | 305 | 238 | 261 | 12 | 11 | 15 |
| 4800 | <i>Citrus sinensis</i> | Midsweet | 2012 | 305 | 238 | 254 | 12 | 11 | 14 |
| 4801 | <i>Citrus sinensis</i> | Orama | 2012 | 312 | 238 | 275 | 13 | 11 | 17 |
| 4802 | <i>Citrus sinensis</i> | Orama | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4804 | <i>Citrus sinensis</i> | Sunstar | 2012 | 312 | 238 | 268 | 13 | 11 | 16 |
| 4805 | <i>Citrus sinensis</i> | Sunstar | 2012 | 312 | 238 | 268 | 13 | 11 | 16 |

Table 1,
Cont.;

| | | | | | | | | | |
|------|------------------------|----------------------------|------|-----|-----|-----|----|----|----|
| 4811 | <i>Citrus sinensis</i> | Harvard | 2012 | 305 | 238 | 268 | 12 | 11 | 16 |
| 4812 | <i>Citrus sinensis</i> | <i>C. sinensis</i> 1342 | 2012 | 319 | 234 | 268 | 14 | 10 | 16 |
| 4813 | <i>Citrus sinensis</i> | Valencia Frost | 2012 | 305 | 238 | 170 | 12 | 11 | 2 |
| 4832 | <i>Citrus sinensis</i> | Stone | 2012 | 312 | 234 | 247 | 13 | 10 | 13 |
| 4834 | <i>Citrus sinensis</i> | Torregrosso | 2012 | 312 | 238 | 275 | 13 | 11 | 17 |

CAPÍTULO II

**Varição estacional de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em citros no estado do
Paraná**

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é considerada uma das principais moléstias da cultura do citros por rapidamente tornar as plantas improdutivas e os frutos inadequados ao consumo, sendo causada por uma bactéria de crescimento limitado ao floema, denominada ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação estacional de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ através de PCR em tempo real (qPCR). Plantas infectadas naturalmente com HLB foram identificadas por PCR convencional, divididas em quatro setores e protegidas com tela antiafídica para evitar a dispersão da bactéria causadora da doença nas áreas. Também utilizou-se mudas inoculadas com borbulhas contaminadas e mantidas em casa de vegetação. O acompanhamento populacional bacteriano foi realizado por 20 meses através de qPCR com os iniciadores específicos As84F/As180R, após a extração de DNA total das nervuras de dez folhas coletadas mensalmente. As médias dos valores de Ct (*Cycle Threshold*) foram separadas de acordo com as estações do ano e empregou-se o modelo linear misto. O teste de Tukey foi empregado para separar médias com diferenças significativas. Foram observadas diferenças significativas entre os Ct em diferentes estações do ano e variações bruscas nos valores de Ct nos setores das plantas no campo. O outono foi a melhor época para detecção da bactéria. Não foram observadas diferenças significativas para as mudas. Com o aumento da população bacteriana no hospedeiro observou-se a evolução dos sintomas. Estes resultados confirmam a importância do conhecimento da época correta para a detecção de HLB e contribuem para a busca de medidas de controle eficazes da doença.

Palavras-chave: Huanglongbing. qPCR. Época de detecção. Quantificação.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is considered one of the principal diseases of citrus cultivation of plants quickly become unproductive and inappropriate consumption fruits, caused by a bacterium limited to the phloem called '*Candidatus Liberibacter*' spp. The objective of this study was to evaluate the seasonal variation of '*Ca. Liberibacter asiaticus*' by the real-time PCR (qPCR). Naturally infected plants with HLB were identified by conventional PCR, divided into four quadrants and protected with antiaphids screen to prevent the spread of bacteria causing disease areas. Was also used seedlings inoculated with infected bubble and maintained in the greenhouse. The bacterial population were followed up for 20 months by the qPCR with primers specific As84F/As180R after total DNA extraction of the ten leaves ribs collected monthly. The average values of Ct (Cycle Threshold) were separated according to the seasons and we used the linear model mixed. The Tukey test was used to separate means with significant differences. Significant differences were observed between the Ct in different seasons and abrupt changes in Ct values in the quadrants of the plants in the field. Autumn is the best period to detect the bacteria. No significant differences were observed for seedlings. With the increase of the bacterial population in the host observed evolution of the symptoms. These results confirm the importance of knowing the correct period for the detection of HLB and contribute to the search for effective measures to control the disease.

Keywords: Huanglongbing. qPCR . Time of detection. Quantification.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira representa um importante segmento da economia nacional, tanto em valor da produção, como na geração de empregos diretos e indiretos. O Brasil se destaca como o maior produtor e exportador de citros, com uma produção estimada em torno de 19 milhões de toneladas no ano de 2012 (IBGE, 2012). Na citricultura brasileira, grandes prejuízos têm sido constatados devido a introdução de pragas e doenças, trazendo preocupações ao setor no cenário nacional (Gravena, 1998).

Dentre as moléstias que atacam a citricultura mundial, *Huanglongbing* (HLB) tem apresentado destaque e importância por ser considerada uma das mais devastadoras doenças (Feichtenberger et al., 2005). A doença é causada por bactérias Gram-negativas de crescimento limitado aos vasos do floema (Jagoueix et al., 1996), denominada ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. Existem três espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ que causam a doença: ‘*Ca. Liberibacter africanus*’, ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ ocorre na Ásia, Península Arábica, Brasil e Estados Unidos (Da Graça, 1991). No Brasil, mais de 95% dos casos de HLB são causados por ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. No Paraná a doença foi detectada em 2007 (Nunes et al., 2007). No Brasil, o psílideo *Diaphorina citri* é o transmissor das bactérias (Yamamoto et al., 2006). Borbulhas contaminadas originando mudas doentes se constituem em um eficaz meio de disseminação da doença a longas distâncias (Da Graça, 1991).

Os sintomas caracterizam-se, principalmente, por ramos ou galhos com folhas apresentando coloração amarelada, normalmente isoladas na planta. As folhas apresentam-se com aparência mosqueada, de coloração alternada entre tons de verde claro, verde escuro e amarelo, não apresentando limites definidos nas tonalidades (Bové, 2006; Chung e Brlansky, 2005; Feichtenberger et al., 2005). Frutos sintomáticos são menores, defeituosos, assimétricos, com coloração externa irregular, podendo apresentar inversão da maturação. Internamente é possível observar sementes abortadas, deslocamento da columela conferindo assimetria ao fruto, além de maturação interna desuniforme e coloração marrom a castanho dos os feixes vasculares (Bové, 2006).

Os baixos títulos bacterianos apresentados nos hospedeiros de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ podem dificultar a detecção do patógeno, especialmente em plantas assintomáticas portadoras de infecção latente (Trivedi et al., 2009; Hu et al., 2013). A prevalência da espécie asiática no Brasil e da maior probabilidade de disseminação desta espécie pelos insetos vetores, pode ser explicada pelos baixos títulos bacterianos de ‘*Ca. Liberibacter americanus*’

obtidos em plantas de citros enxertadas e os altos títulos obtidos com ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b). A quantificação do patógeno é considerada uma importante ferramenta na epidemiologia da doença (Lopes et al., 2009b) para auxiliar em estudos sobre a movimentação do patógeno, sua proliferação e distribuição nos tecidos vegetais (Kawabe et al., 2006; Tatineni et al., 2008). As técnicas de quantificação de patógenos foram simplificadas e aperfeiçoadas ao longo do tempo com a finalidade de obter diagnósticos com valores precisos e compreender os mecanismos de virulência de patógenos, bem como desenvolver eficientes estratégias de manejo e avaliar habilidades de transmissão por insetos vetores (Bach et al., 2002; Alvarez, 2004). A técnica qPCR se demonstra mais eficiente na detecção de ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. quando comparado com PCR convencional, por apresentar alta sensibilidade (Lopes et al., 2009a; Trivedi et al., 2009).

Para evitar diagnósticos demorados e trabalhosos, pesquisadores têm desenvolvido diferentes técnicas e diferentes iniciadores específicos para a detecção e quantificação do agente causal do HLB (Lin et al., 2010; Teixeira et al., 2008; Trivedi et al., 2009). A sonda TaqMan® baseada na região 16S do rDNA foi desenvolvida para qPCR, permite a determinação da concentração bacteriana nos diferentes tecidos vegetais: pecíolos foliares, tecidos e membranas dos frutos, raízes e folhas (Li et al., 2009) e se destaca dentre outras sondas por sua alta sensibilidade e por não ser afetada pelos inibidores presentes nos extratos de plantas, evitando assim, contaminações cruzadas com outros patógenos (Li et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação estacional de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ através do monitoramento do comportamento populacional por PCR em tempo real, em pomares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) e lima ácida Tahiti (*Citrus aurantifolia* Swingle) no Noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Levantamentos e diagnóstico de *huanglongbing*

Foram realizadas inspeções visuais em pomar experimental na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) (23° 25’ S, 51° 57’ O, 550 m de altitude) em 2500 plantas, em pomar comercial de lima ácida Tahiti (*C. aurantifolia* Swingle) na Propriedade Chuva de Prata em Maringá-PR (23° 25’ S, 51° 57’ O, 596 m de altitude) em 400 plantas e em pomar comercial de laranja doce da Fazenda Estrela, no município de Paranavaí-PR (23° 04’ S, 52° 27’ O, 470

m de altitude) em 131.086 plantas, para identificação de plantas naturalmente infectadas com HLB. A Fazenda Estrela foi avaliada com auxílio dos funcionários da propriedade.

As plantas com sintomas foram identificadas e, 10 folhas sintomáticas foram coletadas e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA/UEM). O limbo foliar foi descartado e a nervura central foi macerada com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A extração de DNA total foi feita pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980). A confirmação do diagnóstico foi realizada através de PCR convencional, utilizando-se os iniciadores sintéticos LPAS (5'TGGTGATAGGGTGGATTTAG-3') / RPAS (5'TGGTGATAGGGTGGATTTAG-3'), e as condições de amplificação segundo Colleta Filho et al. (2010).

2.2 Instalação do experimento

2.2.1 Parcelas no campo

Após a confirmação do diagnóstico através de PCR convencional, as parcelas foram instaladas à campo. As plantas doentes foram protegidas com tela anti-afídica para evitar a dispersão do patógeno à campo e novas reinfecções.

Foram instalados experimentos nas três propriedades amostradas. Na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI-UEM), Maringá-PR, o pomar foi instalado no ano de 2004. Foram teladas quatro plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck), das variedades *C. sinensis* 1342, Ovale MUT Proc. 43 5/96 (S), Valencia Campbell e o híbrido Tangor Murcott com Laranja Pêra 96, no mês de setembro de 2010. Na fazenda Estrela, Paranavaí-PR, o pomar foi instalado no ano de 2004 e as plantas foram protegidas contra reinfecção em julho de 2008. Foram teladas quatro plantas (planta 1: *C. sinensis* cv. Pêra-Rio sobre porta-enxerto limão Cravo e plantas 2, 3 e 4: *C. sinensis* cv. Folha Murcha sobre porta-enxerto limão Cravo). Na propriedade Chuva de Prata, o pomar foi instalado no ano de 2009, com plantas de lima ácida Tahiti (*Citrus aurantifolia* Swingle) sobre porta enxerto limão Cravo. Três plantas foram protegidas contra reinfecção nesta área em setembro de 2010.

2.2.2 Parcela em casa de vegetação

Plantas de laranja doce (*C. sinensis* Osbeck), da variedade Pêra sobre porta enxerto limão Cravo, com um ano de idade foram inoculadas no ano de 2008 com borbulhas contaminadas naturalmente por '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Foram utilizadas 15 plantas, as quais foram mantidas em casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA/UEM), Maringá-PR. As coletas de material foram realizadas a cada 30 dias até a confirmação do diagnóstico positivo para a doença por qPCR segundo o protocolo descrito por Coletta-Filho et al. (2010).

2.3 Coleta de material

As plantas selecionadas no campo foram divididas em quatro setores, nos quais observou-se a distribuição dos sintomas, conforme a esquematização apresentada na figura 1. De cada setor, foram coletadas 10 folhas dando-se preferência às sintomáticas. Nas mudas mantidas em casa de vegetação, foram coletadas 10 folhas de cada planta.

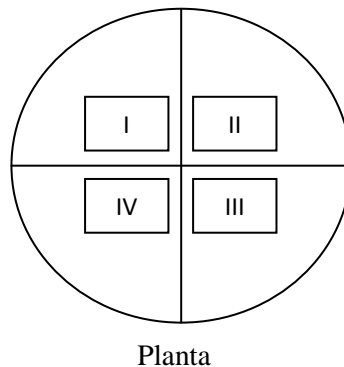


Figura 1 Esquematização da divisão em setores (I, II, III, IV) da copa das plantas infectadas por '*Ca. Liberibacter asiaticus*', monitoradas e protegidas contra reinfecção de *Diaphorina citri*, para coleta mensal de material vegetal para avaliação da variação estacional de populações de *Huanglongbing* (HLB) por PCR em tempo real.

As amostragens em plantas de lima ácida Tahiti foram realizadas durante 20 meses, no período de outubro de 2010 à maio de 2012. No pomar experimental (FEI-UEM) em

Maringá-PR e no pomar comercial no município de Paranaíba-PR, a realização das amostragens se estendeu por 23 meses, de abril de 2010 à maio de 2012. Nas plantas mantidas em casa de vegetação, as coletas se iniciaram em setembro de 2010 até maio de 2012, totalizando 20 meses.

O material coletado foi acondicionado em sacos de papel e encaminhado imediatamente ao laboratório para extração de DNA total.

2.4 Extração e quantificação de DNA

O limbo foliar foi descartado com auxílio de material cortante devidamente esterilizado. As nervuras centrais foram maceradas em cadinho de porcelana estéril com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A extração de DNA total foi realizada pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980) e a integridade e a concentração do DNA foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose (1%) e ajustadas para 100 ng/ μ L. As amostras foram armazenadas em freezer comum (-20 °C).

2.5 PCR quantitativo

As qPCR foram conduzidas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Cordeirópolis-SP). As sequências de iniciadores (AS84F, 5'TCACCGGCAGTCCCTATAAAAGT-3' e As180R, 5'- GGGTTAAGTCCCGCAACGA-3') e a sonda probe (As-NED-MGB-111T, 5'-ACATCTAGGTAAAAACC-3') foram descritas anteriormente por (Coletta-Filho et al, 2010).

