

**INTERACCION DIFERENCIAL ENTRE CEPAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS
Y DIVERSAS RUTACEAS**

Alberto Martin Gochez

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar por el grado
académico de MAGISTER SCIENTIAE

Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Mar del Plata

Balcarce, 18 de diciembre de 2007
Buenos Aires – Argentina

**INTERACCION DIFERENCIAL ENTRE CEPAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS
Y DIVERSAS RUTACEAS**

Alberto Martín Gochez

.....
Ing. Agr. (PhD) Blanca I. Canteros
(Directora de Tesis)

.....
Ing. Agr. (PhD) Alberto Escande, PhD
Asesor

.....
Ing. Agr. (MSc) Alicia Melegari
Asesor

**INTERACCION DIFERENCIAL ENTRE CEPAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS
Y DIVERSAS RUTACEAS**

Alberto Martín Gochez

Aprobada por:

.....

Ing. Agr. (PhD) Blanca I. Canteros
(Directora de Tesis)

.....

Ing. Agr. Adriana Alippi
(Evaluador Externo)

DEDICATORIA

A mis padres, Dionisio y Graciela, por darme su ejemplo de esfuerzo en el trabajo y preocupación por el estudio.

A mi nueva familia, Dolores y Nicolas, por darme un motivo para seguir avanzando en la vida.

AGRADECIMIENTOS:

A todas las personas que colaboraron en esta tesis, en especial a mi directora de tesis, Blanca Canteros, a quien agradezco su constante preocupación en todo aspecto de mi formación profesional.

A todos mis amigos de Balcarce y Bella Vista, quienes con su simple compañía hicieron de este tiempo de estudio un recuerdo imborrable.

INDICE

.....	Pag.-
INTRODUCCIÓN	
.....	1.-
1.1. INTRODUCCIÓN	
.....	1.-
1.1.1. Cancrosis de los citrus. Características de la enfermedad	
.....	2.-
1.1.2. Prácticas de manejo integrado de la cancrrosis	
.....	4.-
1.1.3. Objetivos	
.....	6.-
1.1.4. Hipótesis	
.....	6.-
1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
.....	7.-
1.2.1. Antecedentes sobre dispersión y estudio de la cancrrosis de los citrus	
.....	7.-
1.2.1.1. América del Norte	
.....	7.-
1.2.1.1.1. Estados Unidos	
.....	7.-
1.2.1.1.2. México	
.....	11.-
1.2.1.2. Asia	
.....	11.-
1.2.1.2.1. Sudeste asiático	
.....	11.-
1.2.1.2.2. Medio Oriente	
.....	13.-
1.2.1.3. Africa	
.....	13.-
1.2.1.4. Oceanía	
.....	14.-
1.2.1.5. América del Sur	

.....	15.-
1.2.1.5.1. Brasil	15.-
1.2.1.5.2. Paraguay	17.-
1.2.1.5.3. Uruguay	17.-
1.2.1.5.4. Argentina	18.-
1.3. ANTECEDENTES DE CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO PATÓGENO	20.-
1.3.1 Caracterización del género <i>Xanthomonas</i>	20.-
1.3.2 Caracterización del organismo causal de la cancrrosis de los citrus	21.-
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> Y LOS HOSPEDANTES CÍTRICOS. LA REACCIÓN DE PATOGENICIDAD Y DE HIPERSENSIBILIDAD	38.-
1.5. ANTECEDENTES SOBRE MEJORAMIENTO POR RESISTENCIA A CANCROSIS DE LOS CITRUS	41.-
Capítulo 1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, PATOGENICA Y DE OTROS CARACTERES FENOTÍPICOS DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> DE LOS GRUPOS B Y C	44.-
1.1. INTRODUCCIÓN	44
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	46.-
1.2.1. Caracterización bioquímica y fisiológica	46.-

1.2.1.1.	Cepas bacterianas	46.-
1.2.1.2.	Medios de cultivo y preparación de inóculo	46.-
1.2.1.3.	Pruebas bioquímicas y fisiológicas	47.-
1.2.2.	Caracterización patogénica	47.-
1.2.2.1.	Inoculaciones	47.-
1.2.2.2.	Tamaño de lesiones y nº de bacterias/ lesión	48.-
1.2.2.3.	Determinación del N° bacterias/ cm ²	48.-
1.2.2.4.	Respuesta en otros hospedantes	49.-
1.2.3.	Caracterización molecular	49.-
1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52.-
1.3.1	Caracterización bioquímica y fisiológica	52.-
1.3.1.1.	Tolerancia al ClNa	52.-
1.3.1.2.	Proteólisis de la leche	52.-
1.3.1.3.	Reacción en leche tornasol	52.-
1.3.2.	Patogenicidad en las cepas de los distintos tipos	56.-
1.3.2.1.	Comparación del diámetro de las lesiones obtenidas en distintos hospedadores	56.-

1.3.2.2.	Comparación del nº de lesiones obtenidas en distintos hospedadores	59.-
1.3.2.3.	Comparación de la dinámica poblacional en los distintos hospedadores	61.-
1.3.2.4.	Caracterización de la respuesta observada al inocular cepas de los grupos A, B y C en diferentes hospedadores	67.-
1.3.3	Caracterización molecular	83.-
Capítulo 2. CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD PRODUCIDA EN POMELO DUNCAN POR UNA CEPA DEL GRUPO C DE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PATÓGENA DE CITRUS		89.-
2.1.	INTRODUCCIÓN	89.-
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	90.-
2.2.1.	Cepa bacteriana y medio de cultivo	90.-
2.2.2.	Medios de cultivo y preparación de inóculo	90.-
2.2.3.	Medición de pérdida de electrolitos	91.-
2.2.4.	Curvas de crecimiento bacteriano	91.-
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92.-
2.3.1.	Pérdida de electrolitos	92.-
2.3.2.	Dinámica poblacional	95.-

Capítulo 3. CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA DE DALAN DAN (*CITRUS SP*) Y KUMQUAT (*FORTUNELLA MARGARITA* (LOUR) SWING) A LA INFECCIÓN CON *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI*

.....101.-

3.1. INTRODUCCIÓN

.....101.-

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

.....103.-

3.2.1 Inoculación de hojas

.....103.-

3.2.2 Inoculación de frutos

.....104.-

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

.....105.-

3.3.1 Desarrollo de lesiones en hojas

.....105.-

3.3.2 Desarrollo de lesiones en frutos

.....123.-

Capitulo 4. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIÓN

.....135.-

ANEXO 1. Cepas utilizadas.

