

**EFEITO DE N-acetil-L-cisteína (NAC) NA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO DE  
*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) EM PLANTAS DE LARANJA DOCE**

Gabriel H. B. **ROCHA**<sup>1</sup>; ALESSANDRA A. **SOUZA**<sup>2</sup>; HELVÉCIO D. **COLETTA-FILHO**<sup>3</sup>

**Nº 12127**

**RESUMO**

Como um setor altamente organizado e competitivo, a citricultura no Brasil é uma das mais importantes atividades agroindustriais, contribuindo nos superávites comerciais do Brasil, gerando divisas e empregos. Contudo, a produtividade brasileira de citros é muito baixa, o que está associado à pragas e doenças, como o HLB (Huanglongbin), causado no Brasil pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. A bactéria é injetada pelo inseto nos vasos do floema da planta hospedeira. Não se sabe exatamente sobre o mecanismo de patogenicidade destas bactérias, mas devido ao seu estilo de vida intracelular podem ser melhores descritas como parasitas do que como patógenos clássicos, sendo que os sintomas de HLB parecem ser primariamente decorrentes de desbalanços metabólicos da planta hospedeira. Para bactérias patógenas de humanos, uma forma de controle tem sido interferir no processo de colonização do patógeno na superfície do hospedeiro. Para isto é utilizado análogo de cisteína, N-acetyl-L-cysteina (NAC), uma molécula antioxidante que desfaz as pontes disulfeto das adesinas devido à competição pela utilização de cisteína e NAC. O objetivo deste trabalho é avaliar, a partir de estudos já realizados pelo nosso grupo de pesquisa (evidenciando o efeito do NAC na formação de biofilme de *X. fastidiosa*), o efeito deste composto para o controle ou manejo do HLB. Pretende-se também verificar se o NAC interfere na colonização da bactéria no floema, e se esta característica está associada a patogenicidade da bactéria e sintomatologia no hospedeiro. Os resultados apontaram que o NAC parece ter um efeito negativo no estabelecimento de *Liberibacter* nas plantas. Novos ensaios precisam ser realizados para confirmação dos resultados.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP.  
rocha.ghb@gmail.com

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, IAC-CCSM, Cordeirópolis-SP

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP

## ABSTRACT

As a highly organized and competitive industry, citrus production in Brazil is one of the most important agro-industrial activities, contributing to Brazil's trade surplus, foreign exchange and generating employment. However, the productivity of Brazilian citrus is very low, which is associated with pests and diseases such as HLB (Huanglongbin), in Brazil caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Candidatus Liberibacter americanus*. The bacterium is injected by the insect in phloem of the host plant. No one knows exactly about the mechanism of pathogenicity of these bacteria, but due to its intracellular lifestyle can be best described as parasites than classical pathogens, for HLB symptoms seem to be primarily due to metabolic imbalances of the host plant. For pathogenic bacteria of humans, a form of control has been interfering in the process of colonization of the pathogen on the surface of the host. To this is used an analog of cysteine, N-acetyl-L-cysteine (NAC), an antioxidant molecule which breaks disulfide bridges of the adhesins due to competition for the use of NAC and cysteine. The objective of this study is to evaluate, from previous studies by our research group (showing the effect of NAC on biofilm formation of *X. fastidiosa*), the effect of this compound for the control or management of HLB. We also intend to verify whether NAC interferes with the colonization of bacteria in the phloem, and this characteristic is associated with pathogenic bacteria and symptoms in the host. The results showed that NAC appears to have a negative effect on the establishment of *Liberibacter* in plants. New tests must be performed to confirm the results.