As reações de qPCR foram preparadas para um volume final de 20 μ L, usando 2X TaqMan fast universal Master Mix (Applied Biosystems), 0,8 μ M de cada primer, 0,2 μ M da sonda probe para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', 4 μ L de DNA padronizado (100 ng/ μ L⁻¹), 1 μ L de Eukaryotic 18S rRNA kit (Applied Biosystems) como controle interno para a normalização da quantidade de DNA total de cada reação e 1 μ L de água Milli-Q autoclavada. Cada ciclo foi composto de duas repetições de cada amostra de DNA, duas repetições de água e também de controles negativos e positivos de HLB. As condições de amplificação por PCR em tempo real foram 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Os resultados foram analisados usando ABI Prism software (version 1.4).

2.6 Análises estatísticas

Os menores valores de Ct (*Cycle Threshold* ou ciclo limite: valor que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) indicaram os maiores títulos bacterianos na planta, e seu inverso foi considerado verdadeiro (Lopes et al., 2009a).

Os diferentes valores de Ct obtidos ao longo dos anos foram analisados separadamente de acordo com as estações do ano em seus diferentes níveis (primavera, verão, outono, inverno). As análises foram divididas entre plantas cultivadas a campo e plantas mantidas em casa de vegetação. Modelos lineares mistos foram aplicados para dados longitudinais (Molenberghs e Verbeke, 2005), utilizando-se as estações do ano como efeito fixo. No caso de plantas cultivadas em condições de campo, planta e ano, foram utilizadas como efeitos aleatórios. A biblioteca “lme4” da plataforma estatística R (<http://www.R-project.org>) foi utilizada na análise. Os valores de Ct foram assumidos para seguir distribuição normal, e quando necessário, os dados foram transformados para atingir homocedasticidade e a distribuição normal dos resíduos. Quando diferenças significativas foram obtidas entre os diferentes níveis do efeito fixo (estações do ano), foram realizadas múltiplas comparações entre os níveis com o teste de Tukey (Tukey, 1953) ($p < 0,05$), no presente caso, a biblioteca "multcomp" da plataforma P foi utilizada.

3. RESULTADOS

O modelo que melhor se ajustou para mudas mantidas em casa de vegetação foi: $Ct \sim \text{Época} + (1|\text{Ano}) + (1|\text{Planta})$. Para mudas mantidas em casa de vegetação, o modelo empregado indicou interação entre os fatores aleatórios Planta e Ano (2010, 2011 e 2012). Não foram observadas diferenças significativas nos valores de Ct entre os diferentes níveis das Estações do Ano (Tabela 1).

Tabela 1 Valores médios de Ct (*Cycle Threshold*) das estações do ano, obtidos por modelo linear misto para mudas de laranja doce em casa de vegetação.

| Estações do Ano | Período | Ct (Média ± Erro standart) |
|-----------------|---------------------|----------------------------|
| Primavera | Setembro – Dezembro | 29,81 ± 1,46 ^a |
| Verão | Dezembro – Março | 28,42 ± 1,48 |
| Outono | Março – Junho | 27,78 ± 1,48 |
| Inverno | Junho – Setembro | 30,03 ± 1,61 |

^a Comparação de médias realizada por Teste de Tukey (p<0,05).

Nas plantas adultas cultivadas em diferentes propriedades empregou-se o modelo Ct~Época+(1|Local)+(1|Ano)+(1|Planta)). Para plantas adultas em diferentes propriedades os efeitos aleatórios Local, Plantas e Ano foram significativos no modelo utilizado. No Teste de Tukey foram observadas diferenças significativas entre os Ct em diferentes Estações do Ano (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios de Ct (*Cycle Threshold*) das estações do ano, obtidos por modelo linear misto para plantas das variedades laranja doce e lima ácida Tahiti em diferentes propriedades no noroeste do Paraná.

| Estações do Ano | Período | Ct (Média ± Erro standart) | Temperatura média (°C) |
|-----------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| Primavera | Setembro – Dezembro | 26,48 ± 1,55 a ^a | 23,7 |
| Verão | Dezembro – Março | 25,75 ± 1,47 ab | 25,3 |
| Outono | Março – Junho | 25,07 ± 1,39 b | 20,3 |
| Inverno | Junho – Setembro | 26,28 ± 1,54 ab | 20,8 |

^a Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas mediante modelo linear misto (p<0,05). Comparação de médias realizada por Teste de Tukey.

Os sintomas iniciais observados nas plantas à campo em geral, se distribuíam setorizados e a detecção de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ foi possível mesmo em setores que

apresentavam pouco ou nenhum sintoma. Com o passar dos meses, a evolução dos sintomas foi expressiva na maioria das plantas (Figura 1; Tabela 3).

Na propriedade Estrela, Paranaíba-PR, em alguns setores das plantas monitoradas, a bactéria foi detectada apenas a partir do sétimo mês de coleta. Na planta 2, o setor I possuía a maior expressão dos sintomas e durante todo o experimento apresentou valores de Ct abaixo de 26,0, com exceção do mês de setembro de 2010. Na planta 3, os setores II e III eram assintomáticos e mesmo na ausência de sintomas, o setor II apresentou em média, Ct variando entre 22,0 a 24,0. No setor III a detecção ocorreu apenas a partir do sétimo mês, com Ct entre 23,0 e 24,0. Na planta 4, os sintomas predominavam no alto da copa, gerando dificuldade de coletar material sintomático. Nesta planta a detecção se iniciou a partir do décimo mês no setor I e a partir do sexto mês no setor III. Mesmo com folhas assintomáticas analisadas, os valores de Ct encontrados variavam de 18,0 a 37,5.

'*Ca. Liberibacter asiaticus*' apresentou distribuição desuniforme dentro de um mesmo setor. Com o passar dos meses, os valores de Ct também apresentaram irregularidade dentro do próprio setor amostrado. Em uma mesma estação do ano, foi possível observar variações bruscas nos valores de Ct no setor, onde em alguns meses a população bacteriana encontrava-se a títulos muito baixos e no mês seguinte os títulos da bactéria se encontravam mais altos, o inverso também foi observado (Ex.: Planta 1, setor 1, janeiro/11 = Ct 31,0; fevereiro/11 = Ct 18,8). Com o aumento da população do patógeno no hospedeiro, observou-se a evolução dos sintomas (Tabela 3).

Tabela 3 Distribuição dos sintomas de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ em plantas de citros monitoradas e protegidas contra reinfecção de *Diaphorina citri* (- sem sintomas; + sintomas localizados; ++ sintomas intensos; +++ sintomas intensos com amarelecimento intenso das folhas).

| Local | Planta | Espécie | Setor | Sintomas | | |
|--------------|--------|-------------------------------------|-------|----------|------|------|
| | | | | 2010 | 2011 | 2012 |
| Paranavaí-PR | 1 | <i>C. sinensis</i> cv. Pêra-Rio | I | - | + | + |
| | | | II | - | + | + |
| | | | III | + | + | + |
| | | | IV | - | + | + |
| Paranavaí-PR | 2 | <i>C. sinensis</i> cv. Folha Murcha | I | ++ | +++ | +++ |
| | | | II | - | + | + |
| | | | III | - | + | + |
| | | | IV | + | + | + |
| Paranavaí-PR | 3 | <i>C. sinensis</i> cv. Folha Murcha | I | + | + | + |
| | | | II | - | - | - |
| | | | III | - | - | - |
| | | | IV | + | + | + |
| Paranavaí-PR | 4 | <i>C. sinensis</i> cv. Folha Murcha | I | - | + | + |
| | | | II | + | + | + |
| | | | III | + | + | + |
| | | | IV | - | + | + |
| Maringá-PR | 5 | <i>C. sinensis</i> 1342 | I | ++ | +++ | +++ |
| | | | II | ++ | +++ | +++ |
| | | | III | ++ | +++ | +++ |
| | | | IV | ++ | +++ | +++ |
| Maringá-PR | 6 | Ovale MUT Proc. 43 5/96 (S) | I | - | + | + |
| | | | II | - | ++ | ++ |
| | | | III | + | ++ | ++ |
| | | | IV | + | ++ | ++ |
| Maringá-PR | 7 | Valencia Campbell | I | + | ++ | ++ |
| | | | II | + | ++ | ++ |
| | | | III | - | ++ | ++ |
| | | | IV | - | ++ | ++ |
| Maringá-PR | 8 | Tangor Murcott | I | - | + | + |
| | | | II | + | ++ | ++ |
| | | | III | + | ++ | ++ |
| | | | IV | - | + | + |
| Maringá-PR | 9 | <i>Citrus aurantifolia</i> | I | - | - | + |
| | | | II | + | ++ | ++ |
| | | | III | + | ++ | ++ |
| | | | IV | - | - | + |

Tabela 3, Cont.;

| | | | | | | |
|------------|----|----------------------------|-----|----|-----|-----|
| Maringá-PR | 10 | <i>Citrus aurantifolia</i> | I | - | ++ | +++ |
| | | | II | + | ++ | +++ |
| | | | III | ++ | +++ | +++ |
| | | | IV | ++ | +++ | +++ |
| Maringá-PR | 11 | <i>Citrus aurantifolia</i> | I | + | ++ | ++ |
| | | | II | - | + | + |
| | | | III | - | + | + |
| | | | IV | + | ++ | ++ |

Na planta 5 no experimento instalado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI-UEM), Maringá-PR, Brasil, os sintomas iniciais eram nítidos em toda a planta e observou-se rápida dispersão da doença e declínio do hospedeiro. Nos primeiros meses os valores de Ct variavam entre 34,0 e 37,0 e com a progressão da doença, os valores de Ct diminuíram e se estabilizaram entre 21,0 a 25,0 (Tabela 3).

Nas plantas de lima ácida Tahiti no município de Maringá-PR, Brasil, também foi observado nos setores que possuíam sintomas menos evidentes os maiores valores de Ct. Os setores I e IV da planta 9 possuíam poucos sintomas e a quantidade de bactéria foi pequena comparado aos setores que apresentavam sintomas evidentes. Com a evolução dos sintomas foliares para total amarelecimento no setor III da planta 10, os frutos passaram a exibir deformações, enquanto que nos outros setores da mesma planta onde os sintomas eram menos expressivos, os frutos não apresentavam sintomas (Tabela 3).

Em casa de vegetação nem todas as plantas enxertadas com borbulhas contaminadas por ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e diagnosticadas positivamente para a doença exibiam sintomas.

4. DISCUSSÃO

Durante o monitoramento em mudas mantidas em casa de vegetação, não foram observadas diferenças significativas nos valores de Ct para a população do patógeno nas diferentes estações do ano.

Os menores valores de Ct correspondem aos maiores títulos da bactéria na planta (Lopes et al., 2009a). No campo, os meses correspondentes ao Outono apresentaram os menores valores de Ct, indicando ser esta a época onde a bactéria se encontra em maior título e conseqüentemente, a melhor época para a detecção de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ no Estado

do Paraná. A temperatura pode influenciar diretamente nos valores de Ct encontrados à campo (Lopes et al., 2009a) e afetar a sobrevivência do patógeno em tecidos inoculados (Lopes e Frare, 2008). Todavia, no Verão e no Inverno os valores de Ct encontrados neste trabalho, foram estatisticamente semelhantes aos valores encontrados nos meses do Outono. No estado de São Paulo, os meses correspondentes ao Outono e Inverno também são considerados os melhores períodos para identificação e visualização dos sintomas na erradicação da doença. As menores temperaturas prevalentes nestas épocas, não são capazes de reduzir a multiplicação bacteriana nos tecidos da planta (Lopes et al., 2009a) e podem favorecer as taxas de transmissão (Lopes e Frare, 2008).

Os meses de abril, maio e junho, correspondentes ao outono, coincidem com a fase de indução floral dos citros, onde geralmente a ocorrência de chuvas e as temperaturas diminuem. Em seguida as plantas entram em período de repouso (Rasmussen et al., 1966) no qual há um acúmulo de reservas que são consumidas rapidamente no desenvolvimento das estruturas reprodutivas (Lima et al., 1989). O período de indução floral ocorre nos meses em que a população de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' apresenta os maiores títulos bacterianos, sugerindo que a fenologia dos citros pode ter influencia sobre os títulos bacterianos, devido ao aumento de reservas neste período.

A região noroeste do Paraná durante o monitoramento das plantas apresentou condições atípicas nas estações do ano, com ausência de grandes variações nas condições climáticas e de temperatura. As menores temperaturas foram registradas nos meses correspondentes ao Outono, e as médias encontradas foram de aproximadamente 20 °C. As temperaturas mais altas foram registradas nos meses de Verão e as médias não ultrapassaram os 25 °C (Anexos 1 e 2). A temperatura média anual observada na região noroeste do Paraná (22,5 °C) encontra-se inserida na faixa de temperatura (17 a 22 °C e 22 a 27 °C) onde foi observada a maior eficiência de infecção de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' em citros (Gasparoto et al., 2012), exercendo importante papel na epidemiologia da doença e favorecendo o aumento de plantas que funcionam como fonte de inoculo no campo (Bassanazi et al., 2010). A temperatura pode estar relacionada diretamente com alterações nos títulos bacterianos, afetando a população do patógeno e sua multiplicação (Lopes et al., 2009a). A baixa incidência e a lenta disseminação da bactéria através de *D. citri* nos campos de produção em regiões mais quentes do estado de São Paulo são fatores relacionados com a influência da temperatura ambiente nos títulos de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' nas folhas (Lopes et al., 2013).

Os valores médios de Ct encontrados nas plantas monitoradas foram menores com o decorrer do tempo tanto para plantas de laranja doce nos municípios de Paranaíba-PR e Maringá-PR, como para as plantas de lima ácida Tahiti, em Maringá-PR. Conseqüentemente, observou-se a evolução da expressão dos sintomas. A intensidade dos sintomas foliares de HLB aumentando conforme o tempo também foi constatada em plantas inoculadas por '*Ca. Liberibacter*' spp. (Lopes et al., 2009b). A expressão dos sintomas de HLB está diretamente relacionada à concentração do agente patogênico e uma quantidade mínima de bactéria é necessária para o surgimento dos sintomas (Trivedi et al., 2009; Coletta-Filho et al., 2010). No entanto, '*Ca. Liberibacter asiaticus*' apresenta crescimento lento em plantas de citros (Trivedi et al., 2009). Isto pode explicar a detecção de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' apenas a partir do sexto mês de análise em setores de algumas plantas no campo, onde provavelmente os títulos bacterianos foram inexistentes ou inferiores aos necessários para a detecção do patógeno naquele local da planta.

