

## NOTAS CIENTÍFICAS

### AUSÊNCIA DE PATOGENICIDADE DE *XYLELLA FASTIDIOSA* DA ESCALDADURA DA FOLHA DA AMEIXEIRA NA CULTIVAR DE PESSEGUEIRO FLORDASUN<sup>1</sup>

RUI PEREIRA LEITE JUNIOR<sup>2</sup>, REGINA MARIA VILLAS BÔAS DE CAMPOS LEITE<sup>3</sup> e PAULO CEZAR CERESINI<sup>4</sup>

RESUMO - *Xylella fastidiosa* que causa a escaldadura-da-folha-da-ameixeira (EFA) é relatada como pertencente ao mesmo grupo do agente causal da “phony” do pessegueiro. Plantas de ameixeira, cultivares Santa Rosa e Harry Pickstone, e de pessegueiro, cultivar Flordasun, enxertadas sobre pessegueiro foram enxertadas com borbulhas procedentes de plantas de ameixeira severamente infectadas com *X. fastidiosa*. Após quatro anos de observação, em casa de vegetação, as plantas de pessegueiro apresentaram desenvolvimento normal, sem manifestar sintomas de “phony”, enquanto as plantas de ameixeira das duas cultivares, enxertadas tanto na copa quanto no porta-enxerto, apresentaram sintomas de EFA. Teste sorológico de DAS-ELISA utilizando anticorpo para *X. fastidiosa* e isolamento em meio de cultura BCYE indicaram a presença do patógeno nos tecidos da copa das plantas de ameixeira, mas não nos tecidos do porta-enxerto pessegueiro. No pessegueiro cultivar Flordasun, os testes foram negativos, tanto nas amostras da parte aérea como da raiz.

#### NON PATHOGENICITY TO PEACH CULTIVAR FLORDASUN OF *XYLELLA FASTIDIOSA*

ABSTRACT - *Xylella fastidiosa* associated to plum leaf scald is reported to belong to the same group of the strain that causes the phony disease of peach. Plants of plum cultivars Santa Rosa and Harry Pickstone and peach cultivar Flordasun, grafted on peach rootstock, were inoculated by using buds collected from plum plants severely infected with *X. fastidiosa*. Peach plants did not develop symptoms of phony disease, after four years in the greenhouse. In contrast, plum plants from both cultivars inoculated either in the rootstock or in the canopy developed leaf scald symptoms. DAS-ELISA tests with antibody against *X. fastidiosa* and isolation on BCYE medium indicated the presence of the bacterium in plum tissues. These tests were negative for Flordasun peach for both stem and root samples.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 20 de março de 1998.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Caixa Postal 481, CEP 86001-970 Londrina, PR.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: regina@cnpsa.embrapa.br

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Prof. Assist., Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, Caixa Postal 31, CEP 15378-000 Ilha Solteira, SP.

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa e responsável por doenças em diversas plantas de interesse agrícola, como alfafa, ameixeira, citros, pereira, pessegueiro e videira (Wells et al., 1987; Hopkins, 1989; Chang et al., 1993; Leu & Su, 1993).

As relações patogênicas entre estirpes de *X. fastidiosa* parecem ser muito complexas. Há, pelo menos, dois grupos genética e patogênicamente distintos dentro dessa espécie. O primeiro inclui isolados obtidos de videira com a doença de Pierce, que constituem um grupo com ampla gama de hospedeiros (Hopkins, 1989). Apesar disso, esse grupo é geneticamente uniforme (Hopkins, 1989; Minsavage et al., 1994). O segundo grupo é mais diverso e geneticamente distinto e inclui isolados obtidos de plantas de ameixeira com escaldadura-da-folha, de pessegueiro com “phony”, e de outras árvores (Hopkins, 1989; Minsavage et al., 1994).

Em ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl), a bactéria *X. fastidiosa* causa a doença conhecida como escaldadura-da-folha (EFA). Os sintomas associados à EFA caracterizam-se pela necrose marginal, queima de bordos e queda prematura de folhas, seca de ramos, declínio no vigor e na produção e, finalmente, morte prematura da planta. Em pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Bastch), os sintomas característicos da doença denominada “phony” são a formação de uma copa anormal, devido ao encurtamento de entrenós terminais, crescimento retardado, redução no tamanho dos frutos e declínio no vigor da planta (Mohan et al., 1980; Wells et al., 1981; Hopkins, 1989).