## INTRODUÇÃO

### Importância econômica dos citros

Vários estados brasileiros dispõem de considerável produção de laranja e demais frutos cítricos. Sua produção ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde encontra-se cerca de 85% da produção brasileira de laranjas (14,8 milhões t; 700 mil ha) (Mattos et.al, 2005). O país é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais. O setor citrícola brasileiro somente no Estado de São Paulo gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Entretanto, a citricultura tem enfrentado alguns problemas principalmente de ordem fitossanitária devido ao grande número de pragas e doenças, dentre elas,

Huanglongbing (HLB) também conhecida como Greening. Os sintomas clássicos de HLB são as cloroses assimétricas no limbo foliar. A partir da nervura central, cada metade do limbo foliar passa a apresentar cloroses que não apresentam simetria no lado correspondente. Em uma região predomina o verde escuro, ou próximo à cor normal, enquanto no lado correspondente, têm-se verde claro, ou cloroses. Este sintoma também é chamado de mosqueamento, e é amplamente descrito na literatura internacional (Bové 2006). Essas cloroses estão normalmente delimitadas entre as nervuras secundárias do limbo foliar e são bastante típicas para o reconhecimento de HLB no Brasil em laranjeiras doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Figura 1).

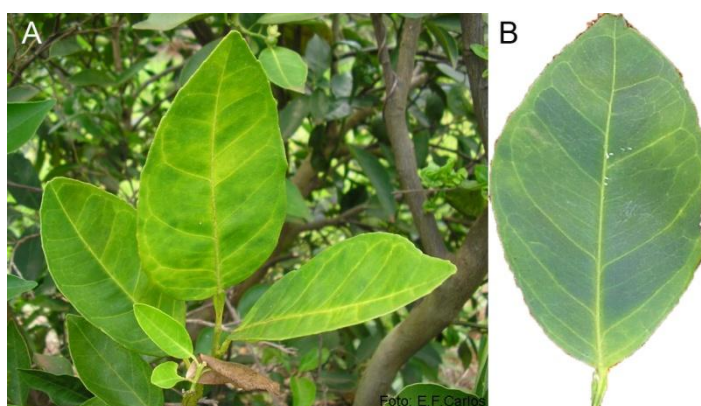


Figura1. Detalhes de sintomas de *huanglongbing*. **A)** Sintomas de HLB em folhas maduras dentro da copa. **B)** Cloroses assimétricas típicas no limbo foliar, normalmente delimitadas entre as nervuras secundárias do limbo foliar de laranjeiras doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

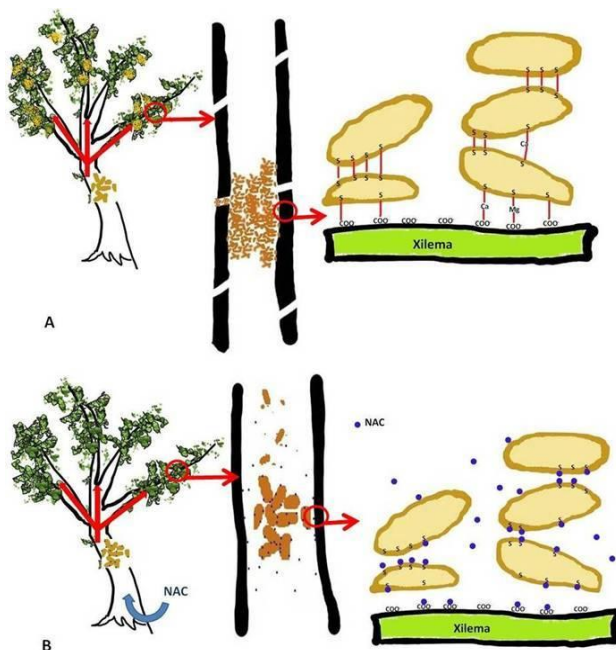
#### **Atuação de N-acetil-cisteína em bactérias patogênicas**

Apesar de sua importância como medicamento, o efeito do NAC sobre bactérias tem sido pouco estudado. Perez-Giraldo et al. (1997) mostraram que o NAC reduziu a população de *Staphylococcus epidermidis* em uma superfície de poliestireno, mas não distinguem entre os efeitos sobre as bactérias e EPS bacteriana. Recentemente foi demonstrado que o NAC reduziu a adesão de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* a células epiteliais orofaríngeas *in vitro*. Da mesma forma, NAC também reduziu a adesão de *Moraxella catarrhalis* a células epiteliais da faringe, possivelmente pela remoção de uma camada de material extracelular de rutênio vermelho-positivo das células epiteliais (Olofsson et al., 2003).