Altos títulos bacterianos associados à pequenas expressões de sintomas contribuem para maior capacidade de adaptação da espécie asiática em relação à espécie americana do patógeno no Brasil (Lopes et al., 2009b). Porém, em plantas e folhas assintomáticas o patógeno normalmente é encontrado na planta em baixos títulos (Li et al., 2007; Teixeira et al., 2008; Trivedi et al., 2009). A distribuição irregular da bactéria no hospedeiro (Teixeira et al., 2008) se constitui em outro importante aspecto observado no comportamento deste patógeno, podendo estar relacionado com a não detecção do mesmo nos meses iniciais do experimento, bem como a visualização dos sintomas em apenas alguns setores e ramos de determinadas plantas.

Alguns setores assintomáticos exibiram altos valores médios de Ct, os quais variaram entre 18 a 37,5. Este evento pode ser explicado pela coleta de folhas novas no momento da amostragem mensal. As folhas novas podem conter altas quantidades do patógeno mesmo em condições assintomáticas (Teixeira et al., 2008; Trivedi et al., 2009). Títulos bacterianos mais elevados para '*Ca. Liberibacter asiaticus*' também foram observados em plantas assintomáticas e quantidades semelhantes do patógeno foram obtidas em tecidos sintomáticos e assintomáticos (Lopes et al., 2009b). Plantas assintomáticas com altos valores de Ct e conseqüentemente, baixos títulos bacterianos, podem fortemente funcionar como fonte de inóculo para outras plantas (Bassanezi et al., 2010). As maiores quantidades da bactéria foram determinadas em folhas sintomáticas e em certas amostras assintomáticas foram encontradas altas concentrações do patógeno (Teixeira et al., 2008). Devido à irregular distribuição do patógeno no hospedeiro, diferentes situações podem ser observadas em um mesmo ramo

infectado, de onde é possível obter-se amostras com diferentes concentrações bacterianas e ao mesmo tempo, obter-se amostras negativas para a bactéria (Teixeira et al., 2008).

Nos diferentes locais do experimento e nas diferentes espécies, frutos assimétricos e deformados foram observados em locais da planta exibindo sintomas expressivos. Setores com poucos sintomas exibiam frutos assintomáticos, porém com a evolução dos sintomas, estes locais da planta passaram a produzir frutos deformados. A observação de frutos sintomáticos também foi descrita anteriormente próximos a folhas sintomáticas com altas concentrações da bactéria e em ramos assintomáticos ou com poucos sintomas foram observados apenas frutos normais (Teixeira et al., 2008).

Estudos desta natureza podem auxiliar a comunidade científica na compreensão do desenvolvimento do patógeno e sua relação com o hospedeiro. A fenologia do hospedeiro e a época de observação da bactéria podem ser um dos fatores responsáveis pelas variações nos títulos bacterianos. Estes fatores, aliados ao lento crescimento bacteriano e sua distribuição irregular no hospedeiro, podem contribuir para a variação estacional de '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Este tipo de estudo é importante na compreensão dos mecanismos de virulência da bactéria e no desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo da doença (Tatineni et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 339–366, 2004.
- BACH, H.-J.; TOMANOVA, J.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J.C. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 1, p. 235–245, 2002.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JR., J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v.31, n.1, p.11-23, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010.
- CHUNG K.R.; BRLANSKY R. H. 2005. Citrus Diseases exotic to Florida: Huanglongbing (citrus greening). Disponível em: <<http://polkhort.ifas.ufl.edu/documents/publications/Citrus%20Greening.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2013.
- DA GRAÇA, J.V. Citrus Greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109-36, 1991.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANESI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR, J. Doenças de citrus. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, vol. 2, 2005, p. 239-269.
- GASPAROTO, M. C. G.; COLETTA-FILHO, H. D.; BASSANEZI, R. B.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Influence of temperature on infection and establishment of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. **Plant Pathology**, v. 61, n. 1, p. 658-664, 2012.
- GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas dos citros- aspectos práticos. **Laranja**, v. 19, n. 1, p. 61-78. 1998.
- HU, H.; DAVIS, M. J.; BRLANSKY, R. H. Quantification of live ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ populations using real-time PCR and propidium monoazide. **Plant Disease**, v. 97, n. 1, p. 1158-1167, 2013.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012. Indicadores IBGE, Estatística da produção agrícola, outubro de 2012. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201210.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2013.

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, n. 1, p. 43-50, 1996.

KAWABE, K.; TRUC, N. T. N.; LAN, B. T. N.; HONG, L. T. T.; ONUKI, M. Quantification of DNA of citrus huanglongbing pathogen in diseased leaves using competitive PCR. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 355-359, 2006.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "*Candidatus* Liberibacter species" associated with citrus huanglongbing. **Plant Disease**, v. 91, n. 1, p. 51-58, 2007.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 139-144, 2009.

LIMA, J. E. O. Florescimento e frutificação em citros. **Laranja**, v. 2, n. 10, p. 523-530, 1989.

LIN, H.; CHEN, C.; DODDAPANENI, H.; DUAN, Y.; CIVEROLO, E. L.; BAI, X.; ZHAO, X. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 1, p. 17-25, 2010.

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, n. 1, 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. 1, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. Q.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; SOUSA, M. C.; BARBOSA, J.C.; BEATTIE, G. A. C. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease** "First Look" paper. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1031-RE>. 2013.

MOLENBERGHS G.; VERBEKE G. Models for Discrete Longitudinal Data. New York, USA: Springer. 2005.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 239, n. 1, p. 487-491, 1980.

NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; RINALDI, D. A. M. F.; CROCE FILHO, J.; AZEVEDO, M. L.; LEITE JR., R. P.; COLETTA-FILHO, H. D.; VICENTINI, S.; NUNES, M. J. C. Primeira constatação de Huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. 2007. Fitopatologia brasileira, v. 32, **Suplementos...** 2007. p.1094.

RASMUSSEN, G. K.; PEYNADO, A.; HILGEMAN, R. The organic acid content of Valencia oranges from four locations in the United States. In: Proceedings of American Society of Horticultural Science. 1966. Chicago, **Proceedings...** 1966, v. 89, p. 206-210.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, v. 98, n. 1, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 1, p. 139-150, 2008.

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 hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 1, p. 553-563, 2009.

TUKEY, J. W. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 16, n. 2, p. 88-97, 1953.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; MARTINS, E. C.; LEITE, A. P. R.; SOUSA, M. C.; ABRAHÃO, D. P.; BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera:Psyllydae): vector of the bacterium '*Candidatus Liberibacter americanus*'. In: Huanglongbing-Greening International Workshop. 2006. Ribeirão Preto, Brazil, **Proceedings...** 2006. p. 96.

ANEXOS

ANEXO 1 Dados climáticos do triênio 2010-2012 em Maringá-PR, Brasil.

| Estação do ano | Temperatura | | | Umidade % (média) | Precipitação (mm) |
|-----------------------|-------------|--------|-------|----------------------|----------------------|
| | Máxima | Mínima | Média | | |
| Primavera/2010 | 28,03 | 17,50 | 22,77 | 72,07 | 165,60 |
| Verão/2011 | 29,23 | 20,00 | 24,62 | 79,70 | 193,13 |
| Outono/2011 | 24,93 | 13,97 | 19,45 | 74,08 | 85,13 |
| Inverno/2011 | 25,80 | 14,53 | 20,17 | 66,08 | 66,53 |
| Primavera/2011 | 29,43 | 18,43 | 23,93 | 69,35 | 118,83 |
| Verão/2012 | 30,53 | 19,83 | 25,18 | 70,25 | 88,07 |
| Outono/2012 | 24,20 | 16,40 | 20,30 | 78,13 | 159,53 |

*Fonte: Universidade Estadual de Maringá (UEM)

ANEXO 2 Dados climáticos do triênio 2010-2012 em Paranavaí-PR, Brasil.

| Estação do ano | Temperatura | | | Umidade %(média) | Precipitação(mm) |
|-----------------------|-------------|--------|-------|---------------------|------------------|
| | Máxima | Mínima | Média | | |
| Outono/2010 | 25,9 | 15,9 | 20,9 | 70 | 42,8 |
| Inverno/2010 | 27,7 | 15,8 | 21,7 | 57 | 83,9 |
| Primavera/2010 | 28,9 | 18,5 | 23,7 | 69 | 188,8 |
| Verão/2011 | 30,0 | 21,2 | 25,6 | 79 | 171,8 |
| Outono/2011 | 25,6 | 15,3 | 20,5 | 69 | 109,1 |
| Inverno/2011 | 26,9 | 15,4 | 21,2 | 58 | 72,7 |
| Primavera/2011 | 30,0 | 19,0 | 24,5 | 63 | 144,3 |
| Verão/2012 | 31,5 | 20,3 | 25,9 | 66 | 88,9 |
| Outono/2012 | 25,7 | 16,1 | 20,9 | 76 | 194,5 |

*Fonte: Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR)

CAPÍTULO III

Spot real-time PCR for direct detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants

***Parte integrante do anexo "Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of '*Candidatus Liberibacter*' species in citrus plants and psyllid vectors".**

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) disease is seriously threatening the citrus industry worldwide. Accurate detection of the three species associated with HBL disease: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ or ‘*Ca. L. americanus*’ is essential for the preventive control of the disease. Real-time PCR is a useful tool for bacterial detection. Nucleic acids purification steps, however, limits the number of samples that can be processed by PCR. The use of direct assays as template showed good agreement with use of purified DNA (Kappa 0,76±0.052). The simplified direct method of sample preparation presented here in can be effectively adopted for use in rapid screening of HLB agents in extensive surveys, certification schemes or for epidemiological and research studies.

Keywords: *Huanglongbing* (HLB). Direct sample preparation. Real time PCR.

RESUMO

A doença *Huanglongbing* (HLB) doença está seriamente ameaçando a indústria de citros no mundo. A precisa detecção das três espécies associadas com a doença de HBL: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*' ou '*Ca. L. americanus*' é essencial para o controle preventivo da doença. PCR em tempo real é um instrumento útil para a detecção bacteriana. Etapas de purificação de ácidos nucleicos, no entanto, limitam o número de amostras que podem ser processadas por PCR. O uso de ensaios diretos como modelo, mostram boa concordância com a utilização do DNA purificado ($Kappa\ 0,76 \pm 0,052$). O método direto simplificado de preparação das amostras aqui apresentado pode ser efetivamente adotado para uso na triagem rápida dos agentes de HLB em extensas pesquisas, sistemas de certificação ou para estudos epidemiológicos e de pesquisa.

Palavras-chave: *Huanglongbing* (HLB). Preparação direta da amostra. PCR em tempo real.

1. INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB), often referred to as citrus greening, is considered the most destructive bacterial disease in the citrus industry. The disease has been described in most of the major citrus growing regions of the world (Africa, Asia and America), except for the Mediterranean region, Australia, New Zealand, and North and South-Pacific islands. Therefore, HLB represents a serious threat for citrus growing regions which are still free of the disease. *Huanglongbing* causes a rapid tree decline, including yellow shoots with blotchy-mottled leaves, lopsided fruits with color inversion, aborted seeds, leaf and fruit drop and shoot dieback (Bové, 2006; Wang and Trivedi, 2013). *Huanglongbing* has been associated with three bacterial species belonging to a new genus, 'Candidatus Liberibacter' within the alpha *Proteobacteria*: 'Ca. Liberibacter africanus' (Laf), 'Ca. L.asiaticus' (Las) and 'Ca. L.americanus' (Lam) (Bové, 2006). These bacterial species are restricted to phloem sieve tubes. They are naturally spread by phloem sap-feeding psyllid species in which they multiply in a persistent, circulative manner (Bové, 2006; Gottwald, 2010). Insect vector species include citrus psyllids *Diaphorina citri* (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006) and *Trioza erytrae* (McClellan and Oberholzer, 1965); as well as *Cacopsylla citrisuga* (Cen et al., 2012), recently described in China. *Diaphorina communis* identified in Bhutan (Yamamoto, 2007) has been found to carry Las (Donovan et al., 2012). Its ability, however, to transmit Las has not been reported yet. The pathogen is also transmitted by grafting or by vegetative propagation of contaminated plant material. To contain HLB and help in decision-making, preventive surveys for early detection of the pathogen are crucial.

Considering there are no curative treatments for HLB, quarantine measures to avoid its entry and establishment, as well as early eradication of the first foci to avoid spread, are the best measures to prevent its introduction into new areas. Once the pathogen and the vector are present, the "three-pronged system" (TPS) has been shown to be successful in controlling HLB in large groves with low initial HLB prevalence ($\leq 10\%$) (Belasque et al., 2010; Bové, 2012).

In the past years, different methods have been developed for detection of HLB agents including biological indexing (Roistacher, 1991), chemifluorescence (Schwarz, 1968), transmission electron microscopy (TEM) (Saglio et al., 1971), ELISA, immunofluorescence (Garnier et al., 1987), and dot-blot DNA hybridization. These methods were able to detect Las and Laf, for the first time, using specific probes in both plants and psyllids (Villechanoux et al., 1992). For instance, detection of the HLB bacterium by TEM became for 20 years, since

the 1970s, the only reliable, although laborious, laboratory technique to undoubtedly confirm HLB (Garnier and Bové, 1996). In the 1990s, conventional PCR became available and could detect Las and Laf by amplification of 16S rDNA (Jagoueix et al., 1996) or beta operon (Hocquellet et al., 1999) sequences. Later, Lam was also identified by specific 16S rDNA-based PCR-primers (Teixeira et al., 2005) and by real-time PCR (Teixeira et al., 2008a). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Okuda et al., 2005) as well as FISH assays (Fujikawa et al., 2013) have also been developed for Las detection.