A EFA foi inicialmente descrita na região do Delta do Rio Paraná, na Argentina, em 1935 (Fernandez-Valiela & Bakarcic, 1954). Posteriormente, a doença foi constatada no Brasil, no Paraguai e no sudeste dos Estados Unidos (French & Kitajima, 1978; Hopkins, 1989). A EFA foi a principal responsável pelo declínio

da cultura da ameixeira nos estados da Região Sul do Brasil, a partir do início da década de 70 (Mohan et al., 1980; Kitajima et al., 1981; French & Feliciano, 1982). Já a doença “phony” do pessegueiro ocorre, basicamente, no sudeste dos Estados Unidos, embora tenha sido também relatada em estados do meio-oeste americano (Hopkins, 1989).

Apesar das diferenças sintomatológicas da EFA e da “phony”, existem evidências de que podem ser causadas pela mesma estirpe de *X. fastidiosa* (Wells et al., 1981; Raju & Wells, 1986). Os aspectos que suportam tais evidências incluem a transmissão da *X. fastidiosa* da “phony” do pessegueiro para ameixeira, através de enxertia de borbulhas ou garfos contaminados e o desenvolvimento de sintomas de escaldadura-da-folha nas plantas de ameixeira (Wells et al., 1981; Wells et al., 1983). Além disso, os isolados de *X. fastidiosa* obtidos de ameixeira com EFA e de pessegueiro com “phony” são geneticamente semelhantes, com base em estudos de homologia de DNA (Kamper et al., 1985). Entretanto, apesar de a escaldadura-da-folha ser endêmica nas regiões produtoras de ameixa na América do Sul e de o pessegueiro ser cultivado nas mesmas regiões geográficas e ser utilizado como porta-enxerto da ameixeira, não há relato da ocorrência de “phony” em pessegueiro nessas regiões (Kitajima et al., 1981; Raju & Wells, 1986).

O conhecimento da bactéria associada à EFA que ocorre no Brasil é de fundamental importância para o esclarecimento de diversos aspectos da epidemiologia e do controle dessa doença. Assim, o objetivo do presente trabalho foi esclarecer a possibilidade de a bactéria *X. fastidiosa* causadora da escaldadura-da-folha da ameixeira ser transmitida experimentalmente e causar doença em pessegueiro.

Em agosto de 1987, plantas de ameixeira japonesa das cultivares Santa Rosa e Harry Pickstone e de pessegueiro da cultivar Flordasun, enxertadas em pessegueiro, foram plantadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. As cultivares de ameixeira utilizadas são de grande interesse comercial e têm se mostrado altamente suscetíveis à escaldadura-da-folha (EPAGRI, 1993). A cultivar de pessegueiro Flordasun é originária da Flórida, onde a “phony” é endêmica (Hopkins, 1989), e é suscetível à doença. O substrato utilizado nos vasos, com capacidade para 5 L, constituiu-se na mistura de solo:areia:esterco na proporção 2:2:1. As adubações periódicas com NPK + micronutrientes e toda a condução das plantas seguiram as recomendações para produção de plantas em casa de vegetação (Hartmann & Kester, 1983), o que proporcionou desenvolvimento normal das plantas durante todo o período experimental. Em fevereiro de 1988, as plantas foram infectadas por meio de dupla enxertia com borbulhas procedentes de plantas de ameixeira japonesa da cultivar Rosa Mineira que apresentavam sintomas severos de EFA. Após 30 dias, foram repetidas as enxertias onde não houve pegamento das borbulhas. Os tratamentos utilizados foram: inoculação por enxertia no porta-enxerto e inoculação por enxertia na copa de pessegueiro ou ameixeira. Plantas que não receberam inóculo foram mantidas como testemunhas. Foram utilizadas quatro plantas de cada combinação copa e porta-enxerto e de testemunhas.

De 1987 a 1992, foram feitas observações nas plantas de ameixeira Santa Rosa e Harry Pickstone e de pessegueiro Flordasun, quanto à presença de sintomas característicos da escaldadura-da-folha e de “phony”, respectivamente (Mohan et al., 1980; Wells et al., 1981; Hopkins, 1989).

No final do período experimental, a presença da bactéria *X. fastidiosa* nos tecidos da copa e do porta-enxerto das plantas foi verificada pelo isolamento em meio de cultura e teste sorológico. Em torno de quatro anos após a inoculação, amostras de ramos do ano, de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, e raízes de mesmo diâmetro foram coletadas. De cada tratamento, foram coletadas quatro seções de ramos e de raízes. Após a coleta, as amostras foram colocadas em sacos de plástico, etiquetadas e acondicionadas em recipiente de isopor. As amostras foram mantidas em refrigerador, a 4°C, até o isolamento ou o preparo do extrato para teste sorológico.

