

DINAMICA POBLACIONAL DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.
CITRI, BACTERIA CAUSAL DE LA CANCROSIS DE LOS CITRUS,
EN CONDICIONES ENDEMICAS

Myrian A. Rybak

Tesis presentada como requisito para optar al grado de
MAGISTER SCIENTIAE

Directora: Dra. Blanca Isabel Canteros

Co-Directora: Ing. Agr. Adriana Alippi

Curso de Posgrado en Protección Vegetal

UNLP-INTA-SENASA

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

La Plata - 2000

ARGENTINA

DINAMICA POBLACIONAL DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI*, BACTERIA CAUSAL DE LA CANCROSIS DE LOS CITRUS, EN CONDICIONES ENDEMICAS

Myrian A. Rybak.

Aprobado por:

.....

Dr. Guillermo Marcó

.....

Ing. Agr. M.Sc. Ricardo Piccolo

.....

Ing. Agr. M. Sc. Delia Manuela Docampo

A mi madre,
Verónica Kuyesen.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la Dra. Blanca Isabel Canteros por su constante orientación, paciencia y profesionalidad que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

También deseo agradecer a la Ing. Agr. Adriana Alippi y a los integrantes del jurado de tesis, Dr. Guillermo Marcó, Ing. Agr. M. Sc. Ricardo Piccolo e Ing. Agr. M. Sc. Delia M. Docampo por el tiempo dedicado a la lectura crítica y sus sugerencias sobre el borrador final.

Mi más preciado reconocimiento a todo el personal de la E.E.A. INTA Bella Vista, Corrientes, por haberme recibido con tanta calidez y haberme cedido un espacio en el cual pude trabajar muy cómodamente.

Agradezco a la E.E.A. INTA Cerro Azul, Misiones, por su aporte financiero, al ánimo de todos mis compañeros, a la colaboración de la Sra. Mercedes Marmelicz y del Sr. Julio Osorio, al apoyo incondicional y estímulo permanente de los Ings. Agrs. Néstor Oliveri y Alejandro Piekun.

Gracias a los Ings. Agrs. Marcial Benítez y Aldo Bernardis por su ayuda y amistad.

Mi máximo reconocimiento a Dios y a mi familia, con su amor me dan fuerzas y me impulsan a crecer.

INDICE

- 1- INTRODUCCION
- 2- REVISION BIBLIOGRAFICA
- 3- DESARROLLO DE MEDIOS DE CULTIVO SEMISELECTIVOS PARA
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI
 - Introducción
 - Materiales y métodos
 - Resultados y discusión
- 4- TITULACION DE INFECTIVIDAD EN HOJAS DE POMELO DUNCAN
 - Introducción
 - Materiales y métodos
 - Resultados y discusión
- 5- POBLACIONES EPIFITAS Y EN SINTOMAS DE CANCROSIS DE
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI EN CONDICIONES NATURALES
 - Introducción
 - Materiales y métodos
 - Resultados y discusión
- 6- POBLACIONES DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI* EN
FRUTOS COSECHADOS
 - Introducción
 - Materiales y métodos
 - Resultados y discusión
- 7- POBLACIONES DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI* EN
DESECHOS DE FRUTOS CITRICOS PROCESADOS
 - Introducción
 - Materiales y métodos
 - Resultados y discusión
- 8- DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES
- 9- BIBLIOGRAFIA CITADA
- 10- ANEXO 1

RESUMEN

La cancrrosis de los citrus, es una enfermedad bacteriana que afecta a las especies de citrus y otros géneros de Rutaceas. La difusión es mundial pero ciertas áreas están libres, como los países del Mediterráneo. En la Argentina se halla en el Litoral mientras el noroeste (NOA) está aún libre. Los síntomas son lesiones corchosas en hojas, espinas, ramas y frutos. Los canchros en frutos disminuyen su calidad comercial y no son aceptados por los mercados más exigentes. La Unión Europea ha impuesto en los últimos años restricciones a la importación de fruta de zonas con cancrrosis, y exige certificación de lotes libres. En Argentina la producción para exportación se realiza en lotes "de sanidad controlada" para obtención de frutos libres de síntomas y de la bacteria causal, cosechados luego de cumplir los requisitos de certificación. Este trabajo se inició para desarrollar métodos de detección y determinar los niveles poblacionales de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en plantas u órganos sanos y en plantas u órganos enfermos con síntomas. Esto permitirá dilucidar el potencial de la fruta, obtenida en diferentes sistemas, como portadora de la bacteria causal de la cancrrosis. Se registraron los niveles poblacionales de Xac en hojas y frutos con y sin síntomas de cancrrosis, muestreados en lotes con alta y baja infección, con y sin tratamiento químico, y obtenidos en galpón de empaque sin procesar y procesados. Se determinó la población de Xac en lesiones obtenidas de frutos en distintas condiciones y en material de desechos de una planta extractora de jugo. Se seleccionaron medios semiselectivos para cuantificación de Xac en las muestras, en lesiones y como epífitas en hojas y frutos. Se detectó Xac mediante diluciones en medio agar lima bean adicionado con kasugamicina, extracto de levadura y cicloheximida y se cuantificaron las poblaciones patogénicas por infiltración en hojas susceptibles de pomelo. La mayor población de Xac se obtuvo en hojas testigo de pomelo con lesiones, sin embargo, la variabilidad fue alta. Fue notable la diferencia poblacional de Xac en muestras de hojas sanas extraídas en quintas muy infectadas y en quintas con baja infección. En hojas sanas de quintas con baja infección no se detectó Xac en medio semiselectivo y sólo por infiltración se obtuvieron menos de $1,02 \times 10^2$ bacterias por hoja. Los resultados obtenidos comprueban que es muy baja o no detectable la presencia de Xac en hojas sin lesiones, en quintas con baja infección. De

acuerdo con los resultados obtenidos, en citrus existe una gran diferencia poblacional, superior a 1000 veces, entre hojas individuales. En muestreo de frutos se detectó la mayor población de Xac en aquellos provenientes de quintas infectadas, sin tratamiento químico. La mayor población en medio semi-selectivo se obtuvo de frutos testigo de pomelo con síntomas ($2,3 \times 10^6$ colonias/fruto). Fue relativamente alta la población en frutos de pomelo sin síntomas, obtenido de plantas con alta infección (promedio de $5,0 \times 10^5$ bacterias por fruto). Por infiltración, la mayor población se encontró en limón Eureka testigo (con síntomas), un promedio de $6,7 \times 10^5$ células de Xac por fruto. En fruto sano de limón se encontró $2,2 \times 10^3$. La diferencia de población bacteriana detectada mediante medios semiselectivos e infiltración de hojas de pomelo se debe, posiblemente, al crecimiento de otras bacterias que impiden la detección de Xac en las cajas. En frutos sanos extraídos de quintas con baja infección con y sin tratamiento químico de control no se detectó Xac por ningún método y en ninguna de las muestras. La población de Xac en frutos en galpón de empaque fue variable, luego del lavado y encerado, la menor población se encontró en naranja y la mayor en pomelo.

ABSTRACT

Citrus canker is an important disease that occurs in all citrus and other genera of the Rutacea family. Occurrence of the disease is worldwide, although the citrus producing countries of the Mediterranean area are free of canker. In Argentina, the Northeastern region of the country is affected whereas in the Northwestern region the disease was never detected. Symptoms of the disease are corky lesions on leaves, thorns, twigs, and fruits. The occurrence of canker lesions on the fruit rind decrease the commercial quality and infected fruit is not accepted by the most important markets. In the last years quarantine restrictions have been imposed to the citrus production from canker-affected areas by the countries of the European Union. Certification of the fruit is required, this includes the production in canker-symptoms-free plots. The certified fruit-production plots have been started in the Northeast of Argentina. This work was initiated to develop methods of detection and to determine the populations of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in healthy and diseased plants and plant parts. Obtained the results will help in finding the potential of the fruit from different production systems as carriers of the canker-causing organism. Populations of Xac were determined on leaves and fruits, with and without symptoms, from plants with high and low disease intensity, sprayed and non-sprayed for canker control. Samples of processed and non-processed fruits were also taken from a packing house that used washing and waxing as the only treatment. Populations were investigated in waste from citrus-juice-processing factories. The semiselective medium ALB+K+EL (lima bean agar plus cicloheximide, kasugamycin, and yeast extract) was found to be effective in recovering the Xac cells from different sources. Injection-infiltration of the same samples in susceptible Duncan grapefruit and Key lime young leaves induced lesions in numbers that were compared to an infectivity titration experiment and were useful in detecting and quantifying the Xac pathogenic populations. Highest populations were obtained from diseased leaves and fruits, although the bacterial numbers were highly variable. Leaves and fruits without lesions and harvested from plots with high disease intensity also carried generally high Xac populations, except for some samples as those of Valencia orange. On the contrary, leaves and fruits without lesions obtained from low

disease intensity plots carried very low populations of *Xac*, some samples yielded no *Xac* cells or they were at non-detectable levels. Populations of *Xac* on unselected fruits from packing houses without treatment for *Xac* were highly variable. Highest bacterial numbers were from grapefruit and lowest from oranges. When individual lesions were analyzed from citrus waste of juice processing plants, some of them showed non *Xac* cells, especially in grapefruit; bacterial numbers from lemon were the highest and less variable. The results presented here will help in understanding the population dynamic of *Xac* in citrus tissue and will increase the scientific basis to produce *Xac*-free citrus fruits in areas where citrus is endemic.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El total de área implantada en 1998, con citrus en la Argentina, fue 143.781 ha., de las cuales 56.274 son de naranjos, 41.571 de limoneros, 33.257 de mandarinos y 12.679 de pomelos. El destino de la producción total de 2.520.188 t. fue 39,5% para la industria, 47,9% para consumo interno y 12,6% para exportación en fresco. Los principales destinos de las exportaciones de frutas cítricas para mesa fueron, puerto de Rotterdam (Holanda) 48%, Rusia 12% y el resto a diferentes zonas del mundo (Zubrzycki, 1999).

La cancrrosis de los citrus es una importante enfermedad bacteriana que afecta a la mayoría de las especies de citrus y géneros relacionados de la familia Rutaceae. La difusión es mundial, se la encuentra en América, Africa, Asia y Oceanía.

Los síntomas de cancrrosis se manifiestan como lesiones corchosas en hojas, espinas, ramas jóvenes y frutos. Los cancos en frutos disminuyen el valor comercial. Cuando ocurren defoliaciones intensas en especies muy susceptibles, se puede retrasar el crecimiento de las plantas.

Si bien en el sudeste asiático se recolectaron muestras con síntomas de cancrrosis a fines del siglo pasado, recién en 1915 Clara Hasse (Hasse, 1915) la describió en EE.UU. como una nueva enfermedad de los citrus, causada por una bacteria.

La cancrrosis fue introducida desde el sudeste asiático a principios de siglo y erradicada mediante destrucción del huésped en Florida (EE.UU.), Australia, Mozambique y Sudáfrica. Reapareció en Florida en 1986 y nuevamente en 1996 (Canteros 1997; Stall y Civerolo, 1991). La cuenca citrícola del Mediterráneo (España, Grecia, Marruecos, Italia) está libre de cancrrosis, con excepción de los territorios de ultramar como la Isla Reunión, cerca de Africa, que pertenece a Francia.

En nuestro país la primera cita bibliográfica respecto de esta enfermedad es la de 1933 de Carrera (mencionado por Atlas de Gotuzzo, 1975), quién la determinó sobre limón en Corrientes, aunque Marchionatto ya citó una enfermedad similar en Santa Fe en 1928 (Atlas de Gotuzzo, 1975).

En la Argentina la cancrrosis se halla difundida y se la considera endémica en todas las provincias del Litoral: Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Misiones, Santa Fe y Buenos Aires (Canteros, 1997). El noroeste argentino (NOA) (Tucumán, Salta, Jujuy, La Rioja, Catamarca) está aún libre de la enfermedad, nunca fue detectada en esa zona y actualmente existen un plan de monitoreo y barreras sanitarias.

A través de los años y por las observaciones a campo, especialmente en áreas recién infectadas, se ha desarrollado el concepto de que existen diferentes formas de la enfermedad. Esta diferenciación observada a campo se ha podido relacionar con rangos de hospedantes, serología, susceptibilidad a bacteriófagos y distribución geográfica. Estudios más recientes determinaron diferencias en proteínas totales por electroforesis en SDS-PAGE, en análisis de los fragmentos de restricción del ADN sin amplificar y amplificado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y en la actividad metabólica sobre distintos substratos de carbono (Canteros, 1997, Vauterin et al, 1995).

Las formas de cancrrosis descriptas en la actualidad son:

La cancrrosis A o asiática, es la de mayor difusión en el mundo (Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Japón, Taiwán, China, India, algunos países de Medio Oriente, diversas islas del océano Indico y Pacífico, Florida (EE.UU.) etc.). Algunas variantes patogénicas de la India han sido ubicadas en este grupo mediante análisis moleculares, aunque varían en rango de huéspedes. Se las conoce actualmente como A* (Verniere et al., 1998). Las cepas típicas del tipo A afectan pomelo, limón, naranjas, mandarinas y otras especies en la familia de las Rutáceas. En el primer tercio del siglo se la pudo erradicar de EE.UU., Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia. En 1986 y 1996 volvió a aparecer en Florida (EE UU.) y se continúan erradicando las plantas afectadas y las

adyacentes. Uruguay y el Estado de San Pablo, en Brasil, también tienen planes de erradicación. Todas las cepas que se aíslan en este momento en la provincia de Corrientes, pertenecen a este grupo.

La cancrrosis B fue señalada en la Argentina en 1927 en Santa Fe, sobre la base de su sintomatología (Atlas de Gotuzo, 1975). Gotuzzo y Rossi (1967) luego de trabajar con muestras del Litoral Argentino demostraron que su agente causal era una bacteria del género *Xanthomonas*. Afectaba a algunas plantaciones en Corrientes, Entre Ríos y Misiones y en países limítrofes como Paraguay y Uruguay. Es mucho menos agresiva que el tipo A. Se la considera desaparecida en el campo ya que ha sido desplazada por la cancrrosis A en las áreas donde se hallaba presente y no ha sido posible aislarla nuevamente en los últimos años (Canteros, com. personal). Ataca principalmente limón (*Citrus limon*) y lima sutil o Key (*C. aurantifolia*), aunque en condiciones de laboratorio se obtienen síntomas en otras especies de citrus.

La cancrrosis C, ha sido descrita sólo en Brasil sobre limonero gallego (*C. aurantifolia*). En inoculaciones experimentales solo produce síntomas en *C. aurantifolia* y en naranjo agrio. En pomelo causa una reacción de hipersensibilidad (rápida necrosis visible cuando se inyecta la bacteria en alta concentración).

La cancrrosis D o bacteriosis, apareció en México en 1981 sobre lima mexicana (*C. aurantifolia*). Su existencia ahora es dudosa puesto que se demostró que los síntomas descritos inicialmente eran causados por hongos del género *Alternaria* y las *Xanthomonas* aisladas de brotes podrían haber sido cepas saprófitas.

La cancrrosis E, de vivero ó mancha bacteriana (CBS= citrus bacterial spot), apareció en Florida (EE. UU.) en 1984 sobre portainjerto citrumelo Swingle. No se pudo determinar su procedencia. Se intentó erradicarla, pero debido a la imposibilidad de evitar su difusión y a los resultados de los trabajos de investigación que demostraron su escasa agresividad, su erradicación se levantó en 1990. Las cepas de este grupo tienen alta variabilidad genotípica y fenotípica.

La nomenclatura aceptada en la actualidad (Vauterin et al., 1995) para clasificar a las cepas bacterianas involucrados en los distintos tipos de cancrrosis es:

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* para el grupo A.

X. axonopodis pv. *aurantifolii* para los grupos B, C y D.

X. axonopodis pv. *citrumelo* para el grupo E.

Se acepta el sinónimo *X. campestris* para la especie.

La reclasificación de *Xanthomonas*, propuesta por Vauterin et al. en 1995 no ha sido aceptada por muchos científicos, especialmente el cambio de *X. campestris* a *X. axonopodis*. Schaad et al. (2000) han propuesto una nueva clasificación en la que las *Xanthomonas* aisladas de citrus vuelven a la especie *X. campestris*, aunque Vauterin et al. (2000) reexaminando la clasificación sugieren mantenerla dentro de *X. axonopodis*.

Luego de muchos años de investigación en el Litoral argentino se han desarrollado programas para el manejo integrado de la cancrrosis. Los costos de control varían de acuerdo con la susceptibilidad de las variedades, pero no son altos en relación con otras enfermedades ni con respecto a la aplicación de otros agroquímicos y fertilizantes. Actualmente el mayor daño económico está dado por su condición de enfermedad cuarentenaria (Canteros, comun. pers.). Los países que no tienen la enfermedad (especialmente aquellos de la Unión Europea) prohíben la entrada de frutas con síntomas o provenientes de lotes y/o zonas afectadas.

Para continuar con las exportaciones a la Unión Europea, en la Argentina se ha propuesto efectuar la producción para exportación en lotes llamados "de sanidad controlada", cuya producción se certifica como proveniente de lotes sin síntomas de cancrrosis. La decisión final sobre los requisitos de la fruta para exportación corresponden a organismos de fiscalización sanitaria (SENASA) de acuerdo con las exigencias de los países importadores (Canteros, 1997).

Si bien existen restricciones cuarentenarias para la exportación de frutos de zonas con cancrrosis hacia zonas libres, no se ha demostrado experimentalmente la

posibilidad de que la fruta sea portadora de la bacteria causal y menos aún que haya causado el inicio de epidemias.

En el Programa Nacional de Sanidad Citrícola del SENASA y el Plan de Mitigación del Riesgo de la Cancrosis en el Litoral argentino puesto en marcha, en forma coordinada, por SENASA – Gobiernos Provinciales- CORENEA e INTA como organismo técnico asesor, se propuso a la Unión Europea la producción de fruta para exportación en "lotes de sanidad controlada" (lotes sin síntomas de cancrrosis que deben cumplir una serie de requisitos e incluyen la certificación de la producción).

El concepto de producción en lotes certificados implica la seguridad de mínimo riesgo de presencia del patógeno. Es preciso profundizar el conocimiento de la dinámica de las poblaciones naturales del agente causal de la cancrrosis de los citrus, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en áreas endémicas y en diferentes condiciones: lotes afectados y lotes libres de síntomas, hojas con síntomas y asintomáticas (como reservorios de la bacteria) y fruta procesada, desinfectada y sin desinfectar como portadora potencial del patógeno, para ampliar la base científica de la exportación desde lotes certificados, ubicados en zona endémica.

Objetivo general:

Este trabajo se inició para desarrollar métodos de detección y utilizarlos para estudiar los niveles poblacionales de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en plantas u órganos sanos y en plantas u órganos enfermos con síntomas y determinar así el potencial de la fruta proveniente de diferentes condiciones como portadora de la bacteria causal de la cancrrosis. Los estudios se realizaron en los siguientes tipos de citrus: pomelo (*Citrus paradisi* Macfadyen), naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limón (*Citrus limon* (L.) Burm.), mandarina satsuma (*Citrus unshiu* (Mak.) Marc.), mandarina Murcott (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*).

Objetivos específicos:

-Evaluar la eficiencia de los distintos medios de cultivo para el desarrollo de Xac y detección de poblaciones naturales.

-Trazar una curva de titulación de infectividad de concentraciones conocidas de Xac en hojas susceptibles de pomelo Duncan mantenidas en cámara de cría para utilizarlas en la cuantificación de poblaciones desconocidas de Xac provenientes de suspensiones de diverso origen mediante comparación de número de células de Xac y número de lesiones desarrolladas por centímetro cuadrado de hoja inoculada.

-Determinar las poblaciones de Xac en hojas y frutos sanos en plantas infectadas con cancrisis o en plantas sanas con diversos tratamientos químicos y sin ellos y en hojas y frutos enfermos como testigos positivos.

-Determinar la población epífita de frutos cosechados, en lotes no certificados de la zona muestreados en galpones de empaque, luego de lavados y encerados sin aplicación de desinfectantes ni otros productos.

-Cuantificar las poblaciones de Xac en los desechos de las plantas procesadoras de frutos de citrus para la elaboración de jugos mediante distintos tratamientos a estos desechos y realizar ensayos preliminares para la eliminación o disminución significativa de las poblaciones.

CAPITULO 2

REVISION BIBLIOGRAFICA

Existen pocos antecedentes sobre la ecología de la cancrrosis de los citrus y sobre la dinámica poblacional de su agente causal. En la revisión realizada por Stall et al. (1993) se detallan los aspectos más importantes estudiados en esta área para bacterias del género *Xanthomonas* y las enfermedades causadas por ellas. Los primeros antecedentes son de Japón, donde la cancrrosis es endémica desde el siglo pasado. En ese país, Koizumi (1969) (en Stall et al., 1993) efectuó la cuantificación de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en el agua de lluvia sobre árboles de distinta susceptibilidad. Un trabajo semejante se realizó en la Argentina y se determinó que la concentración de Xac en el agua de lluvia sobre huéspedes susceptibles era mucho mayor que sobre los resistentes y la curva poblacional a lo largo del año también era diferente (Canteros et al., 1982). Sin embargo, en estos trabajos no se determinó si las bacterias provenían de hojas sanas o con síntomas.

Koizumi (1971) describió la interrelación entre la concentración de inóculo y el grado de desarrollo de las lesiones de cancrrosis. Goto en 1962 encontró una interrelación entre la concentración de Xac y el grado de desarrollo de cancrrosis, en un trabajo realizado para detectar células bacterianas en agua de lluvia y donde usó los métodos de inoculación estomática o heridas de hojas (Goto, 1962) e infiltración de la muestra (Goto, 1970; Goto y Morita, 1969). Lee (1920) y Fulton (1920), mediante inoculación por heridas, investigaron la supervivencia de la bacteria causal de la cancrrosis en el suelo y Fulton y Bowman (1929) determinaron la tasa de multiplicación de Xac en la cáscara de frutos.

No existen antecedentes que demuestren que la fruta cítrica para consumo sea portadora de Xac e iniciadora de nuevas epidemias de cancrrosis. Se han realizado investigaciones en esta área en el tizón del fuego del peral y manzano, causado por *Erwinia amylovora*, que está en expansión en el mundo y es motivo de preocupación

para investigadores y productores en sus aspectos cuarentenarios. Los resultados obtenidos por diversos investigadores (Ishimaru y Klos, 1984; Hatting et al. 1986; Mc Manus y Jones, 1994; Roberts et al., 1998) no son concluyentes sobre la posibilidad de la fruta como portadora de *E. amylovora*.

El conocimiento de la ecología de una enfermedad bacteriana incluye la determinación de la presencia y cuantificación de bacterias epífitas. Hirano y Upper (1983) (citado por Blakeman, 1991) definieron a las bacterias epífitas como aquellas que pueden ser removidas desde la parte aérea de la planta por lavado y determinaron que la población encontrada, muestreada en un momento determinado, puede variar 1000 veces de una hoja a otra. La población media de bacterias epífitas de la canopia fue cuantitativamente menos variable que de hoja en hoja (Hirano et al., 1982) en estudios realizados mediante lavado de hojas y diluciones, sembradas en medio con glicerol KING B. En otros trabajos (Jacques y Morris, 1995) se informó una sobreestimación de un 66 % en la población de *Erwinia herbicola* en muestras conjuntas de muchas hojas comparadas con muestras de cada hoja, en forma individual.

Si bien *Erwinia amylovora* fue determinada como epífita en hojas y otras partes de la planta, se la encontró en puntas de brotes y hojas de peral solamente cuando la enfermedad en quintas fue significativa (Thomson et al. , 1975).

La población residente de la bacteria *Pseudomonas tomato* (*P. syringae*) causante de la mota bacteriana del tomate persistió durante un largo período en asociación con hojas de tomate, pero se redujo a bajos niveles a 32 °C y cuando el agua libre fue mantenida por 48 horas. Una porción de la de la población sobrevivió con calor y condiciones secas en el campo hasta 14 días después de la inoculación, pero no causó síntomas obvios. Sin embargo cuando las hojas fueron humedecidas durante 24 hs, los síntomas se desarrollaron a los 3-5 días. También la exposición de plantines a 39 °C durante 6 horas antes de la inoculación incrementó la susceptibilidad a la invasión y/o infección por la bacteria (Scheider R.W. y Grogan, 1977).

La densidad de la población epífita de *Pseudomonas savastanoi* en hojas de

árboles de olivo está influenciada según Ercolani (1979), por la interacción de los siguientes factores: edad de la hoja, tiempo de formación de la hoja y época del año.

Cepas de *Pseudomonas syringae*, altamente virulentas (Vi^+) para arveja (*Phaseolus vulgaris* L.) sobrevivieron el invierno en hojas de *Vicia villosa* en Wisconsin. Alto número de bacterias Vi^+ fueron dispersados desde *Vicia villosa* a cultivos de arveja durante lluvias tormentosas a principios del verano. Estudios en invernaderos confirmaron la habilidad de Vi^+ *P. syringae* para prosperar como epífita en *Vicia villosa* (Ercolani et al, 1974).

La incidencia del fuego bacteriano en flores de pera, producida por *Erwinia amylovora*, fue significativamente reducida cuando se pulverizó con tres *Pseudomonas* spp. y una *Erwinia* sp. saprófitas. Esas bacterias estudiadas en laboratorio se multiplicaron desde 10^2 células por flor hasta 10^5 a 10^6 células por flor en 24 horas. La *Erwinia* sp. produjo una bacteriocina letal para *Erwinia amylovora* in vitro (Thomson et al., 1976).

Para el estudio de la ecología de una enfermedad bacteriana se han desarrollado diferentes métodos que deben ser adaptados para los objetivos buscados. La cuantificación del tamaño de la población microbiana asociada con las hojas se ha hecho mediante el uso de métodos indirectos, si bien también existen métodos directos (como el de inmunofluorescencia). El lavado o liberación de microorganismos desde la superficie de la hoja (Jacques y Morris, 1995) es clave para la cuantificación. De acuerdo con los estudios de Goto (1972) y Pereira et al. (1976) *Xac* podría sobrevivir por varios años en maleza o suelo. Sin embargo, en los últimos años se estableció que es altamente improbable que *Xac* persista en huéspedes y plantas no hospedantes, en ausencia de síntomas, por un largo tiempo (Timmer et al., 1996). Estas últimas determinaciones se hicieron con el método de muestreo con hisopo (Egel et al., 1991 y Gottwald et al., 1992).

Distintos investigadores estudiaron la relación entre población bacteriana patógena epífita o en síntomas e incidencia o intensidad de enfermedad. La población de

bacterias epífitas (en la superficie de la hoja de citrus) después de una dispersión estuvo relacionada con los niveles de incidencia de la mancha bacteriana, producida por *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, (Gottwald et al., 1992). Por otra parte, el mayor efecto del control de cancrrosis en hojas de primavera es mantener el inóculo de Xac a bajos niveles a lo largo de la estación, (Stall et al., 1981). Goto et al. (1978) al estudiar la sobrevivencia saprofítica de Xac observaron que la cantidad mínima de bacterias necesarias para producir infección es del orden de 10^2 células bacterianas por gramo de muestra.

Las poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus están sujetas a grandes variaciones de acuerdo con la resistencia del huésped, la edad del tejido y el vigor de la planta (Egel et al., 1991).

En investigaciones de otras bacteriosis se determinó que existe una relación directa entre la cantidad de inóculo y la posterior incidencia y severidad del tizón bacteriano producido por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* en arveja “Southern Pea” en parcelas a campo (Gitaitis y Nilakhe, 1982), determinada mediante el mojado por vacío, agitación, centrifugación e infiltración de la suspensión bacteriana en hojas de arveja.

También se encontró una relación directa entre el tamaño de la población de *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (Xtt) y la severidad de la bacteria causal de la hoja estriada del trigo (BLS), las lesiones además desarrollaron más rápido en plantas inoculadas con alta concentración de Xtt (Stromberg et al., 1999). Civerolo, (1975) demostró que el número de lesiones producidas por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en durazno es directamente proporcional a la concentración de inóculo en estudios de titulación de infectividad hechos en cámara de cría. Otros trabajos realizados con *Pseudomonas* fitopatógenas han mostrado que la intensidad de enfermedad está positivamente relacionada con el tamaño de la población de la filosfera previo al desarrollo de síntomas (Stromberg et al., 1999).

En estudios sobre la dinámica de la resistencia a la cancrrosis se halló una relación

lineal directa entre la dosis de inóculo y el número de lesiones formadas en hojas (Stall et al., 1982). Lo mismo ocurrió en pomelo (Canteros, 1992). Los frutos de pomelo son susceptibles a la cancrrosis por un período mucho más largo que las hojas (Stall et al., 1981). La resistencia de los frutos en desarrollo, excepto en los muy jóvenes, se incrementa con la edad y son más resistentes al alcanzar el tamaño final. Canteros (1992), en inoculaciones de frutos en el campo con suspensiones de 10^6 células de Xac por ml mediante el método de presión con tapón de goma encontró una relación inversa entre el tamaño del fruto y el número de lesiones obtenidas por cm^2 .