Real-time PCR is a useful tool that has proven indispensable in a wide range of bacterial detection protocols. This high throughput technique has improved the systems in use, achieving high speed, specificity, sensitivity and reliability; as well as reducing the risks of cross contamination compared with conventional PCR (Schaad and Frederick, 2002; López et al., 2009). Several real-time PCR-based protocols for detection of '*Ca. Liberibacter*' species from citrus have been developed (Li et al., 2006; Teixeira et al., 2008a; Bertolini et al., 2010; Coletta-Filho et al., 2010; Morgan et al., 2012; Fujikawa et al., 2013) but few have been designed for universal detection of all '*Ca. Liberibacter*' species associated with the disease (Li et al., 2006; Bertolini et al., 2010).

The templates used in PCR usually require extract preparation and nucleic acid purification. Nucleic acid purification step can be totally circumvented using direct sample preparation methods such as dilution or spot immobilization on membranes (Olmos et al., 1996; Schaad et al., 2007; Capote et al., 2009; De Boer and López, 2012) or partially circumvented using the so-called "direct PCR" methods (Fujikawa et al., 2013). Nevertheless, all these methods require extract preparations which limit the number of samples that can daily be processed in a robust way. Spot (Capote et al., 2009) is a direct method of sample preparation in which nucleic acid purification is necessary. The main drawback of systems based on target immobilization is the small amount of sample that can be loaded onto the support. This limitation could be avoided by coupling these preparation methods with highly sensitive techniques such as real-time PCR (Schaad and Frederick, 2002; López et al., 2009).

In this study, spotting method for direct sample preparation without DNA extraction were coupled with real-time PCR detection protocol based on TaqMan chemistry.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Ten mature fully expanded leaves were collected around the canopy of each tested adult tree. Leaves were posted to ‘Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias’ (IVIA), in Valencia, Spain to prepare extracts (see below). Samples were collected from heavily HLB-infected groves in Maringá and Paranavaí, (Paraná), Brazil.

Sweet orange, *C. macrophylla* (alemow) field trees and *C. reticulata* (mandarin) and *C. paradisi* (grapefruit) leaves from certified HLB-free trees grown under insect proof facilities were sampled at IVIA in Valencia, Spain. These plant materials were used for comparison of the efficiency of direct procedures and conventional DNA purification methods of sample preparation, as well as healthy controls.

2.2 Extract preparation and DNA purification

For sensitivity evaluation, extracts from HLB-symptomatic and symptomless mature sweet orange leaves (0.5 g of fresh leaf midribs), collected from HLB-infected trees, were prepared in individual plastic bags. Homex 6 homogenizer (Bioreba, Reinach, Switzerland) was used to grind plant material, approximately 1:20 (w/v), in extraction buffer (PBS buffer, pH 7.2, supplemented with 0.2% (w/v) sodium diethyl dithiocarbamate). Serial dilutions of the prepared extract with symptomatic HLB-infected sweet orange leaves were done by diluting it in HLB-free sweet orange leaf extract (1:20 v/v to 1:10¹⁰ v/v). Total DNA was extracted from each dilution by using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980). All extracts were stored at -20 °C until use.

2.3 Real-time PCR protocol

Real-time PCR assays using the new primers coupled with TaqMan probe (FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-BHQ-1) developed in Li et al. (2006), were performed in StepOne Plus (Applied Biosystems), Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) and/or SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) thermocyclers. The reaction mixture in a final volume of 12 µl contained the following: 1 x Path-IDTMqPCR master mix (Ambion, Grand Island, NY, USA), 0.5 µM of each primer (CaLsppF/CaLsppR), 100 nM of TaqMan probe

and 3 μ l of purified or extracted DNA targets from immobilized samples. Real-time PCR protocol consisted of one step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data acquisition and analysis were performed with the thermocycler software. The default threshold set by the thermocycler was slightly adjusted above the noise of the linear part of the growth curve, at its narrowest point, according to manufacturer's instructions.

Diagnostic parameters (sensitivity, specificity and accuracy) were calculated according to the web page: <https://www.antonio-olmos.com/parameters/online/calculator.html>. Results were considered positive or negative for each sample and Ct values were recorded.

2.4 Sample preparation by the spot procedure

Freshly prepared or frozen sweet orange leaf extracts from field trees collected in Maringá and at IVIA, were immobilized on membranes (Capote et al., 2009). Spotting was carried out by loading 5 μ l of crude plant extract onto pieces of approximated 0.5 cm² Whatman 3MM paper filter, which had been previously introduced into Eppendorf tubes. The spotted samples were left to dry for 5 minutes and then the tubes were closed and stored at room temperature in a dark and dry place until use. The DNA targets were then simply extracted using 100 μ l of distilled water (Bertolini et al., 2010; Teresani et al., 2013), vortexed and placed on ice until use. Three microliters of the extract were directly used as template for real-time PCR assays.

2.5 Comparison of DNA extraction and spot procedures of sample preparation

The use of purified DNA and spot procedure was compared for Las detection using Coletta-Filho et al. (2010) real-time PCR method and the ready-made complete kit HLB/100 (Plant Print Diagnostics, Valencia, Spain) developed in this study (see annex). For this comparison, 258 sweet orange and Tahiti lime samples collected in Brazil in 2010, 2011 and 2012; and 100 HLB-healthy plants collected in Spain in 2013 (see plant material) were used. Ten fresh leaf midribs were homogenized in liquid nitrogen and 0.5 g of the powder was used for total DNA extraction by CTAB method. The purified DNA was stored at -20 °C until use. The rest of the powder was stored at -20 °C until PBS buffer was added for extract preparation. Five microliters of the crude extract were spotted on paper as previously described. These extracts were then analyzed by both real-time PCR protocols.

Preparation of spots and analyses was performed in 2013 at IVIA (in some cases three years after the samples were collected). Cohen's kappa index (Cohen, 1960) was calculated to measure the agreement between DNA extraction with the spot system of sample preparation using both real-time PCR protocols as well as to compare them using the same samples spotted on paper. Diagnostic parameters such as sensitivity, specificity and accuracy were calculated taking into account the true and false positive and negative results. Sensitivity is the proportion of true positives that are correctly identified by a test. Specificity is the proportion of true negatives that are correctly identified by the test. Accuracy refers to the number of true positives and negatives correctly identified by the test (Vidal et al., 2012). A sample showing positive results by two differently based real-time PCR protocols was considered as a true positive. A sample showing negative results by at least two differently based real-time PCR protocols was considered as a true negative.

3. RESULTS

The Las target was amplified from a total of 144 out of 358 spotted samples using the commercial ready-made kit. Figure 1 shows a comparison between the Coletta-Filho et al. (2010) protocol using purified DNA or spot and the spotted samples analyzed by the ready-made HLB/100kit. Using the Coletta-Filho et al. (2010) protocol, Las target was amplified from 161 out of 358 analyzed samples using purified DNA, and from 134 when using spots of crude plant extract. When purified DNA analyzed by Coletta-Filho et al. (2010) protocol was compared with the spot analyzed by the kit, coincidental results occurred in 132 positive and in 185 negative samples; 29 samples tested positive only by DNA extraction and 12 samples tested positive only by the spot system (Fig. 1A). The calculated Cohen's kappa index was 0.766 ± 0.052 . When DNA extraction was compared with the spot using the same real-time PCR protocol, coincidental results were obtained in 123 positive and in 186 negative samples; 38 samples tested positive only by DNA extraction and 11 samples resulted positive only by the spot system (Fig. 1B). The calculated Cohen's kappa index was 0.719 ± 0.052 . Fig. 1C shows the comparison of both real-time PCR protocols using the same spotted samples. Coincidental results were obtained in 105 positive and in 185 negative samples; 39 samples tested positive only with the kit and conversely, 29 tested positive only with the Coletta-Filho et al. (2010) protocol. The Cohen's kappa index resulted 0.600 ± 0.052 .

A

| | | DNA by C-F | |
|-----------------|---|------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by the kit | + | 132 | 12 |
| | - | 29 | 185 |
| 358 | | | |

B

| | | DNA by C-F | |
|-------------|---|------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by C-F | + | 123 | 11 |
| | - | 38 | 186 |
| 358 | | | |

C

| | | Spot by C-F | |
|-----------------|---|-------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by the kit | + | 105 | 39 |
| | - | 29 | 185 |
| 358 | | | |

Figure 1 Comparison of purified DNA and spot procedures of sample preparation prior different real-time PCR protocols for detection of '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in 358 adult citrus trees. A: purified DNA Coletta-Filho real-time PCR (DNA by C-F) *versus* spot of crude plant extract analyzed by the kit (spot kit), kappa index 0.766 ± 0.052 ; B: DNA C-F *versus* spot C-F, kappa index 0.719 ± 0.052 ; C: spot C-F *versus* spot kit, kappa index 0.600 ± 0.052 .

A total of 172 trees were considered as true positives (infected by Las) and 186 as HLB-free trees, based on symptom observations and the results obtained with the different real-time PCR protocols and sample preparation systems. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for purified DNA analyzed following the Coletta-Filho et al. (2010) protocol were 0.94 ± 0.012 , 1 ± 0 and 97%, respectively. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for the HLB/100 kit were 0.83 ± 0.019 , 0.99 ± 0.003 and 92%. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for the spot system were 0.78 ± 0.021 , 1 ± 0 and 89%, respectively. The management of the kit in laboratory routine was easier than conventional protocols based on DNA purification. The use of lyophilized master mix remarkably facilitates PCR preparation.

4. DISCUSSION

Prevention and containment of HLB and control of citrus psyllid vectors are crucial for any citrus industry still free of the *Liberibacter* species associated with the disease. Therefore, confident, rapid and simple methods that can process large numbers of samples are required. Considering that many pathogens could be present at low titers in “subclinical infections” or even in particular physiological states in symptomless plants (López et al., 2009), detection methods with high sensitivity are needed. Belasque et al. (2009) reported a prevalence of 10% of trees with visually detectable HLB symptoms in a citrus grove, which corresponded in reality to a prevalence of 36.5% infected trees.

The non-cultivable nature of the HLB-associated bacteria and the lack of specificity of the HLB symptoms complicate the detection of ‘*Ca. Liberibacter*’ species. At present, the identification of HLB in citrus trees is performed through frequent visual inspections of the same grove. However, symptom expression may vary depending on the season and citrus species (Lopes et al., 2009). Moreover, mineral deficiencies and other pathogens including phytoplasma can induce symptoms indistinguishable from those associated with HLB (Teixeira et al., 2008b). Real-time PCR is currently the most sensitive, reliable and gold standard technique for detection and/or identification of ‘*Ca. Liberibacter*’ species (Morgan et al., 2012). This powerful tool could substantially contribute to the TPS strategy to manage the disease, once established in a particular area.

Elimination of symptomatic trees to reduce inoculum source together with insecticide treatments to lower the psyllid vector populations are essential for HLB management (Bové, 2012; Belasque et al., 2010). Infected trees overlooked by inspectors can be a problem. Such

trees can become reservoirs for the pathogen and can start secondary infections. Therefore, the development of user-friendly, direct methods of sample preparation coupled with real-time PCR assays for the screening of '*Ca. Liberibacter*' species would be of high interest. The available real-time PCR methods are sensitive enough but are costly and time consuming. Hence, its use has been limited to training inspectors for symptom recognition and to confirm the presence of the pathogen in leaf samples with doubtful symptoms.

This study presents for the first time detection of '*Ca. Liberibacter*' species in citrus trees through entrapment of *Liberibacter* on a membrane for direct real-time PCR.

The spot system of sample preparation was validated using two real-time PCR protocols for Las detection with samples collected up to three years prior to the analyses. The highest number of Las-positive trees was obtained with extracted DNA, followed by the kit using the spot system, and finally by the protocol of Coletta-Filho et al. (2010) using the spot. These results suggest the high sensitivity of DNA purification when it is used as template, in spite of the false positives inherent to any high sensitivity technique (López et al., 2009). The best agreement was between Coletta-Filho et al. (2010) using purified DNA and the developed kit using the spot system, that resulted "substantial" (Kappa index between 0.61-0.80) according to Landis and Koch (1977) (Fig.1A). The coincidental results in detection of HLB-positive and healthy trees by both protocols (DNA purification and kit using the spot) was 89%. Out of the contradictory results, 8% of the trees tested positive only by DNA purification. These could be explained by the elimination of PCR inhibitors after DNA purification process and high sensitivity of this type of system for preparation of templates. The amount of time needed for analysis and sample preparation, however, should be also take into account. Conversely, 3% of the trees tested positive only by the kit using the spot, probably due to inefficient DNA purification. In fact, the use of the spot by both real-time PCR protocols resulted in 11 HLB-infected and symptomatic field trees that tested negative using purified DNA.

The use of simplified direct methods of sample preparation is adapted for large-scale use due to, robustness, lower cost and the reduced risks of contamination compared with non-direct methods. The developed and proposed system is safe when dealing with quarantine pathogens especially in the case of non-cultivable and phloem restricted organisms that can be managed or transferred by courier without biological risks to other laboratories (De Boer and López, 2012). These methods coupled with real-time PCR are reliable enough for the screening of '*Ca. Liberibacter*' species in extensive surveys for HLB prevention and containment.

REFERENCES

BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JR., R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A. R.; TANK JR., A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F. E. A.; MENEZES, G. M.; DRAGONE, J.; JANK JR., R. H.; BOVÉ, J. M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; SERRA, P.; LÓPEZ, M. M.; LOPES, S.; DURAN-VILA, N.; AYRES, J.; BOVÉ, J. M. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Valencia, Spain). **Direct procedure for specific detection of ‘*Ca. Liberibacter*’ spp. by immobilized targets and real-time PCR and kit for its detection.** Spanish patent 201001157. 2010.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, v.88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, v. 94, n. 1, p. 465-467, 2012.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuway, a vector of greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science*, v. 37, n. 1, p. 572-576, 1967.

CAPOTE, N.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; VIDAL, E.; MARTINEZ, M. C.; CAMBRA, M. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.

CEN, Y.; GAO, J.; DENG, X.; XIA, Y.; CHEN, J.; ZHANG, L.; GUO, J.; GAO, W.; ZHOU, W.; WANG, Z. A new insect vector of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ *Cacopsylla* (*Psylla*) *citrisuga* (Hemiptera:Psyllidae). In: International Citrus Congress. 2012. Valencia, Spain. **Abstracts...** 2012. p. 264.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010.