Para o isolamento, as amostras foram cortadas em seções de 3 cm e desinfestadas superficialmente mediante imersão em álcool, seguida de flambagem. As seções foram cortadas assepticamente e espremidas com o auxílio de um alicate. A seiva foi depositada em meio de cultura BCYE (Hopkins, 1988), através do toque da superfície do meio com a extremidade da seção. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro e observadas periodicamente, com o auxílio de microscópio estereoscópico, com aumento de 25 vezes, por até 30 dias, para a presença de colônias bacterianas (Uchibaba et al., 1992).

Testes sorológicos de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foram realizados para detecção da bactéria nos tecidos de ramos e raízes. O anticorpo policlonal específico para *X. fastidiosa* obtido em coelho foi fornecido pelo Dr. W. B. Fett (Eastern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Philadelphia, PA, EUA). O soro foi parcialmente purificado empregando-se o método de precipitação em solução saturada de sulfato de amônia (Clark & Adams, 1977; Clark et al., 1986). O preparo do conjugado foi realizado de acordo com a conjugação da enzima fosfatase alcalina (Tipo III, Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, EUA) à imunoglobulina do anticorpo em solução de glutaraldeído (Clark et al., 1986). A bactéria foi extraída pela maceração dos tecidos de ramos e raízes em tampão de extração (Hopkins & Adlerz, 1988).

Os testes de ELISA foram realizados pelo método DAS (double antibody sandwich) (Clark et al., 1986). As placas foram sensibilizadas com o anticorpo diluído à concentração aproximada de 1 µg/mL de imunoglobulina, por 4 horas, a 28°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS + 0,05% Tween 20 (PBS-tween) e, em seguida, bloqueadas com solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma) a 3%, e incubadas por 2 horas, a 28°C. Após as lavagens, os extratos foram colocados nos vasos e as placas foram incubadas a 4°C por uma noite. As placas foram novamente lavadas com PBS-tween e o anticorpo conjugado com a enzima foi colocado e mantido a 28°C por 4 horas. O substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma) foi adicionado, com incubação no escuro à temperatura ambiente. A reação foi paralisada após 1 hora com NaOH 1,0 N. A leitura dos resultados foi realizada determinando-se a absorbância a 410 nm em leitora de placas Dynatech modelo MR 600 (Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA, EUA). As amostras foram consideradas positivas ou suspeitas para a presença de *X. fastidiosa* quando a média dos valores de absorbância a 410 nm foi, pelo menos, três vezes maior que os valores médios obtidos para o tampão de extração (Clark et al., 1986).

As plantas de ameixeira das cultivares Santa Rosa e Harry Pickstone enxertadas tanto na copa como no porta-enxerto apresentaram sintomas típicos de escaldadura da folha (Tabela 1), como necrose marginal das folhas e seca de ponteiros (Mohan et al., 1980; Wells et al., 1981; Hopkins, 1989). Em contraste, as plantas de pessegueiro Flordasun, também submetidas à enxertia de borbulhas de ameixeira cultivar Rosa Mineira com EFA, desenvolveram-se normalmente, não apresentando sintomas de “phony” (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Wells et al. (1981, 1983), que evidenciaram o não-desenvolvimento de sintomas de “phony” em pessegueiros enxertados com seções de raízes de ameixeira com EFA. As plantas das duas espécies que não receberam inóculo também não apresentaram sintomas de doença (Tabela 1).

**TABELA 1. Avaliação da infecção de plantas de pessegueiro cultivar Flordasun e ameixeira cultivares Santa Rosa e Harry Pickstone enxertadas com borbulhas oriundas de plantas contaminadas com *Xylella fastidiosa*, por meio da presença de sintomas de escaldadura-da-folha ou “phony”, do teste de DAS-ELISA e do isolamento da bactéria em meio de cultura BCYE.**