El primer mecanismo de defensa que tienen las plantas frente a Xac es el número de estomas y la forma y tamaño del poro estomático (Lee, 1918). Adicionalmente, el mesófilo de la hoja también cumple un rol importante en la resistencia a la cancrrosis, porque en el mesófilo hay sitios susceptibles y sitios resistentes a Xac y la proporción de áreas resistentes sobre las susceptibles se incrementa durante la maduración de la hoja (Stall et al., 1982).

En estudios sobre la interacción entre Xac y *Erwinia herbicola* (Eh), comparando patrones de crecimiento de ambas bacterias en cultivos mezclados en caldo peptona-sucrosa, el crecimiento de Eh siempre tuvo lugar cuando la población de Xac alcanzó un nivel de 10^7 células por ml (Stall, et al., 1980). Observaciones similares se informaron en estudios de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Goto et al., 1979). Los antibióticos producidos por *Pseudomonas gladioli* pv. *gladioli*, *P. cepacia* y *P. avenae* inhibieron el crecimiento in vitro de Xac (Wakimoto et al., 1986). Según Stall et al. (1993), la presencia de microorganismos antagonistas también afecta el desarrollo epidémico de la cancrrosis. La co-infección de Xac y patovares de especies de *Pseudomonas* reducen grandemente la multiplicación de Xac (Ota, 1983).

En estudios realizados por Koizumi (1969), sobre la ecología de Xac e investigando la influencia de los cambios estacionales del agente causal de la cancrrosis y el bacteriófago específico, CP1, en el agua de lluvia, encontró que los cambios estacionales inducen la misma tendencia en la concentración de fagos CP1 que Xac, excepto en los meses de abril y mayo donde Xac es más abundante. Después de una

pulverización con caldo bordelés la población del fago CP1 se incrementó y disminuyó la población de Xac. El número de partículas del fago CP1 fue determinado por el método de recuento en cajas de petri usando *X. citri* N-6181 y E-KC 6501 como bacterias indicadoras y el número de Xac se detectó usando un método donde las hojas de citrus Natsudaidai, separadas de la planta, eran pinchadas con 100 agujas y empapadas con un algodón saturado con agua de lluvia e incubadas en cámara húmeda.

En muchas situaciones los patógenos son competidores pobres. Según Leben (1981) esto probablemente está relacionado con el hecho de que las bacterias patógenas no crecen en sustratos minerales como lo hacen muchos no patógenos. Una *Pseudomonas* antagonica aislada de lesiones de cancrrosis producida por Xac inhibió la multiplicación de Xac no solamente en medio nutritivo PS sino también en tejidos de citrus (Takahiko, 1983).

En estudios sobre ecología, la población microbiana en el caso del tizón del fuego, se observó que otras bacterias epífitas producían interacción y podían suprimir el crecimiento epífita de *E. amylovora* (Johnson y Stockwell, 1998).

La presencia de bacterias saprófitas y antagonicas pueden reducir la recuperación de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en el agua de lavado de semillas de crucíferas aisladas en el medio selectivo NSCA (agar nutritivo, almidón y cicloheximida) (Randhawa y Schaad, 1984).

Se ha demostrado que las lesiones constituyen la fuente primaria de inóculo en cancrrosis. En trabajos preliminares, se determinó que el número de células viables por lesión oscilaba entre $1,5 \times 10^6$ y $1,4 \times 10^7$ según datos obtenidos mediante siembra en medio de cultivo e inoculación de hojas de pomelo (Stall et al., 1980). También se determinó entre 10^6 y 10^7 células por lesión nueva, en crecimiento, mientras en el invierno la población decreció 100 veces a 10^4 ufc (unidades formadoras de colonias) (Stall et al., 1980; Stall y Civerolo, 1991).

En estudios realizados en Japón, se determinó que Xac exudó abundantemente de

lesiones nuevas después que comenzó a llover y su número decreció con el tiempo (Serizawa, 1981). La cantidad de inóculo decrece con la edad de la lesión (Stall y Civerolo, 1993); se presume que en lesiones viejas suberizadas las bacterias no pueden ser liberadas fácilmente (Timmer, 1991).

La población de *Xanthomonas* permanece estática o declina en tejidos de plantas muertas durante el desarrollo de la enfermedad (Stall and Cook, 1966; Barton-Willis et al., 1989; Egel et al., 1991; revisado por Stall et al., 1993) y también declina progresivamente en residuos de cultivo.

Serizawa (1981) determinó que la población de *Xac* decreció cuando el mesófilo se pudrió después que las hojas infectadas cayeron. Las bacterias desaparecieron cuando se pudrió la lignocelulosa y sobrevivieron por un largo tiempo en el invierno cuando las hojas infectadas cayeron al suelo pudriéndose gradualmente. No se sabe qué rol cumplen estas bacterias como agentes de infección en nuevos brotes.

No hay referencias sobre la forma de eliminar las bacterias patógenas en desechos de vegetales. En la experiencia moderna, y para el caso de *Xanthomonas* en citrus, en Florida (EE.UU.) hubo controversia sobre las restricciones cuarentenarias tanto en la industria como en organismos reguladores y científicos (Graham y Gottwald, 1991). Allí, se decidió finalmente que los empaques debían comprometerse a tratar la fruta con desinfectantes para cumplir con los requerimientos del programa de cuarentena. Los desinfectantes usados fueron hipoclorito de sodio y una formulación de orto-fenil fenato de sodio (SOPP), ambos productos de uso común en el procesado de fruta cítrica para consumo.

CAPITULO 3

DESARROLLO DE MEDIOS DE CULTIVO SEMISELECTIVOS PARA

XANTHOMONAS AXONOPODIS pv.*CITRI*

INTRODUCCION

Para evaluar la eficacia de los lotes de sanidad controlada en la producción de fruta libre del patógeno de la canchrosis, se necesita monitorear las poblaciones naturales de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en áreas endémicas y en diferentes condiciones: lotes afectados y lotes libres de síntomas; hojas con síntomas y asintomáticas (como reservorios de la bacteria) y frutas procesadas, desinfectadas y sin desinfectar como portadoras potenciales del patógeno. Estos análisis requieren desarrollar y evaluar métodos de detección de dichas poblaciones bacterianas.

Stall et al., (1980) obtuvieron resultados preliminares sobre la dinámica poblacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en el Nordeste argentino mediante la técnica de infiltración de muestras en tejido susceptible para cuantificar las poblaciones, que desarrollaron para este estudio.

Entre los trabajos más recientes están los de Timmer et al. (1996), en Entre Ríos, quienes determinaron el número de células de Xac presente en hojas con y sin síntomas en diferentes condiciones ambientales mediante el método del hisopo de Egel et al. (1991) y Gottwald et al. (1992). Las determinaciones se hicieron empleando medios de cultivo selectivos como KCB (kasugamicina, cefalexina, clorotalonil) (Gottwald et al., 1992) más 10 ml por litro de Tween 80 (Mc Guire et al., 1986).

La población media de bacterias epífitas de la canopia fue cuantitativamente menos variable que de hoja en hoja (Hirano et al., 1982) cuando se lavaron hojas y se sembraron en un medio con glicerol o medio KING B. Según Leben (1981) los patógenos son competidores pobres, probablemente porque las bacterias patógenas no

crecen en sustratos minerales como lo hacen los saprófitos. Una bacteria antagónica perteneciente al género *Pseudomonas* aislada de lesiones de cancrrosis producida por Xac inhibió la multiplicación no solamente en medio nutritivo PS sino también en tejidos de citrus (Takahiko, 1983).

Un medio de cultivo fue desarrollado para cultivar la raza B de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* (Canteros et al., 1985). Este medio facilitó el estudio de los tipos salvajes del tipo B, considerada hoy desaparecida al haber sido ocupado su nicho por cepas del tipo A (Canteros et al., 1985).

Otras bacterias fueron individualizadas eficientemente por el uso de medios selectivos como el propuesto por Miller y Schroth (1972) para el monitoreo de la población epífita de *Erwinia amylovora* en peras. El medio selectivo inhibió el crecimiento de la mayoría de otros organismos. Las pocas *Pseudomonas* y otras bacterias que crecieron en el medio resultaron azules o verdes en contraste con la roja-anaranjada característica de *Erwinia* sp.

Otro medio semiselectivo fue desarrollado para el aislamiento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a partir de hojas infectadas de zapallo recogidas del suelo. El medio estuvo basado en el requerimiento mínimo nutricional para el género *Xanthomonas* determinado en estudios previos. Este medio permitió además el aislamiento exitoso de otras *Xanthomonas*. Diferencias morfológicas de las colonias, rápido crecimiento y zonas netas hidrolizadas diferenciaron a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de otras bacterias saprófitas (Chun y Alvarez, 1983).

El objetivo del presente trabajo fue determinar los medios de cultivo más adecuados para monitorear las poblaciones de Xac en quintas con cítricos en diversas condiciones, mediante la evaluación de medios conocidos y con modificaciones en sus componentes para aumentar su eficacia.

MATERIALES Y METODOS

Medios de cultivo. Se probaron diferentes medios de cultivo semi-selectivos para el crecimiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, que permitieran el aislamiento desde diferentes sustratos y en diferentes condiciones. Como medio base se usó el agar lima bean (ALB) (Canteros, 1994) al que se le adicionó distintos ingredientes para aumentar la selectividad.

El ALB se preparó con: poroto manteca (lima bean, *Phaseolus lunatus* L.) 62,5 g; Chubut Agar D-100 (Soriano S.A.C.I.F.I.A., Bs.As.) 15,0 g; cicloheximida 200 ppm, agua destilada 1000 ml. Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N.

El poroto manteca seco (cosechado en la zona) hidratado con un litro de agua destilada, durante 12 horas, se hirvió durante 30 minutos. La infusión se coló, se agregaron 15 gramos de Chubut Agar D-100 al líquido y llevó a pH 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Fue fraccionada en erlenmeyers de 500 ml y autoclavada, se enfrió hasta 60°C, se agregaron 100 ppm del fungicida cicloheximida disuelto en etanol y prepararon las cajas (Canteros 1994).

Para el desarrollo de los medios semi-selectivos se probaron las siguientes variables (en 500 ml de medio base):

- 1 - 500 ml ALB + 200 ppm cicloheximida (100 mg disuelto en etanol).
- 2 - 500 ml ALB + 200 ppm cicloheximida + 0,01 g kasugamicina (0,5 ml de KASUMIN, Ando y Cia)
- 3 - 500 ml ALB + 200 ppm cicloheximida + 0,02 g kasugamicina (1 ml KASUMIN).
- 4 - 500 ml ALB + 200 ppm cicloheximida + 0,02 g kasugamicina (1 ml KASUMIN) + 0,5 g extracto de levadura.

La kasugamicina utilizada fue formulación líquida comercial, producto KASUMIN^R (Ando y Cia), con la siguiente composición:

A) Kasugamicina (5-amino-2-metil-6(2,3,4,5,6- pentahidroxilo- hexiloxi) piran 3-il) amino-alfa-iminoacético, 2g.

B) Solventes y coadyuvantes c.s.p, 100 cm³.

Eficiencia de diferentes medios para el crecimiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Para determinar la eficiencia de aislamiento se trabajó con diversos tejidos cítricos obtenidos de distintas fuentes. Las muestras procesadas fueron: lesiones en hojas de pomelo, limón y mandarina.

Cada lesión se cortó con un bisturí y se trituró con una varilla de vidrio en 1 ml de agua de canilla esterilizada (tubo 1). Se hicieron las diluciones de 1:10 usando tubos que contenían 0,45 ml de agua, se transfirió serialmente 0,05 ml con un “Microdiluter” (Cooke Laboratory Products, Alexandría, Virginia EE.UU.), cada una de las diluciones a cajas de petri que contenían los diferentes medios de cultivo. La siembra se difundió con una varilla de vidrio doblada estéril (espátula de Drigalski) y se colocaron las cajas en estufa a 28°C. A las 48-72 horas fueron contadas las colonias y se calculó la cantidad de bacterias que había en el tubo 1 (total de bacterias en cada lesión). Se hicieron dos repeticiones de las siembras en cajas de todas las diluciones y se calculó el promedio.

Otros medios de cultivo. Se evaluaron comparativamente otros medios de cultivo para el crecimiento de diferentes cepas de *Xanthomonas*, como el medio semiselectivo KCB (Gottwald et al.,1992) y con Tween (Timmer et al.,1996).

Los medios probados para aislamiento y crecimiento de distintas cepas de Xac fueron:

- 1) 500 ml de ALB + 0,01 g kasugamicina + 5 mg cefalexina + 0,5 ml Tween 20.
- 2) 500 ml de ALB + 5 mg cefalexina + 500 mg extracto de levadura.
- 3) 500 ml de ALB + 0,01 g kasugamicina + 500 mg extracto de levadura.
- 4) 500 ml de ALB.

Residuos de cobre en frutos pulverizados. Se determinaron los residuos de cobre que podrían afectar la recuperación de las bacterias epífitas de Xac mediante lavado por la contaminación cúprica en el agua. Se determinó la presencia de residuos de cobre en frutos muestreados en quintas pulverizadas periódicamente con oxiclورو de cobre. Se muestrearon seis frutos: tres de la parte superior del árbol y 3 de la parte inferior.

Las muestras se enviaron al Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.N.E. para su análisis. En el método utilizado, cada fruto se lavó en 100 ml de agua destilada y los residuos de cobre fueron determinados por espectrometría de absorción atómica. Este trabajo fue realizado por los Ings. Agrs. Aldo Bernardis y Marcial Benítez.

Prueba de Hugh-Leifson más aceite mineral para determinar anaerobiosis. Se realizó el test de Hugh-Leifson para metabolismo oxidativo-fermentativo (en este caso glucosa) (Klement et al., 1990). Un juego de tubos se cubrió con aceite mineral para identificar rápidamente las bacterias amarillas que no fueran *Xanthomonas* por ser anaeróbicas. Se evaluaron siete cepas, dos de las cuales se presumían eran Xac; dos aparecían con frecuencia en las muestras pero se consideraban dudosas, de aspecto muy parecido a Xac pero de consistencia más cremosa y tres cepas aisladas comúnmente pero de color amarillo más intenso. También se inocularon las siete cepas en plantas de pomelo para determinar patogenicidad y comprobar los resultados del test.

RESULTADOS Y DISCUSION

Eficiencia de diferentes medios para el aislamiento de *Xanthomonas axonopodis* pv.citri (Xac).

Lesiones en hojas. Quintas sin tratamiento.

Pomelo. El aislamiento y cuantificación de células de Xac en una lesión de hoja de pomelo, en tres fechas distintas, mediante el triturado en 1 ml de agua de canilla esterilizada y diluciones sucesivas dio los resultados expuestos en Tabla 3-1. Todos los

datos son promedio de dos repeticiones (cajas) por cada medio, en todos los experimentos. En la dilución 1:10 no se pudieron contar las colonias en ningún medio por su excesiva cantidad (DCC= demasiadas colonias para contar). En la dilución 1:100 desarrollaron mayor número de colonias en Agar Lima Bean + 1 ml de KASUMIN y en 1:1000 igual cantidad de colonias en ambos medios. Las colonias de Xac se diferenciaron mejor de las saprófitas en medios de cultivo que tenían KASUMIN.

En la muestra del 15 Marzo 1999 en la dilución 1:10 no se pudo contar; en las diluciones 1:100 y 1:1.000 se desarrolló la misma cantidad en ALB solo y en ALB + 1 ml de KASUMIN y menor número de colonias con 0.5 ml de KASUMIN. En la dilución 1:10.000 se desarrolló un mayor número de colonias en ALB + 0.5 ml de KASUMIN. Probablemente la mayor eficiencia de diferentes dosis de kasugamicina está determinada por la diferencia en la eliminación de las saprófitas (Tabla 3-1).

En la muestra del 22 Marzo 1999, en las diluciones 1:10 y 1:100 no se pudo contar debido a la gran cantidad de colonias; en la dilución 1:1.000 se desarrollaron más colonias de Xac en ALB y en la dilución 1:10.000 mayor número en ALB + 0.5 ml de KASUMIN (Tabla 3-1).

Comparando las tres fechas de muestreo, se observó que aumentó el número de células de Xac al avanzar la fecha de muestreo. Hubo gran cantidad de saprófitas en las diluciones 1:10 y 1:100 el 22 de marzo en ALB y ALB + kasugamicina. En el promedio de las diferentes fechas se observó que la dilución 1:10 no se pudo contar por la gran cantidad de colonias; en las diluciones 1:100 y 1:1.000 se desarrollaron ligeramente más colonias en medios sin kasugamicina pero en la mayor dilución se desarrolló un mayor número de colonias en medio ALB + 0.5 ml de KASUMIN, presumiblemente por la eliminación de los saprófitos que permitió el desarrollo de Xac (Tabla 3-1).

Tabla 3-1 Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo, obtenidas de una lesión de hoja de pomelo, muestras tomadas 22 febrero, 15 y 22 marzo 1999 en una quinta infectada, sin tratamiento químico y promedio de las tres fechas.

<u>Medio de cultivo</u> <u>(fecha)</u>	<u>N° células/lesión</u> <u>(estimado)</u>	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
<u>22 febrero</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	7,0x10 ⁴	DCC ²	7,0x10 ²	1,0x10	0
ALB + 1 ml KASUMIN	9,6x10 ⁴	DCC	9,6x10 ²	1,0x10	0
ALB + 0,5 KASUMIN	9,0x10 ⁴	DCC	9,0x10 ²	1,0x10	0
<u>15 marzo</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	3,5x10 ⁶	DCC	2,5x10 ⁴	3,5x10 ³	SD ³
ALB + 1 ml KASUMIN	3,5x10 ⁶	DCC	2,4x10 ⁴	3,5x10 ³	3,0x10 ²
ALB + 0,5 KASUMIN	2,4x10 ⁶	DCC	SD	2,4x10 ³	4,2x10 ²
<u>22 marzo</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	1,0x10 ⁶	DCC	DCC	1,0x10 ³	4,0x10
ALB + 1 ml KASUMIN	8,8x10 ⁵	DCC	DCC	8,8x10 ²	8,0x10
ALB + 0,5 KASUMIN	8,8x10 ⁵	DCC	DCC	8,8x10 ²	1,8x10 ²
<u>Promedio (DE¹)</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	1,5x10 ⁶ (1,8x10 ⁶)	DCC ²	1,3x10 ⁴	1,5x10 ³	1,0x10
ALB + 1 ml KASUMIN	1,5x10 ⁶ (1,8x10 ⁶)	DCC	1,3x10 ⁴	1,5x10 ³	1,3x10 ²
ALB + 0,5 KASUMIN	1,1x10 ⁶ (1,2x10 ⁶)	DCC	SD ³	1,1x10 ³	2x10 ²

(1) DE = Desviación estándar

(2) DCC = Demasiadas colonias para contar

(3) SD = Sin datos, cajas contaminadas

Quintas con tratamiento. El mismo muestreo se realizó en un lote con tratamiento químico de control para cancrrosis (oxicloruro de cobre más mancozeb) y se sembró en los mismos medios de cultivo. Las dos primeras diluciones no se pudieron contar (Tabla 3-2) y en 1:1000 desarrollaron más colonias en medio ALB + 1 ml de KASUMIN.

Limón. La determinación del número de células de Xac, mediante el recuento de colonias que desarrollaron en cajas de petri en diferentes medios de cultivo, también se hizo en una lesión de hoja de limón Eureka triturada en 1 ml de agua estéril y diluciones sucesivas. Las muestras fueron tomadas en una quinta infectada, sin tratamiento químico. (Tabla 3-3). Todas las lesiones de limón tenían menor número de bacterias que las lesiones de pomelo en todos los medios de cultivo. En todas las diluciones se desarrollaron mayor número de colonias en ALB.

El 22 marzo de 1999, se determinó la población de Xac en una lesión de hoja de limón Eureka triturada en 1 ml de agua estéril y las diluciones sucesivas (Tabla 3-3). La muestra fue tomada en una quinta infectada sin tratamiento químico. Se sembraron sólo en Agar lima bean y desarrollaron pocas colonias (Tabla 3-3).

El 26 de marzo de 1999 se tomó otra muestra de limón Eureka sin tratamiento químico y se sembró el triturado de una lesión de hoja y diluciones sucesivas en diferentes medios de cultivo, no se obtuvieron colonias de Xac (Tabla 3-3).

Tabla 3-2. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión de hoja de pomelo, muestra tomada 26 marzo 1999 en quinta infectada con tratamiento químico.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>N° células/lesión</u> (estimado)	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$3,6 \times 10^6$	DCC ¹	DCC	$3,6 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$
ALB + 1 ml KASUMIN	$5,2 \times 10^5$	DCC	DCC	$5,2 \times 10^3$	SD ²

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

(2) SD = Sin datos, cajas contaminadas.

Tabla 3-3. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión de hoja de limón Eureka, muestra tomada 15, 22 y 26 marzo 1999 en quinta infectada, sin tratamiento químico y promedio de las tres fechas.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>N° células/lesión</u> <u>(estimado)</u>	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
<u>15 marzo</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	4,2x10 ⁴	4,2x10 ³	5,8x10 ²	8,0x10	0
ALB + 1 ml KASUMIN	2,7x10 ⁴	2,7x10 ³	2,0x10 ²	4,0x10	0
ALB + 0,5 ml KASUMIN	2,2x10 ⁴	2,2x10 ³	2,4x10 ²	0	0
<u>22 marzo</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	8,0x10 ²	8,0x10	2,0x10	0	0
<u>26 marzo</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	0	0	0	0	0
ALB + 1 ml KASUMIN	0	0	0	0	0
<u>Promedio (DE¹)</u>					
Agar Lima Bean (ALB)	1,4x10 ⁴ (2,4x10 ⁴)	1,4x10 ³	2,0x10 ²	2,6x10	0
ALB + 1 ml KASUMIN	1,4x10 ⁴ (1,9x10 ⁴)	1,4x10 ³	1,0x10 ²	2,0x10	0
ALB + 0,5 KASUMIN	2,2x10 ⁴ (0)	2,2x10 ³	2,4x10 ²	0	0

(1) DE = Desviación estándar

Al comparar la cantidad de colonias que crecieron en los distintos medios en diferentes fechas: 15, 22 y 26 marzo 1999 se observó que, a diferencia de lo que ocurrió con lesiones de pomelo, en las cuales aumentó la cantidad de colonias de Xac desde la primera a la última fecha de muestreo, en limón disminuyó la cantidad de colonias y no se detectó Xac en la última fecha de muestreo. Al obtener la media del número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de lesiones de hojas de limón Eureka, en quinta infectada sin tratamiento químico, se obtuvieron los valores de Tabla 3-3. Se desarrollaron más colonias en agar lima bean sin kasugamicina en la dilución 1:10 y casi igual cantidad en todos los medios en las diluciones 1:100 y 1:1.000 en los promedios de las tablas (Tabla 3-3).

Mandarina Murcott. En las muestras tomadas en mandarina Murcott, quinta infectada sin tratamiento químico, el número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo luego de sembrar el triturado de una lesión de hoja en 1 ml de agua y las diluciones sucesivas, en las dos primeras diluciones el resultado fue igual en ALB y ALB + 0.5 ml de KASUMIN mientras que para las dos últimas diluciones desarrollaron más colonias en ALB + 0.5 de KASUMIN (Tabla 3-4).

Mandarina satsuma. Se obtuvo una muestra de mandarina satsuma Okitsu en una quinta infectada sin tratamiento químico para control de cancrisis el 20 marzo de 1999. De la lesión joven extraída de una hoja se desarrolló un mayor número de colonias en medio ALB + 1 ml KASUMIN (Tabla 3-5).

Además se evaluaron los medios con una muestra de lesión vieja en hoja de mandarina Satsuma Okitsu de una quinta sin tratamiento químico, el 30 marzo 1999. Las colonias que desarrollaron a partir de la dilución 1:100 sólo pudieron contarse en medio con kasugamicina, en las suspensiones más concentradas y en otros medios crecieron demasiadas saprófitas (Tabla 3-6).

Tabla 3-4. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión en hoja de mandarina Murcott, muestra tomada 30 marzo 1999 en quinta infectada sin tratamiento químico.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>N° células/lesión</u> (estimado)	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$1,2 \times 10^5$	DCC ¹	$1,2 \times 10^3$	$6,0 \times 10$	0
ALB + 0,5 ml KASUMIN	$1,2 \times 10^5$	DCC	$1,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10$

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

Tabla 3-5. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión joven de hoja de mandarina satsuma Okitsu, muestra tomada 20 marzo 1999 en quinta infectada sin tratamiento químico.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>N° células/lesión</u> (estimado)	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$4,0 \times 10^3$	DCC ¹	$4,0 \times 1$	0	0
ALB + 1 ml KASUMIN	$8,2 \times 10^4$	DCC	$8,2 \times 1$	0	0

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

Tabla 3-6. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión vieja de hoja de mandarina satsuma Okitsu, muestra tomada 30 marzo 1999 en quinta infectada sin tratamiento químico.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>Nº células/lesión</u> <u>(estimado)</u>	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$6,6 \times 10^5$	DCC ¹	DCC	$6,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10$
ALB + 0,5 ml KASUMIN	$2,2 \times 10^5$	DCC	$2,2 \times 10^3$	SD ²	$6,0 \times 10$

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

(2) SD = Sin datos.

Lesiones en frutos. La eficiencia en el aislamiento de lesiones en frutos de quintas con y sin tratamiento y de diferentes variedades, evaluada con los mismos métodos, se presenta en las tablas 3-7 y 3-8.

Quinta sin tratamiento.

Mandarina satsuma. No se observan comúnmente lesiones en frutos de satsuma en nuestra zona. Sin embargo, se obtuvo un fruto de mandarina satsuma Okitsu infectado naturalmente en una quinta sin tratamiento químico de una planta con portainjerto de lima rangpur con ramas muy infectadas (Tabla 3-7). El número de colonias de Xac que desarrollaron en cajas con los dos medios de cultivo de la lesión de fruto triturada en 1 ml de agua y diluciones seriadas, se encontró que las colonias crecieron en ambos medios de igual forma aunque el medio que contenía kasugamicina permitió diferenciar claramente las colonias de Xac de las demás bacterias (Tabla 3-7).

Limón. En fruto de limón Eureka sin tratamiento (Tabla 3-8) se determinó el número de células de Xac, en cajas con diferentes medios, de una lesión en 1 ml y diluciones. La muestra fue tomada en una quinta sin tratamiento químico. La cantidad de colonias desarrolladas fue similar en ALB sólo y con kasugamicina (Tabla 3-8).

Prueba de efectividad de otros medios de cultivo. Las cepas de *Xanthomonas* evaluadas fueron: Xcc 90-20-1 (*X. axonopodis* pv. *citri*) ; Xcc 90-21-1 (*X. a.* pv. *citri*); Xcc 45-1 (*X. a.* pv. *citri*); XcvBV-5-4a (*X. a.* pv. *vesicatoria*); Xcm-5 (*X. a.* pv. *manihotis*). Se observó poco crecimiento de todas las cepas en medios de cultivo que contenían cefalexina, excepto Xcc-90-20-1 que creció bien en medio con cefalexina y extracto de levadura pero sin kasugamicina. En medios de cultivo sin cefalexina todas las cepas crecieron bien pero no todas tuvieron igual aspecto.

Tabla 3-7. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión en fruto de mandarina Satsuma Okitsu, muestra tomada 30 marzo 1999 en quinta infectada sin tratamiento químico.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>Nº células/lesión</u> (<u>estimado</u>)	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$6,0 \times 10^5$	DCC ¹	DCC	$1,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10$
ALB + 1 ml KASUMIN	$4,0 \times 10^5$	DCC	DCC	$1,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10$

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

Tabla 3-8. Número de colonias de Xac que desarrollaron en diferentes medios de cultivo obtenidas de una lesión en fruto de limón Eureka de una quinta infectada sin tratamiento químico, muestra tomada el 26 marzo 1999.

<u>Medio de cultivo</u>	<u>Nº células/lesión</u>	<u>Diluciones (1:10)</u>			
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>	<u>1:1000</u>	<u>1:10000</u>
Agar Lima Bean (ALB)	$7,8 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$7,8 \times 10^2$	SD ²	0
ALB + 1 ml KASUMIN	$8,0 \times 10^4$	DDC ¹	$8,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10$	0
ALB + 0,5 KASUMIN	$6,8 \times 10^4$	SD	$6,8 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	0

(1) DCC = Demasiadas colonias para contar.

(2) SD = Sin datos.

Las cepas en medios con kasugamicina y levadura tenían un color amarillo más intenso que sin levadura y con kasugamicina. Es interesante la diferencia de crecimiento de algunas cepas en diferentes medios, lo que no se había determinado aún en cepas aisladas de esta área geográfica.