DE BOER, S. H.; LÓPEZ, M. M. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annual Review of Phytopathology*, v. 50, n. 1, p. 197-218, 2012.

DONOVAN, N. J.; BEATTIE, G. A. C.; CHAMBERS, G. A.; HOLFORD, P.; ENGLEZOU, A.; HARDY, S.; DORJEE; WANGDI, P.; THINLAY; OM, N. First report of ‘*Candidatus*

- Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina communis*. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2012.
- FUJIKAWA, T.; MIYATA, S. I.; IWANAMI, T. Convenient detection of the citrus greening (huanglongbing) bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by direct PCR from the midrib extract. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2. e57011. doi:10.1371/journal.pone.0057011. 2013.
- GARNIER, M.; MARTIN-GROS, G.; BOVÉ, J. M. Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease. **Annales del'Institut Pasteur/Microbiologie**, v. 138, n. 1, p. 639-650, 1987.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Distribution of the huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. In: 13th CONFERENCE OF INTERNATIONAL CITRUS VIROLOGISTS. 1996. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1996. p. 388-391 .
- GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 119-139, 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 β operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 1, p. 373-379, 1999.
- JAGOUÉIX, 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, n. 1, p. 43-50, 1996.
- LANDIS, J. R. ; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.
- 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. 1, p. 301-306, 2009.
- LÓPEZ, M. M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.
- MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 1, p. 297-298, 1965.
- MORGAN, J. K.; ZHOU, L.; LI, W.; SHATTERS, R. G.; KEREMANE, M.; DUAN, Y. Improved real-time PCR detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from citrus and psyllids hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 26, n. 1, p. 90-98, 2012.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 239, n. 1, p. 487-491, 1980.

OKUDA, M.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, Y.; SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKALrpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 705-711, 2005.

OLMOS, A.; DASI, M. A.; CANDRESSE, T.; CAMBRA, M. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 2192-2193, 1996.

ROISTACHER, C. N. Greening: Techniques for Biological Detection of Specific Citrus Graft Transmissible Diseases. In: **Graft-transmissible diseases of citrus**. Rome: FAO. 1991. p. 35-45.

SAGLIO, P.; LAFLÈCHE, D.; BONISSOL, C.; BOVÉ, J. M. Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associés à la maladie dustubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. **Physiologie Végétale**, v. 9, n. 1, p. 569-582, 1971.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 1, p. 250-258, 2002.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; KNORR, D. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2007.

SCHWARZ, R.E. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. In: 4th Conference of International Organization of Citrus Virologists. 1968. W. C. Price, University of Florida, Gainesville. **Proceedings...** 1968. p. 118-124.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JR., 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, n. 1, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus* Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 1, p. 139-150, 2008a.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 1, p. 977-984, 2008b.

TERESANI, G. R.; BERTOLINI, E.; ALFARO-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, M. C.; TANAKA, F. A. O.; KITAJIMA, E. W.; ROSELLÓ, M.; SANJUÁN, S.; FERRÁNDIZ, J.

C.; LÓPEZ, M. M.; CAMBRA, M.; FONT, M. I. ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ an emerging bacterium associated with vegetative disorders in celery. **Phytopathology**, *in press*. 2013.

VIDAL, E.; YOKOMI, R. K.; MORENO, A.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: a model for other plant pathogens. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 114-121, 2012.

VILLECHANOUX, S.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J. M. Detection of several strains of the bacterial-like organism of citrus greening disease by DNA probes. **Current Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 89-95, 1992.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>. 2013.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; MARTINS, E. C.; LEITE, A. P. R.; SOUSA, M. C.; ABRAHÃO, D. P.; BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera:Psyllydae): vector of the bacterium ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. In: Huanglongbing-Greening International Workshop. 2006. Ribeirão Preto, Brazil, **Proceedings**... 2006. p. 96.

YAMAMOTO, P. T. Control of citrus Huanglongbing (ex-greening) and citrus tristeza virus. Report to the Government of Bhutan of the entomology mission (Sept. 14 to 27, 2007) in Bhutan, TCP/BHU/3001 (A), TR: NPPC/ADM-25, Technical report 1. 2007.

ANNEX

**Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’
species in citrus plants and psyllid vectors**

Artigo aceito para publicação em 16 de dezembro de 2013

Publicado em 20 de fevereiro de 2014

Revista Plant Pathology

Online ISSN: 1365-3059

Doi: 10.1111/ppa.12197

E. Bertolini^a, R.T.A.Felipe^b, A.V. Sauer^c, S.A.Lopes^d, A. Arilla^a, E. Vidal^a, F.A.A.
MourãoFilho^b, W.M.C. Nunes^c, J.M.Bové^e, M.M. López^a and M. Cambra^{a*}

^a PlantProtection Centre. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 Moncada, Valencia, Spain; ^b Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), 13418-900 Piracicaba, São Paulo, Brazil; ^c Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Maringá (UEM). 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil; ^d Fundecitrus, 14807-040 Araraquara, São Paulo, Brazil; ^e Institut National de La Recherche Agronomique (INRA) and Université Ségalen Bordeaux II, 33140 Villenave d’Ornon, France.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) disease is seriously threatening and/or damaging the citrus industry worldwide. Accurate detection of the three species associated with HBL disease: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ or ‘*Ca. L. americanus*’ is essential for the preventive control of the disease. Real-time PCR is a useful tool for bacterial detection. Nucleic acids purification steps, however, limits the number of samples that can be processed by PCR. Universal detection of ‘*Ca. Liberibacter*’ species was achieved by a direct tissue-printing and spotting of plant leaf petiole extract or squashing of individual psyllids onto paper or nylon membranes. New primers were designed and used with TaqMan chemistry for accurate detection of the bacterium in immobilized targets (prints of 10 overlapping leaf pedicels/tree or squashed single vectors), by extraction with water and direct use for real-time PCR. This simplified method was validated and found to be efficient for detection of HLB-liberibacters in 100% of symptomatic and 59% of symptomless leaves collected from HLB-infected trees. The use of direct assays as template showed good agreement with use of purified DNA (Kappa 0,76±0.052). The squash assay allowed detection of the bacterium in 40% of mature *Diaphorina citri* that fed on symptomatic or on symptomless leaves of HLB-infected trees. A commercially ready-made kit based on this technology showed 96% accuracy in intra-laboratory performance studies. The simplified direct methods of sample preparation presented here in can be effectively adopted for use in rapid screening of HLB agents in extensive surveys, certification schemes or for epidemiological and research studies.

Keywords: *Huanglongbing* (HLB). Direct sample preparation. Detection kit. Intra-laboratory validation.

1. INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB), often referred to as citrus greening, is considered the most destructive bacterial disease in the citrus industry. The disease has been described in most of the major citrus growing regions of the world (Africa, Asia and America), except for the Mediterranean region, Australia, New Zealand, and North and South-Pacific islands. Therefore, HLB represents a serious threat for citrus growing regions which are still free of the disease. *Huanglongbing* causes a rapid tree decline, including yellow shoots with blotchy-mottled leaves, lopsided fruits with color inversion, aborted seeds, leaf and fruit drop and shoot dieback (Bové, 2006; Wang and Trivedi, 2013). *Huanglongbing* has been associated with three bacterial species belonging to a new genus, ‘*Candidatus Liberibacter*’ within the alpha *Proteobacteria*: ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ (Laf), ‘*Ca. L.asiaticus*’ (Las) and ‘*Ca. L.americanus*’ (Lam) (Bové, 2006). These bacterial species are restricted to phloem sieve tubes. They are naturally spread by phloem sap-feeding psyllid species in which they multiply in a persistent, circulative manner (Bové, 2006; Gottwald, 2010). Insect vector species include citrus psyllids *Diaphorina citri* (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006) and *Trioza erytrae* (McClellan and Oberholzer, 1965); as well as *Cacopsylla citrisuga* (Cen et al., 2012), recently described in China. *Diaphorina communis* identified in Bhutan (Yamamoto, 2007) has been found to carry Las (Donovan et al., 2012). Its ability, however, to transmit Las has not been reported yet. The pathogen is also transmitted by grafting or by vegetative propagation of contaminated plant material. To contain HLB and help in decision-making, preventive surveys for early detection of the pathogen are crucial.

Considering there are no curative treatments for HLB, quarantine measures to avoid its entry and establishment, as well as early eradication of the first foci to avoid spread, are the best measures to prevent its introduction into new areas. Once the pathogen and the vector are present, the “three-pronged system” (TPS) has been shown to be successful in controlling HLB in large groves with low initial HLB prevalence ($\leq 10\%$) (Belasque et al., 2010; Bové, 2012).

In the past years, different methods have been developed for detection of HLB agents including biological indexing (Roistacher, 1991), chemifluorescence (Schwarz, 1968), transmission electron microscopy (TEM) (Saglio et al., 1971), ELISA, immunofluorescence (Garnier et al., 1987), and dot-blot DNA hybridization. These methods were able to detect Las and Laf, for the first time, using specific probes in both plants and psyllids (Villechanoux et al., 1992). For instance, detection of the HLB bacterium by TEM became for 20 years,

since the 1970s, the only reliable, although laborious, laboratory technique to undoubtedly confirm HLB (Garnier and Bové, 1996). In the 1990s, conventional PCR became available and could detect Las and Laf by amplification of 16S rDNA (Jagoueix et al., 1996) or beta operon (Hocquellet et al., 1999) sequences. Later, Lam was also identified by specific 16S rDNA-based PCR-primers (Teixeira et al., 2005) and by real-time PCR (Teixeira et al., 2008a). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Okuda et al., 2005) as well as FISH assays (Fujikawa et al., 2013) have also been developed for Las detection.

Real-time PCR is a useful tool that has proven indispensable in a wide range of bacterial detection protocols. This high throughput technique has improved the systems in use, achieving high speed, specificity, sensitivity and reliability; as well as reducing the risks of cross contamination compared with conventional PCR (Schaad and Frederick, 2002; López et al., 2009). Several real-time PCR-based protocols for detection of '*Ca. Liberibacter*' species from citrus have been developed (Li et al., 2006; Teixeira et al., 2008a; Bertolini et al., 2010; Coletta-Filho et al., 2010; Morgan et al., 2012; Fujikawa et al., 2013) but few have been designed for universal detection of all '*Ca. Liberibacter*' species associated with the disease (Li et al., 2006; Bertolini et al., 2010).

The templates used in PCR usually require extract preparation and nucleic acid purification. Nucleic acid purification step can be totally circumvented using direct sample preparation methods such as dilution or spot immobilization on membranes (Olmos et al., 1996; Schaad et al., 2007; Capote et al., 2009; De Boer and López, 2012) or partially circumvented using the so-called "direct PCR" methods (Fujikawa et al., 2013). Nevertheless, all these methods require extract preparations which limit the number of samples that can daily be processed in a robust way. Tissue-print and/or squash systems on membranes (Bertolini et al., 2008; Vidal et al., 2012b; De Boer and López, 2012) are direct methods of sample preparation in which neither extract preparation nor nucleic acid purification are necessary. The main drawback of these systems based on target immobilization is the small amount of sample that can be loaded onto the support. This limitation could be avoided by coupling these preparation methods with highly sensitive techniques such as real-time PCR (Schaad and Frederick, 2002; López et al., 2009).

In this study, tissue-printing, squashing and spotting methods for direct sample preparation without DNA extraction were coupled with real-time PCR detection protocol based on TaqMan chemistry. The system was validated in field conditions and by intra-laboratory performance studies for sensitive detection of any of the three '*Ca. Liberibacter*'

species associated with HLB, even in infected asymptomatic plants. A patented and validated ready-made kit is available for detecting HLB-associated liberibacters.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material and insect vector species

Ten mature fully expanded leaves were collected around the canopy of each tested adult tree. Leaves were used to prepare immobilized samples on membranes for *in situ* analysis or posted to ‘Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias’ (IVIA), in Valencia, Spain to prepare extracts (see below). Samples were collected from heavily HLB-infected groves in Maringá and Paranaíba, (Paraná), Brazil and from symptomatic and symptomless sweet orange (*C. sinensis*) HLB-infected trees maintained in a greenhouse in Fundecitrus, São Paulo, Brazil. Furthermore, sweet orange and *Catharanthus roseus* (periwinkle) infected with ‘*Ca. Liberibacter*’ species from 13 different geographical origins (Table 5A), maintained at Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Bordeaux collection, were also used for validation of the new real-time PCR protocol.

Sweet orange, *C. macrophylla* (alemow) field trees and *C. reticulata* (mandarin) and *C. paradisi* (grapefruit) leaves from certified HLB-free trees grown under insect proof facilities were sampled at IVIA in Valencia, Spain. These plant materials were used for comparison of the efficiency of direct procedures and conventional DNA purification methods of sample preparation, as well as healthy controls.

A total of 1,359 adult *Diaphorina citri* were experimentally submitted to an acquisition period of 72h on trees at Fundecitrus facilities. From these, 299 individuals were fed on symptomatic Las and Lam-infected ‘Valencia’ sweet orange leaves, and 1,060 individuals were fed on symptomless leaves of a Las-infected ‘Valencia’ sweet orange tree. Adult psyllids were fed on leaves of healthy trees as negative control. A total of 476 *Trioza erytreae* individuals were collected on different sweet orange field trees in the Canary Islands, Spain.

All individual psyllid species were caught and preserved in 70% ethanol, posted to IVIA, where they were squashed and analyzed by real-time PCR (see below).

2.2 Primer design

A new primer pair was designed based on the available 16S rDNA sequences of ‘*Ca. Liberibacter*’ species from citrus using the Primer Express Software version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The new forward primer CaLsppF was: 5’-GCAGGCCTAACACATGCAAGT-3’ and the reverse primer CaLsppR was: 5’-GCACACGTTTCCATGCGTTAT-3’. These primers were previously patented (Bertolini et al., 2010) and used for ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’ detection (Teresani et al., 2013) as well as in a ready-made kit for detection purposes.