.....139.-

BIBLIOGRAFÍA

.....140.-

FUENTES Y PÁGINAS WEB CONSULTADAS

.....168.-

INDICE DE CUADROS

	Pag.-
CUADRO 1.1. Pruebas bioquímicas realizadas a cepas de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus pertenecientes a los grupos A, B y C.	52.-
CUADRO 1.2. Resultados de las inoculaciones realizadas en distintas especies cítricas utilizando el método de pin-prick (diámetros en mm).	57.-
CUADRO 1.3. Análisis de la varianza y test de Duncan para los datos obtenidos en las inoculaciones realizadas con <i>Xanthomonas</i> patógenas de Citrus correspondiente a los grupos A, B y C en lima Key (<i>C. aurantifolia</i>). Los cálculos fueron realizados utilizando el software estadístico InfoGen v1.0 (UNC).	58.-
CUADRO 1.4. Medias de los valores de 3 hojas inoculadas en distintos cítricos para diferentes concentraciones.	60.-
CUADRO 1.5. Regresiones lineales de los valores $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular hojas jóvenes de lima Key (<i>C. aurantifolia</i>) con distintas concentraciones de cepas del grupo B y C.	63.-
CUADRO 3.1. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas secuencialmente entre 15 y 36 días de edad.	111.-
CUADRO 3.2. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas secuencialmente entre 22 y 36 días de edad.	112.-
CUADRO 3.3. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas secuencialmente entre 15 y 26 días de edad.	121
CUADRO 3.4. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas entre 17 y 26 días de edad.	

.....	122.-
CUADRO 3.5.Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/ \text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular frutos de distintas especies cítricas de diferentes edades.	
.....	132.-

INDICE DE FIGURAS

	Pag.-
.....	
FIGURA 1.1. Prueba de tolerancia al CINa en cepas de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus.	54.-
.....	
FIGURA 1.2. Prueba de crecimiento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus en leche tornasol.	55.-
.....	
FIGURA 1.3. Desarrollo del nº de bacterias por cm ² en hojas de A: lima Key (<i>C. aurantifolia</i>) y B pomelo Duncan (<i>C. paradisi</i>), inoculadas con <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus.	62.-
.....	
FIGURA 1.4. Comparación de forma y tamaño de lesiones de cancrrosis obtenidas al inocular mediante método de pin prick en hojas de lima Key y pomelo Duncan con <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus grupo B y C.	64.-
.....	
FIGURA 1.5. Comparación de forma y tamaño de lesiones de cancrrosis obtenidas al inocular mediante infiltración del mesófilo de hojas de lima Key y pomelo Duncan con <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus grupo B y C.	65.-
.....	
FIGURA 1.6. Comparación de las lesiones obtenidas al inocular mediante el método de pin prick hojas de distintas Rutaceas con <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus grupo B y C.	66.-
.....	
FIGURA 1.7. Inoculaciones realizadas en distintas especies con <i>Xanthomonas axonopodis</i>	68.-
.....	
FIGURA 1.8. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus utilizando <i>Xho</i> I.	85.-
.....	
FIGURA 1.9. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus utilizando <i>Pvu</i> I.	86.-
.....	
FIGURA 1.10. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de <i>Xanthomonas axonopodis</i> patógenas de citrus utilizando <i>Xba</i> I.	

- 87.-
 FIGURA 2.1. Determinación de la pérdida de electrolitos (μhmos) presentes en muestras de hojas de distintos citrus inoculados por infiltración del mesófilo con *Xanthomonas axonopodis* perteneciente al grupo C.
- 93.-
 FIGURA 2.2. Log del N° del bacterias por $\text{cm}^2 + 1$ ($\text{Log bact}/\text{cm}^2 + 1$), determinado para distintas fechas (durante 7 días), luego de infiltrar el mesófilo en hojas de lima Key pomelo Duncan y limón Eureka utilizando una suspensión *Xanthomonas axonopodis* perteneciente al grupo C.
-96.-
 FIGURA 2.3. Hojas de pomelo Duncan (derecha) y lima Key (izquierda) infiltradas con distintas concentraciones (5×10^5 , 5×10^6 y 5×10^8 bact/ ml) de *Xanthomonas axonopodis* grupo C patógena de citrus.
-98.-
 FIGURA 3.1. Log ($\text{les}/\text{cm}^2 + 1$) obtenidas al inocular hojas de citrus Dalan Dan de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
-107.-
 FIGURA 3.2. Log ($\text{les}/\text{cm}^2 + 1$) obtenidas al inocular hojas de pomelo Duncan de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
-108.-
 FIGURA 3.3. Log ($\text{les}/\text{cm}^2 + 1$) obtenidas al inocular hojas de lima Key de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
-109.-
 FIGURA 3.4. Log ($\text{les}/\text{cm}^2 + 1$) obtenidas al inocular hojas de kumquat Nagami de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
-110.-
 FIGURA 3.5. Log ($\text{les}/\text{cm}^2 + 1$) obtenidas al inocular hojas de citrus Dalan de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
-116.-

FIGURA 3.6. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de pomelo Duncan de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....117.-

FIGURA 3.7. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de lima Key de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....118.-

FIGURA 3.8. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de kumquat Nagami de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....119.-

FIGURA 3.9. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de pomelo Red Blush de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....120.-

FIGURA 3.10. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de Dalan Dan de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....124.-

FIGURA 3.11. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de pomelo Red Blush de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....125.-

FIGURA 3.12. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de lima Key de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....126.-

FIGURA 3.13. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de Dalan Dan de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....128.-

FIGURA 3.14. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de pomelo Red Blush de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

.....129.-
FIGURA 3.15. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de lima Key de diferentes
edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri*
.....130.-