O modo de ação do NAC em bactérias ainda permanece desconhecido, porém têm-se sugerido que este deva interferir nos receptores adesivos através de sua capacidade de desfazer pontes dissulfeto (Olofsson et al., 2003). Segundo Leite *et al.*

(2002) o processo inicial de adesão da *X. fastidiosa*, um outro patógeno de citros causador da clorose variegada dos citros (CVC), é decorrente da presença de grupos thiols (SH) na superfície das células bacterianas. A presença destes grupos SH seria uma consequência da existência de proteínas transmembrana e adesinas que exibem resíduos de metionina na porção extracelular. O resíduo (SH) seria adesivo uma vez que possui carga negativa, porém, sua forma oxidada (S) não. Em um processo inicial de adesão, essas cargas negativas na membrana da bactéria estariam atraindo vários cátions como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  principalmente, além de alguns cátions monovalentes, como o Zn, e estes participariam de pontes unindo as membranas das bactérias às paredes dos vasos da planta, que seria negativamente carregado devido à dissociação do ácido poligalacturônico. Esse seqüestro do zinco explicaria os sintomas de deficiência deste mineral na doença CVC. Quanto ao seqüestro de cálcio, o envolvimento de adesinas dependentes desse cátion já foi relatado para *Candida albicans*, um fungo patógeno humano (Leite et al., 2001).

Assim o NAC, sendo um análogo de cisteína, e por possuir então, grupos SH, poderia por competição se ligar aos resíduos negativos das proteínas de superfície da bactéria e evitar com que pontes dissulfeto fossem realizadas com outras células ou com uma superfície (como o floema), comprometendo assim a eficiente adesão e por consequente a colonização no hospedeiro (vide modelo proposto na Figura 2).



**Figura 2.** Modelo do possível modo de ação de NAC *in vivo*. Em A, está ilustrado o modo de evolução normal da doença com o aparecimento dos sintomas. As bactérias começam um processo de adesão entre si e na superfície do xilema, com a formação de biofilme, responsável pela obstrução de vasos condutores e aparecimento de sintomas. Já em B, o NAC atua evitando a formação do biofilme. O NAC (representado em azul), por competição, se ligaria aos radicais das adesinas (fimbriais ou afimbriais) e do próprio xilema não permitindo assim que as pontes dissulfeto das adesinas das bactérias se realizassem, evitando a formação do biofilme,

Dessa forma, o NAC é uma molécula anti-adesiva promissora para desestruturação do biofilme bacteriano *in vivo*. Embora ainda pouco explorado, a

formação de biofilme por *Ca. Liberibacter* parece não ser um dos mecanismos relacionados a patogenicidade desta bactéria. Porém, dado ao sucesso experimental no controle da CVC pelo uso do NAC e a eminente necessidade se ter uma alternativa ao manejo de erradicação de plantas sintomáticas ao HLB, o presente trabalho, visa ampliar os conhecimentos sobre o efeito do NAC para outro patossistema, como *C. liberibactus asiaticus* causadora do Greening em citros. O presente trabalho busca uma visão mais prática do possível efeito do NAC, simulando uma condição mais próxima ao campo, na perspectiva de manejo da doença. Além disto, pretende-se compreender o efeito deste composto na colonização da bactéria antes do aparecimento do sintoma, e assim inferir se o NAC atua no estabelecimento e colonização da bactéria durante o processo de infecção.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparo das plantas**

Para o experimento foram utilizadas mudas de laranja doce enxertadas em Limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) com 8 meses de idade e produzidas em ambiente protegido segundo as normas fitossanitárias mandatórias para o Estado de São Paulo. Um total de 54 plantas foram utilizadas e igualmente distribuídas nos 6 tratamentos descritos abaixo. Em cada tratamento 8 plantas foram inoculadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* através de enxertia tecidos doentes obtidos de plantas fonte desta bactéria e mantidas em casa-de-vegetação no Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Como controle negativo uma plantas de cada tratamento recebeu enxertia de tecido sadio retirado de plantas microenxertadas. Portanto, para cada tratamento um total de 9 plantas foram utilizadas.