El medio ALB + 1 ml KASUMIN resultó adecuado para el crecimiento de Xac e inhibió muchas otras bacterias presentes en las lesiones. Se lo puede considerar como semi- selectivo. Las colonias de la mayoría de las cepas tuvieron una morfología característica que permitió distinguirlas de otras bacterias amarillas. En el medio ALBK la mayoría de las colonias de Xac resultaron escasamente pigmentadas lo que dificultó algunos casos la visualización. El agregado de extracto de levadura hizo que las colonias se vieran más claramente, en un tono amarillo más intenso (Fig. 3-1).

El agregado de otros productos, como el antibiótico cefalexina y el detergente Tween no mejoraron la eficiencia del medio, contrariamente a lo informado por Timmer et al. (1996). Muchas colonias no desarrollaron cuando los medios contenían ambos o uno sólo de cada uno de estos productos.

Residuos de cobre en frutos de limón Eureka. El muestreo realizado el 13 julio 1999 y procesado según lo descrito dio los siguientes resultados (expresados en partes por millón (ppm) en 100 ml de agua destilada.

En la muestra tomada en la parte baja del árbol, los residuos de cobre en cada fruto fueron: fruto 1: 1,6; fruto 2: 1,7; fruto 3: 2,0. Promedio: 1,77 ppm de cobre.

En la muestra tomada de la parte alta del árbol los residuos de cada fruto fueron: fruto 1: 1,4; fruto 2: 0,3; fruto 3: 0,8. Promedio: 0,83 ppm de cobre.

Se presume que los residuos de cobre encontrados en estos frutos podrían modificar la población de Xac, si se hiciera lavado de los mismos, por la acción bactericida del cobre. Es un factor que se debería considerar si se determina la

población de *Xac* epífita de frutos por lavado y que fueron pulverizados con productos cúpricos. En los trabajos aquí presentados y en muestras que provenían de quintas pulverizadas no se observó interferencia del cobre.

Los residuos de cobre también pueden ser un problema si se usaran otros métodos de detección, como los moleculares, muy sensibles a la presencia de algunas sustancias químicas y/o metales pesados. Todos los métodos deberían testarse en presencia y ausencia de cobre.

Prueba de Hugh-Leifson con aceite mineral para diferenciar bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Las dos cepas que se presumían eran *Xac* dieron resultado negativo, y las cinco restantes dieron resultado positivo, es decir no eran *Xanthomonas*. Los resultados de la inoculación en plantines de pomelo de las siete cepas coincidieron con la prueba de Hugh-Leifson, desarrollaron lesiones solamente las cepas que dieron negativo. Es un test rápido para separar bacterias anaeróbicas que tuvieran apariencia de *Xanthomonas*.

El uso de esta prueba resultó muy adecuado para ayudar en la identificación rápida de las colonias de *Xac* y de las que, con morfología de colonia similar, no eran de *Xac*.



Figura 3-1: Crecimiento de cepas bacterianas en medio ALB+ kasugamicina + levadura semiselectivo para detección de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* y otras *Xanthomonas*.

CAPITULO 4

TITULACION DE INFECTIVIDAD EN HOJAS DE POMELO DUNCAN

INTRODUCCION

Stall et al. (1980, 1982) adaptaron el método de inyección-infiltración en hojas susceptibles de citrus para cuantificar poblaciones de Xac en suspensiones acuosas y estudiar la dinámica poblacional en diferentes condiciones.

Existen numerosos trabajos sobre la relación entre la concentración de inóculo y el desarrollo de lesiones en enfermedades bacterianas en plantas (Koizumi, 1971). Goto (1962) encontró relación entre la concentración de Xac y el desarrollo de lesiones de cancrrosis en un trabajo realizado para detectar células bacterianas en agua de lluvia por los métodos de inoculación estomática o heridas de hojas (Goto, 1962) y por infiltración del inóculo (Goto y Morita, 1969; Goto 1970). También se usó inoculación por heridas para investigar la disminución de la bacteria causal de la cancrrosis en el suelo (Lee, 1920, Fulton 1920) y para conocer la tasa de multiplicación de la bacteria en la cáscara de frutos (Fulton y Bowman, 1929).

Existen varios trabajos en estudios de enfermedades bacterianas sobre nivel de inóculo e intensidad de enfermedad. En cancrrosis se pueden mencionar los de Koizumi (1971), Goto (1962), Goto y Morita (1969), Goto (1970), Lee (1920), Fulton y Bowman (1929), Stall et al. (1982), Gottwald et al. (1992) y en otras enfermedades bacterianas, Gitaitis y Nilakhe (1982) y Stromberg et al. (1999), que prueban la relación positiva entre el nivel de inóculo y el grado de desarrollo de la enfermedad.

Civerolo (1993), citado por Stromberg et al. (1999), trabajando en cámara de cría y mediante titulación de infectividad, encontraron que el número de lesiones producidas por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* era directamente proporcional a la concentración de inóculo.

Trabajos con *Pseudomonas* fitopatógenas han mostrado relación positiva entre la intensidad de enfermedad y el tamaño de la población de la filosfera previo al desarrollo de síntomas (Stromberg et al., 1999).

Este trabajo se inició para determinar la curva de respuesta, en titulación de infectividad, de concentraciones conocidas de Xac en hojas susceptibles de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría, en condiciones controladas de luz y temperatura. Esta curva es necesaria para cuantificar Xac en suspensiones de diverso origen, mediante comparación con la curva obtenida en las mismas condiciones.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de una cepa de Xac a partir de síntomas de cancrrosis. Se desinfectó superficialmente el material vegetal con etanol 95°. El método de aislamiento usado fue el de Goth (1965) que consiste en pinchar con aguja el borde de una lesión joven en hoja o fruto, punzar la superficie del medio en cajas de petri y difundir con anza. Las cajas se incubaron luego en estufa a 28°C por 48 horas. Se seleccionaron colonias aisladas típicas de *Xanthomonas* y se estriaron nuevamente dos veces. Se seleccionó una colonia, se comprobó la patogenicidad y se mantuvo en cajas de petri con agar lima bean a 10°C. La cepa seleccionada se denominó Xcc 99-1261-2 y se la incorporó a la Colección de Bacterias Fitopatógenas de la EEA INTA Bella Vista.

Preparación de concentraciones conocidas de Xac. Se sembraron dos cajas con medio ALB con un cultivo fresco de la cepa seleccionada de aislamientos recientes de Xac e incubó durante 24 horas a 28°C. Se agregó agua de canilla esterilizada a las cajas con el cultivo y se resuspendieron las bacterias en un tubo con agua estéril para preparar la solución madre. Se agitó el tubo en un agitador vortex. Se preparó una suspensión de concentración 5×10^8 células por mililitro. La concentración se determinó en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb), transmitancia de 50%, absorbancia 0,03 a una longitud de onda de 600nm. Para obtener concentraciones menores se hicieron diluciones de 1:10 ó 1:100, por ej. se transfirió 1 ml de la solución madre a un

erlenmeyer con 100 ml de agua para lograr una concentración de 5×10^6 células/ml (dilución 1:100). De la misma manera se prepararon otras concentraciones.

Para comprobar el número exacto de células de Xac por ml se tomó 0,05 ml de la suspensión bacteriana con un microdiluter la suspensión se extendió sobre la superficie del agar con espátula de vidrio estéril. Las siembras en cajas se hicieron con las suspensiones más diluidas para obtener colonias aisladas. Se sembraron dos cajas por cada dilución y se promedió el resultado de las dos siembras. Después de 2-4 días de incubación se contaron las colonias y se hizo el cálculo correspondiente. Si se contaban 25 colonias en la caja donde se sembró la dilución 1:10.000, éste número se multiplicaba por 20, (se sembraba 0,05ml, 1/20 partes de 1 ml), y luego se multiplicaba por 10.000, lo que daba 5×10^5 unidades formadoras de colonia (UFC), equiparadas en este caso a células bacterianas por ml para la suspensión inicial.

Concentración de las suspensiones preparadas. Solución madre: 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) tomadas como equivalentes de número de células bacterianas, esto es = 500.000.000 cel/ml: 5×10^8 ; dilución 1/100 = 5.000.000: 5×10^6 ; dilución 1/1.000 = 500.000: 5×10^5 ; dilución 1/10.000 = 50.000: 5×10^4 ; dilución 1/100.000 = 5.000: 5×10^3 ; dilución 1/1.000.000 = 500: 5×10^2 ; la solución madre (sin diluir) se llamó dilución 0.

Inoculación de hojas de pomelo por inyección-infiltración. Se utilizó la técnica de inoculación usada por primera vez en bacterias fitopatógenas por Klement (Klement, 1968; Klement et al., 1990). El método de inyección-infiltración consistió en el llenado de los espacios intercelulares de hojas jóvenes de plantines de pomelo Duncan con la suspensión bacteriana (Stall et al., 1980). Se inocularon tres hojas por cada dilución y se promedió el número de lesiones por cm^2 de hoja. Para el llenado de los espacios intercelulares se usó una jeringa plástica estéril de 2-5 ml y aguja de medida 21-27. Se infiltró la mitad de una hoja de 21 días de edad. Luego de la inoculación las plantas se mantuvieron en cámaras de cría con un programa de iluminación de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y a una temperatura de 28°C. Normalmente las lesiones se hicieron visibles a los 14 días y se contaron después de cuatro semanas de incubación. El área

inoculada de cada hoja se determinó por el método de los puntos de Marshall (1968), que consiste en el recuento de puntos separados cada 0,5 cm entre sí.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Titulación de infectividad en hojas de pomelo en condiciones controladas. Los resultados obtenidos se presentan en Tabla 4-1. Con los datos se construyó la curva de titulación de infectividad. En la tabla 4-1 se presentan las medias y desviación estandar de los experimentos. En el Anexo I se presentan los valores calculados en la regresión obtenida luego de la linearización de los valores mediante la transformación logarítmica del número de células por ml y número de lesiones por cm².

Desarrollo de la curva: Se graficaron los resultados de los 4 experimentos (Tabla 4-1 y Fig. 4-1). La transformación logarítmica de ambos datos, dio la mejor linealización de la curva (Fig. 4-2) y con la ecuación que expresa esta relación ($r^2 = 0,89$) se calcularon los valores intermedios entre aquellos utilizados en el experimento. Estos valores figuran en el Anexo I y fueron utilizados en la interpretación de los resultados de las distintas infiltraciones de suspensiones de concentración desconocida. Se presentan en el Anexo I los datos obtenidos en hojas susceptibles de plantines de pomelo Duncan. En algunos experimentos se utilizaron hojas de plantines de lima Key y se comparó con la curva de infectividad correspondiente, obtenida en la misma cámara de cría con el mismo método (Canteros y Naranjo, com. pers.).

Tabla 4-1. Número de lesiones de cancrrosis obtenidas en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

	<u>Inóculo</u>		<u>N° lesiones/cm²</u>			
	<u>N° células/ml¹</u>	<u>Log⁽¹⁾</u>	<u>Hoja 1</u>	<u>Hoja 2</u>	<u>Hoja 3</u>	<u>Media (DE²)</u>
<u>Exp. 1</u>						
	3,6x10 ⁴	4,67	180,0	231,0	131,0	180,65 (40,8)
	3,6x10 ³	3,67	20,6	18,4	42,2	27,06 (13,15)
	3,8x10 ²	2,57	9,21	6,3	5,9	7,14 (1,81)
	1,0x10	1,0	0,12	0	0	0,04 (0,07)
<u>Exp. 2</u>						
	2,6x10 ⁴	4,41	SD ³	29,8	72,0	50,9 (29,8)
	3,0x10 ³	3,48	21,9	11,1	7,81	13,6 (7,37)
	5,8x10 ²	2,76	2,92	SD	2,6	2,76 (0,23)
	1,0x10	1,0	0,28	0	0	0,09 (0,16)
<u>Exp. 3</u>						
	1,56x10 ⁴	4,15	59,53	80,0	58,0	65,85 (12,3)
	1,4x10 ³	3,14	SD	SD	11,74	11,74 (0)
	1,3x10 ²	2,12	0,85	2,60	0,41	1,29 (1,16)
	1,0x10	1,0	0	0	0	0 (0)
<u>Exp. 4</u>						
	1,61x10 ⁴	4,21	116,83	135,6	157,8	136,74 (20,5)
	5,7x10 ³	3,75	40,64	47,04	45,45	44,37 (3,33)
	1,4x10 ²	2,15	1,33	3,75	2,25	2,34 (1,06)
	6x10	1,78	0,68	0,28	0	0,32 (0,34)

(1) Logaritmo del número de células por mililitro, promedio del número de colonias en dos cajas

(2) DE = Desviación estandar

(3) SD = Sin datos

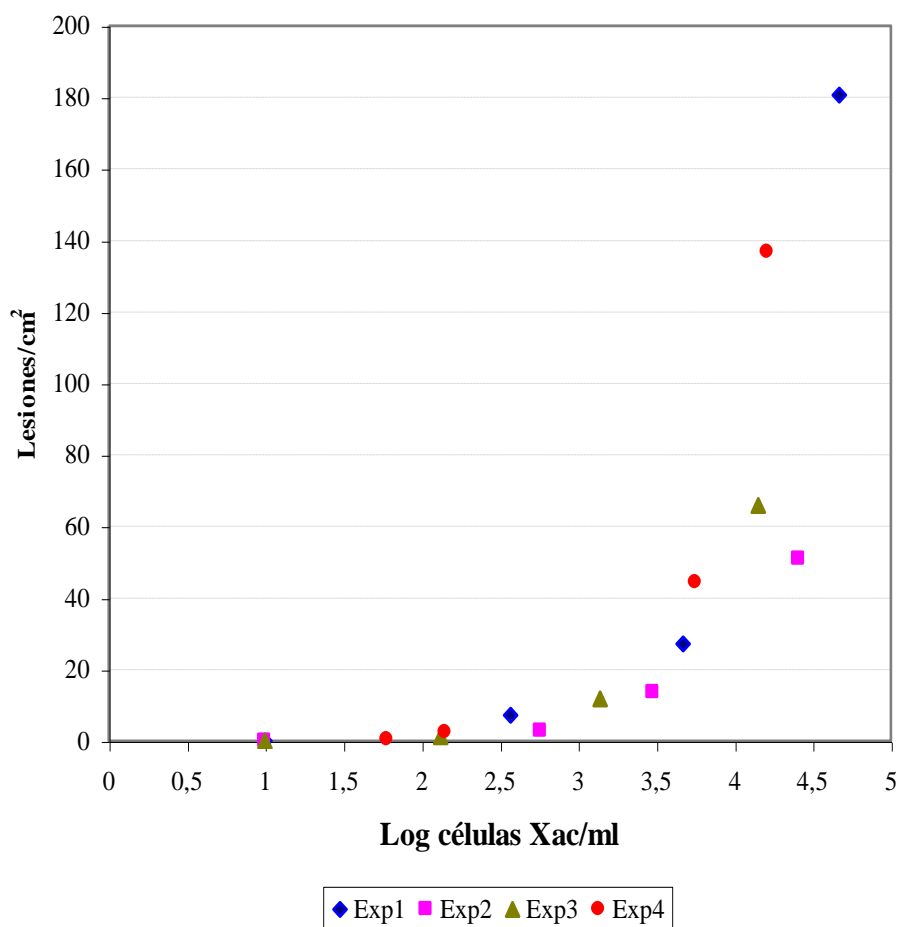


Figura 4-1. Relación entre la concentración de inóculo y las lesiones por cm² obtenidas en hojas de plantines de pomelo Duncan en cámara de cría luego de inoculación por inyección- infiltración.

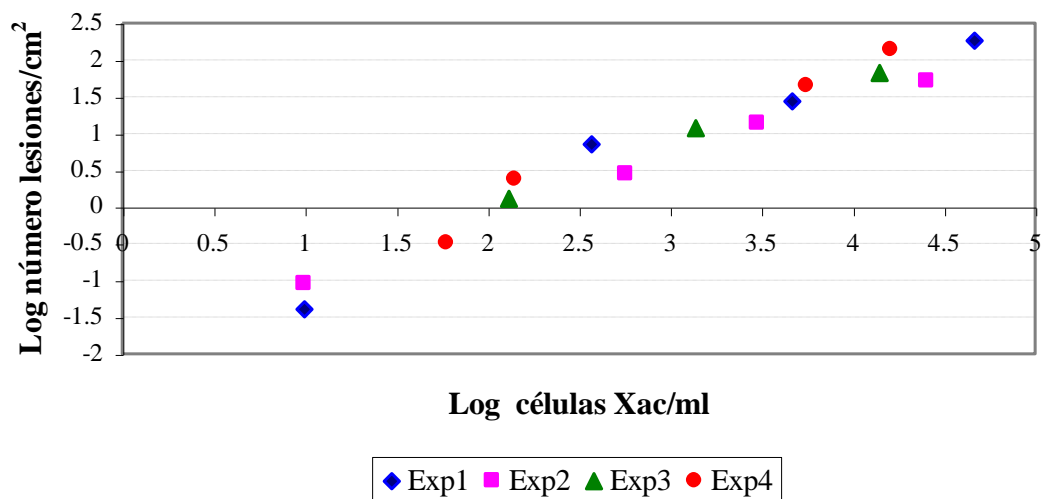


Figura 4-2. Linealización de los datos de titulación mediante transformación logarítmica.

CAPITULO 5

POBLACIONES EPIFITAS Y EN SINTOMAS DE CANCROSIS DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* EN CONDICIONES NATURALES

INTRODUCCION

No existen antecedentes que demuestren que la fruta de citrus para consumo y sin síntomas sea portadora de la bacteria causal de la cancrrosis y tampoco que haya sido iniciadora de epidemias. Los estudios más importantes en este tema están relacionados con la bacteria causal del tizón del fuego del manzano y peral, *Erwinia amylovora* (Ea), que está en expansión en el mundo y ha preocupado a investigadores y productores en sus aspectos cuarentenarios. Ishimaru y Klos (1984) desarrollaron el medio semiselectivo CCT para distinguir *E. amylovora* de *E. herbicola* (Eh) en base a diferencias morfológicas de las colonias. Este medio de cultivo fue exitosamente usado para detectar *E. amylovora* en flores de manzano, yemas y canchros, previo al desarrollo de los síntomas del fuego bacteriano. Hatting et al. (1986) observaron, con microscopio electrónico de barrido (SEM), flores de manzano colonizadas por *Erwinia herbicola* (razas 159 y 252) y *E. amylovora* (raza 273) y encontraron que la raza 252 de *Eh* inhibía el desarrollo de *Ea*, por competir por el mismo nicho ecológico en la superficie estigmática. Roberts et al. (1998) estudiaron la biología de *Ea* con referencia al riesgo fitosanitario asociado con el movimiento de la fruta hacia países donde no está presente el fuego bacteriano. Los métodos de identificación utilizados fueron en algunos casos características culturales en medio semiselectivo en agar (Miller y Schroth, 1972; Crosse y Goodman, 1973, Ishimaru y Klos, 1984). También normas o modelos de utilización de sustrato (Dye, 1968) y varias técnicas serológicas (revisión por Slade y Tiffin, 1984, Lin et al., 1987; Gorris et al., 1996); pruebas celulares de análisis de ácidos grasos (Wells et al., 1994); prueba de hipersensibilidad en tabaco (Schroth y Hildebrand, 1994); tests de patogenicidad (Ritchie y Klos, 1974; Beer y Runcle, 1982),

varios modelos de técnicas moleculares, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (Bereswill et al., 1992; Bereswill et al., 1996). La detección molecular corrientemente no discrimina células vivas de células muertas (Mc Manus y Jones, 1995). Lo mismo ocurre con varias técnicas inmunológicas (Miller, 1984). La mayoría de los autores citados consideran que es extremadamente poco riesgoso el establecimiento del fuego bacteriano en áreas libres por la introducción de fruta para consumo proveniente de zona infectada. No se tiene evidencia en la literatura científica de que la fruta de manzano de una quinta comercial contaminada o no con *Ea* provea de inóculo para un ataque de fuego bacteriano.

La determinación de la existencia de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* epífitas y su cuantificación es importante para determinar su importancia como fuente de inóculo para infecciones posteriores. Hirano y Upper (1983) (citado por Blakeman, 1991) definieron a las bacterias epífitas como aquellas que pueden ser removidas desde la parte aérea de la planta por lavado. Ellos determinaron que la población encontrada, muestreada en un momento dado, puede variar 1000 veces de una hoja a otra, por lo que es importante determinar poblaciones en hojas individualmente y en muestras múltiples (de varias hojas).

La población media de bacterias epífitas en toda la planta fue cuantitativamente menos variable que de hoja en hoja en las determinaciones mediante lavado de hojas y siembra en medio semi-selectivos realizadas por Hirano et al. (1982). Jacques y Morris (1995) encontraron que se cometía una sobrestimación de un 66 % en muestras de muchas hojas comparada con muestras de una sola hoja en estudios del agente causal del tizón del fuego de peras y manzanas, *Erwinia amylovora*.

La cuantificación de la población bacteriana asociada con hojas se realiza comúnmente mediante métodos indirectos. Los métodos directos (inmunofluorescencia, ELISA, hibridaciones de ADN) podrían ser útiles para la detección pero resultan muy engorrosos para el manejo de alto número de muestras y para la cuantificación de la población total, pues se debe trabajar con muchas muestras muy pequeñas (Canteros, com. pers.).

Uno de los pasos más importantes para la cuantificación por métodos indirectos es el lavado que permite la liberación de las bacterias desde la superficie de la hoja (Jacques y Morris, 1995).

En estudios sobre la ecología de otras bacterias patógenas se observó que, en el caso del tizón del fuego producido por *Erwinia amylovora*, al analizar la población microbiana, otras bacterias epífitas producían interacción y podían suprimir el crecimiento epífita del patógeno (Johnson y Stockwell, 1998). La presencia de bacterias saprófitas y antagonicas también pueden reducir la recuperación de *Xanthomonas campestris pv. campestris* en el agua de lavado de semillas de crucíferas aisladas en medio selectivo NSCA (agar nutritivo, almidón y cicloheximida) (Randhawa y Schaad, 1984).

Goto (1972) en Japón y Pereira et al. (1976) en Brasil, determinaron que *Xac* podía persistir por largo tiempo en plantas no huéspedes. Sin embargo, más recientemente, Timmer et al. (1996) en Entre Ríos (Argentina) establecieron que es poco probable que esto ocurra en ausencia de síntomas que brinden una fuente permanente de bacterias. Timmer et al. (1996) utilizaron el método del hisopo (Egel et al., 1991) y las modificaciones de Gottwald et al. (1992).

Las lesiones de cancrrosis en hojas, ramitas y frutos son la fuente de inóculo para las infecciones (formación de síntomas o infecciones latentes) o infestaciones (poblaciones superficiales residentes, casuales o epífitas). En trabajos preliminares realizados en Corrientes (Argentina), se determinó que el número de células viables por lesión fue de entre $1,5 \times 10^6$ y $1,4 \times 10^7$ empleando los métodos de dilución en medio de cultivo e infiltración en hojas de plantines de pomelo (Stall et al., 1980; Stall y Civerolo, 1991).

Este trabajo se inició para determinar las poblaciones de *Xac* y otras bacterias en hojas y frutos de citrus de diversas variedades y en distintas condiciones. El objetivo principal fueron las hojas y frutos sanos en plantas infectadas con cancrrosis o sanas y

con diversos tratamientos o sin control. Se agregaron en todos los estudios muestras con lesiones de cancrrosis, que sirvieron de testigo para comprobar la utilidad de los métodos usados.

MATERIALES Y METODOS

Determinación por trituración del número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones. Para determinar el número de células de Xac presentes en cada lesión de los tejidos cítricos afectados se trituraron, en 5 ml de agua estéril, lesiones de cancrrosis provenientes de frutos de naranja, limón, pomelo y mandarina, muestreados en quintas enfermas sin tratamientos químicos para control de la enfermedad y de frutos procesados y sin procesar de naranja, pomelo y limón muestreados en plantas de empaque.

El número de células de Xac en cada lesión fue determinado por siembra en medio semiselectivo y el método de inoculación de inyección- infiltración de hojas de plantines de lima Key o pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría en condiciones controladas, 16 horas de luz, 8 de oscuridad a temperatura constante de 28° C.

Poblaciones de Xac epífitas sobre hojas de citrus de plantas en distintas condiciones. La recuperación de bacterias de la superficie de las hojas se hizo mediante el método de lavado y agitación.

Se usaron dos tipos de muestras:

- a) 1 hoja en tubo de ensayo con 10 ml de agua de canilla estéril y
- b) 10 hojas en erlenmeyers con 100 ml de agua estéril.

Los tubos se agitaron en un vortex durante 5 minutos, y los erlenmeyers se colocaron en un agitador durante 20 minutos. Se hicieron diluciones sucesivas, generalmente 1:10. El número de células de Xac se determinó con el método de dilución en cajas con medio semi-selectivo y se comprobó por inoculación mediante inyección- infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría.

La siembra se hizo en cajas que contenían medio Agar Lima Bean (ALB) y ALB + 0,02 g de kasugamicina (KASUMIN, Ando y Cía.) en las primeras determinaciones; luego se utilizó únicamente ALB + 0,02 g de kasugamicina. Las cajas se incubaron durante 72 horas y se contaron las colonias de Xac y de otras bacterias.

El cálculo de la concentración (número de células bacterianas por mililitro y por lesión) se hizo considerando que se sembraba 0,05 ml (1/20 de ml) en cada caja, el número de colonias se multiplicó por 200 cuando se sembraba desde tubos que contenían 10 ml y por 2000 cuando los 0,05 ml (50 microlitros) eran tomados de 100 ml.

Se muestrearon hojas con y sin lesiones de quintas infectadas sin tratamiento químico y hojas sin lesiones de quintas con baja infección con tratamiento químico para control de cancrrosis. Cada siembra en caja de petri de las diferentes diluciones se hizo por duplicado y se calculó el promedio de ambas repeticiones.

Nivel poblacional de Xac en la superficie de frutos cítricos de plantas en distintas condiciones. Se determinó el número de células de Xac en frutos de pomelo, naranjas Valencia y limón.

Las muestras procesadas fueron de:

- a) Frutos con síntomas de cancrrosis de quintas infectadas con cancrrosis y sin tratamiento químico.
- b) Frutos sin síntomas de quintas infectadas y sin pulverizaciones para control de cancrrosis.
- c) Frutos sin síntomas de quintas con baja infección y con tratamiento químico.
- d) Frutos sin síntomas de quintas con baja infección sin tratamiento químico.

Métodos de recuperación de bacterias.

Lavado. Se colocó cada fruto en un recipiente plástico estéril con 100 ml de agua de canilla estéril, se agitó durante 5 minutos en un vortex y se hicieron diluciones de 1:10. Luego se sembró 0,05 ml del agua de lavado en cajas de petri y se incubó durante 72 horas. Se contaron las colonias y se hicieron los cálculos correspondientes. También se inocularon por infiltración en hojas de plantines de pomelo Duncan para confirmar el número de bacterias patogénicas al compararlas con la curva de titulación de infectividad.

Hisopado. Para probar este método se trabajó con tres frutos sanos de pomelo y tres frutos enfermos, de quintas infectadas sin tratamiento químico. Cada fruto se roció con agua de canilla estéril, con un atomizador hasta chorreado y se dejó reposar 5 minutos. Luego con un hisopo de algodón, humedecido y estéril, se recolectó la suspensión líquida frotando la superficie de cada fruto. Lo colectado se colocó en 1 ml de agua y se agitó en vortex para liberar las bacterias. Luego se hicieron diluciones apropiadas. También en este método se detectó la presencia de Xac mediante siembra en cajas e inoculación por inyección- infiltración.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se determinaron las poblaciones de Xac y de otras bacterias obtenidas luego del lavado por el método de dilución en cajas de petri usando el medio de cultivo ALB+K+EL y el de infiltración en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Cada fruto se lavó en 100 ml de agua estéril.

Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones en diferentes huéspedes.

Cuando se determinó el número total de células de Xac en diferentes lesiones se encontró mayor variabilidad que la obtenida por otros autores. Por ejemplo, Stall et al. (1980) determinaron entre 10^6 y 10^7 células en lesiones en expansión y 10^4 en lesiones que habían pasado el invierno, en hojas de diversas variedades de naranja, pomelo y limón.

Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que en lesiones de frutos de naranja Valencia, pomelo y limón muestreados en quintas sin tratamiento químico para cancrrosis, el número de células de Xac presente en cada lesión fue variable. Mediante inoculación por inyección- infiltración la menor población se encontró en lesiones de naranjas, un promedio de $1,8 \times 10^4$ células de Xac por lesión (Tabla 5-1). La población encontrada en limón y pomelo fue similar con una concentración mayor a 10^6 . Se determinó en lesiones de pomelo desde $7,0 \times 10$ hasta más de $6,25 \times 10^6$ células de Xac por lesión. El 40% de las lesiones de pomelo tenía más de $6,25 \times 10^5$ cel./lesión y el 60% tenía menos o igual a $6,25 \times 10^2$ cel./lesión (Tabla 5-2). En naranja, 60% de las lesiones tenían más o igual a $2,7 \times 10^4$ células y el 40% tenían menos o igual a $3,0 \times 10^3$ (Tabla 5-1). Se halló mayor número de células en lesiones de frutos de limón. El 100 % de las lesiones de limón tuvieron más de $6,25 \times 10^5$ células de Xac por lesión (Tabla 5-3).