INTERACCION DIFERENCIAL ENTRE CEPAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS Y DIVERSAS RUTACEAS

RESUMEN

Se caracterizaron cepas de los grupos B y C de *Xanthomonas axonopodis* (Xa) causantes de cancrrosis tipo B y C en citrus. Se demostró diferencias en la patogenicidad y la falta de justificación para mantenerlas en un mismo patovar. Se caracterizó la interacción entre especies y variedades de la familia Rutáceas y cepas de Argentina de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac), causantes de cancrrosis tipo A, para desarrollar métodos más adecuados para determinar resistencia en forma rápida. Se encontró respuesta diferencial y algunos cultivares pueden usarse como fuentes de resistencia cuantitativa. La caracterización de cepas A, B y C confirmó diferencias bioquímicas en utilización de lactosa y susceptibilidad al cloruro de sodio. Todos los citrus inoculados con cepas B presentaron síntomas típicos, mientras que las cepas C sólo produjeron cancrrosis en lima Key (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) y no en otras Rutáceas. Se observaron diferentes patrones de polimorfismos en los fragmentos de ADN de cepas A, B y C luego de restricción con enzimas *Xho*I, *Pvu*II y *Xba*I. Se demostró diversidad entre cepas B en el patrón de bandas obtenidos con estas enzimas. Se caracterizó la reacción de las cepas C en pomelo (*C. paradisi* Macfad.) y se demostró la ocurrencia de una reacción de hipersensibilidad (HR). Las cepas C causaron, luego de inoculación a altas concentraciones en pomelo, valores diferenciales en conductividad del fluido intercelular y en la dinámica poblacional con respecto al huésped susceptible lima Key. La inoculación de hojas de Dalan Dan (*Citrus* sp.) y kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle), demostró que la resistencia a cancrrosis observada a campo en estas especies se debe al período de susceptibilidad extremadamente corto. Estas diferencias podrían usarse para seleccionar fuentes de resistencia cuantitativa. En la comparación de pomelo y Dalan Dan (con fruto similar a pomelo) se destacaron las variables “edad del fruto” y “cantidad de inóculo” como descriptores para determinar resistencia a cancrrosis.

Palabras clave: cancrrosis de los citrus, patogenicidad, reacción de hipersensibilidad, resistencia.

**DIFFERENTIAL INTERACTION AMONG STRAINS OF *XANTHOMONAS*
AXONOPODIS AND DIVERSE *RUTACEAE***

SUMMARY

Strains of the B and C groups of *Xanthomonas axonopodis* (Xa), causal agents of the B-type and C-type citrus canker, respectively, were characterized. Differences in pathogenicity and host range were demonstrated that do not justify their inclusion in a same pathovar different than *X. a. pv. citri*. The interaction among species and varieties of the family *Rutaceae* and strains from Argentina of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* group A (XacA), causal agents of the A-type canker, were characterized and methods were developed to determine resistance in short time. Differential reaction to the infection was found among some cultivars that can be used as source of quantitative resistance. The characterization of A, B, and C strains confirmed biochemical differences in lactose utilization and susceptibility to sodium chloride. All citrus inoculated with B strains showed typical symptoms, whereas the C strains only caused canker symptoms in Key lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) and not in other *Rutaceae*. Polymorphism of the DNA fragments was observed among A, B, and C strains after restriction with the *Xho*I, *Pvu*II y *Xba*I enzymes. Profile diversity was found among the enzyme-restricted B-strains. Characterization of the reaction produced by C-strains after inoculation of grapefruit (*C. paradisi* Macfad.) demonstrated the occurrence of a hypersensitive reaction (HR). The C-strains, after inoculation at high inoculum level in grapefruit leaves, caused differential values of conductivity of the intercellular fluid and on the population dynamics respective to the susceptible host Key lime. Inoculation of Dalan Dan (*Citrus sp.*) and kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle) leaves demonstrated that field resistance is due to a very short susceptible period. These results could be used to select source of quantitative resistance among the *Rutaceae* population. When comparing grapefruit and Dalan Dan, a citrus type with fruit similar to grapefruit, 'fruit age' and 'inoculum concentration' were selected as parameters to determine and describe canker resistance.

Key words: citrus canker, pathogenicity, hypersensitive reaction, resistance

INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

La región citrícola del Noreste Argentino (NEA) comprende las provincias de Corrientes, Misiones, Formosa, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos y norte de Buenos Aires. Esta región corresponde a una de las dos tradicionales zonas productoras de cítricos de Argentina, junto con el Noroeste (NOA).

La República Argentina ocupa el noveno puesto entre los países productores de cítricos (*Fuente: SAGPyA, 2005*). La producción nacional de cítricos en el año 2004 fue de 2.737.105 toneladas (2,6% de la producción mundial).

La región NEA posee el 56,54% de la superficie citrícola implantada en el país (147.466 ha), aporta el 48% de la producción total nacional y se destaca en la producción de naranjas y mandarinas (Molina et al., 2005). La producción regional se industrializa y/o comercializa como fruta fresca dentro o fuera del país.

El volumen de cítricos exportados por Argentina en el año 2004 fue de 584.850,85 toneladas (21,37% de la producción nacional), el limón fué el cítrico más exportado durante el año 2004 (48,96% de la producción nacional total). La producción de limón es predominante en el NOA (75,26 %) aunque el NEA también produce (6,22 %) (Luppiz, 2005).

La mayor parte de las exportaciones se destina al mercado de la Comunidad Europea. En el año 2002, el 91,67% de las exportaciones realizadas se dirigieron a mercados europeos (*Fuente: ADI, 2003*).

Existe, por parte de la Unión Europea (UE), restricciones para la importación de cítricos desde zonas donde ocurran enfermedades causadas por patógenos considerados cuarentenarios para Europa (*Fuente: Reglamento CE, N° 178/2002*).

Las enfermedades de los citrus consideradas cuarentenarias (porque están causadas por patógenos con restricciones cuarentenarias) y que ocurren en Argentina son: cancrrosis de los citrus, causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac), black spot, moteado negro ó mancha negra (causada por el hongo *Guignardia citricarpa*) y sarna (causada por hongos del género *Elsinoe*).

Actualmente, existe en Argentina un Programa de Certificación de Cítricos para Exportación, el que se ajusta a los controles exigidos por la UE (Fuente: SINAVIMO, 2005) para el ingreso de fruta fresca (Lopez y Navarro, 1981; OEPP/EPPO, 2005). Este programa está basado en investigaciones desarrolladas en las Estaciones Experimentales de INTA, especialmente en la EEA Bella Vista (Corrientes) durante más de 30 años (Stall et al., 1979a; Canteros, 1997b; Canteros, Naranjo y Rybak, 2001) y complementada por la experiencia e información adquirida en el NEA desde 1965 (Canteros, 1993; Canteros, 2004).