### **Infecção com *Ca. L. asiaticus***

Inoculação das plantas teste positivas foi feito através do sistema conhecido como borbulhia utilizando-se dois pequenos pedaços de ramo (2 a 3 cm) para cada planta. Após a enxertia as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura máxima controlada e não superior a 30°C

### **Tratamentos e preparo das soluções**

Cada um dos 6 tratamentos sofreram a aplicação por aspersão de soluções com composições diferentes mas de mesmo volume (500mL), sendo que cada planta recebeu, em media, 62,5 mL de solução.

- **Tratamento 1:** 1g de NAC + 400mL de água destilada + 100 mL de adjuvante 1 - ácido húmico contendo N(1.5):P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0):K<sub>2</sub>O (1.5) **pH final: 8,32**
- **Tratamento 2:** 1g de NAC + 400mL de água destilada + 100 mL de adjuvante 2 - extrato vegetal purificado a base de *Aloe vera*. **pH final: 4,25**
- **Tratamento 3:** 1g de NAC + 500mL de água destilada. **pH final: 4,40**
- **Tratamento 4:** 400mL de água destilada + 100 mL de adjuvante 1. **pH final: 9,02**
- **Tratamento 5:** 400mL de água destilada + 100 mL de adjuvante 2. **pH final: 3,05**
- **Tratamento 6:** 500 mL de água destilada (testemunha). **pH final: 7,0**

Após feitas as respectivas medidas de volume e pesagem dos constituintes de cada tratamento os componentes destes foram homogeneizados num becker sobre um agitador magnético colocando-se, na ordem, água e NAC (com propriedades sensoriais de pó branco) sendo que somente após total dissolução do NAC fez-se a adição do adjuvante.

#### Aplicações dos tratamentos e amostragens

As aspersões das soluções nas plantas foram feitas mensalmente totalizando-se sete meses (vide cronograma abaixo), sendo a primeira aplicação realizada 30 dias após a inoculação das plantas com tecidos infectados. De forma homogênea as soluções foram aspergidas nos respectivos tratamentos, através de um borrifador manual, procurando-se atingir toda a copa das plantas. Foram realizadas três amostragens sempre num intervalo de 90 dias após cada amostragem, sendo a primeira amostragem realizada 30 dias após o preparo das plantas (vide cronograma abaixo).

Cronograma							
	Set/11	Out/11	Nov/11	Dez/11	Jan/12	Fev/12	Mar/12
Aplicação	X	X	X	X	X	X	X
Amostragem	X			X			X

Para cada amostragem foram coletadas em média 6 folhas por planta sendo utilizado o pecíolo destas. Para a primeira amostragem buscou-se coletar folhas ao longo da copa e para a segunda e terceira amostragem buscou-se coletar folhas que apresentassem sintomas associados ou típicos de HLB.

#### Extração de DNA e Quantificação

Para a extração de DNA foram utilizados 200 mg de pecíolo picotado de cada planta de cada tratamento. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo



modificado de Murray e Thompson (1980) sendo que para o processo de maceração foi utilizado o equipamento “Tissue Lyser” que é capaz de homogeneizar, através de agitação em alta velocidade, múltiplos eppendorfs contendo tampão, a amostra e pequenas esferas de aço inoxidável.