2.3 Real-time PCR protocol

Real-time PCR assays using the new primers coupled with TaqMan probe (FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-BHQ-1) developed in Li et al. (2006), were performed in StepOne Plus (Applied Biosystems), Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) and/or SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) thermocyclers. The reaction mixture in a final volume of 12 µl contained the following: 1 x Path-IDTMqPCR master mix (Ambion, Grand Island, NY, USA), 0.5 µM of each primer (CaLsppF/CaLsppR), 100 nM of TaqMan probe and 3 µl of purified or extracted DNA targets from immobilized samples. Real-time PCR protocol consisted of one step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data acquisition and analysis were performed with the thermocycler software. The default threshold set by the thermocycler was slightly adjusted above the noise of the linear part of the growth curve, at its narrowest point, according to manufacturer’s instructions.

Real-time PCR specificity was compared with Li et al. (2006) protocol using 17 prints of fresh sections of plant tissues of sweet orange and *Catharanthus roseus* (periwinkle) infected with ‘*Ca. Liberibacter*’ species from 13 different geographical origins (Table 5A). The sensitivity of real-time PCR protocols in Teixeira et al. (2008a) that uses SYBR-Green chemistry, TaqMan protocols described in Li et al. (2006) and the newly developed protocol was compared by cycle threshold (Ct) values. Purified DNA obtained from serial dilutions of plant crude extracts from sweet orange trees infected with Lam, Las or Laf (Table 1) were used. Species primers and probe described in Li et al. (2006) were used to confirm universal liberibacter amplifications using the newly developed protocol.

2.4 Extract preparation and DNA purification

For sensitivity evaluation, extracts from HLB-symptomatic and symptomless mature sweet orange leaves (0.5 g of fresh leaf midribs), collected from HLB-infected trees, were prepared in individual plastic bags. Homex 6 homogenizer (Bioreba, Reinach, Switzerland) was used to grind plant material, approximately 1:20 (w/v), in extraction buffer (PBS buffer, pH 7.2, supplemented with 0.2% (w/v) sodium diethyl dithiocarbamate). Serial dilutions of the prepared extract with symptomatic HLB-infected sweet orange leaves were done by diluting it in HLB-free sweet orange leaf extract (1:20 v/v to 1:10¹⁰ v/v). Total DNA was extracted from each dilution by using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980). All extracts were stored at -20 °C until use. For *T. erythrae*-DNA purification, the CTAB method was used.

2.5 Direct sample preparation by tissue-print and squash procedures

Sweet orange leaf samples from HLB-infected trees from Brazil and from HLB-healthy trees from Spain were immobilized on an area about 0.5 cm² of a positively charged nylon (Roche, Mannheim, Germany) or on 3MM Whatman paper (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) membranes by pressing the freshly, manually detached, citrus leaf petioles and touching the membrane, as described in Bertolini et al. (2008). Leaf petiole imprints from HLB-symptomatic leaves collected from adult trees infected with Las were combined with overlapping petiole imprints (on the same area of the membrane) of leaves collected from HLB-healthy tree in ratios (symptomatic: healthy petiole leaves) of 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 and 10:0. Prints of only one HLB-symptomatic leaf were also combined with nine HLB-free leaves by imprinting the infected tissues in the first, fifth and last position on the membrane. Prints of leaves collected from healthy citrus species were combined with prints of infected (Las) symptomatic leaves to analyze the host effect. The healthy control consisted of imprints performed with leaf pedicels collected from a certified HLB-free sweet orange tree.

Fresh single psyllid species or individuals already preserved in alcohol were squashed on nylon or on paper membranes with the rounded end of an Eppendorf tube (Bertolini et al., 2008).

The printed and/or squashed samples immobilized on membranes were carefully cut surrounding the sample and inserted into Eppendorf tubes containing 100 µl of distilled water,

0.5% Triton X-100 or glycine buffer (0.1 M glycine, 0.05 M NaCl, 1 mM EDTA). Samples were then incubated at 100°C for 10 min and at room temperature, vortexed and placed on ice until use. Three microliters of the extract were directly used as template for real-time PCR assays. The Ct values were then compared. To compare the different procedures of sample preparation, an analysis of variance (ANOVA) using STATGRAPHICS 5.1 software (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) with three factors (host, buffer and temperature) and their interactions, was conducted. When the interaction was significant, the effect of each factor within the rest was also examined. If significant differences were obtained among the different levels of one factor, the multiple comparisons among levels were performed with Tukey's test (Tukey, 1953).

2.6 Sample preparation by the spot procedure

Freshly prepared or frozen sweet orange leaf extracts from field trees collected in Maringá and at IVIA, were immobilized on membranes (Capote et al., 2009). Spotting was carried out by loading 5 µl of crude plant extract onto pieces of approximated 0.5 cm² Whatman 3MM paper filter, which had been previously introduced into Eppendorf tubes. The spotted samples were left to dry for 5 minutes and then the tubes were closed and stored at room temperature in a dark and dry place until use. The DNA targets were then simply extracted using 100 µl of distilled water (Bertolini et al., 2010; Teresani et al., 2013), vortexed and placed on ice until use. Three microliters of the extract were directly used as template for real-time PCR assays.

2.7 Comparison of DNA extraction and spot procedures of sample preparation

The use of purified DNA and spot procedure was compared for Las detection using Coletta-Filho et al. (2010) real-time PCR method and the ready-made kit developed in this study (see below). For this comparison, 258 sweet orange and Tahiti lime samples collected in Brazil in 2010, 2011 and 2012; and 100 HLB-healthy plants collected in Spain in 2013 (see plant material) were used. Ten fresh leaf midribs were homogenized in liquid nitrogen and 0.5 g of the powder was used for total DNA extraction by CTAB method. The purified DNA was stored at -20 °C until use. The rest of the powder was stored at -20 °C until PBS buffer was added for extract preparation. Five microliters of the crude extract were spotted on paper as previously described. These extracts were then analyzed by both real-time PCR protocols.

Preparation of spots and analyses was performed in 2013 at IVIA (in some cases three years after the samples were collected). Cohen's kappa index (Cohen, 1960) was calculated to measure the agreement between DNA extraction with the spot system of sample preparation using both real-time PCR protocols as well as to compare them using the same samples spotted on paper. Diagnostic parameters such as sensitivity, specificity and accuracy were calculated taking into account the true and false positive and negative results. Sensitivity is the proportion of true positives that are correctly identified by a test. Specificity is the proportion of true negatives that are correctly identified by the test. Accuracy refers to the number of true positives and negatives correctly identified by the test (Vidal et al. 2012b). A sample showing positive results by two differently based real-time PCR protocols was considered as a true positive. A sample showing negative results by at least two differently based real-time PCR protocols was considered as a true negative.

2.8 Intra-laboratory validation of a complete ready-made kit

The complete kit HLB/100 (Plant Print Diagnostics, Valencia, Spain) based on the patented primers in Bertolini et al. (2010) and TaqMan probes in Li et al. (2006), lyophilized master mix, immobilized controls and direct method of sample preparation was evaluated. The performance study was done by an intra-laboratory assay at three different laboratories from IVIA using different real-time thermocyclers (see above). Ten blind samples immobilized on paper and stored for one month at room temperature were used: six positive and four negative. Template preparation was done as previously described following the kit manufacturer's instructions. The positive samples consisted of three Las-two Laf- and one Lam-infected sweet orange plant extract immobilized on 0.5 cm² pieces of paper. These samples resulted in Ct values ranging from 27.4 to 34.0 in previous analyses. The negative samples consisted of extracts from HLB-healthy citrus plants. The annealing temperature was 4°C higher than the previously described for real-time amplification using fresh (non-lyophilized) master mix. Three replicate reactions were performed for each sample. Diagnostic parameters (sensitivity, specificity and accuracy) were calculated according to the web page: <https://www.antonio-olmos.com/parameters/online/calculator.html>. Results were considered positive or negative for each sample and Ct values were recorded.

3. RESULTS

3.1 Real-time PCR protocol. specificity and sensitivity

The designed primers (CaLsppF/CaLsppR) coupled with the TaqMan probe described in Li et al. (2006) were compatible and were able to detect ‘*Ca. Liberibacter*’ species targets with an amplification product of 109, 109, 110 and 111 bp for Las, Laf, Lam and ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’, respectively. The new real-time PCR protocol amplified all tested ‘*Ca. Liberibacter*’ species associated with HLB including 13 reference samples from Brazil, China, Florida, India, Indonesia, Malaysia, Mauricio Islands, Philippines, Reunion Islands, South Africa, Taiwan, Thailand and Vietnam. Amplification was not obtained from plant tissues infected with other citrus bacterial pathogens, nor with other 15 unidentified bacteria from citrus microbiota (data not shown), common inhabitants of citrus plant surfaces (Table 5A). *In vitro* analysis of tested HLB associated organisms and other citrus pathogens confirmed previous *in silico* specificity analysis performed with available sequences retrieved from databases.

Table 1 shows average Ct values obtained with different real-time PCR protocols using serial dilutions of total DNA purified from crude extracts of infected plants with Las, Laf and/or Lam. The sensitivity of the protocols of Li et al. (2006) and Teixeira et al. (2008a) was identical. Both protocols were able to detect Las up to 10^{-3} and Lam up to 10^{-4} serial sample dilution. The new protocol was ten times more sensitive for Las detection and showed the same sensitivity for Laf and Lam detection than the PCR protocol described in Li et al. (2006). Both detected bacterial targets up to 10^{-4} serial sample dilution. The HLB-free plant and real-time PCR cocktail controls resulted negative by all tested protocols.

Table 1 Sensitivity comparison (cycle threshold-Ct value) of different real-time PCR protocols using serial dilutions of a crude extract from *huanglongbing* positive sweet orange trees

| Protocol | ' <i>Ca.</i> <i>Liberibacter</i> species' ^a | DNA extracted from crude extract serial dilutions | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|------------------|------------------|--------------------|------------------|---------|
| | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | Healthy |
| Teixeira et al. (2008) SYBR-Green | Lam | 25.1 ^b | 28.6 | 32.7 | 36.5 | Undet | Undet |
| | Las | 24.8 | 28.1 | 31.7 | Undet ^c | Undet | Undet |
| Li et al. (2006) TaqMan probe | Lam | 22.2 | 26.0 | 29.9 | 33.0 | Undet | Undet |
| | Las | 20.9 | 24.8 | 27.9 | Undet | Undet | Undet |
| | Laf | 23.1 | 26.7 | 30.7 | 34.8 | Undet | Undet |
| New protocol | Lam | 23.7 | 27.1 | 30.8 | 35.6 | Undet | Undet |
| | Las | 22.0 | 25.7 | 29.1 | 35.6 | Undet | Undet |
| | Laf | 23.1 | 26.9 | 30.6 | 34.9 | Undet | Undet |

^a Lam= '*Candidatus Liberibacter americanus*'

Las= '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

Laf= '*Candidatus Liberibacter africanus*'

^b Average Ct values from 3 repetitions

^c Ct undetermined (No fluorescence signal was detected until 40 cycles)

3.2 Comparison of membrane supports for sample immobilization

The Ct values of single prints performed with five different HLB-symptomatic leaves ranged from 34.1 to 35.9, on nylon and from 33.7 to 36.4, on paper membranes. The Ct values of composite prints prepared with five pedicels of HLB-symptomatic leaves on nylon (32.3) and on paper membranes (32.2) were similar. When the same assay was conducted using symptomless leaves collected from a Las-infected tree, Ct values of the single prints ranged from 33.5 to 36.4, on nylon and from 34.2 to 36.2, on paper membranes. The Ct values of composite prints prepared with five pedicels from symptomless leaves from a HLB-infected sweet orange tree on nylon (33.2) and on paper membranes (33.8) were similar. All single or composite prints prepared with leaves from a HLB-healthy sweet orange tested negative in both type of membranes (data not shown).

3.3 Comparison of protocols for extraction of immobilized ‘*Ca. liberibacter*’ targets

The comparison of the use of water, glycine or Triton X-100 buffers at 100°C or at room temperature, using two different ‘*Ca. Liberibacter*’ host species are shown in Table 2.

Table 2 Comparison of cycle threshold-Ct values from using different protocols to extract immobilized ‘*Ca. Liberibacter*’ species targets from paper membranes

| Host | Buffer | | | | | |
|------------|-----------------------|------------|-----------------|------------|--------------|------------|
| | Glycine | | Distilled water | | Triton X-100 | |
| | Room temp. | 100° C | Room temp. | 100° C | Room temp. | 100° C |
| Citrus | 29.0±1,3 ^a | 30.3±1,9bc | 30.8±1,7bc | 32.4±2,0cd | 34.6±0,9e | 34.3±1,9e |
| Periwinkle | 29.9±1,7ab | 29.5±2,4ab | 29.6±1,0ab | 31.4±2,4bc | 30.3±0,5bc | 33.0±1,9de |

^aAverage Ct values ± standard error from 15 repetitions. Average with different letters is significantly different ($P < 0.05$ using post hoc Tukey’s test)

The average Ct value of each treatment was calculated after 15 repetitions. The use of glycine at room temperature resulted insignificantly lower average Ct value (29.0 ± 1.3) than the rest of extraction protocols. No significant differences in average Ct values were observed among the treatments with glycine at 100 °C (30.3 ± 1.9), water at room temperature (30.8 ± 1.7) and water at 100 °C (32.4 ± 2.0). Triton X-100 resulted in the highest average Ct value at 100° C (34.3 ± 1.9) and at room temperature (34.6 ± 0.9). For periwinkle, the lowest average Ct value was obtained with glycine at 100° C (29.5 ± 2.4). This value was not significantly different from those obtained with glycine at room temperature (29.9 ± 1.7), distilled water at room temperature (29.6 ± 1.0) or at 100° C (31.4 ± 2.4) nor from Triton X-100 at room temperature (30.3 ± 0.5) (Table 2).

3.4 Dilution effect of HLB-free leaves on prints prepared with HBL-positive leaves

There was a dilution effect, as shown in the obtained average Ct values ranging from 36.6 to 29.4 (Table 3), from the analyzed membranes with a variable number of combined prints from HLB-positive and HLB-free leaves. The Las targets were detected from all proportions of positive/negative prints. When only one print from a HLB-positive leaf (six replicates with different leaves) was combined with nine prints from HLB-healthy leaves, amplification occurred (average Ct=36.6). When the proportion of prints from HLB-positive leaves increased, the Ct value decreased. When all the ten prints were prepared using HLB-positive leaves, the Ct was equal to 29.4. The Ct value was undetermined when only HLB-healthy leaves were used (Table 3). Lower Ct values were observed with the use of purified DNA from HLB-symptomatic leaves (average Ct= 18.9) (1 to 6 in Table 3). No remarkable differences in Ct values were observed when a print from a HLB-positive sweet orange leaf was combined with prints from other HLB-free citrus species (mandarin, alemow and grapefruit) (data not shown).