La generación de conocimientos y el desarrollo de nuevas tecnologías para optimizar el manejo de enfermedades como la cancrrosis de los cítricos, es indispensable para conservar y ampliar el mercado para la fruta fresca producida en el país.

1.1.1. Cancrosis de los citrus. Características de la enfermedad

La bacteria causal de la cancrrosis de los citrus (Xac) produce como síntomas lesiones localizadas (llamadas también pústulas o cancros) en hojas, frutos y ramas jóvenes. Los tejidos en crecimiento son más susceptibles (Lee, 1921a; Goto, 1962; Stall et al., 1982; Gottwald y Graham, 1992). Las lesiones de cancrrosis presentes en el árbol sirven como fuente de inóculo para nuevas infecciones en la misma u otras plantas (Stall et al., 1979a; Gottwald y Graham, 2000). El viento y la lluvia combinados, transportan la bacteria desde las lesiones presentes en la planta hasta los tejidos susceptibles (Serizawa e Inoue, 1974; Timmer et al, 1991; Canteros, 2005). El viento de velocidad mayor a 8 m/seg. (Serizawa e Inoue. 1974; Kuhara, 1978) es el que logra

vencer la resistencia estomática y permite el ingreso de las bacterias presentes en las gotas de lluvia. La bacteria penetra en el mesófilo de la planta por estomas y heridas (Serizawa e Inoue, 1974). La resistencia que ofrece el estoma al paso del agua varía en cada especie cítrica y también varía la resistencia en el mesófilo (McLean y Lee, 1922; Stall y Seymour, 1983; Schubert et al., 2001).

Una vez infectado el tejido y con temperaturas entre 20- 30° C, los síntomas pueden observarse a partir de los 7 días o luego de más tiempo (Koizumi y Grierson, 1979). El tamaño y la forma del síntoma depende de la susceptibilidad del hospedante (Koizumi, 1981).

Los síntomas (llamados lesiones, pústulas o canchros) son de aspecto corchoso y márgenes de aspecto oleoso y se producen mediante la proliferación de las bacterias en el interior del tejido y la posterior hiperplasia de las células del hospedante. El margen con aspecto oleoso observado en los alrededores de la lesión indica la zona de multiplicación de las bacterias y depende de la edad del síntoma y de la resistencia del hospedante. En ese lugar ocurre la proliferación bacteriana y puede volverse muy delgado e incluso desaparecer en las lesiones de mayor edad. El centro de la lesión no presenta bacterias vivas y es generalmente necrótico y con presencia de hongos saprófitos superficiales. Los síntomas pueden observarse en ambos lados de la hoja. Tanto en frutos como en brotes (hojas y ramitas jóvenes), los síntomas se producen de manera similar y presentan el mismo aspecto. Frecuentemente, se produce un halo clorótico alrededor del síntoma, más visible en algunas variedades de citrus.

Se ha descrito que la capacidad de la bacteria de producir estas características lesiones hiperplásicas con márgenes de aspecto oleoso y crecimiento en el interior de las plantas está conferido por el gen *pthA* (Swarup et al., 1991). Este gen *pthA* (miembro de la familia de genes de avirulencia *avrBs3*), es dependiente del operón *hrp* (Bonas et al., 1991; Canteros et al., 1991; Kelemu y Leach, 1990) y codifica una

proteína llamada PthA que activa, dentro del hospedante, los mecanismos de patogenicidad de la bacteria por medio de la vía T3S (Brunings y Gabriel, 2003).

Puede obtenerse de manera provocada síntomas de cancrrosis de los cítricos en hojas y frutos utilizando distintas metodologías de inoculación (Koizumi, 1972; Koizumi, 1976a; Koizumi, 1976b; Miller et al., 1980; Canteros, 1991).

En algunos hospedantes y durante temperaturas más frescas puede observarse, en las lesiones producidas por Xac, la proliferación conjunta de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. La infección de esta bacteria induce a la formación de halos cloróticos definidos alrededor del síntoma, debido a la toxina syringomicina que libera (Ota, 1983; Stall et al., 1979a).

1.1.2 Prácticas de manejo integrado de la cancrrosis

La cancrrosis de los cítricos puede controlarse mediante un manejo integrado (Canteros, 2004). La EEA Bella Vista ha desarrollado tecnología para el control químico y otras prácticas culturales que, en su conjunto, permiten el manejo de la enfermedad. (Fálico de Alcaraz y Rodríguez, 1970; Fálico de Alcaraz, 1974; Stall et al., 1979c; Canteros, Naranjo y Rybak, 2001; Canteros, 2004).

Luego de la dispersión acelerada de la cancrrosis en el NEA en el período 1973-1979, causada por condiciones climáticas excepcionales, se determinó que la erradicación no era posible y que se podía controlar la enfermedad mediante la aplicación de productos cúpricos en un momento preciso del crecimiento de hojas y frutos (Stall et al., 1979a); la determinación del momento óptimo de pulverización (timing) fue el resultado de numerosos ensayos a campo y estudios de laboratorio y fue el factor más importante en la lucha contra la enfermedad. Estas prácticas permitieron obtener un control eficiente y económico de la cancrrosis, evitando la erradicación masiva de plantaciones.

En 1994 se encontraron cepas de Xac resistentes al cobre en la zona cítrica del río Paraná, en Corrientes (Canteros, 1994; 1997; 2004). Luego del estudio y

caracterización de la misma, se desarrolló tecnología para el manejo adecuado de la canchrosis en las plantaciones que presentaban resistencia al cobre, mediante el uso de productos adicionados al cobre, como el mancozeb. Se logró restablecer la eficacia del cobre, lo que evitó pérdidas en calidad y cantidad de producción (Canteros, 1995).

La presencia en los cultivos del minador de la hoja de los citrus incide en la intensidad de infección de canchrosis en quintas con presencia de la enfermedad (Sohi y Shandu, 1968; Sinha et al., 1972; Canteros, 1997a). El minador de la hoja de los citrus, *Phyllocnistis citrella* Stainton (1857), es un pequeño lepidóptero de la Familia *Gracillariidae*; originario del sudeste de Asia (Clausen, 1931; Badawy, 1967). Actualmente se encuentra distribuido en casi todas las zonas citrícolas del mundo: India (Latif y Yunus, 1951; Nirvan, 1961), Oriente Medio (Cook, 1988), EEUU (Heppner, 1993), España (Garijo y Garcia, 1994), Centroamérica y Venezuela (Sánchez et al., 2002), Brasil (Prates et al., 1996), e ingresó a Argentina en 1996 (Cáceres, 1996).