Espécie / cultivar	Tratamento	Sintomas de EFA ou “phony” <sup>1</sup>	Reação no teste de DAS-ELISA <sup>2</sup>		Isolamentos positivos / isolamentos realizados <sup>3</sup>
			Ramo	Raiz	
Pessegueiro Flordasun	Inoculação na copa	-	0 / 10 (-)	0 / 10 (-)	0 / 14
	Inoculação no porta-enxerto	-	0 / 10 (-)	0 / 10 (-)	0 / 15
	Sem inoculação	-	0 / 10 (-)	0 / 10 (-)	0 / 15
Ameixeira Santa Rosa	Inoculação na copa	+	0 / 8 (-)	0 / 8 (-)	0 / 14
	Inoculação no porta-enxerto	+	2 / 10 (+)	0 / 10 (-)	2 / 14
	Sem inoculação	-	0 / 5 (-)	0 / 5 (-)	0 / 16
Ameixeira Harry Pickstone	Inoculação na copa	+	8 / 10 (+)	0 / 10 (-)	12 / 15
	Inoculação no porta-enxerto	+	8 / 10 (+)	0 / 10 (-)	7 / 12
	Sem inoculação	-	0 / 10 (-)	0 / 10 (-)	0 / 15
Controles para o teste de DAS-ELISA			Valores do teste de DAS-ELISA		
PLM-G83 (10 <sup>6</sup> ufc/mL) <sup>4</sup>			0,480	0,507	
Tampão de extração			0,003	-0,002	

<sup>1</sup> Sintomas de escaldadura-da-folha para ameixeira e de “phony” para pessegueiro.

<sup>2</sup> Número de amostras com reação positiva / número de amostras testadas; + = reação positiva; - = reação negativa; as reações foram consideradas positivas quando a média dos valores de absorbância a 410 nm obtidos em leitora de ELISA foi pelo menos três vezes maior que os valores médios obtidos para o tampão de extração.

<sup>3</sup> Isolamentos realizados em meio BCYE, desenvolvido para isolamento de *X. fastidiosa*.

<sup>4</sup> A suspensão bacteriana do isolado PLM-G83 (ATCC 35871) de *X. fastidiosa*, fornecido pelo Dr. W.B. Fett, foi preparada em tampão de extração.

A presença de *X. fastidiosa* nos tecidos das plantas de ameixeira enxertadas foi confirmada pelo isolamento da bactéria e pelo teste de DAS-ELISA. O meio BCYE foi utilizado no isolamento porque proporciona maior desenvolvimento de colônias e maior taxa de recuperação da população de *X. fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura-da-folha do que outros meios específicos utilizados para cultivo dessa bactéria (Uchibaba et al., 1992). Isolamentos positivos da bactéria, em meio BCYE, foram obtidos a partir de tecidos de ramos de ameixeira Santa Rosa enxertadas no porta-enxerto e da cultivar Harry Pickstone enxertada tanto na copa como no porta-enxerto.

Determinações da infecção de ramos e raízes por *X. fastidiosa*, medidas pela intensidade dos valores de absorvância em teste de DAS-ELISA, confirmaram os resultados da presença da bactéria nos tecidos de ameixeira obtidos no isolamento. Foram utilizados como controle positivo a suspensão do isolado de *X. fastidiosa* PLM-G83 e como negativo o tampão de extração, já que este último apresenta valores próximos aos extratos de plantas sadias em testes de ELISA (Nomé et al., 1980).

Apesar de apresentar sintomas semelhantes ao da EFA, não foi possível isolar a bactéria de ramos de ameixeira Santa Rosa que recebeu inóculo na copa. Os resultados do teste sorológico também foram negativos nesse tratamento. Provavelmente, a bactéria estaria em baixa concentração nos tecidos dos ramos do ano que foram amostrados dessas plantas, não sendo possível detectá-la. Cabe salientar que o limite de detecção da presença de *X. fastidiosa* em teste de ELISA está em torno de  $10^4$  a  $10^5$  células/mL (Minsavage et al., 1994). Testes como a amplificação de DNA, por meio da técnica de PCR, são mais sensíveis do que o de ELISA e poderão ser utilizados para detectar a bactéria em menores concentrações (Minsavage et al., 1994).

A presença de *X. fastidiosa* não foi constatada nos tecidos das raízes do pessegueiro utilizado como porta-enxerto para as plantas de ameixeira, mesmo a copa estando severamente infectada com a bactéria, como no caso das plantas de ameixeira cultivar Harry Pickstone. Apesar de ser limitada ao xilema e apresentar movimentação sistêmica na planta, a *X. fastidiosa*, aparentemente, não colonizou os tecidos do pessegueiro utilizado como porta-enxerto de ameixeira. Da mesma forma, plantas da cultivar de pessegueiro Flordasun enxertadas no porta-enxerto ou na copa apresentaram resultados negativos quanto à presença de *X. fastidiosa* no teste de ELISA e nas tentativas de isolamento em meio de cultura, tanto para amostras da parte aérea como de raiz.

