

SENSIBILIDADE *IN VITRO* DA BACTÉRIA *Xylella fastidiosa* A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS¹

Vicente S. MIRANDA²
Pedro M. LACAVA³
Paulo R. S. FARIAS²

RESUMO: A clorose variegada dos citros e a requeima das folhas do cafeeiro são algumas das doenças destrutivas causadas pela *Xylella fastidiosa*, que é uma bactéria gram-negativa e limitada ao xilema de plantas afetadas. Como sua caracterização plena ainda não foi obtida, diferentes isolados da *X. fastidiosa* de citros e café foram testados através da técnica de antibiograma com o objetivo de caracterizar esses isolados e a atividade antimicrobiana dos mesmos. Foram utilizados nesses experimentos dezesseis isolados de *X. fastidiosa* provenientes de citros e café no desenvolvimento dos experimentos. Os testes para avaliar atividade antimicrobiana foram realizados utilizando-se discos da marca CECOM e fitas ETEST da AB BIODISK, contendo diversas concentrações dos antibióticos: Polimixina B, Tetraciclina, Clorafenicol, Netilmicina, Gentamicina, Tobramicina, Penicilina, Ampicilina, Estreptomicina, Amicacina, Sulfazotrim, Vancomicina, Ac. Nalidixico, Nitrofurantoína, Oxacilina, Norfloxacin, Eritromicina, Carbenicilina e Clindamicina. Os resultados demonstraram que os agentes antimicrobianos responsáveis pela formação dos maiores halos de inibição foram: Polimixina B, Tetraciclina, Clorafenicol, Netilmicina e Gentamicina. Com relação às demais moléculas, não houve a formação do halo ou este foi de tamanho inferior quando em contato com a bactéria.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Café, Citros, Agentes Antimicrobianos.

IN VITRO SENSIBILITY OF THE *Xylella fastidiosa* BACTERIA TO DIFFERENTS ANTIBIOTICS

ABSTRACT: The citrus variegated chlorosis and coffee leaf scorch are some of the destructive diseases caused by *Xylella fastidiosa*, which is a gram-negative bacteria found in the xylem of infected plants. In order to characterize *X. fastidiosa*, sixteen isolates of citrus and coffee were tested through the antibiogram technique and the antimicrobial activity of this bacteria. The tests of antimicrobial activity were made using discs of the mark CECOM and strips ETEST of the AB BIODISK containing several concentrations of the antibiotics Polymyxin B, Tetracycline,

¹ Aprovado para publicação em 17.08.2004

² Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto da UFRA – Instituto de Ciências Agrárias. Av. Tancredo Neves, 2501, 66077-530 Belém, PA. E-mail: vicente.miranda@ufra.edu.br; paulo.farias@ufra.edu.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia-UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, s/nº, CEP: 14801-970, Araraquara (SP).

Chloramphenicol, Netilmicin, Gentamicin, Tobramycin, Penicillin, Ampicillin, Streptomycin, Amikacin, Sulfazotrin, Vancomycin, Ac. Nalidixic, Nitrofurantoin, Oxacillin, Norfloxacin, Erythromycin, Carbenicillin e Clindamycin. The results showed that the antimicrobiological agents Polimyxin B, Tetracycline, Chloramphenicol, Netilmicin and Gentamicin formed the largest halo of inhibition. The other antibiotics did not form inhibition halo or it was of lower size in touch with the bacteria.

INDEX TERMS: Coffee, Citrus, Ant Microbiological Agents.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 100 anos, algumas frutíferas de importância econômica, principalmente na América do Norte, passaram a sofrer grandes perdas em função de doenças causadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* (WELLS et al., 1987), que é uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema das plantas, medindo de 1,0 mm a 3,5 mm de comprimento por 0,3 mm a 0,5 mm de largura e compreendendo uma larga faixa de hospedeiros, incluindo plantas mono e dicotiledôneas, algumas com grande significado econômico (CHAGAS; ROSSETTI; BERETTA, 1992).

No Brasil, essa bactéria é o agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), da requeima das folhas do cafeeiro (RFC) e da escaldadura da ameixeira. Foi observada pela primeira vez nos estados de São Paulo e Minas Gerais em 1987 (LEE et al., 1993). Atualmente, a CVC encontra-se disseminada em pomares cítricos nos estados de São Paulo, Paraná (LEITE; JACOMINO, 1993), Minas Gerais (MIZUBUTI; MATSUOKA;

PARIZZI, 1994), Goiás (TUBELIS; RODRIGUES NETO; BERETTA, 1993), Rio de Janeiro (LEE et al., 1991; ROSSETTI; DE NEGRI, 1990), Sergipe, Santa Catarina, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (TUBELIS; RODRIGUES NETO; BERETTA, 1993).