El muestreo de lesiones de frutos de naranja la población de Xac varió entre $4,2 \times 10^2$ y $3,2 \times 10^4$ cel/lesión (Tabla 5-1), más bajo que lo esperado según los antecedentes. El muestreo de lesiones de frutos de pomelo dio una población de Xac entre $7,0 \times 10$ y más de $6,25 \times 10^6$ células por lesión (Tabla 5-2), lo que indica que existe variabilidad en el tamaño de la población bacteriana por lesión en esta especie muy susceptible. Algunas lesiones tenían una población muy baja, en contraste con anteriores determinaciones. La cuantificación de la población de Xac en lesiones de limón dio entre más de $6,25 \times 10^5$ y más de $6,25 \times 10^6$ cel/lesión (Tabla 5-3). En esta especie los valores fueron menos variables y la población fue en general alta.

Tabla 5-1. Número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en lesiones de frutos de naranja Valencia estimado mediante la inoculación por inyección-infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestra tomada el 26 mayo 1999.

<u>Lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Nº células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>Nº células Xac/lesión</u> <u>(estimado)</u>
1	27,04 ¹	6,5x10 ³	3,2x10 ⁴
2	23,55	5,5x10 ³	2,8x10 ⁴
3	23,00	5,4x10 ³	2,7x10 ⁴
4	3,28	6,0x10 ²	3,0x10 ³
5	0,54	8,0x10	4,2x10 ²
<u>Media (DE)</u>	<u>15,48 (12,52)</u>	<u>3,6x10³ (3x10³)</u>	<u>1,8x10⁴ (1,5x10⁴)</u>

(1) Promedio de dos lesiones

(2) DE = desviación estandar

Tabla 5-2. Número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en lesiones de frutos de pomelo estimado mediante la inoculación por inyección-infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestra tomada el 26 mayo 1999.

<u>Lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células Xac/lesión</u> <u>(estimado)</u>
1	Confluente 1 ¹	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
2	Confluente 2 ²	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
3	0,11 ³	1,4x10	7,0x10
4	0,78	1,2x10 ²	6,2x10 ²
5	0,29	4,2x10	2,0x10 ²
<u>Media (DE)</u>		<u>2,8x10⁵</u> (5,5x10 ⁵)	<u>1,4x10⁶</u> (2,7x10 ⁶)

(1) = confluente 1: lesiones no individualizadas

(2) = confluente 2: lesiones individualizadas pero tan unidas que impedía contarlas

(3) = promedio de dos lesiones

Tabla 5-3. Número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en lesiones de frutos de limón estimado mediante la inoculación por inyección- infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestra tomada el 26 mayo 1999.

<u>Lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células Xac/lesión</u> <u>(estimado)</u>
1	Confluente 1 ^{1,3}	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
2	Confluente 1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
3	Confluente 2 ²	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
4	Confluente 2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
5	Confluente 1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
<u>Media (DE)</u>		<u>8x10⁵(6,2x10⁵)</u>	<u>4x10⁶(3,1x10⁶)</u>

(1) = confluente 1: lesiones no individualizadas

(2) = confluente 2: lesiones individualizadas pero tan unidas que impedía contarlas

(3) = promedio de dos lesiones

Recuperación de poblaciones bacterianas mediante lavado y otros métodos.

Nivel poblacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* epífitas en hojas cítricas en distintas condiciones. Se determinaron las poblaciones de Xac y de otras bacterias en la superficie de hojas y frutos de diferentes tipos de citrus y en plantas en quintas en distintas condiciones. Se incluyeron hojas con síntomas en todos los muestreos para que sirvan como testigo.

Se detectaron poblaciones de Xac en hojas sanas de pomelo y en hojas sanas de mandarina Murcott por dilución en medio de cultivo semiselectivo y por inoculación en hojas de plantines de pomelo. Las muestras se tomaron en quintas infectadas sin tratamiento químico. La mayor población de Xac se encontró en hojas de pomelo con lesiones, en las cuáles se detectó por dilución en cajas $2,9 \times 10^6$ (promedio) UFC/hoja.

Fue notable la diferencia poblacional de Xac en muestras extraídas en quintas con alta intensidad de cancrrosis y aquellas con baja infección. Cuando se lavaron hojas sanas de quintas con baja infección no se detectó Xac por el método de dilución en tubos y siembra en cajas y solamente por infiltración de hojas de plantines de pomelo se detectaron menos de $1,02 \times 10$ células por hoja. Los resultados obtenidos son similares a los determinados por Timmer et al. (1996), quienes encontraron baja o nula población de Xac en hojas sin lesiones, muestreadas en una quinta con baja infección de cancrrosis.

Los resultados de poblaciones en hojas se corresponden además con los de Blakeman (1991) e Hirano y Upper (1983), quienes sostuvieron que la población de bacterias epífitas puede variar 1000 veces de una hoja a otra, muestreadas en el mismo momento. De acuerdo a los resultados aquí presentados, también en citrus existe una gran diferencia poblacional, superior a 1000 veces, entre hojas individuales.

Poblaciones en hojas de plantas en quintas infectadas y sin tratamiento. Se muestrearon hojas en quintas que no recibieron pulverizaciones para control de cancrrosis y tenían infección.

El lavado de hojas de pomelo con y sin lesiones de quintas infectadas sin tratamiento químico dio en medio Agar Lima Bean (ALB) entre 0 (1 hoja sana) y $6,2 \times 10^4$ colonias de Xac por hoja (en la muestra de 10 hojas enfermas) y entre 0 (1 hoja sana) y $8,4 \times 10^4$ colonias por hoja (10 hojas enfermas) en medio ALB con kasugamicina (ALB+K). El medio con kasugamicina testado previamente permitió detectar Xac en el lavado de 10 hojas sanas. Se encontró alta población de otras bacterias diferentes a Xac en todas las hojas lavadas (Tabla 5-4).

El número de células de Xac patógenas se estimó además mediante la infiltración del agua de lavado de las diferentes muestras en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Del lavado de hojas de pomelo con y sin lesiones (Tabla 5-5) se obtuvieron entre menos de $1,02 \times 10^5$ en 1 hoja sana y $3,0 \times 10^5$ células de Xac por hoja en 10 hojas enfermas (Tabla 5-5).

En otro muestreo, realizado el 16 abril 1999, se determinó nuevamente mediante siembra en caja, el número de UFC de Xac y de otras bacterias en hojas de pomelo, luego del lavado y diluciones apropiadas. Los números variaron entre 0 (1 hoja sana) y $6,2 \times 10^4$ por hoja (10 hojas enfermas) UFC de Xac en medio ALB y entre 0 (1 hoja sana) y $3,9 \times 10^5$ por hoja (10 hojas enfermas) en el medio ALB+K. El agregado de kasugamicina permitió detectar Xac en presencia de gran cantidad de bacterias saprófitas, cuando se lavaron muestras de 10 hojas enfermas (Tabla 5-6). En la infiltración de la muestra del 16 de abril en hojas de plantines de pomelo Duncan se encontró entre 0 (1 hoja sana) y $1,5 \times 10^5$ células/por hoja en el lavado de 10 hojas enfermas (Tabla 5-7).

Tabla 5-4. Número de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con diferentes medios luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo individuales o en muestra de diez hojas, tomada el 11 abril 1999 en quinta enferma sin tratamiento químico.

Muestra	UFC/hoja		UFC de otras bacterias	
	<u>ALB</u>	<u>ALB+K</u>	<u>ALB</u>	<u>ALB+K</u>
1 sana	0	0	$1,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
10 sanas ¹	0	$2,0 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
1 enferma	$8,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$6,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^3$
10 enfermas ¹	$6,2 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

(1) = promedio por hoja

Tabla 5-5. Número de lesiones de cancrrosis que desarrollaron por cm^2 de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de diferentes muestras de hojas de pomelo obtenidas el 11 abril 1999 en quinta enferma sin tratamiento.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células/hoja</u> <u>(estimado)</u>
1 hoja sana	0,038 ²	$<1,02 \times 10$	$<1,02 \times 10^2$
10 hojas sanas ¹	0,085	$<1,1 \times 10$	$<1,1 \times 10^2$
1 hoja enferma	16,73	$3,7 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
10 hojas enfermas ¹	16,67 (1:10)	$3,0 \times 10^3$ (1:10)	$3,0 \times 10^5$

(1) = promedio por hoja

(2) = promedio de dos hojas inoculadas

Tabla 5-6. Número de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con diferentes medios luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo individuales o en muestra de diez hojas; muestra tomada el 15 abril 1999 en quinta enferma sin tratamiento químico.

Muestras	<u>Colonias Xac</u>		<u>Colonias otras bacterias</u>	
	<u>ALB</u>	<u>ALB+K</u>	<u>ALB</u>	<u>ALB+K</u>
1 sana	0	0	$5,4 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
10 sanas ¹	0	0	$4,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$
1 enferma	$8,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$6,4 \times 10^4$	$9,6 \times 10^3$
10 enfermas ¹	$6,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

(1) = promedio por hoja

Tabla 5-7. Número de lesiones de cancrrosis que desarrollaron por cm^2 de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de diferentes muestras de pomelo obtenidas el 15 abril 1999 en quinta enferma sin tratamiento para control de cancrrosis.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> (estimado)	<u>N° células/hoja</u> (estimado)
1 hoja sana	0 ²	0	0
10 hojas sanas ¹	0,28	$4,0 \times 10$	$4,0 \times 10^2$
1 hoja enferma	3,51	$6,6 \times 10^2$	$6,6 \times 10^3$
10 hojas enfermas ¹	58,56	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$

(1) = promedio por hoja

(2) = promedio de dos hojas inoculadas

Al analizar el promedio de las muestras de pomelo (Tabla 5-8), no se detectó Xac en hojas sanas en medio ALB y se encontraron $8,1 \times 10^3$ colonias de Xac en una hoja enferma y $6,2 \times 10^4$ colonias de Xac por hoja en 10 hojas enfermas. Cuando se usó ALB + K se detectaron $1,0 \times 10^2$ por hoja (en el muestreo de 10 hojas sanas), $1,6 \times 10^3$ colonias en una hoja enferma y $2,4 \times 10^5$ por hoja (promedio de 10 hojas enfermas) (Tabla 5-8). Por este método se detectó 100 veces más Xac/hoja cuando se lavaron 10 hojas juntas respecto al lavado de hojas individuales.

En el promedio de estas mismas muestras infiltradas en hojas de plantines de pomelo se encontró menos de $1,02 \times 10$ UFC de Xac (una hoja sana) y $2,6 \times 10^2$ por hoja (10 hojas enfermas). En este método no se observaron diferencias entre el número de Xac recuperadas por lavado de hojas individuales y el lavado de 10 hojas (Tabla 5-9).

Se muestrearon además hojas de mandarina (tangor) Murcott y mandarina satsuma Okitsu. En el lavado se detectaron entre 0 y 2×10 colonias de Xac (1 hoja enferma de Murcott) y en Okitsu no se detectó Xac (Tabla 5-10). Estas mismas muestras se procesaron y se determinó el número de Xac patogénicas mediante el método de inyección-infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan en cámara de cría (Tabla 5-11). Al analizar el promedio de los datos de Tablas 5-10 y 5-11 se notó que en cajas se recuperó mayor número de células de Xac de hojas de Murcott enfermas, mientras que por inoculación en hojas de pomelo se detectó más cantidad en Okitsu (Tabla 5-12).

Tabla 5-8. Número promedio de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con diferentes medios luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo individuales o en muestra de diez en dos muestreos en una quinta enferma sin tratamiento químico.

<u>Muestra</u>	<u>UFC de Xac</u>		<u>UFC otras bacterias</u>	
	<u>ALB</u>	<u>ALB+1 ml K</u>	<u>ALB</u>	<u>ALB+1 ml K</u>
1 sana	0	0	3,5x10 ⁴	3,4x10 ⁴
10 sanas ¹	0	1,0x10 ²	5,3x10 ⁴	5,6x10 ⁴
1 enferma	8,1x10 ³	1,6x10 ³	1,7x10 ⁵	1,8x10 ⁵
10 enfermas ¹	6,2x10 ⁴	2,4x10 ⁵	3,9x10 ⁵	2,5x10 ⁵

(1) = promedio por hoja

Tabla 5-9. Número promedio de lesiones de canchros que desarrollaron por cm² de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de diferentes muestreos de hojas de pomelo obtenidas en una quinta enferma sin tratamiento.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células/hoja</u> <u>(estimado)</u>
1 hoja sana	0,019 ²	<1,02x10	<1,02x10 ²
10 hojas sanas ¹	0,18	2,6x10	2,6x10 ²
1 hoja enferma	10,12	2,2x10 ³	2,2x10 ⁴
10 hojas enfermas ¹	37,56	9,3x10 ³	9,3x10 ⁴

(1) = promedio por hoja

(2) = promedio de dos hojas inoculadas en cada muestra

Tabla 5-10. Número promedio de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con medio ALB+K luego de la siembra del lavado de hojas de mandarina Murcott y satsuma Okitsu, en muestras de hojas individuales o en muestra de diez tomadas el 22 abril 1999 en quinta infectada sin tratamiento químico.

<u>Muestra</u>	<u>Colonias Xac</u>		<u>Colonias otras bacterias</u>	
	<u>Murcott</u>	<u>Okitsu</u>	<u>Murcott</u>	<u>Okitsu</u>
1 hoja enferma r1	0	0	$1,7 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$
1 hoja enferma r2	$2,0 \times 10$	0	$2,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$
10 hojas sanas ¹	0	0	$2,9 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$

(1) = promedio por hoja

Tabla 5-11. Número de lesiones de cancrrosis que desarrollaron por cm^2 de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de diferentes muestras de mandarina Murcott y satsuma Okitsu obtenidas el 22 abril 1999 en una quinta enferma sin tratamiento.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células/hoja</u> <u>(estimado)</u>
1 hoja enferma Murcott r1	5,2 ²	1,02x10 ³	1,02x10 ⁴
1 hoja enferma Murcott r2	0,08	<1,02x10	<1,02x10 ²
1 hoja enferma Okitsu r1	0,68	1,0x10 ²	1,0x10 ³
1 hoja enferma Okitsu r2	2,91	5,4x10 ²	5,4x10 ³
10 hojas sanas Murcott ⁽¹⁾	0,103	1,3x10	1,3x10 ²

(1) = promedio por hoja

(2) = promedio de dos hojas inoculadas

Tabla 5-12. Número promedio de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con medio ALB+K luego de la siembra del lavado de hojas de mandarina Murcott y satsuma Okitsu, en muestras de hojas individuales o en muestra de diez tomadas el 22 abril 1999 en una quinta infectada sin tratamiento químico y número de células de Xac determinadas en estas mismas muestras por infiltración de hojas de pomelo en cámara de cría.

<u>Muestra</u>	<u>Les./cm²</u>		<u>N° cel. Xac/hoja</u>		<u>UFC Xac</u>		<u>UFC otras bacterias</u>	
	<u>Mrt.</u>	<u>Okt.</u>	<u>Mrt.</u>	<u>Okt.</u>	<u>Mrt.</u>	<u>Okt.</u>	<u>Mrt.</u>	<u>Okt.</u>
1 hoja enferma	2,64	1,79	5,5x10 ³	8,0x10 ²	1x10	0	1,9x10 ⁵	1,6x10 ⁴
10 hojas sanas ¹	0,103	SD ²	1,3x10 ²	SD	0	SD	2,9x10 ⁴	8,0x10 ⁴

(1) = promedio por hoja

(2) = SD: sin datos

El 13 de mayo de 1999 se muestrearon nuevamente hojas de pomelo con y sin lesiones de quintas sin tratamiento químico y se obtuvieron células de Xac y otras bacterias, detectadas mediante siembra de diluciones apropiadas en cajas e infiltradas en hojas de plantines de pomelo Duncan en cámara de cría.

El lavado de hojas de pomelo dio 5×10^2 (promedio) UFC de Xac por hoja, en muestras de 5 hojas sanas y $2,4 \times 10^5$ por hoja, en muestras de hojas enfermas, cuando se sembraron en caja (Tabla 5-13). Se encontró una alta población de bacterias saprófitas en todas las hojas.

Las muestras de la Tabla 5-13, luego de procesadas se infiltraron en hojas de plantines de pomelo Duncan en cámara de cría. Por este método se detectaron entre $3,5 \times 10^2$ (promedio), células de Xac por hoja en muestras de 10 hojas sanas y $5,8 \times 10^5$ (promedio), células por hoja en muestras de 5 hojas enfermas (Tabla 5-14 y Fig. 5-1).

Poblaciones en hojas de quintas con baja infección de cancrrosis. En el lavado de hojas de pomelo Duncan, limón Eureka y naranja Valencia, sin lesiones, de quintas con baja infección con tratamiento químico para control de cancrrosis, no se detectó Xac (Tabla 5-15). Se encontró entre $1,0 \times 10^2$ y $4,6 \times 10^4$ colonias de otras bacterias por el método de siembra en caja (Tabla 5-15).

El 15 julio de 1999 se lavaron hojas de pomelo, limón y naranja y se encontró que en cajas de petri con ALB+K no crecieron colonias de Xac en las siembras del agua de lavado de ninguna de las especies y sólo crecieron colonias de otras bacterias en la muestra de naranja Valencia, la que produjo $6,0 \times 10^2$ células por hoja.

Al infiltrar el agua de lavado y las diluciones seriadas en hojas de plantines de pomelo en cámara de cría de las muestras procesadas en las tres fechas muestreadas (15 junio y 15 y 19 julio 1999) se detectó solamente en hojas de pomelo (19 de julio) una baja población de Xac igual a $1,9 \times 10^2$ células/hoja. (Tabla 5-16).

Tabla 5-13. Número de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con medio ALB+K luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo con y sin lesiones, muestra tomada el 13 mayo 1999 en una quinta enferma sin tratamiento químico.

<u>Muestra</u>	<u>Xac</u> UFC ⁽²⁾ /ml	<u>Xac</u> UFC/hoja	<u>Otras</u> UFC/ml	<u>Bacterias</u> UFC/hoja
10 hojas sanas r1 ⁽¹⁾	4,0x10	4,0x10 ²	3,4x10 ³	3,4x10 ⁴
10 hojas sanas r2	6,0x10	6,0x10 ²	2,4x10 ³	2,5x10 ⁴
<u>Media</u>		<u>5,0x10²</u>		<u>2,9x10⁴</u>
5 hojas enfermas r1 ⁽¹⁾	8,2x10 ² (1:10)	1,6x10 ⁵	2,3x10 ⁴ (1:10)	4,6x10 ⁶
5 hojas enfermas r2	1,6x10 ² (1:100)	3,2x10 ⁵	5,6x10 ² (1:100)	1,1x10 ⁶
<u>Media</u>		<u>2,4x10⁵</u>		<u>2,8x10⁶</u>

(1) = Promedio por hoja

(2) =UFC unidades formadoras de colonia

Tabla 5-14. Número de lesiones de cancrrosis que desarrollaron por cm^2 de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de muestras de hojas de pomelo con y sin síntomas obtenidas el 13 mayo 1999 en una quinta infectada sin tratamiento.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° células/hoja</u> <u>(estimado)</u>
10 hojas sanas r1 ⁽¹⁾	0,85 ²	1,3x10 ²	1,3x10 ³
10 hojas sanas r2	0,385	5,6x10	5,6x10 ²
<u>Media</u>			<u>3,5x10²</u>
5 hojas enfermas r1	78,54	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁵
5 hojas enfermas r2	128,0	3,5x10 ⁴	7,5x10 ⁵
<u>Media</u>			<u>5,8x10⁵</u>

(1) = Promedio por hoja

(2) = Promedio de dos hojas inoculadas



Figura 5-1. Lesiones de cancrisis que desarrollaron en hojas de pomelo Duncan luego de infiltradas con una dilución 1:100 de los 100 ml del agua de lavado de cinco hojas de pomelo con síntomas. Muestra del 13 de mayo de 1999.

Tabla 5-15. Número de colonias (=UFC:unidades formadoras de colonias) de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con medio ALB+K luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo, limón Eureka y naranja Valencia sin lesiones, muestra tomada el 15 junio y 19 julio 1999 en una quinta con baja infección de cancrisis y con tratamiento químico para control.

<u>Muestra</u> <u>15 junio 1999</u>	<u>Xac</u>	<u>UFC/ml</u> <u>Otras bacterias</u>	<u>UFC/hoja</u> <u>Otras bacterias</u>
10 hojas sanas pomelo ⁽¹⁾	0	2,6x10 ³	2,6x10 ⁴
10 hojas sanas limón	0	4,6x10 ³	4,6x10 ⁴
10 hojas sanas naranja	0	4,4x10 ³	4,4x10 ⁴
<u>19 julio 1999</u>			
10 hojas sanas pomelo ⁽¹⁾	0	1,8x10 ²	1,8x10 ³
10 hojas sanas limón	0	3,0x10	3,0x10 ²
10 hojas sanas naranja	0	1,0x10	1,0x10 ²

(1) = promedio por hoja

Tabla 5-16. Número de lesiones de cancrrosis que desarrollaron por cm^2 de hoja de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado de hojas de pomelo, limón Eureka y naranja Valencia sin síntomas, obtenidas el 19 julio 1999 en una quinta con baja infección de cancrrosis y con tratamiento químico para control.

<u>Muestra</u>	<u>Lesiones/cm²</u>	<u>N° células/ml</u> (estimado)	<u>N° células/hoja</u> (estimado)
10 hojas sanas pomelo ¹	0,14 ²	1,9x10	1,9x10 ²
10 hojas sanas limón	0	0	0
10 hojas sanas naranja	0	0	0

(1) = Promedio por hoja

(2) = Promedio de dos hojas inoculadas

El promedio de los muestreos del 15 de junio y 15 de julio efectuados en quintas de pomelo, limón y naranja Valencia se evidencia que: en medios semiselectivos, no se detectó Xac, mientras que por infiltración en hojas de Duncan se detectó muy baja población de Xac proveniente de una sola muestra de pomelo (promedio de $1,9 \times 10^2$ células de Xac por hoja). Otras bacterias diferentes de *Xanthomonas* también fueron cuantificadas y se encontraron promedios de $1,4 \times 10^4$ UFC de otras bacterias por hoja en 10 hojas sanas de pomelo; $2,3 \times 10^4$ UFC de otras bacterias por hoja en 10 hojas sanas de limón, y $2,2 \times 10^4$ UFC de otras bacterias por hoja en 10 hojas sanas de naranja en medio ALB+K (Tabla 5-17).

Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en frutos cítricos en distintas condiciones. En el hisopado de frutos de pomelo con y sin lesiones de una quinta infectada sin tratamiento químico, en Agar Lima Bean + Kasugamicina + extracto de levadura (ALB+K+EL) se obtuvieron entre $2,0 \times 10$ y $1,2 \times 10^2$ células de Xac en frutos sanos y entre $2,0 \times 10^3$ y $2,6 \times 10^4$ en frutos enfermos.

Se recuperaron gran cantidad de otras bacterias, lo que dificultó el recuento de las colonias de Xac presentes. Por el método de inoculación por infiltración en hojas de plantines de pomelo no se desarrollaron lesiones a partir del hisopado de frutos sanos y se encontró entre menos de $1,02 \times 10^2$ y $6,9 \times 10^2$ células de Xac en frutos enfermos (Tabla 5-18).

El método de recuperación de células de Xac mediante hisopo de algodón humedecido (Gottwald, 1992) es señalado como eficiente (Timmer et al., 1996) pero no resultó adecuado en este trabajo, probablemente debido a la gran cantidad de otras bacterias presentes que dificultaron el recuento de Xac. Los trabajos de Timmer et al. (1996) se hicieron en otra área ecológica lo que podría tener influencia sobre la población bacteriana epífita de hojas, especialmente de especies saprófitas.

Tabla 5-17. Número promedio de colonias de Xac y otras bacterias que desarrollaron en cajas con medio ALB+K luego de la siembra del lavado de hojas de pomelo, limón Eureka y naranja Valencia sin síntomas, muestras tomadas en quinta con baja infección, el 15 junio y 19 julio 1999, con tratamiento químico y número de células de Xac determinadas en estas mismas muestras por infiltración de hojas de pomelo en cámara de cría.

<u>Muestra</u>	<u>Xac</u> UFC/ml	<u>Les./cm2</u>	<u>Xac</u> N°cél./hoja	<u>Otras</u> UFC/ml	<u>bacterias</u> UFC/hoja
10 hojas sanas pomelo ¹	0	0,14	1,9x10	1,4x10 ³	1,4x10 ⁴
10 hojas sanas limón	0	0	0	2,3x10 ³	2,3x10 ⁴
10 hojas sanas naranja	0	0	0	2,2x10 ³	2,2x10 ⁴

(1) = Promedio por hoja

Tabla 5-18. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron mediante el hisopado de frutos sanos y enfermos de pomelo de quintas enfermas sin tratamiento químico y detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizado el 3 mayo 1999.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml Xac</u> <u>(ALB+K+EL)</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xac/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N° cél.Xac/fruto¹</u> <u>(estimado)</u>
Fruto sano r1	2,0x10	0	0 ²	0
Fruto sano r2	6,0x10	0	0	0
Fruto sano r3	1,2x10 ²	0	0	0
<u>Promedio sanos</u>	<u>6,7x10</u>			<u>0</u>
Fruto enfermo r1	2,0x10 ³	0,46	6,9x10	6,9x10 ³
Fruto enfermo r2	4,0x10 ³	0,10	1,3x10	1,3x10 ³
Fruto enfermo r3	2,6x10 ⁴	0,06	<1,02x10	1,02x10 ³
<u>Promedio enfermo</u>	<u>1,1x10⁴</u>			<u>3,1x10³</u>

(1) Fruto lavado en 100 ml

(2) Promedio de dos hojas inoculadas

Todas las siembras en cajas se hicieron en medio de cultivo ALB+K+EL; el agregado del extracto de levadura (EL) mejoró el recuento al dar colonias de color amarillo más intenso.

Descripción del método desarrollado para el lavado de frutos. Los frutos fueron lavados en 100 ml de agua estéril, colocados en un recipiente nuevo de plástico (Fig. 5.2) y agitados en un vortex. Se sembró 0,05 ml directamente del agua de lavado (dilución 0) y se hicieron diluciones de 1:10 (dilución 1) y de 1:100 (dilución 2). Se contaron las colonias en las cajas de la dilución que permitía una mejor detección y luego se hizo el cálculo para estimar la cantidad de células bacterianas en cada fruto. Ejemplo: si se contó un promedio de dos colonias en las cajas donde se sembró la dilución 2 (1:100) se multiplicó por 100 para expresar la concentración en dilución 0 y luego se multiplicó el resultado por 2000 puesto que se sembró 0,05 ml de los 100 ml del agua de lavado. Se tendría según el ejemplo: $4,0 \times 10^5$ células por fruto.

En todas las tablas en las que aparece el número de lesiones por centímetro cuadrado y obtenido por el método de infiltración en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría los datos son el promedio de la inoculación de dos hojas.

La determinación de células de Xac en hojas y frutos con lesiones de cancrisis en el lavado se hizo como testigo para asegurar la recuperación de las bacterias, si bien ellas podrían provenir de la superficie o del síntoma mismo, lo cual no puede diferenciarse. Los resultados efectivamente buscados fueron aquéllos en hojas y frutos sin síntomas y baja infección.