A bactéria *X. fastidiosa* isolada de pessegueiro com a doença “phony” causa sintomas de escaldadura-da-folha quando inoculada em ameixeira, indicando, portanto, similaridades patogênicas entre as estirpes da EFA e da “phony” (Wells et al., 1981, 1983). Além disso, a análise genética de isolados de *X. fastidiosa* obtidos de diferentes plantas indicam uma alta homologia de DNA entre os isolados de ameixeira e pessegueiro (Kamper et al., 1985). Por outro lado, os resultados obtidos no presente estudo com a cultivar Flordasun vêm sustentar observações realizadas anteriormente quanto ao não-desenvolvimento de “phony” em plantas de pessegueiro infectadas com isolados da bactéria obtidos de ameixeira (Wells et al., 1981, 1983). Além disso, os resultados obtidos nos testes de ELISA e de isolamento da bactéria em meio BCYE também indicam a não-colonização dos tecidos de pessegueiro da cultivar Flordasun como do porta-enxerto pela *X. fastidiosa* da EFA. Tais resultados sugerem a existência de variabilidade entre estirpes de *X. fastidiosa* associadas com ameixeira e pessegueiro. Desta forma, a estirpe que ocorre naturalmente causando a escaldadura-da-folha em ameixeira no Brasil, provavelmente, não é capaz de colonizar o pessegueiro e causar a doença “phony”. Em contraste, a estirpe que ocorre naturalmente em pessegueiro causando a “phony” nos Estados Unidos, aparentemente, é capaz de também colonizar a ameixeira e causar sintomas de EFA, como demonstrado em estudos anteriores (Wells et al., 1981, 1983).

Estudos mais detalhados, utilizando análise genética do patógeno, são de fundamental importância no esclarecimento das relações entre as diferentes estirpes de *X. fastidiosa* associadas com a EFA e a “phony” que ocorrem em diferentes regiões geográficas, e, conseqüentemente, norteiam estratégias de manejo das doenças causadas por essa bactéria.

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao técnico de laboratório Naodi Komori e aos técnicos agrícolas Valdecy Alves de Miranda e Sydnei Dias dos Santos, cujo auxílio foi indispensável para a realização deste trabalho, e ao Dr. W. B. Fett, pelo fornecimento do anticorpo e do isolado de *X. fastidiosa* utilizados.

## R E F E R Ê N C I A S

- CHANG, C.J.; 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 Microbiology**, New York, v.27, p.137-142, 1993.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.V. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Reading, v.34, p.475-483, 1977.
- CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. In: WEISSBACH, H.; WEISSBACH, A. (Eds.). **Plant molecular biology**. New York: Academic Press, 1986. p.742-766. (Methods in Enzymology, v.118).
- EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis, 1993. 32p. (EPAGRI. Sistemas de produção, 22).
- FERNANDEZ-VALIELA, M.V.; BAKARCIC, M. Nuevas enfermedades del ciruelo en el Delta del Paraná. **Informes de Investigaciones Agrarias**, Buenos Aires, v.84, p.2-7, 1954.
- FRENCH, W.J.; FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf scald disease in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.66, p.515-517, 1982.
- FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.62, p.1035-1038, 1978.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation principles and practices**. 4.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1983. 727p.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* and other fastidious bacteria of uncertain affiliation. In: SCHAAD, V.W. (Ed.). **Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria**. 2.ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1988. p.95-103.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v.72, p.429-431, 1988.
- KAMPER, S.M.; FRENCH, W.J.; DE KLOET, S.R. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.35, p.185-188, 1985.
- KITAJIMA, E.W.; MOHAN, S.K.; TSUNETA, M.; BLEICHER, J.; FRENCH, W.J.; LEITE JUNIOR, R.P. Ocorrência da escaldadura das folhas de ameixeira nos Estados do Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.285-292, 1981.
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, p.642-646, 1993.
- MINSAVAGE, G.V.; THOPSOM, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, p.456-461, 1994.
- MOHAN, S.K.; LEITE JUNIOR, R.P.; TSUNETA, M.; HAUAGGE, R. **Problema da escaldadura da folha da ameixeira no Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1980. 5p. (Informe da Pesquisa, 31).
- NOMÉ, S.F.; RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; DOCAMPO, D. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, p.746-749, 1980.
- RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p.182-186, 1986.
- UCHIBABA, E.Y.; LEITE JUNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.252-257, 1992.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* geov.sp.nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.136-143, 1987.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p.859-862, 1983.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; THOMPSON, J.M.; LOWE, S.K. Etiology of phony peach and plum leaf scald diseases.  
**Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.1156-1161, 1981.