As árvores afetadas apresentam clorose foliar semelhante a deficiência de zinco e as folhas jovens não apresentam sintomas como as folhas adultas, que apresentam lesões gomosas pequenas, de cor marrom que aparecem na face ventral das folhas, as quais correspondem às áreas amarelas cloróticas na face dorsal das folhas. Os frutos são pequenos e duros, com alta concentração de açúcar e com produção de suco reduzida.

Os sintomas ocorrem inicialmente em um lado da planta e se espalham rapidamente para toda a árvore, esta não morre, e seu crescimento é reduzido, quando comparado com o de uma árvore sadia. Há morte dos ponteiros, queda das folhas e a produção diminuem um ano após a planta ser afetada (LEE et al., 1993). Sintomas

semelhantes foram observados em plantas na Argentina, na região de Misiones, desde 1984 (CONTRERAS et al., 1992).

A requeima das folhas do café (RFC) foi relatada pela primeira vez em outubro de 1995, em algumas regiões do estado de São Paulo e no Sul de Minas Gerais (PARADELA FILHO et al., 1995). O agente causal foi isolado e cultivado por Lima (LIMA et al., 1996). Atualmente, a RFC encontra-se disseminada nas áreas cafeeiras dos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Rio de Janeiro e Rondônia (MATIELLO et al., 1998). Folhas pequenas, verde claras e amarelas, principalmente no topo do cafeeiro, encurtamento dos entrenós nos ramos, redução do crescimento geral da planta e morte dos ramos laterais na haste principal, são sintomas observados nessa doença (MATIELLO et al., 1998).

A caracterização plena da bactéria (*X. fastidiosa*) ainda não foi obtida, embora não apresente significativas exigências nutricionais e em meio de cultura semi-sólido apresenta um cultivo satisfatório, em tempo de inoculação relativamente rápido (24 h), detectado pelo teste de ELISA. Considerando-se estes aspectos, os objetivos

do presente trabalho foram caracterizar os isolados de citros e café e avaliar a atividade antimicrobiana frente a diferentes moléculas de antibióticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PLANTAS CÍTRICAS E DE CAFÉ EMPREGADAS PARA O ISOLAMENTO

Foram utilizadas plantas com idade acima de 6 anos por apresentarem sintomas severos da clorose variegada dos citros e da requeima das folhas do cafeeiro oriundas das regiões Norte, Sul, Leste e Oeste do estado de São Paulo, Norte do Paraná, Norte da Argentina e Costa Oeste Americana.. Folhas maduras com sintomas das doenças pertencentes às variedades Pêra e Valência para os citros e mundo novo para o café, foram retiradas para produção do extrato a partir de tecidos vasculares. Deste material, foram obtidos 16 isolados (Quadro 1) entre citros e café, utilizados para todas as pesquisas realizadas no laboratório do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), localizado na cidade de Araraquara (SP) entre 1998 e 2000.

Quadro 1 – Isolados de *Xylella fastidiosa* utilizados para o desenvolvimento dos experimentos com os agentes antimicrobianos.

| Isolado | Região do Isolamento | Coordenadas | | Hospedeiro | Variedade |
|---------|---------------------------------|--------------|-------------|------------|------------|
| | | Longitude | Latitude | | |
| 1 | Cordeirópolis, SP | 47° 27' 25" | 22° 28' 56" | Citros | Pêra |
| 2 | Jales, SP | 50° 32' 46" | 20° 16' 09" | Citros | Pêra |
| 3 | Itapetininga, SP | 48° 03' 12" | 23° 35' 31" | Citros | Pêra |
| 4 | São José Rio Preto, SP | 49° 22' 47" | 20° 49' 12" | Citros | Pêra |
| 5 | Macaubal, SP | 49° 57' 51" | 20° 48' 22" | Citros | Pêra |
| 6 | Misiones, Argentina | 55° 40' 12" | 27° 47' 23" | Citros | Valência |
| 7 | Matão, SP | 48° 21' 58" | 21° 36' 13" | Café | Mundo Novo |
| 8 | Norte do Paraná – Londrina | 51° 09' 47" | 23° 18' 38" | Citros | Pêra |
| 9 | Taquaritinga, SP | 48° 30' 18" | 21° 24' 23" | Citros | Pêra |
| 10 | Silvania, SP | 48° 19' 31" | 21° 20' 14" | Café | Mundo Novo |
| 11 | Casa Branca, SP | 47° 05' 12" | 21° 46' 27" | Café | Mundo Novo |
| 12 | Franca, SP | 47° 24' 04" | 20° 32' 20" | Café | Mundo Novo |
| 13 | São Manuel, SP | 48° 34' 15" | 22° 43' 53" | Café | Mundo Novo |
| 14 | Marília, SP | 49° 56' 46" | 22° 12' 51" | Café | Mundo Novo |
| 15 | São José Rio Preto, SP | 49° 22' 47" | 20° 49' 12" | Café | Mundo Novo |
| 16 | ATCC 35870 – Califórnia, USA | 117° 17' 20" | 34° 06' 30" | Amêndoa | — |