Las larvas del minador luego de romper la cutícula, se alimentan de las células sub- epidérmicas de hojas y frutos jóvenes (Achor et al., 1996). El daño producido por las larvas del minador facilita el ingreso de las bacterias y la producción de mayor número de síntomas de canchrosis (Bergamin-Filho et al., 2000).

El aumento de la intensidad de la enfermedad se genera debido a la mayor producción de lesiones en los tejidos, con lo cual se aumenta el nivel de inóculo presente (Graham et al., 2004). El tejido herido por la larva permanece susceptible de infectarse por Xac durante 10 a 14 días (Goto, 1992a) debido a la permanencia de la cutícula que mantiene la humedad e impide la cicatrización. La disseminación se produce únicamente a través del viento con lluvia ya que los adultos o larvas de minador no llevan altas concentraciones bacterianas (Canteros y Cáceres, 2004; Belasque et al., 2005).

El desarrollo de tecnología de manejo de lotes para exportación libres de síntomas de cancrrosis (llamados lotes de sanidad controlada), permitió la certificación de envíos de fruta fresca a la UE. Esta metodología está basada en el conocimiento de la variabilidad en la intensidad de la enfermedad según las condiciones ambientales y el uso adecuado de cortinas rompevientos, tipo de citrus utilizado, podas y pulverizaciones de productos químicos (Canteros, 1997a; 2004).

Se ha demostrado la efectividad de los tratamientos de hipoclorito de sodio y SOPP (ortofenil fenato de sodio) en postcosecha como desinfectante de frutos sin síntomas e inoculados superficialmente con *Xanthomonas* (Canteros et al., 2000).

El control de la cancrrosis es el método más efectivo para disminuir el daño asociado al minador; pues plantas sanas sin síntomas no mostraron lesiones de cancrrosis, incluso en heridas causadas por el minador (Canteros, 2004).

1.1.3. Objetivos

- Caracterizar patogénicamente las cepas de los grupos B y C de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de *Citrus*.
- Caracterizar la interacción entre diversos géneros de Rutáceas y *Xa* pv *citri* tipo A de Argentina y hallar los métodos más adecuados para determinar resistencia en forma rápida.

1.1.4. Hipótesis

- H1: Existe diferencia en la patogenicidad hacia las rutáceas en las cepas de los grupos B y C de *Xa* pv *citri* y no deberían estar en un mismo patovar.
- H2: Existe respuesta diferencial dentro de las Rutáceas bajo estudio frente a *Xa* pv *citri* y algunos cultivares pueden usarse como fuentes de resistencia cuantitativa.

1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Antecedentes sobre dispersión y estudio de la cancrrosis de los citrus

La cancrrosis de los cítricos es probablemente originaria de Asia, lugar de origen de la mayoría de los cítricos.

Aunque esta afección se reconoció como una nueva enfermedad en 1913 (Berger, 1914) ya Fawcett y Jenkins, en 1933, encontraron síntomas de cancrrosis en plantas herborizadas colectadas en 1827- 1831 (*Citrus medica* originaria de la India) y en 1842- 1844 (*C. aurantifolia* originaria de Indonesia). En 1915, Clara Hasse, aisló por primera vez la bacteria causal de la cancrrosis de los citrus en síntomas de pomelo y cumplió con los postulados de Koch.

Actualmente, la distribución de esta enfermedad en el mundo es amplia (*fuentes*: CAB, 2002). La introducción de la cancrrosis de los citrus incide en la economía de los citricultores de un país o región debido a las restricciones cuarentenarias que imponen algunos países (Kawai, 1967; Marcó, 2004; Canteros, 2005; Hau, 2005; OEPP/EPPO, 2005).

1.2.1.1. América del Norte

1.2.1.1.1. Estados Unidos

En 1914, se reportó oficialmente la enfermedad en EEUU (Berger, 1914; Berger, et al., 1914). Se supone que esta epifitía se inició en 1910 con el ingreso de plantas procedentes de semilleros de portainjerto trifolio (*Poncirus trifoliata*) (Loucks, 1934) y plantas infectadas de mandarina Satsuma (*C. unshiu*) y otras plantas infectadas de otros cultivares (Massey, 1914; Rhoads, 1931). En 1914, Edgerton, informó haber observado durante el verano de 1911 plantas de citrus infectadas con cancrrosis en los estados de Florida y Texas.

En 1915, EEUU comenzó un plan de erradicación de las plantas con síntomas. La enfermedad se declaró erradicada en 1933 (por primera vez) y hacia 1947 se declaró

a este país libre de cancrrosis (Schubert, et al., 2001). Los estados afectados por esta enfermedad fueron Alabama, Florida, Georgia, Louisiana, Mississippi, Carolina del Sur y Texas (EPPO, 2002). En 1987 la cancrrosis se encontró nuevamente.

El estudio de las cepas de *Xanthomonas* causantes de las infecciones de cancrrosis en cada nueva epidemia ha permitido la caracterización de los diversos grupos de cepas. Esta diferenciación no se hizo nunca en Japón, India, China ni otro país asiático sino solamente en las nuevas epidemias o detecciones en otro continente. En 1934, Fawcett y Bitancourt, diferenciaron por primera vez a la cancrrosis observada en Sudamerica de la presente en el resto del mundo, llamando Tipo B a la encontrada en nuestro país y Tipo A a la descrita en la epifitía de 1910 en EE. UU. A partir de ese momento la nomenclatura para todas las descripciones de cancrrosis se basó en la clasificación iniciada por estos autores. En 1971, Namekata y Oliveira describió en Brasil un tipo de cancrrosis, la cual solo se producía en plantas de lima key y se diferenciaba serológicamente de las demás, continuando con la denominación de Fawcett y Bitancourt llamaron a ésta cancrrosis Tipo C.

En EE. UU los grupos de cepas bacterianas que causan lesiones de cancrrosis en citrus descritos hasta la fecha son:

Cepas de Xac grupo A, causantes de cancrrosis tipo A, probablemente causantes de la epifitía de 1910; cepas obtenidas de síntomas en pomelo caracterizados en 1915 por Clara Hasse (Fawcett & Bitancourt, 1937).