#### **PCR quantitativo em tempo real**

O DNA extraído das folhas das plantas submetidas aos diferentes tipos de tratamentos foi quantificado por espectrofotômetro (Thermo Scientific - NanoDrop 8000 Spectrophotometer) e teve sua quantidade padronizada em 100ng/μL. As amostras, em duplicata, foram então analisadas por qPCR utilizando o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems) para um volume de reação de 13.5 μL contendo 0,8μM de cada um dos primers direto (CGATTGGTGTCTTGTAGCG) e reverso (AACAATAGAAGGATCAAGCATCT), 0,2μM da sonda (reporter FAM-AATCACCGAAGGAGAAGCCAGCATTACA – quencher IOWA Black) (IDT technology), 6, 5 μL do master mix (ABI) e 3 μL do DNA padronizado a 100 ng/μL. Junto ao processo de quantificação por qPCR estavam presentes amostras positivas (sintomáticas) e negativas (plantas não inoculadas). Para a quantificação absoluta de *Liberibacter* nas amostras foi estabelecido uma curva padrão através de diluições seriais (x10) iniciando-se de concentrações conhecidas de plasmídeo contendo o inserto parcial do gene ‘elongation factor’ de CLas (Lin et al., 2011). A equação de regressão linear obtida foi  $y = -3.0006x + 40.901$  ( $r^2 = 0.9896$ ), com slope da curva de valor satisfatório (-3.0006) quando comparado ao ideal (-3.32) indicando uma boa eficiência. O cálculo da estimativa de eficiência da reação dado pela fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$  foi de 1,21, também considerado razoável. Foi estimado, com base em trabalhos prévios, que o valor de Ct (threshold cycle) máximo, acima do qual as amostras seriam consideradas como Negativas, e abaixo do qual seriam Positivas, foi 36. Ct é definido pelo ciclo da PCR no qual a fluorescência emitida pela sonda marcada ultrapassa o limite (threshold) pré-estabelecido, adotado por nós como 0.2. Em cada placa foram utilizados as diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para averiguação da eficiência das reações entre placas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observa-se na Figura 3 um aumento gradativo de infecção em todos os tratamentos a partir de 120 dias da infecção. No tratamento #1 12,5% estavam infectadas aos 120 após a inoculação - DAI, chegando a 25% aos 210 DAI, portanto, a menor taxa final de infecção entre todos os tratamentos. Para este tratamento se faz uso de NAC e adjuvante 1. Assim como no primeiro tratamento, no tratamento #2 também foi feito o uso de NAC, porém com adjuvante 2 e diferentemente dos outros tratamentos, apresenta uma taxa inicial de infecção nos primeiros 30 DAI após a inoculação, com uma porcentagem de 12,5%. Tal valor se mantém nos 120 DAI e sofre um aumento para 62,5% aos 210 DAI, valor igual a taxa final de infecção do tratamento 5 em que se faz uso de adjuvante e água.

No tratamento #3 no qual se faz uso de NAC e água, a mesma taxa de infecção aos 120 dias foi de mesmo valor que a taxa final, apresentando uma porcentagem de 50% das plantas infectadas.

Já o tratamento #4, em que foi feito o uso de adjuvante 1 e água, apresenta taxa inicial de infecção de 37,5% aos 120 dias sendo que esse valor aumentou para 87,5%, sendo que esse valor também é igual a porcentagem final do tratamento #6 que se refere ao tratamento testemunha.

Essa menor taxa de infecção no tratamento #1 pode estar relacionada a presença do NAC pois, o tratamento #2 em que também se fez uso dessa substância junto com adjuvante, apresentou a segunda menor taxa de infecção final entre os tratamentos, com valor de 62,5%. Já o tratamento que apresentou os piores resultados contra o desenvolvimento de *Ca. Liberibacter asiaticus* foi o tratamento #4 pois, apresenta maior taxa final de infecção, de forma igual ao tratamento 6 (Figura 3).

Portanto, visto que na maioria dos tratamentos o índice de enxertia viável do inóculo foi de 87,5%, ou seja, das 8 plantas inoculadas 7 apresentaram-se com inóculos viáveis, estes diferentes índices de plantas infectadas discutidos acima podem ser acreditados a efeitos dos diferentes tratamentos e não a alguma falha no processo de infecção, como a ausência de união dos tecidos da planta teste com os da borbolha utilizada como fonte de *Ca. Liberibacter*.