2.2 MEIO DE CULTURA

Utilizou-se o meio de cultura Periwinkle (PW) (CHANG et al., 1993) constituído por: peptona de soja, 4,0 g; caseína hidrolisada, 1,0 g; K_2HPO_4 , 1,2 g; KH_2PO_4 , 1,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4 g; ágar, 12,0 g; cloreto de hemina (0,1%), 10,0 mL; vermelho de fenol (0,2%), 10,0 mL; água destilada, 920,0 mL; albumina bovina (6,7%), 6,0g/60,0 mL e glutamina (8,0%), 4,0g/100,0 mL. O BSA (soro albumina bovina) e a glutamina foram diluídos em água e filtrados em filtros esterilizantes de porosidades 0,45 μ m e 0,22 μ m, antes de

serem adicionadas ao meio, anteriormente autoclavado.

2.3 TÉCNICA DE ISOLAMENTO BACTERIANO

As folhas foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e os seus pecíolos foram cortados. Esterilizaram-se os pecíolos através de exposição em álcool 70% por um minuto, lavagem em água destilada esterilizada por 3 vezes, exposição a solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, lavando-se, em seguida, por 3 vezes em água destilada esterilizada (LIMA et al., 1998).

Para o isolamento da bactéria, os pecíolos foram cortados em secções de 2mm, colocados em tubo de centrífuga (15 mL), adicionando 1mL do caldo PW e centrifugados a 900 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida foram pipetados 0,1 mL do sobrenadante formado no tubo centrifugado e adicionado em um tubo de vidro contendo 5,0 mL do caldo PW.

Foram realizados cultivos no Ágar PW (1,2%) e no caldo PW, com pH em torno de 6,6, e a temperatura de 28 °C (LIMA et al., 1998).

2.4 TESTE DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Foram utilizados discos da marca CECOM para realização do antibiograma com os seguintes agentes antimicrobianos: Polimixina B, Cloranfenicol, Tetraciclina, Netilmicina, Gentamicina, Tobramicina, Penicilina, Ampicilina, Estreptomicina, Amicacina, Sulfazotrim, Vancomicina, Ac. Nalidixico, Nitrofurantoína, Oxacilina, Norfloxacin, Eritromicina, Carbenicilina e Clindamicina.

Para determinar as concentrações inibitórias mínimas dos agentes antimicrobianos selecionados, utilizaram-se fitas ETEST da marca AB BIODISK contendo diversas concentrações dos antibióticos: Tetraciclina, Cloranfenicol, Netilmicina e Penicilina.

O procedimento, seguindo às recomendações do fabricante, para os testes com os diferentes agentes antimicrobianos e a verificação da concentração inibitória mínima