Cepas de Xac grupo A Manatee, causantes de cancrrosis tipo A, aisladas en 1986 en la zona residencial de la bahía de Tampa, Florida (región centro- oeste del estado de Florida, EE. UU.). Se encontraron posteriormente plantas infectadas en lotes comerciales cercanos. En 1992 se registró por última vez cancrrosis de los citrus en los EE. UU. (en esta epidemia) (Schubert y Sun, 1996); luego de la erradicación de este foco, se declaró a esta enfermedad como oficialmente erradicada en 1994 (Schubert et al, 2003). Diversas teorías se postularon para explicar el origen de esta infección:

desde el ingreso ilegal de plantas infectadas a mediados de 1980 desde Japón (Li et al., 2005), hasta teorías acerca de la dispersión de bacterias por plantas infectadas remanentes de la epifítia de 1910 (Whiteside 1986; Schubert et al., 2001).

En 1997 se encontraron nuevamente síntomas de cancrrosis en la zona centro-oeste de Florida (condado de Manatee). La caracterización de las bacterias aisladas demostraron que eran similares a las encontradas en 1986 (Schubert y Sun, 2003).

Cepas de Xac del grupo A Miami, causantes de cancrrosis tipo A, aisladas en 1995 de síntomas producidos dos años antes que fueran vistos en el sector residencial de Miami. Estudios moleculares mostraron patrones distintos en comparación con cepas anteriormente aisladas (Schubert et al., 2003). Se supone que este foco se produjo por el ingreso ilegal de material vegetal infectado desde Filipinas (Li et al., 2005).

Cepas Xac del grupo A^w, causantes de cancrrosis tipo A, aisladas en Mayo de 2000 en el condado de Palm Beach, ubicado en el sudeste del estado de Florida (en cercanías de Lake Worth y Wellington de donde tomó su nombre). Sólo se observaron síntomas en plantas de lima Key (*C. aurantiifolia*) (Rybak, 2005) y Alemow (*C. macrophylla* Wester, híbrido originario probablemente en la isla Cebú, Filipinas, entre cidra y pummelo) (Sun et al., 2004; Saunt, 2000).

Mediante la observación de la dispersión desigual del patógeno entre los distintos hospedantes y la caracterización del perfil genético y fisiológico se determinó que este grupo de cepas (A^w) era diferente de los anteriormente aislados (Sun et al., 2004). Se supone que esta última introducción se produjo por el ingreso ilegal de material vegetal infectado desde la India (Schubert, 2001; Li et al., 2005) donde ocurren cepas con estas características.

Cepas del grupo E de *Xanthomonas* patógenas de citrus, identificadas luego como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*; (inicialmente llamado Tipo E o de vivero), se considera el organismo causal de la mancha bacteriana de los cítricos (Citrus Bacterial Spot, CBS). Fue encontrado por primera vez en un vivero de la región central de

Florida en 1984, en plantas del portainjerto citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) (Ferguson et al., 1984). Inicialmente se decidió la erradicación, pero en Setiembre de 1990 se suspendió este intento, luego de demostrarse que no era una enfermedad grave y que tenía un restringido rango de hospedantes en condiciones naturales a campo (Graham et al., 1990; Graham y Gottwald, 1991, Graham et al., 1992). Algunos la consideran una *Xanthomonas* saprófita que ocasiona enfermedad en citrumelo Swingle (Graham y Gottwald, 1991) aunque este concepto no está aceptado en forma unánime (Vauterin et al, 1996b).

El aporte realizado en EE. UU. al conocimiento de algunos aspectos de esta enfermedad y su agente causal es abundante (Wolf, 1916; Loucks, 1934; Fawcett, 1936; Civerolo, 1985; Whiteside, 1986; Whiteside, 1988; Egel, 1991; Graham y Gottwald, 1991; Stall y Civerolo, 1991; Stall et al., 1993; Schubert y Sun, 2003; Brunings y Gabriel, 2003; Schubert et al., 2001; Graham et al., 2004).

Luego de los intentos por parte de las autoridades sanitarias de EE. UU. de erradicar la cancrrosis de tipo A del territorio de Florida, el clima del lugar (caracterizado por huracanes y tormentas) y, probablemente, las diferentes condiciones de la citricultura y la economía, hicieron imposible la erradicación de la enfermedad en las plantaciones de citrus en Florida (Gottwald et al., 2005; Irey et al., 2005; Canteros, 2005). En 2006, la oficina del APHIS (USDA) no aportó fondos para erradicación y la consideró imposible de concretarse (*fuentes:* USDA). El DPI de Florida, aún discute la utilidad de la política de erradicación (*fuentes:* DPI <http://doacs.sta.fl>).

1.2.1.1.2. México

A fines de 1981 se anunció la ocurrencia de un foco de cancrrosis de los citrus en lima mexicana (*C. aurantifolia*) en Colima, México. Las cepas aisladas fueron denominadas como pertenecientes a un nuevo tipo de cancrrosis (cancrrosis Tipo D causada por cepas del grupo D) (García P. y Barreto. V. 1984). Estudios posteriores

demonstraron que las bacterias encontradas podrían haber sido algún tipo de *Xanthomonas* saprófita (Garza L., y Medina U., 1984; Sanchez A. y Félix C., 1984; Rodriguez G. et al., 1985), porque los síntomas observados correspondían a lesiones causadas por *Alternaria limicola* (Palm y Civerolo, 1994) como se demostró varios años después.

En América Central, se ha registrado la presencia de cancrrosis de los citrus en los últimos años en las Islas Vírgenes Británicas y en las Antillas Holandesas (EPPO, 2002). Ya en 1920, Edwin Smith, comunicó que observó lesiones similares a cancrrosis del limonero en Costa Rica (Condado, 1942).