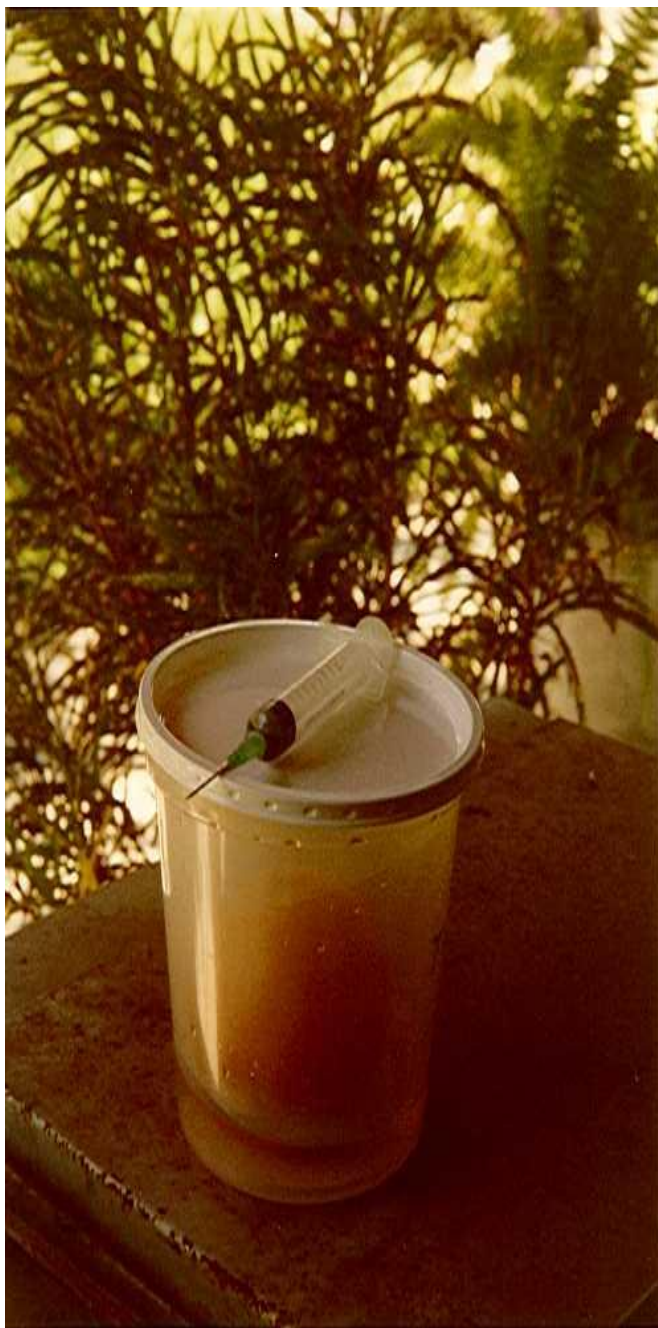


Figura 5-2. Recipiente de plástico con agua estéril donde se lavaron los frutos para obtener las muestras sembradas en medio de cultivo y/o inyectadas en hojas susceptibles, para recuento de células bacterianas.

Poblaciones bacterianas en diferentes tipos de citrus.

Muestreo de frutos en quintas infectadas sin tratamiento químico.

Frutos de pomelo: El lavado de frutos de pomelo sin tratamiento químico con y sin lesiones de quintas infectadas dio en el primer muestreo por el método de dilución en medio semiselectivo entre $1,2 \times 10^7$ UFC/fruto y $2,2 \times 10^8$ en frutos sanos y entre $2,4 \times 10^4$ y $3,0 \times 10^8$ UFC en frutos enfermos (Tabla 5-19a). Por inoculación en hojas de pomelo, entre $4,8 \times 10^5$ y $7,8 \times 10^6$ células de Xac/fruto en frutos sanos (Fig 5-3) y entre $2,5 \times 10^5$ y $1,3 \times 10^6$ en frutos enfermos (Tabla 5-19 a y Fig. 5-4).

En el segundo muestreo en quintas de pomelo (Tabla 5-19b) se detectó por el método de dilución en cajas de petri entre 0 y $4,0 \times 10^4$ UFC/fruto en frutos sanos (Fig 5-5) y entre 0 y $4,0 \times 10^7$ UFC/fruto en frutos enfermos (Fig. 5-6). Por inoculación-inyección de esas muestras procesadas inoculadas en hojas de plantines de pomelo se encontró entre menos de $1,02 \times 10^2$ células de Xac/fruto en frutos sanos y $4,1 \times 10^4$ y $3,2 \times 10^5$ células de Xac/fruto en frutos enfermos.

Frutos de limón. El lavado de frutos de limón con y sin lesiones de quintas infectadas sin tratamiento químico dio entre 0 y $2,0 \times 10^3$ UFC de Xac/fruto, en frutos sanos y entre 0 y $8,0 \times 10^5$ UFC/fruto, en frutos enfermos, por el método de dilución en cajas y entre $2,3 \times 10^4$ y $5,9 \times 10^5$ células de Xac/fruto, en frutos sanos y entre $2,4 \times 10^6$ y $9,8 \times 10^7$ células de Xac/fruto, en frutos enfermos por el método de inoculación-inyección en hojas de plantines de pomelo (Tabla 5-20).

Tabla 5-19a. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos sanos y enfermos de pomelo de quintas enfermas sin tratamiento químico mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizado el 18 mayo 1999.

<u>Muestra</u>	<u>UFC Xac/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél.Xac/ml</u>	<u>N° cél.Xac/fruto¹</u>
	<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>		<u>(estimado)</u>	<u>(estimado)</u>
Fruto sano r1	2,2x10 ⁶	2,2x10 ⁸	108,81 ²	3,0x10 ⁴ ²	3,0x10 ⁶
Fruto sano r2	1,2x10 ⁵	1,2x10 ⁷	20,93	4,8x10 ³	4,8x10 ⁵
Fruto sano r3	SD ³	SD ³	32,52	7,8x10 ³ (1:10)	7,8x10 ⁶
<u>Promedio</u>	<u>1,1x10⁶</u>	<u>1,1x10⁸</u>			<u>3,7x10⁶</u>
Fruto enfermo	DCC ⁴	DCC ⁴	11,71	2,5x10 ³	2,5x10 ⁵
Fruto enfermo	3,0x10 ⁶	3,0x10 ⁸	28,13	6,6x10 ³	6,6x10 ⁵
Fruto enfermo	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁶	51,8	1,3x10 ⁴	1,3x10 ⁶
<u>Promedio</u>	<u>≥1,5x10⁶></u>	<u>≥1,5x10⁸</u>			<u>7,3x10⁵</u>

(1) Fruto lavado en 100 ml

(2) Promedio de dos hojas inoculadas

(3) SD= Sin datos

(4) DCC= Demasiadas colonias de bacterias, no se pudo contar



Figura 5-3. Lesiones de cancrrosis que desarrollaron en hojas de pomelo Duncan luego de infiltradas con el agua de lavado (100 ml) de un fruto sano de pomelo. Muestra del 18 de mayo de 1999.



Figura 5-4. Lesiones de cancrrosis que desarrollaron en hojas de pomelo Duncan mantenidas en cámara de cría luego de infiltradas con el agua de lavado (100 ml) de un fruto enfermo de pomelo. Muestra del 18 de mayo de 1999.

Tabla 5-19b. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos sanos y enfermos de pomelo de quintas enfermas sin tratamiento químico mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizado 27 mayo 1999.

<u>Muestra</u>	<u>UFC Xac/ml</u> <u>En cajas</u>	<u>UFC/fruto</u> <u>En cajas</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N°cél.Xac/ml</u> <u>(estimado)</u>	<u>N°cél.Xac/fruto¹</u> <u>(estimado)</u>
Fruto sano r1	4,0x10 ²	4,0x10 ⁴	0,075 ²	<1,02x10	<1,02x10 ²
Fruto sano r2	0	0	0	0	SD
Fruto sano r3	0	0	0	0	SD
<u>Promedio</u>	<u>1,3x10²</u>	1,3x10 ⁴			<u><0,3x10²</u>
Fruto enfermo	2,2x10 ⁵	2,2x10 ⁵	13,81	3,0x10 ³	3,0x10 ⁵
Fruto enfermo	4,0x10 ⁵	4,0x10 ⁵	14,77	3,2x10 ³	3,2x10 ⁵
Fruto enfermo	0	0	2,26	4,1x10 ²	4,1x10 ⁴
<u>Promedio</u>	<u>2,1x10⁵</u>	<u>2,1x10⁷</u>			<u>2,2x10⁵</u>

(1) Fruto lavado en 100 ml

(2) Promedio de dos hojas inoculadas

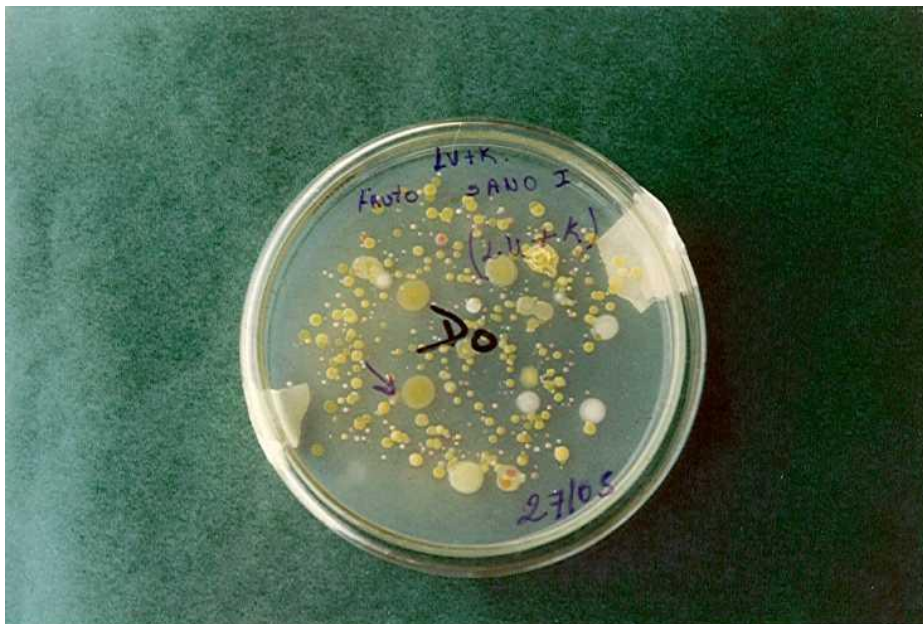


Figura 5-5. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* provenientes de un fruto sano de pomelo por el método de dilución en cajas con medio de cultivo semiselectivo ALB+K+EL. Muestreo realizado el 27 de mayo de 1999.

Tabla 5-20. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de limón con y sin lesiones, de quintas infectadas sin tratamiento químico mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizado el 1 Junio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml</u> <u>En cajas</u>	<u>UFC/fruto</u> <u>En cajas</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél.Xac/fruto</u>
Fruto sano r1	2,0x10	2,0x10 ³	1,37	2,3x10 ²	2,3x10 ⁴
Fruto sano r2	0 ¹	0	25,35	5,9x10 ³	5,9x10 ⁵
Fruto sano r3	0	0	2,51	4,6x10 ²	4,6x10 ⁴
<u>Media</u>	<u>0,7x10</u>	<u>7,0x10²</u>			<u>2,2x10⁵</u>
Fruto enfermo r1	8,0x10 ² (1:10)	8,0x10 ⁵	39,94 (1:100)	9,7x10 ⁵	9,8x10 ⁷
Fruto enfermo r2	0	0	90,81	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁶
Fruto enfermo r3	0	0	11,71 (1:100)	2,5x10 ⁵	2,5x10 ⁷
<u>Media</u>	<u>2,7x10²</u>	<u>2,7x10⁵</u>			<u>4,1x10⁷</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

Frutos de naranja Valencia de quintas con alta infección. La variabilidad en el tamaño de la población de Xac fue muy alta. El lavado de frutos de naranja Valencia con y sin lesiones de quintas infectadas sin tratamiento químico dio por el método de dilución en cajas con medio de cultivo entre 0 y $2,0 \times 10^3$ UFC de Xac por fruto (en frutos sanos) y entre $2,0 \times 10^4$ y $1,0 \times 10^6$ por fruto (en frutos enfermos). Por inoculación del agua de lavado en hojas de pomelo se encontró entre 0 y $1,8 \times 10^3$ células de Xac en frutos sanos y entre menos de $1,02 \times 10^3$ y $1,0 \times 10^6$ células de Xac/fruto en frutos enfermos (Tabla 5-21).

Frutos de naranja Valencia sin lesiones en quintas con baja infección. En el lavado de frutos de naranja Valencia sin lesiones de quintas con baja infección sin tratamientos químicos no se encontraron Xac epífitas. Se hicieron tres muestreos (15 y 18 de junio y 15 de julio de 1999). En cada uno de los muestreos se lavaron tres frutos de naranja y se procesaron de la misma forma que los frutos provenientes de quintas infectadas. No se detectaron Xac epífitas por el método de dilución en cajas de petri del agua de lavado de los frutos en medio de cultivo ALB+K+EL ni tampoco por el método de inyección-infiltración del agua de lavado de esos frutos inoculados en hojas de plantines de pomelo. La población encontrada de otras bacterias fue de $1,1 \times 10^5$ UFC/fruto (promedio).

Frutos de limón de quintas con baja infección. También se lavaron frutos de limón de una quinta con baja infección con tratamiento químico (quinta comercial). Se hicieron dos muestreos (14 y 15 de julio de 1999). No se detectaron Xac epífitas por el método de dilución en cajas de petri ni por inyección –infiltración del agua de lavado de todos los frutos muestreados (tres por muestreo). Se encontró por dilución en cajas de petri $8,1 \times 10^4$ UFC/fruto (promedio) de bacterias saprófitas por fruto.

Tabla 5-21. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de naranja Valencia, con y sin lesiones, de quintas infectadas sin tratamiento químico mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizado el 31 Mayo 1999.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml</u> <u>En cajas</u>	<u>UFC/fruto</u> <u>En cajas</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél. Xac/fruto</u>
Fruto sano r1	0 ¹	0	0	0	0
Fruto sano r2	0	0	20,14	1,8x10	1,8x10 ³
Fruto sano r3	2,0x10	2,0x10 ³	0	0	0
<u>Media</u>	<u>0,7x10</u>	<u>6,7x10²</u>		<u>0,6x10</u>	<u>6,0x10²</u>
Fruto enfermo r1	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁶	41,01	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁶
Fruto enfermo r2	2,0x10 ²	2,0x10 ⁴	0,37 (1:10)	5,4x10 ²	5,4x10 ⁴
Fruto enfermo r3	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁶	0,05	<1,02x10	<1,02x10 ³
<u>Media</u>	<u>6,7x10⁴</u>	<u>6,7x10⁵</u>		<u>3,5x10³</u>	<u>3,5x10⁵</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

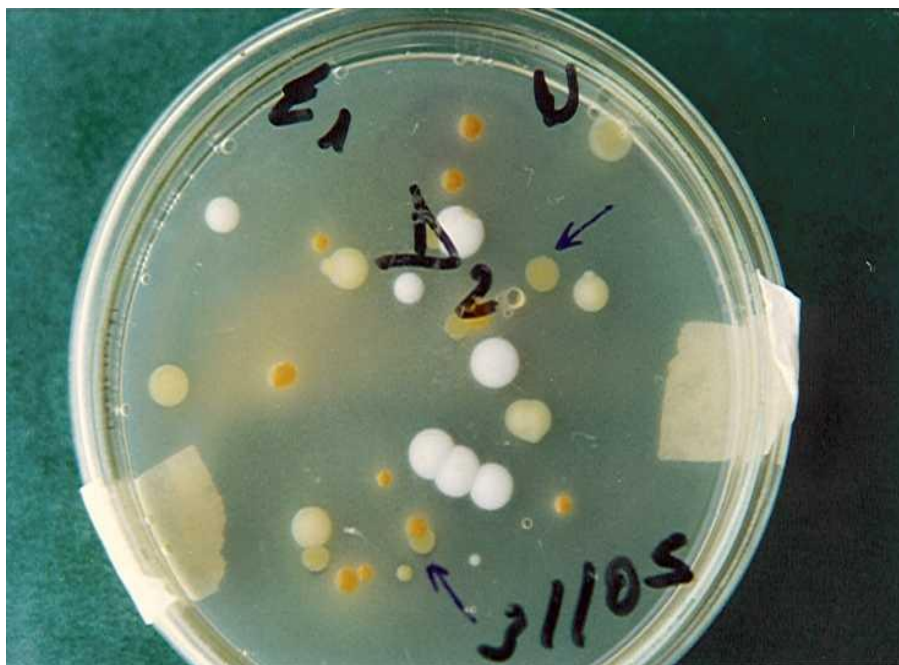


Figura 5-6. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* de un fruto enfermo de naranja Valencia, diluciones en cajas con medio semiselectivo ALB+K+EL. Muestreo realizado el 31 de mayo de 1999.

Eficiencia de los métodos de detección.

Método de medios de cultivo semi-selectivo. Por el método de dilución en cajas con medio de cultivo semiselectivo se encontró la mayor población en frutos de pomelo provenientes de quintas infectadas sin tratamiento químico. Se hicieron dos muestreos en quintas de pomelo. En el primer muestreo (18 de mayo de 1999), se encontró $1,1 \times 10^8$ UFC/fruto (promedio) en frutos sanos y más de $1,5 \times 10^8$ UFC/fruto (promedio) en frutos enfermos (Tabla 5-19a). En el segundo muestreo (27 de mayo de 1999), se encontró $1,3 \times 10^4$ UFC/fruto (promedio) en frutos sanos y $2,1 \times 10^7$ UFC/fruto (promedio) en frutos enfermos (Tabla 5-19b). En quintas de limón Eureka se encontró $6,7 \times 10^2$ UFC/fruto (promedio) en frutos sanos y $2,7 \times 10^5$ UFC/fruto (promedio) en frutos enfermos (Tabla 5-20). En quintas de naranja Valencia se encontró $6,7 \times 10^2$ UFC/fruto (promedio) en frutos sanos y $6,7 \times 10^5$ UFC/fruto (promedio) en frutos enfermos.

Método de infiltración de hojas susceptibles. Por el método de inoculación por inyección-infiltración de las mismas muestras procesadas e inoculadas en hojas de plantines de pomelo se encontró mayor población de Xac en frutos de limón enfermo con $4,2 \times 10^7$ células de Xac/fruto (promedio) y en frutos sanos se encontró $2,2 \times 10^5$ células de Xac/fruto (promedio) (Tabla 5-20). En pomelo se encontró en el primer muestreo (18 de mayo de 1999) una población levemente mayor en frutos sanos que en frutos enfermos con $3,7 \times 10^6$ células de Xac/fruto (promedio) en sanos y en frutos enfermos $7,3 \times 10^5$ células de Xac/fruto (promedio) (Tabla 5-19a). En el segundo muestreo (27 de mayo de 1999), se encontró menos de $0,3 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio) en frutos sanos y $2,2 \times 10^2$ células de Xac/fruto en frutos enfermos (Tabla 5-19b). Fue notable la variación de una fecha a otra, probablemente debido a las condiciones ambientales. En quintas de naranja Valencia se encontró $6,0 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio) en frutos sanos y $3,5 \times 10^5$ células de Xac/fruto en frutos enfermos (Tabla 5-21).

Se encontró entre dos y tres veces más cantidad de población de Xac en frutos enfermos que en frutos sanos en las tres especies de citrus, excepto en el primer muestreo (18 de mayo de 1999) en quintas infectadas de pomelo, donde se encontró casi

igual población en frutos de pomelo sanos y enfermos por el método de dilución en cajas de petri y por el método de inoculación-inyección del agua de lavado de los frutos en hojas de plantines de pomelo, mantenidas en cámara de cría, se encontró mayor población en frutos de pomelo sano que en frutos enfermos (Tabla 5-19a).

Comparación de métodos. Las diferencias de población de Xac determinada por los métodos de dilución en cajas de petri e inoculación en hojas de pomelo se debe posiblemente a la alta cantidad de otras bacterias que impiden una clara detección de Xac en las cajas de petri. Hay trabajos como los de Wakimoto et al. (1986), Ota (1983), Takahiko (1983) que determinaron que la presencia de otras bacterias inhibe el crecimiento y la multiplicación de Xac in vivo e in vitro. Trabajos similares de poblaciones bacterianas se han realizado con otras bacterias causales de enfermedades (Johnson y Stockwell, 1998 y Randhawa y Schaad, 1984).

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran una diferencia poblacional entre frutos provenientes de quintas infectadas sin tratamiento químico en contraste con las frutas muestreadas en quintas con baja infección con y sin tratamiento químico. En quintas con baja infección de cancrrosis no se detectó Xac en fruto sin lesiones en ningún muestreo.

Si se considera que en un estudio hecho sobre sobrevivencia saprofítica de Xac se observó que la cantidad mínima de bacterias para producir infección fue de 10^2 por gramo de muestra (Goto et al., 1978) la probabilidad de que frutos sanos, muestreados en quintas con baja infección sean portadores de la bacteria causal de la cancrrosis es mínima.

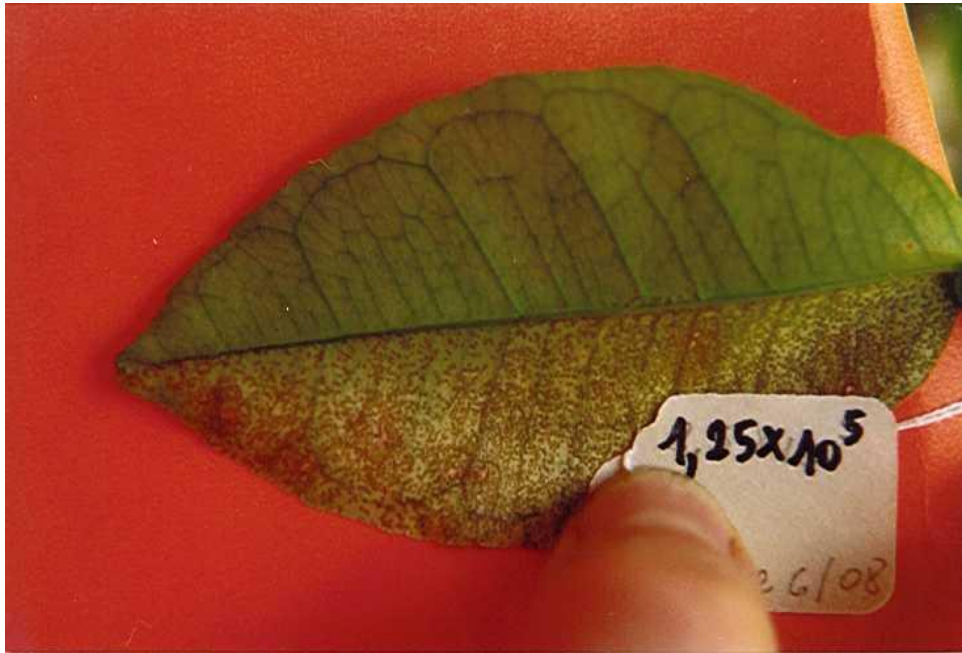


Figura 5-7. Lesiones de cancrrosis que desarrollaron en hojas susceptibles de pomelo Duncan luego de inoculadas por infiltración con una suspensión bacteriana de $1,25 \times 10^5$ células de Xac/ml. (Confluente 2).



Figura 5-8. Lesiones de cancrisis que desarrollaron en hojas susceptibles de pomelo Duncan luego de inoculadas por infiltración con una suspensión bacteriana de $1,25 \times 10^6$ células de Xac/ml . (Confluente 1).

CAPITULO 6

POBLACIONES DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* EN FRUTOS COSECHADOS

INTRODUCCION

Para incrementar el conocimiento que sirve de base para la implementación de los lotes de sanidad controlada de producción de frutos para exportación, es preciso completar la determinación de la dinámica de poblaciones naturales del agente causal de la cancrrosis, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en áreas endémicas y en diferentes condiciones, como frutos procesados y sin procesar, con y sin lesiones como portadores potenciales del patógeno. También es importante conocer las poblaciones de Xac en las lesiones de cancrrosis de esos mismos frutos por ser fuentes primarias de inóculo.

En trabajos preliminares se determinó el número de células viables por lesión en frutos y se halló entre $1,5 \times 10^5$ y $1,4 \times 10^7$ por los métodos de dilución en cajas de petri con agar nutritivo e infiltración de hojas de pomelo Duncan (Stall et al., 1980).

MATERIALES Y METODOS

Muestreo de frutos en galpón de empaque. Se muestrearon y procesaron diversos tipos de citrus en dos galpones de empaque de la zona, que procesan fruta para el mercado interno y sólo realizan la limpieza y encerado sin agregado de ningún otro producto. Las muestras fueron de:

- a) Frutos sin procesar con síntomas de cancrrosis.
- b) Frutos sin procesar sin síntomas de cancrrosis.
- c) Frutos procesados con síntomas de cancrrosis.
- d) Frutos procesados sin síntomas de cancrrosis.

Además se realizó un estudio preliminar de frutos con tratamiento completo en galpón de empaque, muestreados en cajas listas para comercialización.

Determinación del número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones por trituración. Para determinar el número de células de Xac presentes en cada lesión de los tejidos cítricos afectados se trituraron, en cinco mililitros de agua estéril, lesiones de cancrrosis provenientes de frutos y hojas de naranja, limón, pomelo y mandarina, muestreados en quintas enfermas sin tratamientos químicos para control de cancrrosis y de frutos procesados y sin procesar de naranja, pomelo y limón, muestreados en plantas de empaque.

Se determinó el número de células de Xac en cada lesión por el método de inyección-infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría en condiciones controladas, 16 horas de luz, ocho de oscuridad; temperatura constante 28° C. Los datos se compararon con la curva de titulación de infectividad para Xac-lima Key (Naranjo Morera y Canteros (com. pers.)).

Desarrollo del método para lavado de frutos y recuperación de bacterias. Se usó básicamente el mismo método utilizado para el procesado de hojas y frutos muestreados en el campo. Los frutos se lavaron en 100 ml de agua de canilla estéril, se sembró 0,05 ml en cajas que contenían ALB+K+EL (dilución 0) y se hicieron diluciones de 1:10 (dilución 1) y de 1:100 (dilución 2). Se contaron las colonias en la dilución que permitía un mejor reconocimiento y se hizo el cálculo de cantidad de células bacterianas en cada fruto.

En todas las tablas en las que aparece el número de lesiones por centímetro cuadrado obtenido por el método de infiltración-inyección en hojas de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría los datos son el promedio de la inoculación de dos hojas.

Se hizo el lavado de frutos de mandarina Ellendale y naranja Navel, obtenidas de cajas preparadas para comercialización y provenientes de un empaque de Entre Ríos y con tratamientos completos: aditivos de uso permitido, ortofenilfenol, tiabendazol e

imazalil y cera sintética. No se pudo trazar los lotes de donde provenían los frutos, no estaban producidos para exportación pero estaban seleccionados por calidad. No obstante, se observaron algunos frutos con lesiones pequeñas de canchris.

Se lavaron nueve frutos de mandarina Ellendale y nueve frutos de naranja Navel en tres experimentos diferentes (tres frutos por experimento: 6, 7 y 14 Julio 1999). Se determinó las poblaciones de *Xac* y de otras bacterias obtenidas luego del lavado por el método de dilución en cajas de petri usando el medio de cultivo ALB+K+EL y el de infiltración en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Cada fruto se lavó en 100 ml de agua estéril

Concentración por filtración. Para realizar una evaluación preliminar y puesta a punto de este método, utilizado para detectar niveles poblacionales muy bajos, se muestrearon dos frutos de mandarina Ellendale y dos frutos de naranja Navel de las mismas cajas del experimento anterior. Los frutos se lavaron en 50 ml de agua esterilizada cada uno, usando el método descrito más arriba. El agua del lavado de los frutos se filtró través de filtro Sartorius 0,45 micrones de diámetro de poro, adosado a una bomba de vacío para disminuir el tiempo de filtrado.

El filtrado se colocó en un tubo de ensayo con 2 ml de agua de canilla esterilizada. Las bacterias fueron liberadas por agitación en un vortex. Del agua de lavado de cada filtro se hicieron siembras en cajas. A las 72 horas se contó el número de colonias y se hizo el cálculo. Se sembró en ALB+K+EL 0,05 ml del agua de lavado antes de filtrar y a las 72 horas se contó el número de colonias de *Xac* y de otras bacterias. Los valores obtenidos se multiplicaron por 100 pues se sembró 0,05 de los 50 ml del lavado.

Para calcular el número luego del filtrado se sembró 0,05 ml de los 2 ml ($\times 40 =$ en un ml), este número se multiplicó por 50 ml originales = células por ml. También se infiltró en hojas de pomelo Duncan el agua de lavado y luego de 30 días se registró el número de lesiones por cm^2 contado en cada hoja inoculada. Con este valor se estimó el número de bacterias por mililitro contenidas en el agua donde se lavaron los frutos mediante el uso de la curva de titulación de infectividad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Poblaciones en lesiones de frutos cosechados. Frutos de limón. La trituración de lesiones de frutos de limón procesados en 5 ml de agua estéril dio por el método de inoculación-infiltración entre 0 y más de $6,25 \times 10^6$ células de Xac/lesión. Se determinaron $8,5 \times 10^4$ células de Xac/lesión (promedio del número de células de Xac/lesión de todas las lesiones de las tres fechas muestreadas) (Tabla 6-1).

La trituración de lesiones de limón, de frutos sin procesar, en 5 ml de agua estéril dio por el método de inoculación-infiltración entre 0 y $7,8 \times 10^4$ células de Xac /lesión. Se determinaron $6,1 \times 10^3$ células de Xac/lesión (promedio del número de células de Xac/lesión de todas las lesiones de las tres fechas muestreadas) (Tabla 6-2). Las cantidades encontradas son bajas comparadas con lo que podría esperarse.

Frutos de pomelo. La trituración de lesiones de pomelo, de frutos procesados, en 5 ml de agua estéril dio por el método de inoculación-infiltración en hojas de lima Key entre 0 y $> 6,25 \times 10^5$ células de Xac/lesión. Se determinó más de $2,1 \times 10^5$ (promedio del número de células de Xac de todas las lesiones en las tres fechas de muestreo) (Tabla 6-3). También en pomelo se encontró gran variabilidad, con lesiones con concentraciones de Xac no detectables.