frente aos antibióticos, consistiu em colocar 10 mL de Ágar PW em placas de Petri descartáveis (80 x 10 mm). Após sua solidificação inoculou-se, com um SWAB sobre o meio, a bactéria suspensa em caldo PW na concentração 10^9 células/mL. Após 2 horas foram colocados os discos e as fitas sobre o meio e prensados com uma pinça. As leituras foram realizadas a partir do 2º dia até o 7º dia, seguindo às recomendações do fabricante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os agentes antimicrobianos responsáveis pela formação dos maiores halos (Tabela 1) segundo o método de Kirby-Bauer (Difusão em disco) em contato com os isolados foram: Polimixina B, Cloranfenicol, Tetraciclina, Netilmicina e Gentamicina. Já para os agentes antimicrobianos Tobramicina, Penicilina, Ampicilina, Estreptomicina, Amicacina, Sulfazotrim, Vancomicina, Ac. Nalidixico, Nitrofurantoína, Oxacilina, Norfloxacin, Eritromicina, Carbenicilina, Clindamicina não houve a formação de halo de inibição ou este foi de tamanho inferior em contato com a bactéria.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas com os 16 isolados de citrus e café utilizando-se os antibióticos Tetraciclina, Cloranfenicol, Netilmicina e Penicilina. A molécula que apresentou a menor concentração inibitória mínima frente às linhagens testadas foi a Tetraciclina, seguida das moléculas de Cloranfenicol, Netilmicina e Polimixina.

Tabela 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana da *Xylella fastidiosa* frente aos diferentes agentes analisados.

| Nome do agente | [] molécula | Halo (mm) ¹ |
|-----------------|--------------|------------------------|
| Gentamicina | 10 mg/mL | 12 |
| Tobramicina | 10 mg/mL | 10 |
| Polimixina | 300 mg/mL | 12 |
| Penicilina | 10 mg/mL | 0 |
| Cloranfenicol | 30 mg/mL | 20 |
| Ampicilina | 10 mg/mL | 11 |
| Estreptomicina | 10 mg/mL | 11 |
| Tetraciclina | 30 mg/mL | 21 |
| Amicacina | 30 mg/mL | 10 |
| Sulfazotrim | 25 mg/mL | 0 |
| Vancomicina | 30 mg/mL | 0 |
| Ac.Nalidixico | 30 mg/mL | 0 |
| Netilmicina | 30 mg/mL | 15 |
| Nitrofurantoína | 300 mg/mL | 0 |
| Oxacilina | 5 mg/mL | 0 |
| Norfloxacina | 10 mg/mL | 0 |
| Eritromicina | 15 mg/mL | 0 |
| Carbenicilina | 100 mg/mL | 0 |
| Clindamicina | 2 mg/mL | 0 |

¹ Leituras realizadas entre o segundo e o sétimo dia de inoculação.

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória mínima dos 16 isolados da bactéria *Xylella fastidiosa*, frente aos diferentes antibióticos.

| Isolados | Hospedeiro | Antibióticos (concentração em mg/mL) | | | |
|--------------------------|------------|--------------------------------------|---------------|-------------|------------|
| | | Tetraciclina | Cloranfenicol | Netilmicina | Penicilina |
| 1- Cordeirópolis, SP | Citros | 0,032 | 0,5 | 2 | 16 |
| 2- Jales, SP | Citros | 0,032 | 0,5 | 2 | 16 |
| 3- Itapetininga, SP | Citros | 0,75 | 2 | 2 | 16 |
| 4- S. José Rio Preto, SP | Citros | 0,032 | 1 | 1 | 16 |
| 5- Macaubal, SP | Citros | 0,19 | 6 | 2 | 16 |
| 6- Misiones, Argentina | Citros | 0,094 | 0,5 | 2 | 6 |
| 7- Matão, SP | Café | 0,032 | 8 | 0,5 | 48 |
| 8- Norte do Paraná | Citros | 0,023 | 8 | 0,5 | 4 |
| 9- Taquaritinga, SP | Citros | 0,032 | 0,5 | 0,5 | 16 |
| 10- Silvania, SP | Café | 0,032 | 2 | 1 | 48 |
| 11- Casa Branca, | Café | 0,025 | 2 | 0,5 | 48 |
| 12- Franca | Café | 0,064 | 16 | 0,5 | 48 |
| 13- São Manuel | Café | 0,25 | 16 | 0,5 | 48 |
| 14- Marília | Café | 0,094 | 16 | 4 | 48 |
| 15- S. José Rio Preto | Café | 0,19 | 8 | 0,5 | 48 |
| 16-ATCC 35870, USA | Amêndoa | 0,25 | 6 | 1,5 | 64 |