Table 3 Dilution effect of *Huanglongbing*-healthy leaves in the pool of prints prepared with *Huanglongbing*-symptomatic sweet orange leaf prints for ‘*Ca.Liberibacter asiaticus*’ detection by tissue-print real-time PCR

| Leaf ^a | Pools of HLB-symptomatic leaf prints / HLB-healthy leaf prints | | | | | | | | | | | Purified DNA ^e |
|----------------------------|--|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| | 0/10 | 1/9 | 2/8 | 3/7 | 4/6 | 5/5 | 6/4 | 7/3 | 8/2 | 9/1 | 10/0 | |
| 1 | Undet ^c | 37.1 ^d | 35.4 | 34.7 | 33.8 | 32.9 | 32.5 | 30.7 | 29.8 | 30.6 | 31.8 | 21.2 |
| 2 | Undet | 39.9 | 33.7 | 32.4 | 32.1 | 31.7 | 31.1 | 30.3 | 30.3 | 30.5 | 29.9 | 19.8 |
| 3 | Undet | 38.4 | 32.9 | 31.6 | 32.1 | 32.8 | 31.2 | 31.2 | 31.5 | 30.8 | 29.4 | 19.8 |
| 4 | Undet | 33.1 | 31.5 | 30.8 | 30.9 | 29.5 | 29.3 | 29.2 | 29.6 | 29.9 | 29.5 | 19.1 |
| 5 | Undet | 38.7 | 33.2 | 30.5 | 29.5 | 30.2 | 29.5 | 29.6 | 29.4 | 29.2 | 28.8 | 16.9 |
| 6 | Undet | 32.7 | 33.2 | 31.2 | 30.4 | 30.4 | 28.8 | 28.2 | 28.3 | 28.5 | 27.5 | 16.7 |
| Average^b | Undet | 36.6 | 33.3 | 31.8 | 31.4 | 31.2 | 30.4 | 29.8 | 29.8 | 29.9 | 29.4 | 18.9 |

^aNumbers 1 to 6 mean different symptomatic leaves collected from a *Huanglongbing*-infected sweet orange tree used to prepare prints.

^bAverage of Ct values including *Huanglongbing*-infected and healthy leaf tissues.

^cCycle threshold-Ct undetermined (No fluorescence signal was detected until 40 cycles).

^dReal-time PCR Cycle threshold value.

^eReal-time PCR Cycle threshold value obtained purifying DNA from each of the leaves (1 to 6) used to prepare the print

3.5 Comparison between real-time PCR using direct tissue-printing or purified DNA

Real-time PCR using tissue-print or DNA extraction was able to detect Las in all HLB-symptomatic leaves from trees grown under greenhouse facilities at Fundecitrus and at INRA, individually analyzed. Both tissue-print real-time PCR and real-time PCR after DNA extraction detected Las in 59 out of 100 symptomless leaves collected from symptomatic trees. However, extracted DNA resulted in a stronger PCR signal than when using printed individual pedicels (average Ct value was lower). No amplifications were observed with any methods from samples of healthy trees (Table 4).

Table 4 Comparison between tissue-print real-time PCR and real-time PCR using purified DNA for ‘*Ca. Liberibacter*’ detection in individual prints of citrus *Huanglongbing* symptomatic and symptomless leaves.

| Sample | Real-time PCR | | | |
|---|---------------|------------|----------------|------------|
| | Tissue-print | Average Ct | DNA extraction | Average Ct |
| Symptomatic leaves | 56/56* | 31.80 | 56/56 | 22.60 |
| Symptomless leaves from symptomatic tree | 59/100 | 35.41 | 59/100 | 24.87 |
| Leaves from healthy tree | 0/85 | - | 0/85 | - |

* Analyzed leaves / positives leaves

^d Real-time PCR Ct value.

^e Real-time PCR Ct value obtained purifying DNA from each of the leaves (1 to 6) used to prepare the prints.

3.6 Development and intra-laboratory validation of a complete ready-made kit based on direct tissue-print system

The real-time PCR results obtained in the three different laboratories using the Plant Print Diagnostics kit HLB/100 (containing lyophilized master mix and spotted positive and negative controls) showed 54 out of 54 positive samples. However, 3 out of 36 negative samples were positive resulting in Ct values ranging from 35.3 to 37.4. In contrast, the average Ct values from positive samples ranged from 27.3 to 34.4 (data not shown). No differences among Ct values were observed using the different thermocyclers or in the different laboratories (data not shown). The calculated diagnostic parameters of the tested kit showed a sensitivity of 1 ± 0 , specificity of 0.91 ± 0.02 and accuracy of 96 %.

3.7 Detection of ‘*Ca. Liberibacter*’ targets in individual squashed psyllids

Targets from Las and Lam were successfully amplified from 476 individual *D. citri* species using the squash direct method of sample preparation prior to real-time PCR. In the case of Las, 40 out of 98 (40.8%) analyzed individual psyllids that fed on symptomatic leaves were positive, and 431 out of 1,060 (40.7%) analyzed individual psyllids that fed on symptomless leaves were positive. In the case of Lam, only 5 out of 201 (2.5%) individual psyllids that fed on symptomatic leaves were positive. No amplification was obtained from 100 psyllids that fed on leaves of healthy trees used as controls. ‘*Ca. Liberibacter*’ targets were amplified from 9 out of 476 analyzed *T. erythrae* individuals from the Canary Islands. The same samples tested negative for Las, Laf and Lam by species specific real-time PCR (Li et al., 2006).

3.8 Comparison of purified DNA or spot as systems of target preparation for real-time PCR

The Las target was amplified from a total of 144 out of 358 spotted samples using the commercial ready-made kit. Figure 1 shows a comparison between the Coletta-Filho et al. (2010) protocol using purified DNA or spot and the spotted samples analyzed by the ready-made HLB/100kit. Using the Coletta-Filho et al. (2010) protocol, Las target was amplified from 161 out of 358 analyzed samples using purified DNA, and from 134 when using spots of crude plant extract. When purified DNA analyzed by Coletta-Filho et al. (2010) protocol was compared with the spot analyzed by the kit, coincidental results occurred in 132 positive and

in 185 negative samples; 29 samples tested positive only by DNA extraction and 12 samples tested positive only by the spot system (Fig. 1A). The calculated Cohen's kappa index was 0.766 ± 0.052 . When DNA extraction was compared with the spot using the same real-time PCR protocol, coincidental results were obtained in 123 positive and in 186 negative samples; 38 samples tested positive only by DNA extraction and 11 samples resulted positive only by the spot system (Fig. 1B). The calculated Cohen's kappa index was 0.719 ± 0.052 . Fig. 1C shows the comparison of both real-time PCR protocols using the same spotted samples. Coincidental results were obtained in 105 positive and in 185 negative samples; 39 samples tested positive only with the kit and conversely, 29 tested positive only with the Coletta-Filho et al. (2010) protocol. The Cohen's kappa index resulted 0.600 ± 0.052 .

A

| | | DNA by C-F | |
|-----------------|---|------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by the kit | + | 132 | 12 |
| | - | 29 | 185 |
| 358 | | | |

B

| | | DNA by C-F | |
|-------------|---|------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by C-F | + | 123 | 11 |
| | - | 38 | 186 |
| 358 | | | |

C

| | | Spot by C-F | |
|-----------------|---|-------------|-----|
| | | + | - |
| Spot by the kit | + | 105 | 39 |
| | - | 29 | 185 |
| 358 | | | |

Figure 2 Comparison of purified DNA and spot procedures of sample preparation prior different real-time PCR protocols for detection of '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in 358 adult citrus trees. A: purified DNA Coletta-Filho real-time PCR (DNA by C-F) *versus* spot of crude plant extract analyzed by the kit (spot kit), kappa index 0.766 ± 0.052 ; B: DNA C-F *versus* spot C-F, kappa index 0.719 ± 0.052 ; C: spot C-F *versus* spot kit, kappa index 0.600 ± 0.052 .

A total of 172 trees were considered as true positives (infected by Las) and 186 as HLB-free trees, based on symptom observations and the results obtained with the different real-time PCR protocols and sample preparation systems. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for purified DNA analyzed following the Coletta-Filho et al. (2010) protocol were 0.94 ± 0.012 , 1 ± 0 and 97%, respectively. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for the HLB/100 kit were 0.83 ± 0.019 , 0.99 ± 0.003 and 92%. The calculated sensitivity, specificity and accuracy for the spot system were 0.78 ± 0.021 , 1 ± 0 and 89%, respectively. The management of the kit in laboratory routine was easier than conventional protocols based on DNA purification. The use of lyophilized master mix remarkably facilitates PCR preparation.

4. DISCUSSION

Prevention and containment of HLB and control of citrus psyllid vectors are crucial for any citrus industry still free of the *Liberibacter* species associated with the disease. Therefore, confident, rapid and simple methods that can process large numbers of samples are required. Considering that many pathogens could be present at low titers in “subclinical infections” or even in particular physiological states in symptomless plants (López et al., 2009), detection methods with high sensitivity are needed. Belasque et al. (2009) reported a prevalence of 10% of trees with visually detectable HLB symptoms in a citrus grove, which corresponded in reality to a prevalence of 36.5% infected trees.

The non-cultivable nature of the HLB-associated bacteria and the lack of specificity of the HLB symptoms complicate the detection of ‘*Ca. Liberibacter*’ species. At present, the identification of HLB in citrus trees is performed through frequent visual inspections of the same grove. However, symptom expression may vary depending on the season and citrus species (Lopes et al., 2009). Moreover, mineral deficiencies and other pathogens including phytoplasma can induce symptoms indistinguishable from those associated with HLB (Teixeira et al., 2008b). Real-time PCR is currently the most sensitive, reliable and gold standard technique for detection and/or identification of ‘*Ca. Liberibacter*’ species (Morgan et al., 2012). This powerful tool could substantially contribute to the TPS strategy to manage the disease, once established in a particular area.

Elimination of symptomatic trees to reduce inoculum source together with insecticide treatments to lower the psyllid vector populations are essential for HLB management (Bové, 2012; Belasque et al., 2010). Infected trees overlooked by inspectors can be a problem. Such

trees can become reservoirs for the pathogen and can start secondary infections. Therefore, the development of user-friendly, direct methods of sample preparation coupled with real-time PCR assays for the screening of '*Ca. Liberibacter*' species would be of high interest. The available real-time PCR methods are sensitive enough but are costly and time consuming. Hence, its use has been limited to training inspectors for symptom recognition and to confirm the presence of the pathogen in leaf samples with doubtful symptoms.

This study presents for the first time detection of '*Ca. Liberibacter*' species in citrus trees or psyllid species through entrapment of *Liberibacter* on a membrane for direct real-time PCR. The newly reported primers CaLsppF and CaLsppR, based on the sequence of the most conserved region of the '*Ca. Liberibacter*' species genome, recognized all the tested '*Ca. Liberibacter*' species associated with HLB from different hosts and origins. No cross-reaction was noticed when it was tested with other graft-transmitted citrus pathogens. Although the amplification of '*Ca. Liberibacter solanacearum*' could be inconvenient in terms of specificity, this pathogen is not colonizing citrus and none of the HLB psyllid vectors has been reported to be a vector of '*Ca. Liberibacter solanacearum*'. The new real-time PCR protocol showed similar sensitivity for '*Ca. Liberibacter*' spp. detection than the protocols of Li et al. (2006) and Teixeira et al. (2008a). Printing or compressing leaf petioles or insects on membranes is simpler than the extract preparation and DNA extraction routinely used for PCR detection of *Liberibacter*. Moreover, sample immobilization on membranes can be performed in field conditions by non-specialized personnel in laboratory procedures (De Boer and López, 2012). Nylon and paper membranes showed similar efficiency (Ct values) for fixation and release of the real-time PCR amplifiable '*Ca. Liberibacter*' targets; being paper membranes cheaper and more easily handled in field, as well as in laboratory conditions.

The effect of glycine and temperature on the efficiency of extraction and amplification of '*Ca. Liberibacter*' immobilized targets varied depending on the host. In infected periwinkle, the use of glycine or distilled water at room temperature resulted in similar effects (no significant differences) probably due to the relative high titer of the bacterium in this host. In citrus, however, glycine at room temperature showed significantly lower Ct values than glycine incubated at 100 °C for 10 min or distilled water at room temperature (Table 2). Nevertheless, glycine or just water at room temperature are cheap and simple and were adopted for screening purposes.

The release of target DNA and the amplification by real-time PCR occurred efficiently from composite prints of leaf pedicels from HLB-free and HLB-positive trees independent of the number of positive prints and the printing order. The presence of a single print of HLB-

positive leaves in ten prints, was enough to give a positive amplification, even when the positive was covered by the nine prints from healthy citrus plants. This was independent of the cultivar or citrus species printed. These results suggest that the method can consistently detect HLB in any citrus species when ten leaves are collected in the canopy of adult trees. Nevertheless, a decrease of Ct values was observed when the number of printed HLB-positive leaves increased in the pool of ten prints (Table 3). The HLB detection was equally efficient using the tissue-print method and purified DNA as templates (Table 3 and 4). Tissue-print templates, however, resulted in higher Ct values (less sensitive) than purified DNA. This is probably due to the higher amount of plant material used for DNA purification (complete midrib from a leaf) compared with tissue-print (sap of the printed section of a hand-detached single leaf pedicel) and to the quality of the template (purified DNA vs crude sap from plant material).

The Ct values provide a relative indication of the amount of DNA targets present in an analyzed sample. Values with a Ct above 35 could be an uncomfortable zone for identifying infected plants in the case of using SYBR-Green chemistry where unspecific amplifications might appear. However, the use of TaqMan chemistry solves this drawback. In this case, the presence of a sigmoidal amplification curve is directly related with the presence of the specific product. Capote et al. (2009) demonstrated that Ct values over 35 were related with *Plum pox virus* infection in *Prunus* trees. In other models, this value can be increased to up to 65 cycles of amplification without increasing the number of positive results (Osman and Rowhani, 2004). In any case, diagnostic parameters such as likelihood ratios can clarify false positive and negative rates allow in risk assessment associated with any method (Massart et al., 2009; Vidal et al., 2012a). In this study, the print of a single pedicel from a HLB-symptomatic leaf always tested positive with Ct values ranging from 32.7 to 39.9. In the case of healthy leaves, no amplification was observed. For this reason, the limit of detection (LOD) of the test was established at Ct equal to 40. '*Ca. Liberibacter*' targets were detected in 100% of the symptomatic and in the 59% of the symptomless leaves collected from HLB-infected trees independent of the sample preparation method (Table 4).