La trituración de lesiones de pomelo, de frutos sin procesar, en 5 ml de agua estéril dio por el método de inoculación-infiltración en hojas de lima Key entre 0 y más de $6,25 \times 10^5$ células de Xac/lesión. Se determinó más de $2,1 \times 10^5$ células de Xac/lesión (promedio del número de células de Xac/lesión de todas las lesiones en las tres fechas de muestreo) (Tabla 6-4). Se detectó gran variabilidad en el número de células de Xac por lesión.

Tabla 6-1. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de limón procesados en empaque determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestras realizadas en empaque privado, en Bella Vista, el 18 y 28 junio y 1 julio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	18-6-99	0 ¹	0	0
2		7,43	1,2x10 ³	5,9x10 ³
3		6,72	1,1x10 ³	5,4x10 ³
4		0,12	2,0x10	1,0x10 ²
5		2,66	4,3x10 ²	2,1x10 ³
6		1,6	2,6x10 ²	1,3x10 ³
<u>Media</u>	<u>18-6-99</u>	<u>3,08</u>	<u>4,9x10²</u>	<u>2,5x10³</u>
7	28-6-99	0,34	5,8x10	2,9x10 ²
8		0,16	2,7x10	1,3x10 ²
9		0,19	3,2x10	1,6x10 ²
10		0	0	0
11		0,96	1,6x10 ²	7,9x10 ²
<u>Media</u>	<u>28-6-99</u>	<u>0,33</u>	<u>5,5x10</u>	<u>2,7x10²</u>
12	1-7-99	15,73	2,5x10 ³	1,2x10 ⁴
13		5,0	8,1x10 ²	4,1x10 ³
14		0,13	2,2x10	1,1x10 ²
15		0,065	1,1x10	5,6x10
16		Confl.1 ³	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
<u>Media</u>	<u>1-7-99</u>		<u>2,5x10⁵</u>	<u>2,5x10⁵</u>
<u>Media</u>	<u>3 fechas</u>		<u>8,4x10⁴</u>	<u>8,5x10⁴</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente1= >1,25x10⁶.

Tabla 6-2. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de limón antes de procesar en empaque, determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 18 y 28 junio y 1 julio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	18-6-99	6,27 ¹	1,0x10 ³	5,0x10 ³
2		0	0	0
3		0	0	0
<u>Media</u>	<u>18-6-99</u>		3,3x10 ²	1,7x10 ³
4	28-6-99	0	0	0
5		3,89	6,2x10 ²	3,1x10 ³
6		1,2	2,0x10 ²	10x10 ²
7		0	0	0
8		0	0	0
<u>Media</u>	<u>28-6-99</u>		1,6x10 ²	8,2x10 ²
9	1-7-99	102,0	1,6x10 ⁴	7,8x10 ⁴
10		0	0	0
11		0,13	2,2x10	1,1x10 ²
12		1,03	1,7x10 ²	8,5x10 ²
13		1,16	1,9x10 ²	9,5x10 ²
<u>Media</u>	<u>1-7-99</u>		3,2x10 ³	1,6x10 ⁴
<u>Media</u>	<u>3 fechas</u>		1,2x10 ³	6,1x10 ³

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

Tabla 6-3. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de pomelo procesados en empaque determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 18 y 25 junio y 2 julio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	18-6-99	0 ¹	0	0
2		0,27	4,6x10	2,3x10 ²
3		0,08	1,4x10	6,9x10
4		0	0	0
5		0,13	2,2x10	1,1x10 ²
<u>Media</u>	<u>18-6-99</u>		<u>1,6x10</u>	<u>8,2x10</u>
6	25-6-99	Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
7		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
8		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
9		6,64	1,05x10 ³	5,25x10 ³
10		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
<u>Media</u>	<u>25-6-99</u>		<u>>1,0x10⁵</u>	<u>>5,0x10⁵</u>
11	2-7-99	1,31	2,1x10 ²	1,1x10 ³
12		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
13		63,0	9,8x10 ³	4,9x10 ⁴
14		11,87	1,9x10 ³	9,3x10 ³
15		Confl.2 ³	>1,25x10 ⁵	>1,25x10 ⁵
<u>Media</u>	<u>2-7-99</u>		<u>≥5,2x10⁴</u>	<u>≥1,6x10⁵</u>
<u>Media</u>	<u>3 fechas</u>		<u>≥5,1x10⁴</u>	<u>≥2,2x10⁵</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente 2= >1,25x10⁵.

Tabla 6-4. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de pomelo antes de procesar en empaque determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 18 y 25 junio y 2 julio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	18-6-99	0,68 ¹	1,0x10 ²	5,6x10 ²
2		14,1	2,2x10 ³	1,1x10 ⁴
3		8,3	1,3x10 ³	6,6x10 ³
4		1,397	2,2x10 ²	1,1x10 ²
5		0	0	0
6		20,43	3,2x10 ³	1,6x10 ⁴
<u>Media</u>	<u>18-6-99</u>		<u>1,2x10³</u>	<u>5,7x10³</u>
7	25-6-99	Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
8		Confl.2	>1,25x10 ⁵	<6,25x10 ⁵
9		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
10		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
11		Confl.2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
<u>Media</u>	<u>25-6-99</u>		<u>>1,25x10⁵</u>	<u>>6,25x10⁵</u>
12	2-7-99	0	0	0
13		1,12	1,8x10 ²	9,1x10 ²
14		1,21	2,0x10 ²	10x10 ²
15		2,2	3,5x10 ²	1,8x10 ³
16		0,53	8,7x10	4,4x10 ²
17		0,22	3,7x10	1,9x10 ²
<u>Media</u>	<u>2-7-99</u>		<u>1,4x10²</u>	<u>7,2x10²</u>
<u>Media</u>	<u>3 fechas</u>		<u>>4,2x10⁴</u>	<u>>2,1x10⁵</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente1= >1,25x10⁶.

Frutos de naranja. La trituración de lesiones de naranja Navel de frutos procesados en 5 ml de agua estéril dio por el método de infiltración en hojas de lima Key entre $1,9 \times 10^3$ y más de $6,25 \times 10^5$ cel/lesión. Se determinó más de $2,5 \times 10^5$ cel. De Xac/lesión (promedio) (Tabla 6-5).

La trituración de lesiones de frutos de naranja Navel sin procesar en 5 ml de agua estéril produjeron por el método de inoculación-infiltración entre $1,1 \times 10^2$ y más de $6,25 \times 10^6$ células de Xac/lesión. Se determinaron $6,3 \times 10^5$ (promedio del número de células de Xac/lesión de todas las lesiones de las dos fechas de muestreo) (Tabla 6-6) y alta variabilidad entre lesiones.

La trituración de lesiones de frutos procesados de naranja Hamlin en 5 ml de agua estéril por el método de inoculación-infiltración en hojas de lima key dio entre 0 y más de $6,25 \times 10^6$ células de Xac/lesión. Se determinó $1,9 \times 10^6$ células de Xac/lesión (promedio del número de células de Xac/lesión de las dos fechas de muestreo) (Tabla 6-7). Varias lesiones dieron valores no detectables.

La trituración de lesiones de naranja Hamlin de frutos no procesados en 5 ml de agua estéril dio por el método de inoculación-infiltración en hojas de lima key entre $9,8 \times 10^2$ y más de $6,25 \times 10^6$ células de Xac/lesión. Se determinó más de $2,5 \times 10^6$ células de Xac/lesión (promedio) (Tabla 6-8). Algunas lesiones tenían valores relativamente bajos de Xac.

Tabla 6-5. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de naranja Navel procesados en empaque, determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreo realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 23 junio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	23-6-99	Confl.2 ^{1,3}	$>1,25 \times 10^5$	$>6,25 \times 10^5$
2		3,48	$5,6 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$
3		14,12	$2,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
4		2,33	$3,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
5		Confl.2	$>1,25 \times 10^5$	$>6,25 \times 10^5$
<u>Media</u>	<u>23-6-99</u>		<u>$\geq 5,1 \times 10^4$</u>	<u>$\geq 2,5 \times 10^5$</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente2= $>1,25 \times 10^5$.

Tabla 6-6. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de naranja Navel antes de procesar en empaque, determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 23 y 30 junio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	23-6-99	36,48 ¹	5,6x10 ³	2,8x10 ⁴
2		Confl.1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
3		3,53	5,6x10 ²	2,8x10 ³
4		43,71	6,8x10 ³	3,4x10 ⁴
5		0,13	2,2x10	1,1x10 ²
<u>Media</u>	<u>23-6-99</u>		<u>2,5x10⁵</u>	<u>1,3x10⁶</u>
6		9,27	1,4x10 ³	7,2x10 ³
7		5,75	9,1x10 ²	4,56x10 ³
8		0,67	1,1x10 ²	5,5x10 ²
9		0,75	1,2x10 ²	6,2x10 ²
10		4,0	6,5x10 ²	3,2x10 ³
<u>Media</u>	<u>30-6-99</u>		<u>6,5x10³</u>	<u>3,2x10³</u>
<u>Media</u>	<u>2 fechas</u>		<u>1,3x10⁵</u>	<u>6,3x10⁵</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente1= >1,25x10⁶.

Tabla 6-7. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de naranja Hamlin procesados en empaque, determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 24 y 30 junio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	24-6-99	0,46 ¹	7,8x10	3,9x10 ²
2		0	0	0
3		Confl.1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
4		2,81	4,6x10 ²	2,3x10 ³
5		0	0	0
<u>Media</u>	<u>24-6-99</u>		<u>2,5x10⁵</u>	<u>1,25x10⁶</u>
6	30-6-99	Confl.1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
7		Confl.1	>9,1x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
8		2,13	3,5x10 ²	1,7x10 ³
9		2,55	4,1x10 ²	2,0x10 ³
10		13,62	2,1x10 ³	1,1x10 ⁴
<u>Media</u>	<u>30-6-99</u>		<u>2,1x10⁶</u>	<u>2,5x10⁶</u>
<u>Media</u>	<u>2 fechas</u>		<u>1,2x10⁶</u>	<u>1,9x10⁶</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente1= >1,25x10⁶.

Tabla 6-8. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en lesiones de frutos de naranja Hamlin antes de procesar en empaque, determinadas mediante la infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados en empaque privado, en Bella Vista, el 24 Junio 1999.

<u>Lesión N°</u>	<u>Fecha</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél. Xca/ml²</u>	<u>N° cél. Xca/lesión</u>
1	24-6-99	1,21 ¹	2,0x10 ²	9,8x10 ²
2		5,55	8,8x10 ³	4,4x10 ⁴
3		30,6	4,6x10 ³	2,3x10 ⁴
4		Confl.1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
5		Confl.1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
<u>Media</u>	<u>24-6-99</u>		<u>≥5,0x10⁵</u>	<u>≥2,5x10⁶</u>

(1) Promedio de 2 hojas infiltradas.

(2) Calculada mediante la curva de titulación de infectividad.

(3) Confluyente1= >1,25x10⁶.

El número de células de Xac por lesión obtenidas por trituración fue variable, lo que marca una diferencia con lo encontrado por Stall et al. (1980), que hallaron entre $1,5 \times 10^6$ y $1,4 \times 10^7$ células por lesión en hojas jóvenes.

Se encontró la menor población en frutos de limón sin procesar con $6,1 \times 10^3$ (promedio), células por lesión y en frutos procesados, $8,5 \times 10^4$ (promedio) células por lesión. En pomelo y naranja Navel se halló una cantidad similar de células por lesión, con una concentración promedio mayor del orden de 10^5 . La mayor cantidad de células por lesión se encontró en frutos de naranja Hamlin, con una concentración mayor a 10^6 células por lesión (promedio). Los valores fueron muy variables en todas las especies y cultivares.

Muestreo de frutos en galpón de empaque. Poblaciones de Xac en frutos de diferentes tipos de citrus.

Frutos de limón. El lavado de frutos de limón de una planta de empaque por el método de dilución en cajas de petri dio en frutos sanos procesados 0 colonia de Xac; en frutos sanos sin procesar entre 0 y $1,2 \times 10^4$ UFC/fruto con un promedio de $1,8 \times 10^3$ UFC/fruto. Por el método de inoculación en hojas de pomelo se determinó: en frutos sanos procesados entre 0 y $3,5 \times 10^3$ células de Xac/fruto, $5,1 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio); en frutos sanos sin procesar entre valores no detectables (ND) y $2,2 \times 10^4$ células de Xac/fruto con $3,7 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio) (Tabla 6-9). Los valores fueron muy bajos, con muchos frutos con niveles no detectables.

El lavado de frutos enfermos procesados de limón arrojó por el método de dilución en cajas de petri entre 0 y $4,0 \times 10^4$, con un promedio de $4,4 \times 10^3$ UFC/fruto y en frutos enfermos sin procesar entre 0 y $3,4 \times 10^5$, con un promedio de $3,8 \times 10^4$ UFC/fruto. Por el método de infiltración en hojas de pomelo se encontró en frutos enfermos procesados entre 0 y $3,5 \times 10^5$ con un promedio de $6,9 \times 10^4$ células de Xac/fruto (promedio), y en frutos enfermos sin procesar entre valores no detectables (ND) y $5,0 \times 10^6$, con $9,4 \times 10^5$ células de Xac/fruto (promedio) (Tabla 6-10). Muchos frutos dieron valores no detectables y la variabilidad fue alta.

Tabla 6-9. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de limón sin lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 16 y 28 junio y 1 julio 1999.

<u>Muestras</u>	<u>Fecha</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u> Xac/ml	<u>Cél.</u> Xac/fruto
<u>Frutos sanos</u>		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesado 1	16-6-99	0 ¹	0	0,04	<1,02x10	<1,02x10 ³
Procesado 2		0	0	0	0	0
Procesado 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Procesado 4	28-6-99	0	0	0	0	0
Procesado 5		0	0	0	0	0
Procesado 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Procesado 7	1-7-99	0	0	0,26	3,6x10	3,6x10 ³
Procesado 8		0	0	0	0	ND
Procesado 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
<u>Media</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,03</u>	<u>0,5x10</u>	<u>5,1x10²</u>
Sin procesar 1	16-6-99	2,0x10	2,0x10 ³	0	0	ND
Sin procesar 2		0	0	0	0	ND
Sin procesar 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Sin procesar 4	28-6-99	0	0	0,05	<1,02x10	<1,02x10 ³
Sin procesar 5		0	0	0,5	7,6x10	7,6x10 ³
Sin procesar 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Sin procesar 7	1-7-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 8		1,2x10 ²	1,2x10 ⁴	1,21	2,2x10 ²	2,2x10 ⁴
Sin procesar 9		<u>2,0x10</u>	<u>2,0x10³</u>	<u>0,17</u>	<u>2,3x10</u>	<u>2,3x10³</u>
<u>Media</u>		<u>1,8x10</u>	<u>1,8x10³</u>	<u>0,21</u>	<u>3,7x10</u>	<u>3,7x10³</u>

(1) 0= No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(2) ND= no detectable

Tabla 6-10. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de limón con lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 16 y 28 junio y 1 julio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>Fecha</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél. Xac/fruto</u>
<u>Frutos enfermos</u>		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesado 1	16-6-99	0 ¹	0	0	0	ND ²
Procesado 2		0	0	0,14	1,9x10	1,9x10 ³
Procesado 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 4	28-6-99	0	0	0	0	ND
Procesado 5		0	0	0	0	ND
Procesado 6		<u>4,0x10²</u>	<u>4,0x10⁴</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 7	1-7-99	0	0	2,0(1:10)	3,5x10 ³	3,5x10 ⁵
Procesado 8		0	0	1,2(1:10)	2,0x10 ³	2,0x10 ⁵
Procesado 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,4(1:10)</u>	<u>6,6x10²</u>	<u>6,6x10⁴</u>
<u>Media</u>		<u>4,4x10</u>	<u>4,4x10³</u>		<u>6,9x10²</u>	<u>6,9x10⁴</u>
Sin procesar 1	16-6-99	0	0	0,33(1:10)	5,0x10 ²	5,0x10 ⁴
Sin procesar 2		0	0	0,33(1:10)	4,3x10 ²	4,3x10 ⁴
Sin procesar 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1,5(1:10)</u>	<u>2,6x10³</u>	<u>2,6x10⁵</u>
Sin procesar 4	28-6-99	3,4x10 ³	3,4x10 ⁵	0	0	ND
Sin procesar 5		0	0	4,29	8,2x10 ²	8,2x10 ⁴
Sin procesar 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,03</u>	<u><1,02x10</u>	<u><1,02x10³</u>
Sin procesar 7	1-7-99	0	0	74,29	1,9x10 ⁴	1,9x10 ⁶
Sin procesar 8		0	0	21,94	5,0x10 ⁴	5,0x10 ⁶
Si		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>5,76</u>	<u>1,1x10⁴</u>	<u>1,1x10⁶</u>
<u>Media</u>		<u>3,8x10²</u>	<u>3,8x10⁴</u>		<u>9,4x10³</u>	<u>9,4x10⁵</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(3) ND = no detectable

El lavado de frutos de limón de una planta de empaque por el método de dilución en cajas dio 0 (promedio) UFC de Xac en frutos sanos procesados (promedio); en un fruto sano sin procesar $1,8 \times 10^3$ (promedio) UFC de Xac/fruto; en un fruto enfermo procesado $4,4 \times 10^3$ (promedio) y en un fruto enfermo sin procesar $3,8 \times 10^4$ (promedio) UFC de Xac/ fruto. Por inoculación del agua de lavado de hojas de pomelo se encontró: en un fruto sano procesado $5,1 \times 10^2$ (promedio) células de Xac/fruto; en un fruto sano sin procesar $3,7 \times 10^3$ (promedio); en un fruto enfermo procesado $6,9 \times 10^4$ (promedio) y en un fruto enfermo sin procesar $9,4 \times 10^5$ (promedio) células de Xac/fruto (Tabla 6-11). Los valores fueron bajos en frutos sanos y bajos y medios en frutos enfermos.

Frutos de pomelo. El lavado de frutos de pomelo muestreados en una planta de empaque dio por el método de dilución en cajas de petri en fruto sano procesado 0 (No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias); en un fruto sano sin procesar entre 0 y $2,0 \times 10^3$ UFC de Xac, el promedio de $3,3 \times 10^2$ UFC/fruto. Por el método de inoculación en hojas de pomelo del agua de lavado de los frutos se encontró en un fruto sano procesado entre valores no detectables (ND) y $4,6 \times 10^4$ con un promedio de $5,6 \times 10^3$ células de Xac/fruto. En fruto sano sin procesar se encontró entre valores no detectables (ND) y $8,3 \times 10^5$ con un promedio de $1,4 \times 10^5$ células de Xac/fruto (Tabla 6-12). Los valores encontrados fueron relativamente bajos, incluso en frutos sanos seleccionados de cajones que contenían gran cantidad de frutos con lesiones. El lavado de frutos de pomelo enfermos muestreados en galpón de empaque dio por el método de dilución en cajas de petri en fruto enfermo procesado entre 0 y 5×10^5 , y promedio de $8,2 \times 10^4$ UFC/fruto, y en un fruto enfermo sin procesar entre 0 y 6×10^4 , y promedio de 1×10^4 UFC/fruto.

Tabla 6-11. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de limón con lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Promedios de los muestreos de las tablas 6-9 y 6-10.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/ml</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/fruto</u>
<u>Frutos sanos</u>	<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesados	0 ¹	0	0,03	0,5x10	5,1x10 ²
Sin procesar	1,8x10	1,8x10 ³	0,21	3,7x10	3,7x10 ³
<u>Frutos enfermos</u>					
Procesados	4,4x10	4,4x10 ³	4,1	6,9x10 ²	6,9x10 ⁴
Sin procesar	3,8x10 ²	3,8x10 ⁴	14,24	9,4x10 ³	9,4x10 ⁵

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

Tabla 6-12. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de pomelo sin lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 18 y 25 junio y 2 julio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>Fecha</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u>	<u>Cél.</u>
					<u>Xac/ml</u>	<u>Xac/fruto</u>
<u>Frutos sanos</u>		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesado 1	18-6-99	0 ¹	0	0	0	ND ²
Procesado 2		0	0	0,24	3,4x10	3,4x10 ³
Procesado 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 4	25-6-99	0	0	0	0	ND
Procesado 5		0	0	0,1	1,3x10	1,3x10 ³
Procesado 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>2,57</u>	<u>4,6x10²</u>	<u>4,6x10⁴</u>
Procesado 7	2-7-99	0	0	0	0	ND
Procesado 8		0	0	0	0	ND
Procesado 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
<u>Media</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,32</u>	<u>5,6x10</u>	<u>5,6x10³</u>
Sin procesar 1	25-6-99	0	0	34,44	8,3x10 ³	8,3x10 ⁵
Sin procesar 2		0	0	0	0	ND
Sin procesar 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,07</u>	<u><1,02x10</u>	<u><1,02x10²</u>
Sin procesar 4	2-7-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 5		2,0x10	2,0x10 ³	0	0	ND
Sin procesar 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1,31</u>	<u>2,2x10²</u>	<u>2,2x10⁴</u>
<u>Media</u>		<u>3,3</u>	<u>3,3x10²</u>	<u>5,97</u>	<u>1,4x10³</u>	<u>1,4x10⁵</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(2) ND = no detectable

Por el método de infiltración en hojas de pomelo dio en fruto enfermo procesado entre $1,7 \times 10^3$ y $2,6 \times 10^6$, y el promedio $4,5 \times 10^5$ células de Xac/fruto y en un fruto enfermo sin procesar entre $1,1 \times 10^3$ y $5,2 \times 10^6$ con un promedio de $2,7 \times 10^6$ células de Xac/fruto (Tabla 6-13). Todos los frutos dieron positivo, pero las poblaciones en algunos de ellos fueron muy bajas.

Al analizar el promedio de las tablas 6-12 y 6-13 se puede observar que el lavado de frutos de pomelo dio por el método de dilución en cajas de petri: 0 (No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias) en fruto sano procesado; $3,3 \times 10^2$ UFC/fruto (promedio) en fruto sano sin procesar; $8,2 \times 10^4$ UFC/fruto (promedio) en fruto enfermo procesado y $1,0 \times 10^4$ (promedio) UFC de Xac en fruto enfermo sin procesar. Por el método de inoculación-inyección del agua de lavado de los frutos se encontró $5,6 \times 10^3$ (promedio) células de Xac/fruto en fruto sano procesado; $1,4 \times 10^5$ (promedio) en fruto sano sin procesar; $4,5 \times 10^5$ (promedio) en fruto enfermo procesado y $2,7 \times 10^6$ (promedio) células de Xac/fruto en fruto enfermo sin procesar (Tabla 6-14).

Frutos de naranja. En el lavado de frutos de naranjas tempranas Navel y Hamlin por el método de dilución en cajas de petri no se detectó UFC de Xac. Por inoculación en hojas de pomelo del agua de lavado de los frutos solamente se detectó en dos frutos sanos procesados menos de $1,02 \times 10^3$ células de Xac/fruto (Tabla 6-15).

En el lavado de frutos de naranja Navel enfermos mostrados en galpón de empaque dio por el método de dilución en cajas de petri solamente en fruto enfermo procesado $2,2 \times 10^4$ UFC/fruto de Xac, en las demás muestras no se detectó Xac. Por el método de inoculación-inyección en hojas de pomelo se detectó entre valores no detectables (ND) y $2,9 \times 10^4$ células de Xac por fruto, con un promedio por fruto de menos de $4,3 \times 10^3$ y en frutos enfermos sin procesar se encontró entre valores no detectables (ND) y $7,8 \times 10^3$, promedio menos de $2,0 \times 10^3$ células de Xac/fruto (Tabla 6-16). La variabilidad fue alta, en muchos frutos no se detectaron células de Xac.

Tabla 6-13. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de pomelo con lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 18 y 25 junio y 2 julio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>Fecha</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u> Xac/ml	<u>Cél.</u> Xac/fruto
<u>Frutos enfermos</u>		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesado 1	18-6-99	0 ¹	0	0,3	4,3x10	4,3x10 ³
Procesado 2		1,2x10 ³	1,2x10 ⁵	98,96	2,6x10 ⁴	2,6x10 ⁶
Procesado 3		0	0	0,13	1,7x10	1,7x10 ³
Procesado 4	25-6-99	5,0x10 ³	5,0x10 ⁵	34,19	8,1x10 ³	8,1x10 ⁵
Procesado 5		0	0	0,18	2,4x10	2,4x10 ³
Procesado 6		1,2x10 ³	1,2x10 ⁵	0,51	7,8x10	7,8x10 ³
Procesado 7	2-7-99	0	0	13,83	3,0x10 ³	3,0x10 ⁵
Procesado 8		0	0	11,42	2,4x10 ³	2,4x10 ⁵
Procesado 9		0	0	2,98	5,5x10 ²	5,5x10 ⁴
<u>Media</u>		<u>8,2x10²</u>	<u>8,2x10⁴</u>	<u>18,05</u>	<u>4,5x10³</u>	<u>4,5x10⁵</u>
Sin procesar 1	25-6-99	6,0x10 ²	6,0x10 ⁴	67,37	1,8x10 ⁴	1,8x10 ⁶
Sin procesar 2		0	0	46,75(1:10)	1,2x10 ⁵	1,2x10 ⁷
Sin procesar 3		0	0	69,05	1,8x10 ⁴	1,8x10 ⁶
Sin procesar 4	2-7-99	0	0	0,095	1,1x10	1,1x10 ³
Sin procesar 5		0	0	22,63	5,2x10 ³	5,2x10 ⁶
Sin procesar 6		0	0	1,76(1:10)	3,0x10 ³	3,0x10 ⁵
<u>Media</u>		<u>1,0x10²</u>	<u>1,0x10⁴</u>		<u>2,7x10⁴</u>	<u>2,7x10⁶</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

Tabla 6-14. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de pomelo con y sin lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Promedios de los muestreos de las tablas 6-12 y 6-13.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/ml</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/fruto</u>
<u>Frutos sanos</u>	<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesados	0 ¹	0	0,32	5,6x10	5,6x10 ³
Sin procesar	0,3x10	3,3x10 ²	5,97	1,4x10 ³	1,4x10 ⁵
<u>Frutos enfermos</u>					
Procesados	8,2x10 ²	8,2x10 ⁴	16,05	4,5x10 ³	4,5x10 ⁵
Sin procesar	1,0x10 ²	1,0x10 ⁴		2,7x10 ⁴	2,7x10 ⁶

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

Tabla 6-15. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de naranjas tempranas Navel y Hamlin sin lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 22, 24 y 30 junio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>Fecha- variedad</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u>	<u>Cél.</u>
		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>		Xac/ml	Xac/fruto
<u>Frutos sanos</u>						
Procesado 1	22-6-99	0 ¹	0	0	0	ND ²
Procesado 2	Navel	0	0	0,05	<1,02x10	<1,02x10 ³
Procesado 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,06</u>	<u><1,02x10</u>	<u><1,02x10³</u>
Procesado 4	24-6-99	0	0	0	0	ND
Procesado 5	Hamlin	0	0	0	0	ND
Procesado 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 7	30-6-99	0	0	0	0	ND
Procesado 8	Navel	0	0	0	0	ND
Procesado 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
<u>Media</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,012</u>	<u><0,23x10</u>	<u><0,23x10³</u>
Sin procesar 1	22-6-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 2	Navel	0	0	0	0	ND
Sin procesar 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Sin procesar 4	24-6-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 5	Hamlin	0	0	0	0	ND
Sin procesar 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Sin procesar 7	30-6-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 8	Navel	0	0	0	0	ND
Sin procesar 9		0	0	0	0	ND
<u>Media</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(2) ND = no detectable

Tabla 6-16. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de naranjas tempranas Navel y Hamlin con lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreos realizados el 22, 24 y 30 junio 1999.