A Tabela 2 indica que a maioria dos isolados analisados apresentaram concentração inibitória frente à molécula de Tetraciclina entre 0,023 e 0,094 mg/mL (Figura 1) (CHAGAS; ROSSETTI; BERETTA, 1992; CHANG et al., 1993; LEE et al., 1993; LEITE; JACOMINO, 1993; LIMA et al., 1996; MATIELLO et al., 1998; MIZUBUTI; MATSUOKA; PARIZZI, 1994; PARADELA FILHO et al., 1995; ROSSETTI; DENEGRI, 1990, TUBELIS; RODRIGUES NETO; BERETTA, 1993), já os isolados 5 e 15 apresentaram concentração inibitória de 0,19 mg/mL, os isolados 13 e 16 apresentaram concentração inibitória de 0,25 mg/mL e o

isolado 3 apresentou uma concentração inibitória que foi de 0,75 mg/mL. Deste modo, pode-se verificar de uma forma geral, que houve uma variação entre os isolados de citros e de café, mesmo em comparação ao isolado de amêndoa com relação à molécula de Tetraciclina. A molécula de Tetraciclina também foi testada através do método de difusão em disco no meio PW (LACAVA et al., 2001) nas concentrações de 1, 2, e 5g mL⁻¹ sendo que, para os isolados de café, a concentração inibitória mínima variou entre 1 e 2g mL⁻¹ e para os isolados de citros entre 1 e 5g mL⁻¹, concentrações estas maiores que as obtidas neste experimento.

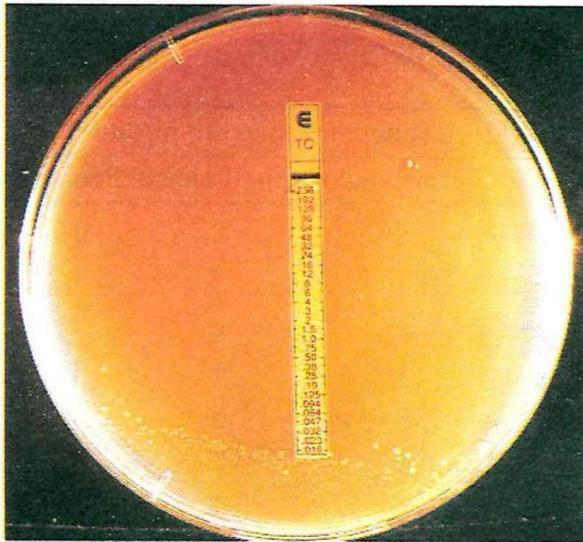


Figura 1 – Avaliação da concentração inibitória mínima da linhagem do Norte do Paraná (8), frente a molécula de Tetraciclina

Com relação à molécula de Cloranfenicol, os isolados 1, 2, 6, e 9 apresentaram a menor concentração inibitória que foi de 0,5 mg/mL, o isolado 4 apresentou concentração inibitória de 1 mg/mL, os isolados 3, 10 e 11 apresentaram concentração inibitória de 2 mg/mL, os isolados 5 e 16 apresentaram concentração inibitória de 6 mg/mL, os isolados 7, 8 e 15 apresentaram concentração inibitória de 8 mg/mL e os isolados 12, 13 e 14 apresentaram uma concentração inibitória que foi de 16 mg/mL. Deste modo, pode-se verificar que os isolados de citros apresentaram uma concentração inibitória menor frente aos de café. Já a linhagem de amêndoa apresentou uma concentração inibitória intermediária entre os isolados de citrus e de café. Chang e Schaad (1982) testaram diferentes antibióticos dissolvidos no meio CS20 frente a diferentes isolados

da bactéria *Xylella fastidiosa* oriundos de ameixeira, pessegueiro, videira e carvalho e concluíram que concentrações igual ou acima de 6,25ug/mL dos antibióticos Cloranfenicol e Tetraciclina inibiram o crescimento de todos os isolados, valores estes acima dos obtidos neste experimento para a molécula de Tetraciclina e intermediário para a molécula de Cloranfenicol.

Com relação à molécula de Netilmicina, os isolados 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 15 apresentaram uma menor concentração inibitória que foi de 0,5 mg/mL, os isolados 4 e 10 apresentaram concentração inibitória de 1 mg/mL, o isolado 16 apresentou uma concentração inibitória de 1,5 mg/mL, os isolados 1, 2, 3, 5 e 6 apresentaram concentração inibitória de 2 g/mL e o isolado 14 apresentou concentração inibitória de 4 mg/mL. De um modo geral, os isolados de café apresentaram uma concentração inibitória menor frente à molécula de Netilmicina do que os de citros. Já o isolado de amêndoa apresentou uma concentração inibitória muito parecida com a maioria dos isolados de citros.