1.2.1.2 Asia

1.2.1.2.1 Sudeste asiático

En 1914, luego del anuncio en EE. UU. del ingreso de plantines infectados con cancrrosis desde Japón, las autoridades japonesas ordenaron hacer una revisión de la presencia de la enfermedad en ese país. Como resultado de esta investigación, se renombraron antiguas muestras clasificadas erróneamente como “sarna de los citrus”, las cuales eran síntomas de cancrrosis; lo que indicaría que esta enfermedad estaba en Japón desde 1865 (Loucks, 1934).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre esta enfermedad en Japón (Goto, 1968; Kuhara, 1978; Miyakawa y Yamaguchi, 1981, Goto, 1992b). Fueron especialmente útiles diversos trabajos realizados sobre control de la enfermedad (Lee y Shino, 1922; Kitajima, 1965), ecología y dinámica poblacional del organismo causal (Koizumi, 1969; Goto et al, 1975, Koizumi et al., 1996), fisiología y desarrollo de la enfermedad (Koizumi, 1977; Serisawa, 1981, Koizumi, 1988), metodologías de evaluación y caracterización de la resistencia a cancrrosis en diversos hospedantes (Koizumi, 1979; Koizumi, 1981, Koizumi, 1983), susceptibilidad del patógeno a los bacteriófagos (Wakimoto, 1967), mejoramiento genético de los hospedantes

(Matsumoto y Okudai, 1990; Takeshi, 2004) y obtención de variedades más resistentes a la enfermedad (Nishiura et al., 1984a, Nishiura et al., 1984b)

Según Verniere (1992), la primera referencia para cancrrosis de los citrus en China data de 1918. Actualmente, se encuentra presente en doce provincias chinas: Fujian, Guangdong, Guangxi, Guizhou, Hong Kong, Hubei, Hunan, Jiangsu, Jiangxi, Sichuan, Taiwán y Zhejiang (Johns, 2004)

Las primeras referencias sobre cancrrosis de los citrus en la India datan de 1942 y son del estado de Punjab, al noreste del país (Luthra y Sattar, 1942), además de los ya señalados en especímenes herborizados en el siglo XIX. En 1952, Chowdhury, citó esta enfermedad en el estado de Assam, al noroeste. Actualmente, la enfermedad se halla dispersa en la mayor parte de la India (Srivastava y Ahlawat, 1999).

El estudio de la enfermedad en la India es amplio. Se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre la fisiología de la enfermedad (Ramakrishnam, 1954), dinámica poblacional de la bacteria causal (Rao e Hingorani, 1963), mejoramiento genético de los hospedantes (Parsai, 1959; Prasad et al., 1997) y manejo integrado (Nirvan, 1961; Patel y Padhya, 1964; Patel y Desai, 1970; Ram et al., 1972; Sinha et al., 1972; Kishore y Chand, 1987; Kalita et al., 1996).

Diversos autores de otros países del sudeste asiático han trabajado en etiología de la enfermedad (Okabe, 1932; Hsie et al., 1974; Wu, 1972a), metodologías de control (Lee, 1920; Lee, 1921b; Bertus, 1931; Liu, 1966; Cheng y Cheng, 1998), resistencia de Xac a fagos (Okabe, 1961; Wu, 1972b; Wu et al., 1981; Wu et al., 1985, Wu et al., 1993), medios de cultivo para conservación del patógeno (Wu et al., 1976; Wu et al., 1985) y caracterización de mecanismos de resistencia de los hospedantes ante el patógeno (Tung et al., 1999; Tung y Kuo, 2000; Cheng et al., 2003).

Hasta la fecha, la cancrrosis de los citrus fue registrada en Afganistán, Bangladesh, Camboya, Islas Christmas, Cocos y Maldivas, Indonesia, Iran, Corea del Norte y del

Sur, Laos, Malasia, Myanmar, Nepal, Oman, Pakistan, Filipinas, Arabia Saudita, Singapur, Sri Lanka, Tailandia, Emiratos Arabes, Vietnam y Yemen (Johns, 2004).

1.2.1.2.2 Medio Oriente

La cancrrosis de los citrus fue encontrada en cultivos comerciales del norte de Yemen (Cook, 1988), Arabia Saudita, Oman, Iraq (Ibrahim y Bayaa, 1989), Emiratos Arabes (el Goorani, 1989) e Irán (Alizadeh y Rahimian, 1990). La patogenicidad de las cepas aisladas, denominadas Xac grupo A*, fue diferente al compararlas en distintas especies de *Citrus* y *Poncirus* (Vernière et al., 1998). La caracterización de estas *Xanthomonas* demostró cierta similitud con las Xac A típicas (Mohamadi et al., 2001; Graham et al., 2004).

1.2.1.3 Africa

En 1916, Ethel M. Doidge, citó por primera vez a la cancrrosis de los citrus en Sudáfrica (Doidge, 1916). Se supone que esta epifitía comenzó por el ingreso de plantines infectados traídos desde Japón (Loucks, 1934). La eliminación de la enfermedad se logró mediante la implementación de un plan de erradicación; que se inició en 1916 y finalizó en 1927 (Domato et al., 1977).

La cancrrosis se ha reportado en países y lugares del sur de Africa: Mozambique (Koizumi 1985; CAB, 2002) e islas del archipiélago Mascarene, como la Isla Reunión, que es territorio francés de ultramar (Verniere et al., 1994). En estas islas se han realizado diversos trabajos sobre detección (Hartung et al., 1996), manejo del cultivo para el control de la enfermedad (Pruvost et al., 1999) e interacción del patógeno con el ambiente (Pruvost et al., 2002). Esta enfermedad también ha sido citada en Comoros, República de Congo, Costa de Marfil, Gabón, Madagascar, Mauricio e Isla Rodríguez (Verniere, 1992), Seychelles y Tanzania (Johns, 2004).

1.2.1.4 Oceanía

La cancrrosis de los cítricos se detectó por primera vez en Australia en 1912, en el Territorio Norte (Northern Territory). La erradicación de la cancrrosis en esa infección duró 11 años e incluyó la destrucción de todo cítrico ubicado sobre el paralelo 19 de latitud Sur (Hill, 1918; *fuentes*: Austcitrus, 2006). Jones et al., (1984), encontraron cancrrosis de los citrus en las islas Thursday. Este brote fue eliminado hacia 1988 (Vernière, 1992) mediante la destrucción de todos los árboles de citrus. En 1987, se detectó en las Islas Christmas (dependencia australiana en el Océano Índico) síntomas de cancrrosis en cinco plantas de lima Key (*Citrus aurantifolia* Swingle), las cuales fueron eliminadas (Shivas, 1987). En 2004, aparentemente debido a la importación ilegal de plantines cítricos, se inició un nuevo foco de cancrrosis en varios establecimientos de la localidad de Emerald (Queensland). Esta nueva epifitía obligó a la implementación de un plan de erradicación de todos los cítricos de Emerald (Gambley et al., 2005; Matthews et al., 2005).