<u>Muestra</u>	<u>Fecha- variedad</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél.</u>	<u>Cél.</u>
		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>		<u>Xac/ml</u>	<u>Xac/fruto</u>
<u>Frutos enfermos</u>		<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesado 1	22-6-99	0 ¹	0	0	0	ND ²
Procesado 2	Navel	0	0	0,07	<1,02x10	<1,02x10 ³
Procesado 3		<u>2,2x10²</u>	<u>2,2x10⁴</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 4	24-6-99	0	0	1,70	2,9x10 ²	2,9x10 ⁴
Procesado 5	Hamlin	0	0	0	0	ND
Procesado 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Procesado 7	30-6-99	0	0	0	0	ND
Procesado 8	Navel	0	0	0,57	8,9x10	8,9x10 ³
Procesado 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
<u>Media</u>		<u>2,4x10</u>	<u>2,4x10³</u>	<u>0,26</u>	<u><4,3x10</u>	<u><4,3x10³</u>
Sin procesar 1	22-6-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 2	Navel	0	0	0,51	7,8x10	7,8x10 ³
Sin procesar 3		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,07</u>	<u><1,02x10</u>	<u><1,02x10³</u>
Sin procesar 4	24-6-99	0	0	0	0	ND
Sin procesar 5	Hamlin	0	0	0	0	ND
Sin procesar 6		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
Sin procesar 7	30-6-99	0	0	0,066	<1,02x10	<1,02x10
Sin procesar 8	Navel	0	0	0	0	ND
Sin procesar 9		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>ND</u>
<u>Media</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0,07</u>	<u><2,0x10</u>	<u><2,0x10³</u>

(1) 0 = No colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(4) ND se distinguió = no detectable

El lavado de frutos de naranja con y sin lesiones, procesados y sin procesar de una planta de empaque dio por el método de dilución en cajas de petri no detectable (ND) UFC de Xac en frutos sanos y $2,4 \times 10^3$ UFC de Xac (promedio) en fruto enfermo procesado. No se detectó UFC de Xac en fruto enfermo sin procesar. Por el método de inoculación en hojas de plantines de pomelo se detectó baja cantidad de células/fruto en fruto sano procesado, menos de $0,2 \times 10^3$ cel. de Xac/fruto. No se detectó en frutos sanos sin procesar, se detectó $4,3 \times 10^3$ células de Xac (promedio) por fruto enfermo procesado y $2,0 \times 10^3$ (promedio) células de Xac en fruto enfermo sin procesar. (Tabla 6-17). Los valores también fueron variables en ésta especie.

Poblaciones de Xac en diferentes frutos. La población encontrada en frutos por lavado fue en todas las especies, inferior en frutos sin lesiones. Comparando las tres especies probadas, pomelo, limón y naranja, la menor población se encontró en frutos de naranja debido presumiblemente a la menor susceptibilidad relativa de esta especie a la cancrrosis. Por el método de dilución en cajas de petri solo se detectó en frutos de naranja procesados con lesiones con $2,4 \times 10^3$ UFC/fruto .

Al analizar todas las determinaciones en su conjunto se encontró que la población de Xac en frutos muestreados en galpón de empaque fue muy variable, probablemente debido a que los frutos provenían de quintas que podían estar más o menos infectadas. Por el método de dilución en medio semiselectivo se encontró que la menor población de Xac correspondió a frutos de naranja, en el 100 % de los frutos sanos procesados y sin procesar y enfermos sin procesar no se encontró Xac.

Tabla 6-17. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se obtuvieron del lavado de frutos de naranjas tempranas Navel y Hamlin con y sin lesiones, antes de procesar y procesados en empaque privado en Bella Vista, mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Promedios de los muestreos de las tablas 6-15 y 6-16.

<u>Muestra</u>	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/fruto</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél. Xac/fruto</u>
<u>Frutos sanos</u>	<u>En cajas</u>	<u>En cajas</u>			
Procesados	0 ¹	0	0,012	<0,2x10	<0,2x10 ³
Sin procesar	0	0	0	0	ND
<u>Frutos enfermos</u>					
Procesados	2,4x10	2,4x10 ³	0,26	4,3x10	4,3x10 ³
Sin procesar	0	0	0,07	2,0x10	2,0x10 ³

(1) 0 = No se distinguieron colonias de Xac, pero sí confluentes de otras bacterias.

(2) ND = no detectable

Poblaciones bacterianas en frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale procesados para comercialización. El trabajo preliminar con frutos obtenidos de empaque con procesado y adición de fungicidas se realizó con una muestra obtenida de Entre Ríos. Cuando se lavaron frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale con tratamiento de cera y fungicidas no se detectó Xac por el método de dilución en caja. Sin embargo se encontró alta población de otras bacterias saprófitas, las que posiblemente dificultaron el crecimiento de Xac. Cuando el agua de lavado se inoculó en hojas de pomelo se detectó en frutos de naranja Navel $1,2 \times 10^5$ células de Xac/fruto (promedio) y menos de $0,1 \times 10^2$ células/fruto (promedio) en mandarina Ellendale.

En fruto de naranja Navel, en medio de cultivo, se encontró un promedio de $5,2 \times 10^5$ UFC de otras bacterias en los tres muestreos. Por inoculación en hojas de pomelo del agua de lavado de los frutos se detectó en el primer experimento (6 julio 1999) $3,7 \times 10^5$ células de Xac (promedio) por fruto. En el segundo y tercer experimento (7 y 14 de julio) no se detectó Xac. Al evaluar los tres experimentos se encontró $1,2 \times 10^5$ células de Xac por fruto (promedio) (Tabla 6-18).

No se pudo detectar Xac en frutos de mandarina Ellendale por el método de dilución en medio de cultivo. Hubo una alta población de otras bacterias con $8,5 \times 10^5$ UFC/ml (promedio de los tres experimentos). Por inoculación-inyección en hojas de pomelo del agua de lavado de los frutos se detectó una baja población de Xac por fruto, menos de $0,1 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio de las tres fechas de muestreo) (Tabla 6-19).

Concentración de la población bacteriana por lavado y filtración. Se tomaron otras muestras de las mismas cajas con frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale para proceder al posterior filtrado del agua de lavado. Cada fruto se lavó en 50 ml de agua de canilla estéril, se sembró 0,05 ml del agua de lavado y se hizo una dilución de 1/10. Se contó el número de colonias, se hizo el cálculo para dilución 0, y se multiplicó por 1000, ya que se sembró 0,05 ml de 50 ml de agua de lavado.

Tabla 6-18. Poblaciones de Xac y de otras bacterias obtenidas luego del lavado de frutos de naranja Navel tratados en empaque para comercialización y determinadas mediante dilución en cajas y por infiltración de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría.

<u>Muestra</u> <u>(fecha)</u>	<u>UFC/ml</u> <u>otras bact.</u> <u>En cajas</u>	<u>UFC/ml</u> <u>Xac</u> <u>En cajas</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/fruto</u>
6-Jul-99					
Fruto 1	1,2x10 ⁶	NSP ¹	55,35	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁶
Fruto 2	3,0x10 ⁴	NSP	4,1	7,8x10 ²	7,8x10 ⁴
Fruto 3	0	0	0	0	0
<u>Media</u>	<u>3,6x10⁵</u>	<u>NSP</u>	<u>19,8</u>	<u>3,7x10³</u>	<u>3,7x10⁵</u>
7-Jul-99					
Fruto 1	2,0x10 ³	NSP	0	0	0
Fruto 2	4,0x10 ⁴	NSP	0	0	0
Fruto 3	0	0	0	0	0
<u>Media</u>	<u>1,4x10⁴</u>	<u>NSP</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
14-Jul-99					
Fruto 1	1,9x10 ⁶	NSP	0	0	0
Fruto 2	8,8x10 ⁵	NSP	0	0	0
Fruto 3	8,2x10 ⁵	NSP	0	0	0
<u>Media</u>	<u>1,2x10⁶</u>	<u>NSP</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>Media</u>	<u>5,2x10⁵</u>	<u>NSP</u>	<u>6,6</u>	<u>1,2x10³</u>	<u>1,2x10⁵</u>

(3 fechas)

(1) NSP = No se pudo contar, demasiadas colonias de diferentes bacterias.

Tabla 6-19. Poblaciones de Xac y de otras bacterias obtenidas luego del lavado de frutos de mandarina Ellendale tratados en empaque para comercialización y determinadas mediante dilución en cajas y por infiltración de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría.

<u>Muestra</u> <u>(fecha)</u>	<u>UFC/ml</u> <u>otras bact.</u> <u>En cajas</u>	<u>UFC/ml</u> <u>Xac</u> <u>En cajas</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél.</u> <u>Xac/fruto</u>
6-Jul-99					
Fruto 1	0	0	0	0	0
Fruto 2	2,0x10 ³	NSP ¹	0,075	<1,02x10	<1,0x10 ²
Fruto 3	2,8x10 ⁵	NSP	0	0	0
<u>Media</u>	<u>9,5x10⁴</u>	<u>NSP</u>	<u>0,025</u>	<u><0,3x10</u>	<u>0,3x10²</u>
7-Jul-99					
Fruto 1	4,0x10 ³	NSP	0	0	0
Fruto 2	1,2x10 ⁴	NSP	0	0	0
Fruto 3	0	0	0,037	<1,02x10	<1,02x10 ²
<u>Media</u>	<u>5,3x10³</u>	<u>NSP</u>	<u>0,012</u>	<u><0,3x10</u>	<u><0,3x10²</u>
14-Jul-99					
Fruto 1	4,0x10 ⁶	NSP	0	0	
Fruto 2	NSP	NSP	0	0	
Fruto 3	9,4x10 ⁵	NSP	0	0	
<u>Media</u>	<u>2,5x10⁶</u>	<u>NSP</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	
<u>Media 3</u> fechas	<u>8,5x10⁵</u>	<u>NSP</u>	<u>0,012</u>	<u><0,1x10</u>	<u><0,1x10²</u>

(1) NSP = No se pudo contar, demasiadas colonias de diferentes bacterias.

No se detectaron poblaciones de Xac luego del lavado de frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale cuando se sembraron en medio semiselectivo ALB+K+EL, pero sí se detectaron 2×10^2 UFC (promedio) de otras bacterias por fruto de naranja Navel y 3×10 UFC (promedio) de otras bacterias por fruto de mandarina Ellendale (Tabla 6-20).

Concentración por filtrado. Para mejorar el nivel de detección se procedió a la concentración por filtrado de las muestras obtenidas. Se filtró el agua de lavado de los frutos que figuran en la Tabla 6-20 con un filtro bacteriológico Sartorius, diámetro de poro 0,45 micrones y aparato de filtrado con bomba de vacío. Luego se lavó por agitación el filtro en dos mililitros de agua y se hizo una dilución de 1/10, se determinó la cantidad de Xac y de bacterias saprófitas por el método de dilución en medio de cultivo ALB+K+EL y también se determinó la cantidad de Xac por inoculación-infiltración del agua de lavado en hojas de pomelo.

Cuando se filtró el agua de lavado de los frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale no se detectó Xac por el método de dilución en medio de cultivo pero se recuperó mayor cantidad de otras bacterias. Mediante inoculación- infiltración en hojas de pomelo se determinó entre 0 y menos de $5,1 \times 10^2$ y menos de $2,6 \times 10^2$ células de Xac/fruto (promedio) en naranja Navel y entre 0 y $3,4 \times 10^4$ y $1,9 \times 10^4$ células de Xac/fruto (promedio) en mandarina Ellendale (Tabla 6-21). La concentración por filtración del agua de lavado mejoró el nivel de detección de Xac por el método de inoculación inyección .

Es preciso aclarar que estos frutos no provenían de lotes de sanidad controlada. Si bien fueron seleccionados como frutos sanos, luego de una inspección exhaustiva de todos los frutos se encontraron frutos con lesiones en la caja. Probablemente los frutos fueron cosechados en quintas con infección y se trataron de seleccionar los frutos aparentemente sanos.

Tabla 6-20: Poblaciones de Xac y de otras bacterias obtenidas luego del lavado de frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale con aplicación de fungicidas en empaque determinadas mediante dilución en cajas, 21 de julio de 1999.

Medio ALB+K+EL	UFC/fruto Xac	UFC/fruto Otras bacterias
Navel fruto 1	0	5,0x10
Navel fruto 2	0	3,5x10 ²
<u>Media</u>	0	<u>2,0x10²</u>
Ellendale fruto 1	0	5,0x10
Ellendale fruto 2	0	1,0x10
<u>Media</u>	0	<u>3,0x10</u>

Tabla 6-21: Poblaciones de Xac y de otras bacterias luego del lavado y concentración por filtrado del agua de lavado de frutos de naranja Navel y mandarina Ellendale con tratamiento de fungicidas en empaque determinados mediante dilución en cajas e inoculación-infiltración en hojas de plantines de pomelo.

Medio ALB+K+EL.	UFC/fruto Xac	UFC/fruto otras bacterias	Les./cm ²	Nºcél./ml	Nº cél./fruto
Navel fruto 1	0	9,0x10 ³	0	0	0
Navel fruto 2	0	4,0x10 ³	0.065	<1,02x10	<5,1x10 ²
<u>Media</u>	<u>0</u>		<u><5,1x10</u>	<u>6,6x10³</u>	<u><2,6x10²</u>
Ellen fruto 1	0	8,0x10 ²	4	7,8x10 ²	3,4x10 ⁴
Ellen. Fruto 2	0	3,0x10 ³	0	0	0
<u>Media</u>	<u>0</u>	<u>1,9x10³</u>		<u>3,4x10²</u>	<u>1,9x10⁴</u>

CAPITULO 7

POBLACIONES DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* EN DESECHOS DE FRUTOS CITRICOS PROCESADOS

INTRODUCCION

Los desechos de las plantas procesadoras de frutos de citrus para la elaboración de jugos (fábricas de jugo) que están instaladas en la rivera de los ríos en el Litoral Argentino son descargados a estas fuentes de agua sin tratamiento previo. Las reglamentaciones preparadas para el Plan Nacional de Sanidad Citríco (Canteros, 1977) indican que los desechos de las fábricas de provincias con Planes de Lucha deben ser eliminados en una forma eficiente, si la fruta es traída de otras provincias o países sin planes de control en vigencia. Con el tiempo también se podrá exigir el tratamiento de todos los desechos (especialmente cáscara) aún aquellos originados en la misma zona.

Un destino adecuado para estos desechos es la preparación de “pellets” para exportación para alimento del ganado, pero cuando las plantas preparadoras de “pellets” se hallan muy alejadas no resulta económico el traslado del material (Canteros, com. pers.).

Se impone, por lo tanto, desarrollar un método para asegurar que los desechos orgánicos (especialmente cáscara), que son residuos de las fábricas de jugo no sean portadores de la bacteria causal de la cancrrosis evitando su diseminación.

No se han encontrado referencias sobre la forma de eliminar las bacterias patógenas en desechos de vegetales que son industrializados. Luego de la reaparición de *Xanthomonas* en citrus, en Florida (EE.UU.), desde 1984 en adelante se planteó la controversia sobre las restricciones cuarentenarias tanto en el terreno de la industria como en el de los organismos reguladores y científicos (Graham y Gottwald, 1991). En Florida, los empaques debían comprometerse a tratar toda la fruta con desinfectantes

para cumplir con los requerimientos del programa de cuarentena, los desinfectantes usados fueron hipoclorito de sodio y una formulación de ortofenilfenol al 16 % (SOPP) (Gottwald y Graham, 1991). En el caso del SOPP se demostró que tenía acción bactericida (Canteros y Miller, com. pers.).

Este trabajo se inició para cuantificar las poblaciones de Xac en los desechos de fábricas de jugo y realizar ensayos preliminares de diversos tratamientos para lograr su eliminación o la disminución significativa de las poblaciones.

MATERIALES Y METODOS

Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* en cáscaras de naranja Valencia obtenidas del campo.

Se obtuvieron muestras de frutos de naranja Valencia con síntomas de cancrrosis de una quinta, puesto que no se consiguieron muestras de fábrica de esta importante variedad para la extracción de jugo.

Se pesaron 50 gramos de cáscara de naranja Valencia y se trituraron en un mortero. Algunas muestras además de trituradas fueron licuadas. Se agregó 100 ml de agua estéril. Se determinó la cantidad de Xac por los métodos de dilución en medio semiselectivo ALB+K+EL y por inoculación en hojas de pomelo, antes y después de concentración por filtrado. Las cáscaras de naranja Valencia fueron expuestas a diversos tratamientos:

a- Se pesó 50 g de cáscara y se trituró con un mortero, se agregó 100 ml de agua de canilla estéril y se agitó en agitador vortex.

b- Algunas muestras además de trituradas fueron licuadas. Una muestra sin licuar se trituró y el agua de lavado se filtró con filtro bacteriológico de 0,45 micrones.

Población de Xac en desechos de fábrica de jugos cítricos y tratamientos con distintos productos.

Se determinó el número de células de Xac en lesiones de cáscaras partidas por el medio, de frutos de limón y pomelo, luego de procesados para extracción de jugo. También se determinó el número de Xac en el mismo material pero con un grado mayor de trituración.

Cada lesión se trituró en un mililitro de agua estéril y se le agregó cuatro mililitros de agua. Del material más picado se pesó 50 g y se trituró primero en un mortero, se agregó 100 ml de agua de canilla estéril y se procesó con una licuadora eléctrica, hasta homogeneizar. También se trabajó con muestras de 50 gramos que sólo se trituraron con mortero sin licuarlas.

Se determinó el número de Xac en cada lesión y en el material más picado por el método de dilución en medio semiselectivo e inoculación-inyección en hojas de lima Key.

Los tratamientos que se probaron para eliminar las bacterias fueron: aplicación de HCl y ortofenilfenol al 5 %. El primer tratamiento consistió en agregar gotas de ácido clorhídrico (HCl), al material triturado con esto se bajó el pH de 6,0 a pH 3,0. La muestra tratada se dejó reposar y se sembraron las cajas a las 2 y las 24 horas.

El segundo tratamiento consistió en agregar ortofenilfenol al 5%. Se procedió como en el tratamiento anterior. El efecto de la desinfección se determinó por el método de dilución en medio de cultivo e inoculación en hojas de plantines de pomelo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Población de *Xantomonas axonopodis* pv *citri* en cáscaras de naranja Valencia.

No se detectaron células de Xac en material triturado sin licuar. Sí se encontraron entre 0 y $5,3 \times 10^5$ UFC de Xac/ml en muestras trituradas y licuadas y $2,6 \times 10^5$ en una muestra que fue triturada, licuada y filtrada y cuantificada por el método de dilución en medio de cultivo (Tabla 7-1).

Por el método de inoculación-infiltración se detectaron entre $7,5 \times 10$ y $2,6 \times 10^3$ células de Xac/ml en las cáscaras de Valencia que fueron trituradas con mortero, el promedio fue de $8,8 \times 10^2$ células de Xac/ml (promedio de tres muestras). En los demás tratamientos no se detectó Xac (Tabla 7-1).

Población de Xac en desechos de fábrica de jugos cítricos y eliminación con distintos productos.

Población de Xac en lesión de cáscara de limón. El número de células de Xac que se encontró en cada lesión fue variable. Por el método de dilución en medio de cultivo semiselectivo ALB+K+EL se encontraron entre 0 hasta $3,4 \times 10^5$ UFC por lesión y el promedio fue $5,7 \times 10^4$ UFC por lesión.

Por inoculación en hojas de lima Key se encontró entre $2,1 \times 10^2$ y hasta más de $6,3 \times 10^6$ células por lesión (promedio de $5,9 \times 10^5$ células por lesión) (Tabla 7-2).

Algunos valores fueron bajos, menos de lo esperado, pero similares a las determinaciones realizadas en fruta entera cosechada.

Poblaciones de Xac en material picado de cáscara de limón. Por el método de dilución en medio semiselectivo ALB+K+EL se encontró entre $4,0 \times 10^3$ y $1,7 \times 10^5$ UFC/gramo y el promedio fue de $5,0 \times 10^4$ UFC/gramo. Por el método de inoculación en hojas de pomelo se encontraron entre 0 y $4,2 \times 10^2$ células/gramo y $1,6 \times 10^2$ de células/gramo (promedio) (Tabla 7-3).

Tabla 7-1. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en cáscaras de frutos de naranja Valencia con lesiones, muestreados en quinta sin control, licuadas y sin licuar, determinadas en cajas de petri con medio ALB+K+EL. Muestreos realizados el 28 octubre 1999.

Cajas con medio ALB+K+EL

<u>Muestra</u>	<u>UFC Xca/ml</u> <u>T¹</u>	<u>UFC Xac/ml</u> <u>TL²</u>	<u>UFC Xca/ml</u> <u>TLF³</u>
Fruto 1	0	5,3x10 ⁵	2,6x10 ⁵
Fruto 2	0	2,4x10 ⁴	SD ⁴
Fruto 3	0	0	0
<u>Media</u>	<u>0</u>	<u>1,7x10⁵</u>	

Inoculación de plantines

	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>	<u>Cél. Xac/ml</u>
Fruto 1	7,5x10	0	0
Fruto 2	2,6x10 ³	0	0
Fruto 3	0	0	0
<u>Media</u>	<u>8,8x10²</u>	0	0

(1) T= Triturada

(2) TL= Triturada y licuada

(3) TLF= Triturada y filtrada

Tabla 7-2. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en lesiones de canchosis obtenidas de cáscaras de limón luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas mediante detección en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plántines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 3 agosto 1999.

Muestras	En cajas		En plántines		
	<u>Lesión N°.</u>	<u>UFC/ lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél./ml</u>	<u>N° cél./lesión</u>
1		3,7x10 ⁴	Confl 2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
2		3,4x10 ⁵	Confl 1	>1,25x10 ⁶	>6,25x10 ⁶
3		1,3x10 ⁴	12,75	2,0x10 ³	10x10 ³
4		6,0x10 ⁴	42,37	6,6x10 ³	3,3x10 ⁴
5		1,7x10 ⁴	0,88	1,4x10 ²	7,2x10 ²
6		1,0x10 ³	2,7	4,4x10 ²	2,2x10 ³
7		1,0x10 ³	0,33	5,4x10	2,7x10 ²
8		3,0x10 ³	59,33	9,1x10 ³	4,6x10 ⁴
9		2,0x10 ³	Confl 2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
10		3,1x10 ⁵	Confl 2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
11		1,0x10 ³	4,98	7,9x10 ²	4,0x10 ³
12		5,5x10 ⁴	Confl 2	>1,25x10 ⁵	>6,25x10 ⁵
13		2,0x10 ⁴	0,25	4,3x10	2,1x10 ²
14		1,0x10	0,32	5,3x10 ³	2,7x10 ²
15		0	16,5	2,6x10 ³	1,3x10 ⁴
<u>Media (DE) ¹</u>		<u>5,7x10⁴</u> (1,1x10 ⁵)		<u>1,2x10⁵</u> (3,2x10 ⁵)	<u>5,9x10⁵</u> (1,6x10 ⁶)

(1) DE = Desviación estándar

Tabla 7-3. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en 50 gramos de cáscara de limón picada, luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas mediante detección en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 9 agosto 1999.

<u>Muestra.</u>	En cajas		<u>N° les./cm²</u>	En plantines	
	<u>N° cél./ml</u>	<u>N^acél./gramo</u>		<u>N°cél./ml</u>	<u>N° cél./gramo</u>
1	2,0x10 ³	4,0x10 ³	0	0	0
2	7,0x10 ⁴	1,4x10 ⁵	0,18	2,5x10	5,0x10
3	2,0x10 ³	4,0x10 ³	1,27	2,1x10 ²	4,2x10 ²
<u>Media</u>	<u>2,5x10⁴</u>	<u>5,0x10⁴</u>		<u>7,9x10</u>	<u>1,6x10²</u>
(DE)	(4,0x10 ⁴)	(8,0x10 ⁴)		(1,2x10 ²)	(2,3x10 ²)

Población de Xac en lesiones de cáscaras de pomelo provenientes de Chaco. El número de Xac presente en cada lesión fue variable. Se encontró menor número de células de Xac en lesiones de cáscaras de pomelo que de limón. Por el método de dilución en cajas de petri dio entre 0 y 2×10^4 UFC/lesión y el promedio fue $8,2 \times 10^3$ UFC/lesión. Por el método de inoculación-infiltración en hojas de lima Key se encontró entre 0 y $2,3 \times 10^2$ células de Xac/lesión y el promedio $7,6 \times 10^2$ células/ lesión (Tabla 7-4).

Población de Xac en cáscara picada de pomelo. No se detectó Xac en la dilución 0 (sin diluir). Por el método de dilución en cajas de petri se encontró entre 0 y $4,8 \times 10^4$ UFC/g en la dilución 1:10. Por el método de inoculación en hojas de pomelo se encontró entre $2,3 \times 10^3$ y $4,5 \times 10^3$ células de Xac/g en la dilución 1:10 (Tabla 7-5).

Población de Xac en lesiones de cáscara de pomelo de Chajarí (Entre Ríos). El número de Xac en cada lesión fue variable y bajo. Se encontró por el método de dilución en cajas de petri entre 0 y $7,1 \times 10^3$ UFC/lesión y el promedio $1,2 \times 10^3$ UFC/lesión. Por el método de inoculación en hojas de lima Key se encontró entre 0 y $1,1 \times 10^3$ células de Xac/lesión y el promedio de $2,0 \times 10^2$ células/lesión (Tabla 7-6).

Población de Xac en cáscara picada de pomelo. Por el método de dilución en cajas de petri se detectó casi igual número de colonias de Xac en la dilución 0 y en la dilución 1:10. Por el método de inoculación en hojas de pomelo no se detectó Xac en la dilución 0. En la dilución 1:10 se encontró entre $1,7 \times 10$ y $1,6 \times 10^2$, es decir muy baja población (Tabla 7-7). Se sembró en medio de cultivo y se inoculó en plantas de pomelo la dilución 0 (sin diluir) y la dilución 1:10.

Tabla 7-4. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en lesiones de canchros obtenidas de cáscaras de pomelo, procedente de Chaco, luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas en cajas con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 17 agosto 1999.

<u>Lesión No.</u>	En cajas		En Plantines	
	<u>UFC/lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél./ml</u>	<u>N° cél./lesión</u>
1	3,0x10 ³	2,63	4,3x10 ²	2,1x10 ³
2	1,4x10 ⁴	0,05	<1,02x10	<5,1x10
3	1,4x10 ⁴	0,29	4,8x10	2,4x10 ²
4	9,0x10 ³	1,59	2,6x10 ²	1,3x10 ³
5	2,0x10 ⁴	0,2	3,4x10	1,7x10 ²
6	0	2,88	4,7x10 ²	2,3x10 ³
7	5,0x10 ³	0	0	0
8	4,0x10 ³	1,33	2,1x10 ²	1,1x10 ³
9	7,0x10 ³	0,74	1,2x10 ²	6,0x10 ²
10	SD ¹	1,25	2,0x10 ²	1,0x10 ³
11	SD	0,69	1,1x10 ²	5,7x10 ²
12	1,4x10 ⁴	0,68	1,1x10 ²	5,6x10 ²
13	SD	0,37	6,2x10	3,1x10 ²
14	SD	1,20	1,9x10 ²	9,7x10 ²
15	0	0,22	3,7x10	1,9x10 ²
<u>Media</u>	<u>8,2x10³</u>	<u>0,94</u>	<u>1,5x10²</u>	<u>7,6x10²</u>
(DE)	(6,57x10 ³)	(0,88)	(1,43x10 ²)	(7,14x10 ²)

(1) SD = Sin datos, cajas contaminadas

Tabla 7-5. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en 50 gramos de cáscara picada de pomelo, luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 9 agosto 1999.

<u>Muestra.</u>	En cajas ¹		N° les./cm ²	En plantines	
	<u>UFC/ml</u>	<u>UFC/g</u>		<u>N°cél./ml</u>	<u>N° cél./gramo</u>
1	2,4x10 ⁴	4,8x10 ⁴	10,81 ²	2,2x10 ³	4,4x10 ³
2	0	0	10,50	2,3x10 ³	4,5x10 ³
3	0	0	5,79	1,2x10 ³	2,3x10 ³
<u>Media</u>	<u>8,0x10³</u>	<u>1,6x10⁴</u>		<u>1,9x10³</u>	<u>3,7x10³</u>
DE	(1,4x10 ⁴)	(2,8x10 ⁴)		(6,2x10 ²)	(1,2x10 ³)

-
- (1) En cajas, determinada en la dilución (1:10), sin diluir no se pudo contar
 (2) En plantines, infiltrada dilución 1:10, sin diluir no dio lesiones
 (3) Desviación estándar

Tabla 7-6. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en lesiones de cancrrosis obtenidas de cáscaras de pomelo, procedente de Chajarí (Entre Ríos), luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas mediante detección por siembra en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de lima Key mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 18 agosto 1999.

<u>Lesión No.</u>	En cajas		En plantines	
	<u>UFC/ lesión</u>	<u>Les./cm²</u>	<u>N° cél./ml</u>	<u>N° cél./lesión</u>
1	1,1x10 ³	0,43	7,2x10	3,6x10 ²
2	0	0	0	0
3	8,0x10 ²	0,83	1,3x10 ²	6,7x10 ²
4	7,0x10 ³	0,12	2,0x10	1,0x10 ²
5	0	0,025	<1,02x10	<5,1x10
6	3,0x10 ²	0,19	3,2x10	1,6x10 ²
7	0	0	0	0
8	1,1x10 ³	1,85	1,4x10 ²	6,9x10 ²
9	0	0,24	4,1x10	2,0x10 ²
10	1,0x10 ²	0,16	2,7x10	1,3x10 ²
11	1,0x10 ²	1,40	2,3x10 ²	1,1x10 ³
12	0	0	0	0
13	7,1x10 ³	0,14	2,4x10	1,2x10 ²
14	0	0	0	0
15	2,0x10 ²	0,5	8,3x10	4,2x10 ²
<u>Media</u>	<u>1,2x10³</u>	<u>0,39</u>	<u>5,4x10</u>	<u>2,0x10²</u>
(DE)	(2,41x10 ³)	(0,56)	(6,67x10)	(2,3x10 ²)

Tabla 7-7. Poblaciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, en 50 gramos de cáscara de pomelo picada, luego de procesadas para extracción de jugo, determinadas en caja con medio ALB+K+EL e inoculación por infiltración de hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Muestreo del 19 agosto 1999.