Intra-laboratory performance studies demonstrated the practicality of the commercially ready-made kit based on direct methods of sample preparation and on the developed real-time PCR. The recommended real-time protocol included in the kit differs from the protocol that uses fresh master mix by four degrees for the amplification reaction (64 °C instead of 60 °C). In fact, in previous assays it was observed that lyophilization could alter the specificity of TaqMan probes (data not shown). However, this change of 4 °C does not compromise the

sensitivity and/or specificity of the method. The availability of such a kit could contribute to extend the use and increase the number of tests for the detection of the HLB agents in field conditions, as it does not require cold storage.

The spot system of sample preparation was validated using two real-time PCR protocols for Las detection with samples collected up to three years prior to the analyses. The highest number of Las-positive trees was obtained with extracted DNA, followed by the kit using the spot system, and finally by the protocol of Coletta-Filho et al. (2010) using the spot. These results suggest the high sensitivity of DNA purification when it is used as template, in spite of the false positives inherent to any high sensitivity technique (López et al., 2009). The best agreement was between Coletta-Filho et al. (2010) using purified DNA and the developed kit using the spot system, that resulted “substantial” (Kappa index between 0.61-0.80) according to Landis and Koch (1977) (Fig.1A). The coincidental results in detection of HLB-positive and healthy trees by both protocols (DNA purification and kit using the spot) was 89%. Out of the contradictory results, 8% of the trees tested positive only by DNA purification. These could be explained by the elimination of PCR inhibitors after DNA purification process and high sensitivity of this type of system for preparation of templates. The amount of time needed for analysis and sample preparation, however, should be also take into account. Conversely, 3% of the trees tested positive only by the kit using the spot, probably due to inefficient DNA purification. In fact, the use of the spot by both real-time PCR protocols resulted in 11 HLB-infected and symptomatic field trees that tested negative using purified DNA.

The detection of HLB agents in individual vector species was successfully achieved using squashed *D. citri* previously stored in alcohol. The Las species was more frequently detected than Lam in *D. citri* that fed in infected trees in Brazil. This could be due to a lower titer of Lam in Lam-infected trees, resulting in lower acquisition rates by the insect vector (Lopes et al., 2009). Similar percentage of Las detection on psyllids was observed after feeding in symptomatic or symptomless leaves from infected trees, suggesting that bacterial titer could be high even before the observation of symptoms. This fact supports the need for combination of visual inspections and molecular analysis for accurate HLB containment. No species specific amplification was obtained from *T. erythrae* from the Canary Islands. These data confirm HLB agents are not present in this area in spite of positive results in 1.3% of tested individuals using universal primers. However, these results suggest other liberibacters could be present in *T. erythrae*.

The use of simplified direct methods of sample preparation is adapted for large-scale use due to, robustness, lower cost and the reduced risks of contamination compared with non-direct methods. Furthermore, the immobilization of samples, especially by tissue-print and squash enables the preparation of samples in the field, without need for cold storage. The developed and proposed system is safe when dealing with quarantine pathogens especially in the case of non-cultivable and phloem restricted organisms that can be managed or transferred by courier without biological risks to other laboratories (De Boer and López, 2012). The method has already been adopted in an international protocol (IPPC-FAO, 2012) and validated for other hosts and pathogens (Vidal et al., 2012a and b). These methods coupled with real-time PCR are reliable enough for the screening of '*Ca. Liberibacter*' species in extensive surveys for HLB prevention and containment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from MAGRAMA (National Reference Laboratories), RE-LAB, INIA (RTA2011-00142) and FP7-ERANET EUPHRESKO (266505/PHYLIB). We thank Mario Colomer from Plant Print Diagnòstics S.L., Valencia-Spain for preparation of kit prototypes and Dr. María Cambra-López for critical reading of the manuscript. Dr. E. Bertolini is recipient of an INIA-CCAA 2011-2016 contract from Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. R.T.A. Felipe was recipient of CNPq grants (SWE), and R.T.A. Felipe and A.V. Sauer are recipients of PhD grants from CAPES, Ministério da Educação of Brazil.

REFERENCES

BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JR., R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A. R.; TANK JR., A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F. E. A.; MENEZES, G. M.; DRAGONE, J.; JANK JR., R. H.; BOVÉ, J. M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; DE LUIS, A.; VIDAL, E.; PÉREZ-PANADES, J.; CAMBRA M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v. 120, n. 1, p. 177-188, 2008.

BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; SERRA, P.; LÓPEZ, M. M.; LOPES, S.; DURAN-VILA, N.; AYRES, J.; BOVÉ, J. M. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Valencia, Spain). **Direct procedure for specific detection of ‘Ca. Liberibacter’ spp. by immobilized targets and real-time PCR and kit for its detection.** Spanish patent 201001157. 2010.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, v.88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, v. 94, n. 1, p. 465-467, 2012.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuway, a vector of greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science*, v. 37, n. 1, p. 572-576, 1967.

CAPOTE, N.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; VIDAL, E.; MARTINEZ, M. C.; CAMBRA, M. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.

CEN, Y.; GAO, J.; DENG, X.; XIA, Y.; CHEN, J.; ZHANG, L.; GUO, J.; GAO, W.; ZHOU, W.; WANG, Z. A new insect vector of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ *Cacopsylla* (*Psylla*) *citrisuga* (Hemiptera:Psyllidae). In: International Citrus Congress. 2012. Valencia, Spain. **Abstracts...** 2012. p. 264.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010.

- DE BOER, S. H.; LÓPEZ, M. M. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 197-218, 2012.
- DONOVAN, N. J.; BEATTIE, G. A. C.; CHAMBERS, G. A.; HOLFORD, P.; ENGLEZOU, A.; HARDY, S.; DORJEE; WANGDI, P.; THINLAY; OM, N. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina communis*. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2012.
- FUJIKAWA, T.; MIYATA, S. I.; IWANAMI, T. Convenient detection of the citrus greening (huanglongbing) bacterium ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by direct PCR from the midrib extract. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2. e57011. doi:10.1371/journal.pone.0057011. 2013.
- GARNIER, M.; MARTIN-GROS, G.; BOVÉ, J. M. Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease. **Annales del’Institut Pasteur/Microbiologie**, v. 138, n. 1, p. 639-650, 1987.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Distribution of the huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. In: 13th CONFERENCE OF INTERNATIONAL CITRUS VIROLOGISTS. 1996. University of California, Riverside. **Proceedings...** 1996. p. 388-391 .
- GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 119-139, 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 β operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 1, p. 373–379, 1999.
- IPPC-FAO, 2012. Diagnostics protocols for regulated pests. *Plum pox virus*. ISPM. 27, Annex 2.
- JAGOUÉIX, 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, n. 1, p. 43-50, 1996.
- LANDIS, J. R. ; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.
- 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. 1, p. 301-306, 2009.
- LÓPEZ, M. M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.

MASSART, S.; BROSTAUX, Y.; BARBAROSSA, L.; BATLLE, A.; CESAR, V.; DUTRECQ, O.; FONSECA, F.; GUILLEM, R.; KOMOROWSKA, B.; OLMOS, A.; STEYER, S.; WETZEL, T.; KUMMERT, J.; JIJAKLI, M. H. Interlaboratory evaluation of two Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction-based methods for detection of fourfruit tree viruses. **Annals of Applied Biology**, v. 154, n. 1, p. 133-141, 2009.

MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 1, p. 297-298, 1965.

MORGAN, J. K.; ZHOU, L.; LI, W.; SHATTERS, R. G.; KEREMANE, M.; DUAN, Y. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllids hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 26, n. 1, p. 90-98, 2012.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 239, n. 1, p. 487-491, 1980.

OKUDA, M.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, Y.; SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJLrpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 705-711, 2005.

OLMOS, A.; DASI, M. A.; CANDRESSE, T.; CAMBRA, M. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 2192-2193, 1996.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, v. 133, n. 1, p. 130-136, 2004.

ROISTACHER, C. N. Greening: Techniques for Biological Detection of Specific Citrus Graft Transmissible Diseases. In: **Graft-transmissible diseases of citrus**. Rome: FAO. 1991. p. 35-45.

SAGLIO, P.; LAFLÈCHE, D.; BONISSOL, C.; BOVÉ, J. M. Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associés à la maladie dustubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. **Physiologie Végétale**, v. 9, n. 1, p. 569-582, 1971.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 1, p. 250-258, 2002.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; KNORR, D. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringaepv. phaseolicola*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2007.

SCHWARZ, R.E. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. In: 4th Conference of International Organization of Citrus Virologists. 1968. W. C. Price, University of Florida, Gainesville. **Proceedings...** 1968. p. 118-124.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JR., 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, n. 1, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus* *Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 1, p. 139–150, 2008a.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches’-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 1, p. 977-984, 2008b.

TERESANI, G. R.; BERTOLINI, E.; ALFARO-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, M. C.; TANAKA, F. A. O.; KITAJIMA, E. W.; ROSELLÓ, M.; SANJUÁN, S.; FERRÁNDIZ, J. C.; LÓPEZ, M. M.; CAMBRA, M.; FONT, M. I. ‘*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*’ an emerging bacterium associated with vegetative disorders in celery. **Phytopathology**, *in press*. 2013.

TUKEY, J. W. **Some selected quick and easy methods of statistical analysis**. New York: Transactions of the New York Academy of Sciences, Series 2, v.16, p. 88-97, 1953.

VIDAL, E.; MORENO, A.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Estimation of the accuracy of two diagnostic methods for the detection of *Plum pox virus* in nursery blocks by latent class models. **Plant Pathology**, v. 61, n. 1, p. 413-422, 2012a.

VIDAL, E.; YOKOMI, R. K.; MORENO, A.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: a model for other plant pathogens. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 114-121, 2012b.

VILLECHANOUX, S.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J. M. Detection of several strains of the bacterial-like organism of citrus greening disease by DNA probes. **Current Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 89-95, 1992.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>. 2013.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; MARTINS, E. C.; LEITE, A. P. R.; SOUSA, M. C.; ABRAHÃO, D. P.; BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera:Psyllidae): vector of the bacterium ‘*Candidatus* *Liberibacter americanus*’. In: Huanglongbing-Greening International Workshop. 2006. Ribeirão Preto, Brazil, **Proceedings**... 2006. p. 96.

YAMAMOTO, P. T. Control of citrus Huanglongbing (ex-greening) and citrus tristeza virus. Report to the Government of Bhutan of the entomology mission (Sept. 14 to 27, 2007) in Bhutan, TCP/BHU/3001 (A), TR: NPPC/ADM-25, Technical report 1. 2007.

Table 1A Reference ‘*Candidatus Liberibacter*’ isolates, other bacteria, viruses and viroids that affect citrus crops and microbiota strains from citrus, used to test the specificity of the new designed real-time PCR primers.

| Species | Host | Origin (Reference) | Real-time PCR | |
|---|----------------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| | | | Li et al. (2006) | New primers |
| ‘ <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> ’ | <i>Catharanthus roseus</i> | Brazil* | + | + |
| ‘ <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> ’ | <i>Citrus</i> sp. | Brazil* | + | + |
| ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’ | <i>Citrus</i> sp. | Brazil | + | + |
| ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’ | <i>Catharanthus roseus</i> | China* | + | + |

Table 5A, Cont.;

| | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|---|---|
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Catharanthus roseus</i> | Filipinas* | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Citrus</i> sp. | Filipinas (PH 70) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Catharanthus roseus</i> | Florida* | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Catharanthus roseus</i> | India (Poona 70) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Citrus</i> sp. | India (Poona 70) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Citrus</i> sp. | Indonesia-Bali* | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Citrus</i> sp. | Malaysia (95-1) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus' | <i>Citrus</i> sp. | Mauritius Island (95-11) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter africanus' | <i>Citrus</i> sp. | Reunion Island (USA-7) * | + | + |
| ' <i>Candidatus</i> Liberibacter africanus' | <i>Catharanthus roseus</i> | South Africa (AFS 84) * | + | + |

Table 5A, Cont.;

| | | | | |
|---|----------------------------|-------------------------------|---|---|
| <i>'Candidatus Liberibacter asiaticus'</i> | <i>Citrus</i> sp. | Taiwan (LK 70) * | + | + |
| <i>'Candidatus Liberibacter asiaticus'</i> | <i>Catharanthus roseus</i> | Thailand (TH 88) * | + | + |
| <i>'Candidatus Liberibacter asiaticus'</i> | <i>Citrus</i> sp. | Vietnam (95-35) * | + | + |
| <i>'Candidatus Liberibacter solanacearum'</i> | <i>Daucus carota</i> | Spain | - | + |
| <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> | <i>Citrus</i> sp. | Brazil | - | - |
| <i>Xylella fastidiosa</i> | <i>Citrus</i> sp. | Brazil | - | - |
| 15 other unidentified microbiota | <i>Citrus</i> spp. | Spain (IVIA collection) | - | - |
| <i>Spiroplasma citri</i> | <i>Catharanthus roseus</i> | Morocco (G II-3)* | - | - |
| <i>Citrus tristeza virus</i> | Sweet orange | Spain (T388, IVIA collection) | - | - |
| <i>Citrus exocortis viroid</i> | Sweet orange | Spain (IVIA collection) | - | - |

Table 5A, Cont.;

| | | | | |
|---|--------------|-------------------------|---|---|
| <i>Citrus psorosis virus</i> | Sweet orange | Spain (IVIA collection) | - | - |
| Citrus vein enation virus | Sweet orange | Spain (IVIA collection) | - | - |
| <i>Hop stunt viroid</i> | Sweet orange | Spain (IVIA collection) | - | - |
| <i>Citrus sudden death associated virus</i> | Sweet orange | Brazil | - | - |

*From INRA-Bordeaux collection, Franc