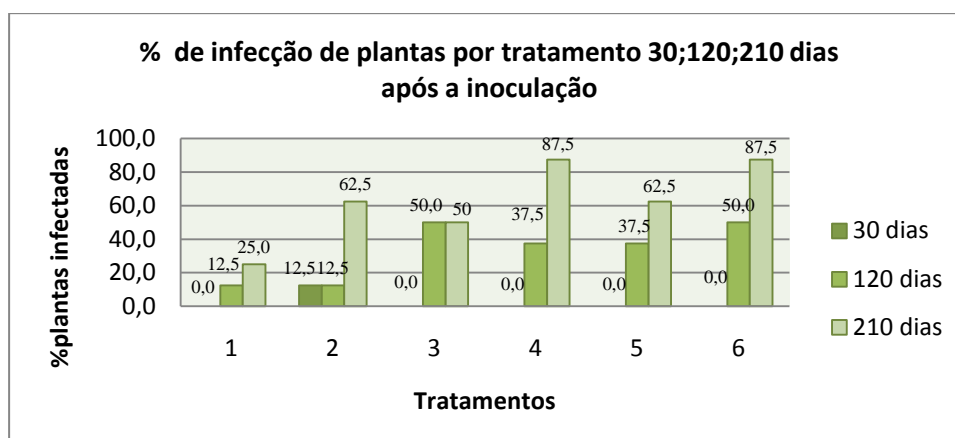


Figura 3. Porcentagem de infecção ao decorrer de 30, 120 e 210 dias após a inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus* em plantas nos diferentes tratamentos.

Embora o tratamento 1 tenha sido o menos favorável a infecção (2 plantas em 8 inoculadas), a concentração de *Liberibacter* aos 210 dias após a infecção nas duas plantas infectadas, dado pelo valor médio de Ct, foi similar ao obtido pelo tratamento 6 (testemunha) onde somente água foi aspergido nas folhas (Tabela 1). Valor médio de Ct muito similar ao da testemunha foi também obtido para o tratamento 3. Neste mesmo período pós infecção observa-se que os tratamentos 2, 4 e 5 apresentaram valores médios de Ct superiores ao do tratamento 6, indicando uma menor concentração da bactéria, porém numa diferença máxima de 3 ciclos da PCR (Tabela 1). De uma maneira geral, exceto para o tratamento #1, nos demais tratamentos observa-se um leve aumento na concentração de *Ca. Liberibacter* nas plantas entre 120 e 210 dias após a infecção. Por outro lado, no tratamento #1 houve um aumento expressivo na concentração de *Liberibacter*. Isto é explicado pela infecção tardia das plantas deste tratamento, uma vez que aos 120 dias somente uma planta estava positiva e mesmo assim com Ct = 34,31, ou seja próximo ao limite máximo.

Através da equação de regressão linear obtida ( $y = -3.0006x + 40.901 - r^2 = 0.9896$ ) foi estimado a população de *Ca. Liberibacter asiaticus*, em valores absolutos do número de cópias do inserto do gene 'elongation factor', alvo dos primers e sonda utilizados nas amplificações. Analisando-se os resultados aos 210 dias observa-se que nos tratamentos 1, 3 e 6 a concentração de *Ca. Lib. asiaticus* atingiu concentrações próximas ou iguais  $10^6$  número de cópias do inserto (NCI) amplificado, enquanto que nos tratamentos 2 e 5 estes valores foram próximos ou inferiores a  $10^5$  NCI, ou seja, hospedando 1000 células a menos.

Tabela 1. Porcentagem de infecção e colonização de *Ca. Liberibacter asiaticus* nos diversos tratamentos testados.