<u>Muestra.</u>	En cajas ¹	En plantines		
	<u>N° cél./ml</u>	<u>N° les./cm²</u>	<u>N°cél./ml</u>	<u>N° cél./gramo</u>
1	4,0x10 ⁴	0,13 ²	1,7x10	3,4x10
2	4,0x10 ³	0,17	2,3x10	4,6x10
3	1,8x10 ⁴	0,98	1,6x10 ²	3,2x10 ²
<u>Media</u>	<u>2,1x10⁴</u>		<u>6,6x10</u>	<u>1,3x10²</u>
(DE)	(1,8x10 ⁴)		(8,0x10)	(1,6x10 ²)

(1) En cajas, determinada en la dilución 1:10, sin diluir no se pudo contar.

(2) En plantines, infiltrada dilución 1:10, sin diluir no dio lesiones

Población de Xac en desecho de fábrica de frutas de Chajarí, Concordia (Entre Ríos), Monte Caseros y Mocoretá (Corrientes). Se analizaron 12 muestras de muestras de cáscaras de limón, 6 muestras de cáscaras de naranja y 3 muestras de cáscaras de pomelo. Los muestreos se realizaron el 27 de septiembre, 4, 13, 15, 18, 22 y 26 de octubre de 1999.

Se tomaron 50 gramos de muestra, se trituró en mortero y se licuó con licuadora eléctrica. Se agregó 100 ml de agua estéril. No se detectó Xac por el método de dilución en cajas con medio ALB+K+EL ni con el método de inoculación en hojas de pomelo.

Experimentos para eliminación de Xac con ácido clorídrico (HCl) y ortofenilfenol.

Se determinó la presencia de Xac y de bacterias saprófitas por el método de dilución en medio de cultivo semiselectivo e inoculación- infiltración de hojas de pomelo. Se trabajó con la dilución 0 (sin diluir) y la dilución 1:10: No se detectó Xac en ninguna muestra lo que impidió evaluar el efecto de los tratamientos con HCl y ortofenilfenol para la eliminación de Xac.

Ensayos de eliminación de Xac con HCl. Por el método de dilución en cajas de petri se detectó gran cantidad de bacterias saprófitas. La dilución 0 (sin diluir) resultó tóxica a las hojas de pomelo inoculadas. Aunque la toxicidad fue más acentuada en las muestras tratadas con ácido clorhídrico, la muestra testigo también fue tóxica. Se podría inferir que la toxicidad es debida en parte a la presencia de los jugos de la misma cáscara del fruto cuando se trituró y no se diluyó.

Muestras tratadas con ácido clorhídrico. No se detectó células de Xac en ningún tratamiento. Se detectó entre $8,2 \times 10^5$ y muchas colonias que no se pudieron contar (DCC) UFC/gramo de muestra de otras bacterias en la primer fecha de muestreo (27 septiembre 1999) por el método de dilución en medio de cultivo. Se detectó entre $4,2 \times 10^5$ y DCC UFC/gramo de muestra de otras bacterias en la segunda fecha (29 septiembre 1999) (Tabla 7-8).

Tabla 7-8 . Número de células de Xac y de otras bacterias que crecieron en cajas luego del tratamiento HCL. Muestras 27 de septiembre de 1999 y 29 de septiembre de 1999.

Tratamientos	Fecha	UFC/ml	UFC/ml	UFC/g
	27-09-99	Xac	Saprófitas	Saprófitas
Testigo		0	1.1x10 ⁶	2,2x10 ⁶
Con HCl (siembra: 2 horas)		0	4.1x10 ⁵	8,2x10 ⁵
Con HCl (siembra: 24 horas)		0	DCC ¹	DCC
Con HCl (siembra: 24 horas)		0	DCC	DCC
	29-09-99			
Testigo			DCC	DCC
Con HCl (siembra: 2 horas)		0	2.1x10 ⁵	4,2x10 ⁵
Con HCl (siembra: 24 horas)		0	1.1x10 ⁶	2,2x10 ⁶
Con HCl (siembra: 24 horas)		0	D.C.C.	D.C.C.

(1) DCC= Demasiadas colonias de bacterias, no se puede contar

Ensayos de eliminación con ortofenilfenol al 5%. Por el método de dilución en cajas de petri se detectaron menor cantidad de otras bacterias en las muestras tratadas con ortofenilfenol al 5% que las muestras tratadas con HCl. Por el método de inoculación en hojas de pomelo se vio al igual que las muestras tratadas con HCl toxicidad en las hojas inoculadas con la dilución 0.

En las muestras tratadas con ortofenilfenol al 5 % no se detectaron células de Xac en ninguna muestra. Se encontraron por el método de dilución en medio de cultivo entre 0 y $8,0 \times 10^3$ UFC/g de otras bacterias en la primer fecha de muestreo (28 septiembre 1999) y entre 0 y $4,0 \times 10^4$ UFC/g de otras bacterias en la segunda fecha de muestreo (1 octubre 1999). No se detectaron otras bacterias 24 horas después de que las muestras fueron tratadas con ortofenilfenol en la segunda fecha de muestreo (Tabla 7-9).

Tabla 7-9. Número de células de Xac y de otras bacterias que crecieron en cajas luego del tratamiento con ortofenilfenol al 5%. Muestra 28 de septiembre de 1999.

Tratamientos	Fecha	UFC/ml	UFC/ml	UFC/g
	28-09-99	Xac	Saprófitas	Saprófitas
Testigo		0	4,0x10 ³	8,0x10 ³
Con OFF ¹ (siembra: 2 horas)		0	3,0x10 ³	6,0x10 ³
Con OFF (siembra: 24 horas)		0	4,0x10 ³	8,0x10 ³
Con OFF (siembra: 24 horas)		0	0	0
	01-10-99			
Testigo			2,0x10 ⁴	4,0x10 ⁴
Con OFF (siembra: 2 horas)		0	2,0x10 ⁴	4,0x10 ⁴
Con OFF (siembra: 24 horas)		0	0	0
Con OFF (siembra: 24 horas)		0	0	0

(1) OFF= ortofenilfenol.

CAPITULO 8

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

Se desarrollaron métodos y se estudiaron los niveles poblacionales de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en plantas u órganos sanos y en plantas u órganos enfermos con síntomas y se determinó el potencial de la fruta en diferentes condiciones como portadora de la bacteria causal de la cancrrosis.

Se desarrollaron medios semiselectivos para cuantificación de Xac en las muestras. Se determinó presencia y se cuantificaron otras bacterias en lesiones y como epífitas en hojas y frutos. Se registraron los niveles poblacionales de Xac en hojas y frutos con y sin síntomas de cancrrosis, muestreados en lotes afectados y con baja infección, con y sin tratamiento químico, y obtenidos en galpón de empaque sin procesar y procesados y en cajas preparadas para su comercialización. Se determinó la población de Xac en lesiones obtenidas de frutos en distintas condiciones como fuente primaria de inóculo y en material de desechos de fábrica de jugo. Se recolectaron las bacterias mediante lavado y concentración por filtrado.

Se detectó Xac en hojas sanas de pomelo, de quinta muy infectada, por dilución en caja de petri y por inoculación en hojas de pomelo y en hojas sanas de mandarina Murcott, muestreadas en quintas infectadas sin tratamiento químico. La mayor población de Xac, probablemente epífitas o residentes, se encontró en hojas de pomelo con lesiones, aunque no se puede separar de las bacterias que podrían fluir desde las lesiones mismas. La inclusión de hojas y frutos enfermos, con síntomas, como testigos en todos los experimentos permitió además determinar cuáles eran estas poblaciones.

Fue notable la diferencia poblacional de Xac en muestras extraídas en quintas infectadas y en quintas con baja infección. Cuando se lavaron hojas sanas de quintas con baja infección no se detectó Xac por el método de dilución en tubos y siembra en cajas en ninguna especie de citrus. Se detectó solamente en hojas de pomelo por infiltración de hojas de plantines de pomelo menos de $1,02 \times 10$ células por hoja, nivel

poblacional no importante para producir infecciones salvo excepcionales condiciones ambientales. Los resultados obtenidos comprueban que puede detectarse baja o nula población de Xac en hojas sin lesiones, muestreadas en una quinta con baja infección.

De acuerdo a los resultados aquí presentados, también en citrus existe una gran diferencia poblacional, superior a 1000 veces, entre hojas individuales. Las poblaciones epífitas en hojas fueron claramente superiores en hojas muestreadas en quintas infectadas sin tratamiento químico.

Por el método de lavado de frutos se detectó la mayor población de Xac en frutos provenientes de quintas infectadas sin tratamiento químico. La mayor población por el método de dilución en cajas con medio semi-selectivo se encontró en frutos de pomelo con síntomas. También fue relativamente alta en algunas ocasiones la población en frutos de pomelo sin síntomas, obtenidos de plantas enfermas. El promedio fue de $5,0 \times 10^5$ células por fruto. Por el método de infiltración de hojas de pomelo la mayor población se encontró en limón con un promedio de $6,7 \times 10^5$ células de Xac por fruto. En fruto sano de limón se encontró $2,19 \times 10^3$. La diferencia de población detectada por los métodos de dilución en medios de cultivo e inoculación en hojas de pomelo se debe posiblemente a la cantidad de otras bacterias que impiden una clara detección de Xac en cajas de petri. En frutos sanos extraídos de quintas con baja infección con y sin tratamiento químico de control no se detectó Xac por ningún método y en ninguna de las muestras.

La población de Xac en frutos muestreados en galpón de empaque fue variable. Estos frutos provenían de diversas quintas de la zona y estaban destinados al consumo local, el procesado consistía sólo de lavado y encerado. La menor población se encontró en naranja y la mayor en pomelo. El número de células bacterianas por lesión en frutos fue variable. La mayor cantidad se encontró en frutos de limón muestreados en quintas infectadas sin tratamiento químico donde el 100 % de las lesiones tenían mas de $1,25 \times 10^5$ cel de Xac/lesión. En lesiones de frutos muestreados en galpón de empaque se encontró mayor cantidad en frutos de pomelo. La población de Xac en desechos de fábrica de jugos de cítricos fue variable, en general muy baja. En muchas muestras no se

detectó Xac.

El número de células de Xac por lesión obtenidas por trituración fue muy variable en la mayoría de los casos estudiados. Se encontró la menor población en frutos de limón sin procesar con $6,1 \times 10^3$ (promedio), células por lesión y en frutos procesados, $8,5 \times 10^4$ (promedio) células por lesión. En pomelo y naranja Navel se halló una cantidad similar de células por lesión, con una concentración promedio mayor de 10^5 . La mayor cantidad de células por lesión se encontró en frutos de naranja Hamlin, con una concentración mayor a 10^6 (promedio) células por lesión. Los valores fueron muy variables en todas las especies y cultivares.

La población encontrada en frutos por lavado fue en todas las especies inferior en frutos sin lesiones y comparando las tres especies testadas, pomelo, limón y naranja, la menor población se encontró en frutos de naranja debido presumiblemente a la menor susceptibilidad relativa de esta especie a la cancrrosis. Por el método de dilución en cajas de petri solo se detectó en frutos de naranja con lesiones, procesados, con $2,4 \times 10^3$ UFC/fruto.

En limón no se detectó Xac en frutos procesados sin lesiones y se detectó $1,8 \times 10^3$ (promedio) UFC/fruto, en frutos sin lesiones, sin procesar. En frutos de limón procesados con lesiones se detectó $4,4 \times 10^3$ UFC/fruto (promedio) y en frutos con lesiones, sin procesar se halló $3,8 \times 10^4$ UFC/fruto (promedio).

En frutos de limón con lesiones se halló en frutos procesados $8,2 \times 10^4$ UFC/fruto (promedio) y en frutos sin procesar $1,0 \times 10^4$ UFC/fruto, es decir, no hubo diferencia poblacional entre frutos con lesiones procesados y sin procesar.

En limón se detectó en frutos procesados con lesiones $5,1 \times 10^2$ UFC/fruto y en frutos sin procesar $3,7 \times 10^3$, no se halló diferencia entre frutos procesados y sin procesar (promedio). En pomelo no se detectó, igual que limón, en frutos procesados sin lesiones y sí se detectó $3,3 \times 10^2$ en frutos sin lesiones, sin procesar. En pomelo se encontró en frutos procesados sin lesiones $5,6 \times 10^3$ UFC/fruto y en frutos sin procesar $1,4 \times 10^5$

UFC/fruto en frutos con lesiones se encontró en frutos procesados $4,5 \times 10^5$ UFC/fruto y en frutos sin procesar $2,7 \times 10^6$ UFC/fruto. Se encontró en pomelo la mayor población en coincidencia con la mayor susceptibilidad del fruto de pomelo a la cancrrosis.

Por el método de inoculación–inyección en hojas de plantines de pomelo también se encontró menor población de Xac en frutos de naranja, se hallaron en frutos sanos procesados, menos de $0,2 \times 10^3$ células por lesión y en fruto con lesiones procesados $4,3 \times 10^3$ cel./fruto (promedio) y en frutos sin procesar se encontró $1,1 \times 10^3$ células/fruto (promedio).

Se estudiaron las poblaciones de Xac en desechos de plantas procesadoras de fruta para jugo (fábrica de jugo). El número de células de Xac que se encontró en cada lesión fue variable, las muestras de limón generalmente tenían más bacterias por lesión que las de pomelo.

Algunos valores fueron bajos, menos de lo esperado, pero similares a las determinaciones realizadas en fruta entera cosechada.

De este trabajo iniciado para desarrollar métodos de detección y determinar los niveles poblacionales de Xac en plantas u órganos sanos y en plantas u órganos enfermos con síntomas para dilucidar el potencial de la fruta, obtenida en diferentes sistemas, como portadora de la bacteria causal de la cancrrosis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El medio semiselectivo agar lima bean adicionado con cicloheximida, kasugamicina y extracto de levadura fue adecuado para cuantificar las poblaciones de Xac en condiciones naturales y eliminó la mayoría de los hongos y bacterias saprófitas.
- La infiltración de las muestras en hojas susceptibles de pomelo Duncan y lima Key mantenidos en cámara de cría permitió cuantificar las poblaciones patógenas de Xac y la eliminación de otras bacterias presentes, mediante la

comparación con la curva de la relación número de células de Xac y número de lesiones desarrolladas por centímetro cuadrado de hoja inoculada.

- La mayor población de Xac se obtuvo en hojas testigo de pomelo con lesiones, sin embargo, aún en esas muestras la variabilidad fue alta. Se encontró diferencia poblacional de Xac en muestras de hojas sanas extraídas en quintas muy infectadas, comparadas con aquellas obtenidas de quintas con baja infección. Los resultados obtenidos permiten inferir que es muy baja o no detectable la población de Xac en hojas sin lesiones, en quinta con baja infección. En plantas de citrus existe una gran diferencia poblacional, superior a 1000 veces, entre hojas individuales, tomadas de un mismo árbol. No se hicieron determinaciones en lotes sin síntomas.
- En muestreos de frutos se detectó la mayor población de Xac en aquellos provenientes de quintas infectadas sin tratamiento químico. La mayor población se obtuvo de frutos testigo de pomelo con síntomas. Fue relativamente alta la población en frutos de pomelo y limón sin síntomas, obtenidos de plantas con alta infección y sin tratamiento. La población en naranja en esas condiciones fue baja.
- La diferencia de población detectada en medios semiselectivo e infiltración de hojas de pomelo se debe posiblemente a la cantidad de otras bacterias que impiden la detección de Xac en las cajas.
- En frutos sanos extraídos de quintas con baja infección con y sin tratamiento químico de control no se detectó Xac por ningún método y en ninguna de las muestras.
- La población de Xac en frutos cosechados, muestreados en galpón de empaque fue variable, luego de lavado y encerado sin aplicación de otros productos, la menor población se encontró en naranja y la mayor en pomelo.

- Los tratamientos realizados en material de desecho de planta extractora de jugo, triturado, triturado y licuado y triturado y filtrado resultaron adecuados para cuantificar las poblaciones de Xac. Las mismas fueron bajas en casi todas las muestras, en muchas no detectables., lo que impidió medir la eficiencia de los tratamientos para la eliminación de la bacteria causal de la cancrisis.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Atlas de Gotuzzo E. 1975. Cancrosis de los citrus. En: Fernández Valiela M.V. Introducción a la Fitopatología. Volumen II.p. 162-173. INTA.
- Barton-Willis, P.A., Roberts, P.D., Guo, A. and Leach, J.E. 1989. Growth dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in leaves of rice differential cultivars. *Phytopathology* 79: 573-578.
- Beer S.V. y Rundle J.R. 1982. Suppression of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola* in immature pear fruits. *Phytopathology* 73: 1346.
- Bereswill S., Bugert P., Bruchmüller I. y Geider K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2636-2642.
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W. y Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.
- Blakeman J.P. 1991. Foliar bacterial pathogens: epiphytic growth and interactions on leaves. *J. Appl. Bacter. Symposium supplement.* (70): 49-49.
- Canteros B.I. 1992. Changes in the resistance of developing citrus fruit to canker. *Proc. Int. Soc. Citriculture* pp.825-827.
- Canteros B.I. 1994. Aislamiento y conservación de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* en agar lima bean. 5ta Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, Corrientes, 1994. *Fac. Ciencias Agrarias, UNNE.* Pag.68.
- Canteros B.I. 1997. Manejo integrado de la cancrrosis de los citrus en lotes de sanidad

controlada. Boletín Información Técnica, EEA INTA, Bella Vista.

Canteros B. I., Zagory D. y Stall R. E. 1985. A medium for cultivation of the B-strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of canker B in Argentina and Uruguay. Plant Dis. 69: 122-123.

Canteros de Echenique B.I., Zagory D. y Stall R.E. 1982. Población de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* en diferentes variedades de citrus y su relación en la infección de la Cancrosis. II Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Trabajos y comunicaciones. Tomo II, Bacteriología.

Chun W.W.C. y Alvarez A.M. 1983. A Starch-methionine medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from debris in soil. Plant. Dis. 67: 632-635.

Civerolo E.L. 1975. Quantitative aspects of pathogenesis of *Xanthomonas pruni* in peach leaves. Phytopathology 65: 258-264.

Crosse J.E. y Goodman R.N. 1973. A selective medium and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 63: 1425-1426.

Dye D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "amylovora" group. New Zealand J. Science 11: 590-607.

Egel D. S., Graham J.H. y Riley T.D. 1991. Population dynamics of strains of *Xanthomonas campestris* differing in aggressiveness on Swingle citrumelo and grapefruit. Phytopathology 81: 666-671.

Ercolani G. L. 1979. Distribuzione di *Pseudomonas savastanoi* sulle foglie dell'Olivio. Phytopath. medit. 18: 85-88.

Ercolani G. L., Hagedorn D. J., Kelman A. y Rand R. E. 1974. Epiphytic survival of

Pseudomonas syringae on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathology* 64: 1330-1339.

Fulton, H.R. 1920. Decline of *Pseudomonas citri* in the soil. *J Agric. Res.* 19: 207-223.

Fulton H.R. y Bowman 1929. Infection of fruits of citrus by *Pseudomonas citri*. *J.Agr. Res.* 39: 403-426.

Gitaitis R.D. y Nilakhe S.S. 1982. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in southern pea seed. *Pant Dis.* 66: 20-22.

Gorris M.T., Camarasa E., Lopez M. M. , Lecompte P., Chartier R. y Paulin J.P. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies and their use in different serological techniques. *Acta Horticulturae* 411: 47-51.

Goth R.W. 1965. Puncture method for isolating bacterial blights of bean. *Phytopathology* 55: 930-931.

Goto, M. 1962. Studies on citrus canker, I. *Bull Fac. Agr. Shizuoka Univ.* 12: 3-72.

Goto, M. 1970. Studies on citrus canker, III. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in soil and on the surface of weeds. *Bull. Facul. Agr. Shizuoka Univ.* 20: 21-29.

Goto, M. 1972. The significance of the vegetation for the survival of plant pathogenic bacteria. pp. 39-53. In: H.M.P. Gusteranus, ed. *Proc. Third Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria.* Centre Agr. Pub. and Doc., Wageningen, The Netherlands. 365 pp.

Goto, M. y Morita M. 1969. Studies on minimum infection units of *Xanthomonas citri* by injecting inoculus in mesophyll. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35:390.

- Goto M., Tadauchi Y. y Okabe N. 1979. Interaction between *Xanthomonas citri* and *Erwinia herbicola* in vitro and in vivo. Ann. Phytopath. Soc. Japón 45: 618-624.
- Goto M., Toyoshima A. y Tanaka S. 1978. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. 3. Inoculum density of the bacterium surviving in the saprophytic form. Ann. Phytopath. Soc. Japan 44: 197-201.
- Graham J. H. Y Gottwald T. R. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. Plant Dis. 75: 1193-1200.
- Gottwald T.R., Graham J.H. y Richie S.M. 1992. Relationship of leaf surface populations of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* to development of citrus bacterial spot and persistence of disease symptoms. Phytopathology 82: 625-632.
- Hasse C. H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. J. Agric. Res. 4: 97-100.
- Hatting M.J., Beer S.V. y Lanson E.W. 1986. Scanning electron microscopy of apple blossoms colonized by *Erwinia herbicola*. Phytopathology 76: 900-904.
- Hirano, S.S. and Upper C.D. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 21: 243-269.
- Hirano S.S., Nordheim E.V., Arny D. C. y Upper C.D. 1982. Lognormal distribution of epiphytic bacterial populations on leaf surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 44: 695-700.
- Ishimaru C. y Klos 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74: 1342-1344.
- Jacques M.A. y Morris C.E. 1995. A review of issues related to the quantification of

- bacteria from the phyllosphere. FEMS Microbiology Ecology 18. France. pp. 1-14.
- Johnson K.B. y Stockwell V.O. 1998. Management of Fire Blight: A case study in Microbial Ecology. Annu. Rev. Phytopath. 1998. 36: 227-48.
- Klement Z. 1968. Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria. Phytopathology 58: 1218-1222.
- Klement Z., Mavridis, A., Rudolph K., Vidaver A., Prombelon, M.C.M. y Moore, L.W. 1990. Inoculation of Plant Tissues. In: Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands (eds.) 1990. Methods in Phytobacteriology. Chapter 1.5 pp. 96-121.
- Koizumi M. 1969. Ecological studies on citrus canker caused by *Xanthomonas citri*. III. Seasonal changes in number of causal bacteria and its bacteriophages CP1 in rain water flowing down from the diseased trees. Bull. Hort. Res. Sta., Japan. Ser. B (9): 129-144.
- Koizumi M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. Bull. Hort. Res. Sta., Japón. Ser. B (1): 167-183
- Leben C. 1981. How plant pathogenic bacteria survive. Plant Dis. 65: 633-637.
- Lee H.A. 1918. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. J. Agric. Res., 15 (12). 661-665.
- Lee H.A. 1920. Behavior of the citrus canker organism in the soil. J. Agric. Res. 19: 189-206.
- Lin C.P., Chen T.A., Wells J.M. y van der Zwet T. 1987. Identification and detection of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. Phytopathology 77: 376-380.

- Marshall J.K. 1968. Methods for leaf area measurement of large and small leaf samples. *Phytosynthetica* 2: 41-47.
- Mc Guire R.G., Jones J.B. y Sasser 1986. Tween media for the semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Dis.* 70: 887-891.
- Mc Manus P.S. y Jones A.L. 1994. Role of wind-driven, rain, aerosols, and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of Fire Blight in apple nursery. *Plant Dis.* 78: 1059-1066.
- Miller J.H. 1984. *Erwinia amylovora* detection and its significance in survival studies. *Acta Horticulturae* 151: 63-68.
- Miller T. D. y Schroth M. N. 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* 62: 1175-1182.
- Ota T. 1983. Interactions in vitro and in vivo between *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and antagonistic *Pseudomonas* sp. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 49: 308-315.
- Pereira A, Lima G., Watanabe K., Zagato A.G. y Ciancuilli 1976. Sobrevivencia de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson em capim amargo (*Trichachne insularis* (L) Nees) em pomares erradicados, no Estado do Sao Paulo. *O Biologico* 42:217-221.
- Randhawa P.S. y Schaad N.W. 1984. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 74: 268-272.
- Ritchie D.F. y Klos E.J. 1974. A laboratory method of testing pathogenicity of suspected *Erwinia amylovora* isolates. *Plant Dis. Rep.* 58: 181-183.
- Roberts R.G., Hale C.N., T.van der Zwet, Miller C.E. y Redlin S.C. 1998. The potencial for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple

- fruit; a critical review and risk assessment. *Crop Protection* Vol. 17, N° 1, pp. 19-28
- Serizawa S. 1981. Recent studies on the behavior of the causal bacterium of the citrus canker. *Proc. Int. Citriculture* 1: 395-397.
- Schaad N.W., Vidaver A.K., Lacy G.H., Rudolph K. y Jones J.B. 2000. Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. *Phytopathology* 90: 208-213.
- Schneider R. W. y Grogan R. G. 1977. Bacterial speck of tomato: sources of inoculum and establishment of a resident population. *Phytopathology* 67: 388-394.
- Schroth M.N. y Hildebrand D.C. 1994. *Erwinia amylovora* or non-soft rot group. In *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, ed. N. W. Schaad, 2nd Edn, pp. 37-43. American Phytopathological Society. St. Paul, MN.
- Slade M. B. y Tiffin A. I. 1984. Biochemical and serological characterization of *Erwinia*. *Meth. Microb.* 15: 228-293.
- Stall R.E. y Civerolo E.L. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annu. Rev. Phytopath.* 29: 399-420.
- Stall R.E. y Civerolo E.L. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: Cause of citrus canker. pp 48-51. En: *Xanthomonas*. J.G. Swing and Civerolo (eds.). Chapman & Hall, London.
- Stall, R.E. y Cook, A.A. 1996. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistant and susceptible pepper. *Phytopathology* 56: 1152-1154.
- Stall R.E., Gottwald T.R., Kouzumi M. y Schaad N.C. 1993. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. pp 265-295. En: *Xanthomonas*. J.G. Swings and Civerolo (eds.). Chapman & Hall, London.

- Stall R.E., Marcó G. M. y Canteros B. I. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to cankers of citrus. *Phytopathology* 72: 1097-1100.
- Stall R.E., Miller J.W., Marcó G.M. y Canteros de Echenique B.I. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cankers of citrus in Argentina 1980. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93: 10-14.
- Stall R.E., Miller J.K., Marcó G.M. y Canteros de Echenique B.I. 1981. Timing of sprays to control cankers of grapefruit in Argentina. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 414-417.
- Stromberg K.D., Kindel L.L. y Leonard K.J. 1999. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedling. *Phytopathology* 89: 131-135.
- Takahiko O. 1983. Interaction in vitro and in vivo between *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and antagonistic *Pseudomonas* sp. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (49): 308-315.
- Thomson S. V., Schroth M. N., Moller W. J. y Reil W. O. 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66: 1457-1459.
- Thomson S. V., Schroth M. N., Moller W. J. y Reil W. O. 1975. Occurrence of fire blight of pears in relation to weather and epiphytic populations of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 65: 353-358.
- Timmer L.W., Gottwald T.R. y Zitko S.E. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* 75: 192-195.
- Timmer L.W., Zitko S.E. y Gottwald T.R. 1996. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* p.v. *citri* on symptomatic and asymptomatic citrus leaves under various

environmental conditions. Proc.Int. Soc. Citriculture, 448-451. VIII International Citrus Congress 12-17 May 1996. Sun City, South Africa

Vauterin L., Hoste B., Kersters K. y Serring J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Intern. J. Syst. Bacter. 45: 472-489.

Vauterin L., Rademaker J. Y Swings J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90: 677-682.

Verniere C., Hartung J.S., Pruvost O.P., Civerolo E.L., Alvarez A.M., Maestri P. y Luisetti J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southweast Asia. Europ. J. Plant path. 104: 477-487.

Waquimoto S., Hirayae K., Tsuchiya K., Kushima Y., Furuya N. y Matsuyama N. 1986. Production of antibiotics by plant pathogenic Pseudomonads. Ann. Phythopath. Soc. Japan, 52: 835-842.

Wells J.M., van der Zwet T. y Hale C.N. 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the “*amylovora*” group by class analysis of cellular fatty acids. J Phytopathology 140:31-38.

Zubrzycki H.M. 1999. Reseña sobre la citricultura argentina Año 1998. En: Curso de actualización en sanidad citrícola. 8 al 10 de junio de 1999 en la E.E.A., INTA Bella Vista, Corrientes.

ANEXO I

Relación entre la concentración de inóculo y la cantidad de lesiones obtenidas en hojas de plantines de pomelo Duncan mantenidos en cámara de cría. Datos obtenidos mediante la ecuación de regresión de los datos de los experimentos, con transformación logarítmica.