Com relação à molécula de Penicilina, observou-se que o isolado 8 apresentou a menor concentração inibitória que foi de 4 mg/mL, o isolado 6 apresentou concentração inibitória de 6 mg/mL, os isolados 1, 2, 3, 4, 5 e 9 apresentaram concentração inibitória de 16 mg/mL, os isolados 7, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 apresentaram concentração inibitória de 48 g/mL e o isolado 16

apresentou a maior concentração inibitória que foi de 64 mg/mL. De um modo geral, os isolados de citros apresentaram concentração inibitória menor frente à molécula de Penicilina do que os de café. Já o isolado de amêndoa apresentou a maior concentração inibitória dos isolados analisados. Lacava et al. 2001 analisando a molécula de Penicilina nas concentrações de 50 e 100g mL⁻¹ obteve para os isolados de café uma concentração inibitória mínima de 50g mL⁻¹ e para os isolados de citros a concentração variou entre 50 e 100g mL⁻¹, concentrações estas também maiores que as obtidas neste experimento.

4 CONCLUSÃO

Os agentes antimicrobianos Polimixina B, Cloranfenicol, Tetraciclina, Netilmicina e Gentamicina foram eficientes no controle do crescimento da bactéria, sendo responsáveis pela formação dos maiores halos de inibição e podendo ser utilizados em pesquisas futuras em áreas como a obtenção de bactérias geneticamente modificadas não patogênicas, desinfecção de borbulhas ou em testes com mudas e plantas contaminadas. Com relação às demais moléculas, as concentrações utilizadas nos experimentos não foram eficientes no controle do crescimento bacteriano, sendo possível à realização de novos ensaios com concentrações diferentes das utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Elétron microscopy studies of xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.134, p.306-12, 1992.

CHANG, C.J.; SCHAAD, N. W. In vitro antibiotic susceptibility of xylem-limited plant pathogenic rickettsia-like bacteria. *Phytopathology*, v. 72, p. 1006, 1982.

—————; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing Citrus Variegated Chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiologic*, New York, v.27, n.3, p.137-142, 1993.

CONTRERAS, J. del V. “Pecosita” ou “Falsa mancha Grasieta” na Argentina. *Laranja & Cia*, Matão, v.31, n.6, 1992.

LACAVA, P. T.; ARAUJO, W. L.; MACCHERONI Jr, W.; AZEVEDO, J. L. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of Citrus Variegated Chlorosis. *Applied Microbiology*, v. 33, p. 1-5, 2001.

LEE, R. F.; BERETTA, M. J. G.; HARTUNG, J. H.; HOOKER, M. E.; DERRICK, K. S. *Xylella fastidiosa*: agente causal da clorose variegada dos citros. *Laranja*, Cordeirópolis, v.14, p.157-166, 1993. Suplemento 1.

- LEE, R.F.; DERRICK, K.S.; BERETTA, M.J.G.; CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*, Boston, v.72, p.10-13, 15, 1991.
- LEITE, R. M. V. B. C.; JACOMINO, A. P. Ocorrência de Clorose Variegada dos Citros no estado do Paraná. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.19, p.35, 1993.
- LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Distribuição de *Xylella fastidiosana* cafeeiro, nas regiões cafeeiras e seu isolamento in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.21, n.3, p.392, 1996.
- ; —————; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: anoxic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Disease*, v. 82, n. 1, p. 94-97, 1998.
- MATIELLO, J.B.; ALMEIDA, S.R.; GARCIA, A.W.R.; MIGUEL A. E.; PERINE, J.; ARAUJO, M.; MIRANDA, V.S.; MANFIO, G.P. Survey of occurrences of the "Amarelinho" in coffee plantation regions of Brazil and the first confirmation of "Conilon" in coffee trees. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CAFEICULTURA 24., 1998, Poços de Caldas. *Resumos...* Poços de Caldas, 1998. p. 17.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de Clorose Variegada dos Citros na região da Zona da Mata de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.19, n.2, p.241-244, 1994.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. et al. Primeira constatação em cafeeiro da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja*, Cordeirópolis, v.16, 1995.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. D. Clorose Variegada dos Citros - revisão. *Laranja*, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- TUBELIS, A.; RODRIGUES NETO, J.; BERETTA, M. J. G. Primeira constatação da anomalia clorose variegada dos citros CVC no estado de Goiás. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.19, p.46, 1993. (resumos).
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen nov., sp. nov. gramnegative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, DC, v. 37, p. 136-143, 1987.