Plantas testes <sup>1</sup>	Valores de Ct 120 e 210 dias após a infecção <sup>2</sup>											
	Tratamento1		Tratamento2		Tratamento3		Tratamento4		Tratamento5		Tratamento6	
	120	210	120	210	120	210	120	210	120	210	120	210
Planta 1	Und	Und	Und	30,57	26,61	24,09	Und	24,09	33,42	Und	25,67	24,45
Planta 2	Und	Und	Und	Und	29,26	31,10	Und	Und	Und	Und	26,25	22,69
Planta 3	Und	25,07	Und	25,90	22,84	25,33	31,30	30,53	Und	22,99	Und	28,13
Planta 4	Und	Und	Und	27,78	23,26	25,62	Und	25,70	Und	Und	Und	27,96
Planta 5	Und	Und	Und	Und	Und	Und	24,507	26,67	Und	33,03	Und	24,81
Planta 6	34,31	Und	Und	28,08	Und	Und	Und	34,00	22,20	22,20	29,96	35,67
Planta 7	Und	27,07	Und	Und	Und	Und	Und	Und	Und	34,97	Und	23,02
Planta 8	Und	Und	30,82	34,34	Und	Und	25,84	25,77	33,77	35,81	35,76	und
Media	34,31	26,07	30,82	29,334	25,49	26,52	27,21	27,96	29,79	29,80	29,41	26,67
Viabilidade da borbúlia (%) <sup>3</sup>	87,5		87,5		87,5		87,5		75		87,5	

<sup>1</sup> Aos 30 dias após a infecção somente uma única planta (#8 do Tratamento 2) apresentou valor de Ct na faixa positiva, Ct = 34,07 (Ct<36), razão pela qual a amostragem aos 30 dias não foi apresentada aqui.

<sup>2</sup>Valores Ct (threshold value) são lidos em ordem inversa de magnitude para a concentração do patógeno na amostra. Para a significância vide Material & Métodos. Und – amostras sem a presença da bactéria.

<sup>3</sup>Plantas cujas borbúlias usadas para a infecção estavam viáveis após 30 dias, ou seja, não sendo um fator limitante no processo de infecção.

Estes tratamentos têm em comum a presença do extrato vegetal purificado a base de *Aloe vera*. Foi encontrado dois trabalhos científicos que suportam a ação de *Aloe vera* sobre bactérias (Campos et al., 2011; Cardoso et al., 2010). Ambos apontam para efeitos bactericidas sobre bactérias Gram negativas patogênicas a mamíferos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Uma vez que são poucas as informações de trabalhos científicos suportando a ação bactericida de *Aloe vera* e além do que os dados obtidos com estes dois tratamentos (#2 e #5) apresentaram um significativo coeficiente de variação entre plantas, novos experimentos devem ser feitos para que possamos avançar no conhecimento destes resultados.

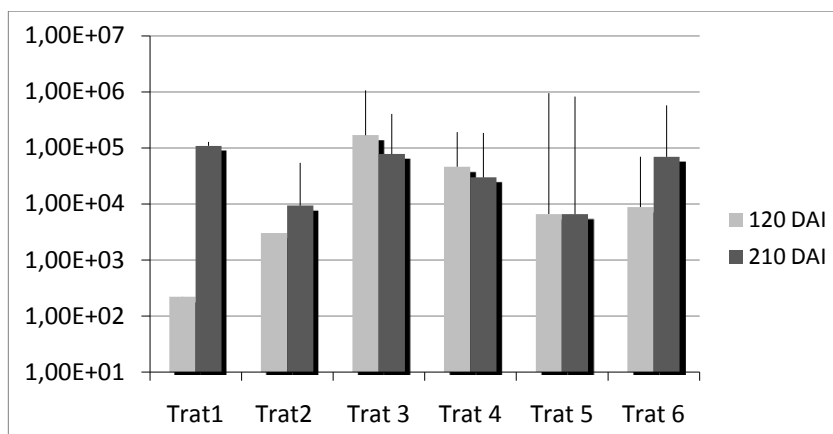


Figura 4. Quantidade de *Ca. Liberibacter asiaticus* presente nas plantas dos diversos tratamentos

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui obtidos pode-se concluir que a presença do NAC apresentou algum efeito no estabelecimento de *Liberibacter* nas plantas uma vez que a taxa de infecção não superou os 50% nos tratamentos onde este composto foi utilizado.

Tratamentos com a presença de extratos de *Aloe vera* (#2 e #5) proporcionaram a menor concentração de Las nas plantas.

Dado aos significativos coeficientes de variação outros estudos precisam ser realizados para que os resultados aqui obtidos possam ser confirmados.

## AGRADECIMENTOS

Ao CCSM – IAC, pela oportunidade de estágio.

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

- 1 Associtros. **A origem e a característica da Laranja**. 2008. Disponível em <<http://www.associtrus.com.br/index.php?xvar=mostra-noticia&id=1939&idtipo=4>> Acesso em Março de 2011.
- 2 Azevêdo, Claudio L. L. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>> Acessado em Março de 2011.
- 3 Campos, L.; Cezar, L.; Osório, F.; Rauseo, B.; Soares, J.; Vicente, L. 2011. **Verificação da ação bactericida de agentes naturais**. XI Simpósio de base experimental de Ciências Naturais, Universidade Federal do ABC. 12 e 13 de Agosto de 2011.

- 4 Cardoso F.L., Murakami C., Mayworm, M.A.S., Marques L.M. 2010. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20:35-40.
- 5 Baccari, C., and Lindow, S. E. 2011. **Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars.** *Phytopathology* 101:77-84.
- 6 Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37.
- 7 Cava, Cristiane Ramos da Veiga Lima. Influência do regime hídrico na infecção de plantas cítricas jovens por *Xylella fastidiosa*. ESALQ. Piracicaba 2006. 64 p. : il.
- 8 Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscariol-Camargo RL, de Souza AA, Machado MA. 2010. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. *Eur J Plant Pathol*. 126:53–60.
- 9 Fundecitrus. 2000. Manual **de convivência com a CVC**. Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, Araraquara, Brazil.
- 10 Hoiczyk, E.; Roggenkamp, A.; Reichenbecher, M.; Lupas, A.; Heesemann, J. 2000. **Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins.** *The EMBO Journal*. 19: 5989-5999.
- 11 Leite, B., Ishida, M.L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S.F. & Kitajima, E.W. 2002. **Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca<sup>2+</sup> and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 645-650.
- 12 Leite, jr., R.P. **Ocorrência de *Xylella* em café no Brasil.** Programa e Resumos XXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Espírito Santo do Pinhal, SP. 2002. pp.32-34.
- 13 Leite, R.M.V.B.C., Leite, JR., R.P. & Cerezine, P.C. **Flutuação populacional de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha.** *Fitopatologia Brasileira* 22:58-63.
- 14 Machado, E. C., Quaggio, J. A., Lagoa, A. M. M. A., Ticelli, M. e Furlani, P. R. (1994). **Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com CVC.** *R. Brás. Fisiol. Veg.* 6: 53-57.
- 15 Mattos Jr., Dirceu et al. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo.** Disponível em <[http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm#\\_ftn1](http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm#_ftn1)> Acesso em Maio de 2011. Boletim Técnico 200 (IAC), 2005.
- 16 .Muranaka, L. S. **Mecanismos envolvidos com a sobrevivência de *Xylella fastidiosa* em condições de estresse e efeito de N-Acetil-L-Cisteína em seu biofilme.** 2010. 161 p. Dissertação de mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 17 Neves, Evaristo Marzabal et al . **Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros**, 1996 - 2000. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, Aug. 2001 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452001000200048&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452001000200048&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em Abril de 2011.
- 18 Olofsson, Ann-Cathrin; Hermansson, Malte and Elwing,Hans. **N-Acetyl-L-Cysteine Affects Growth, Extracellular Polysaccharide Production, and Bacterial Biofilm Formation on Solid Surfaces.** Department of Cell and Molecular Biology—Interface Biophysics<sup>1</sup> and Department of Cell and Molecular Biology—Microbiology,<sup>2</sup> Göteborg University, 405 30 Göteborg, Swede.69:1-9.2003.
- 19 Perez-Giraldo, C., A. Rodriguez-Benito, F. J. Moran, C. Hurtado, M. T. Blanco, and A. C. Gomez-Garcia. 1997. **Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*.** *J. Antimicrob. Chemother.* 39:643–646.
- 20 St. Geme, J. W., Cutter, D., and Barenkamp, S. J. (1996). **Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils.** *J. Bacteriol.* 178, 6281-6287.