En Nueva Zelanda se presentó un foco de cancrrosis en el año 1937 (Reid, 1938; Domato et al, 1977). La enfermedad pudo eliminarse en 1972, luego de que las autoridades de este país implementaran un plan de erradicación (Pennycook, 1989). Este país fue declarado libre de cancrrosis de los citrus en 1993 (Dance, 1993, citado por Taylor et al., 2002; Taylor et al., 2002).

Diversos autores de este continente realizaron importantes aportes al estudio, como caracterización de cepas (Dye, 1958; Dye, 1966a; Dye, 1966b) y detección del organismo patógeno de la cancrrosis (Davis et al, 2000; Taylor et al., 2002).

La cancrrosis de los citrus también ha sido registrada en Belau, Estado Federado de Micronesia (Islas Carolina), Fiji, Papua y Nueva Guinea (Bradbury, 1986).

1.2.1.5 América del Sur

1.2.1.5.1 Brasil

La cancrrosis de los citrus fue registrada por primera vez en Brasil en 1957, en un vivero de Presidente Prudente en el Estado de São Paulo (Bitancourt, 1957; Camp, 1958). En 1958 se la encontró en los estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais y luego en Rio Grande do Sul, Paraná y Santa Catarina. El estado de Goiás logró mantenerse libre de esta enfermedad mediante un estricto plan de erradicación de plantas afectadas. El estado de São Paulo realizó hasta 1961 un plan de erradicación total de los cítricos. Luego de eliminar 1,2 millones de plantas (sanas y contaminadas), este plan fué reemplazado por un programa de erradicación de áreas contaminadas. Esta medida tuvo vigencia hasta 1969 (Ayres, 2001) cuando se decidió nuevamente erradicar los lotes completos que tuvieran por lo menos una planta con síntomas.

Hasta la fecha se han registrado brotes de esta enfermedad en los estados de Matto Grosso do Sul, Minas Gerais, Parana, Río Grande do Sul, Santa Catarina y São Paulo (EPPO, 2002)

En 1963, en Brasil, se encontró en áreas infectadas del estado de São Paulo, un nuevo tipo de *Xanthomonas* que ocasionaba lesiones solamente en lima Key (*C. aurantifolia*) (Rossetti, 1977). En 1971, Namekata caracterizó serológicamente este nuevo tipo de *Xanthomonas* y la diferenció de las del grupo A, causantes de la cancrrosis típica o de tipo A. Hasta la diferenciación serológica la única diferencia encontrada era el rango de hospedantes. Namekata propuso denominar a este nuevo tipo, *Xanthomonas citri forma specialis* (f. sp.) *aurantifolia* (Namekata y Oliveira, 1971). Posteriormente este tipo de cancrrosis se denominó: cancrrosis Tipo C, para seguir la nomenclatura de la enfermedad (Rosetti, 1977).

En 1979 se encontraron plantas afectadas con Xac al norte del río Tietê (Monte Alto, S.P.). Entre 1980-82 se prohibió la producción de cítricos en propiedades con presencia de cancrrosis. En 1987 se modificaron los procedimientos de erradicación y

sólo se eliminaban plantas enfermas y sanas en un radio de 50 m de la planta enferma. Entre 1992 y 1998 sólo se realizaron inspecciones en áreas con ocurrencia de síntomas de la enfermedad. El ingreso en 1996 del minador de la hoja de los citrus contribuyó al aumento del inóculo y posterior dispersión de la cancrrosis (Gottwald et al., 1997; Bergamin Filho et al, 2000).

En 1995 se modificó nuevamente las disposiciones de control, y se decidió eliminar todo cítrico en un radio de 30 m de las plantas afectadas. A partir de 1997 esta metodología perdió eficacia, los cultivos continuaban contaminados aún después de la erradicación. En agosto de 1999 se dispuso erradicar todas las plantas en quintas ó lotes con más de 0,5 % de plantas enfermas. Mediante esta metodología se logró mantener un 99,73 % de las parcelas sanas (Barbosa y Fernandes, 1999). Nuevos relevamientos en el año 2000, demostraron que la incidencia de la enfermedad se mantuvo en esos valores (Ayres, 2001; Hau, 2005).

La bibliografía producida por los investigadores en Brasil es numerosa y abarca diversos temas aunque no se efectuaron trabajos de control, excepto en los últimos años en el estado de Paraná (Rosetti, 1977; Leite 2000). Se pueden destacar estudios realizados en: caracterización de la bacteria causal por serología (Bach y Rossetti, 1984), susceptibilidad a fagos (Namekata, 1973), patogenicidad en distintos hospedantes (Namekata y Balmer, 1973), productos desinfectantes (Bach et al., 1984), dinámica poblacional y capacidad saprofítica del organismo causal de la enfermedad (Carvalho et al., 1984; Leite y Mohan, 1984b, Palazzo et al., 1984; Palazzo et al., 1988; Rinaldi y Leite, 2000), evaluación de la resistencia de diversos hospedantes a la enfermedad (Leite y Mohan, 1984b, Malavolta et al., 1984), estudios genómicos y comparativos de la bacteria y secuenciación total de una cepa correspondiente al grupo A, causante de cancrrosis A típica (Reinach, 2000; Hartung, 2000; da Silva et al., 2002; Machado, 2004; Moreira et al., 2004). Luego de la secuenciación de la cepa del grupo A la São Paulo State Science Foundation (FAPESP) y la FAPESP Genome

Program han iniciado un proyecto de secuenciación de los genomas de cepas de los grupos B y C del organismo causal de la cancrrosis de los citrus (*Fuente: FAPESP, 2006*).

1.2.1.5.2 Paraguay

En 1932, H. Fawcett envió desde Puerto Casado (Paraguay) hojas de lima con síntomas de cancrrosis para ser analizadas por H. R. Fulton en el Departamento de Agricultura de EEUU. El estudio de estas muestras determinó que se trataba de una enfermedad similar a la cancrrosis de los cítricos, la cual fue denominada “Falsa Cancrrosis” (Condado, 1942; Domato et al., 1977). Se cree que estas infecciones correspondían a cepas del grupo B o, incluso, del tipo C ya que se trataba de hojas de lima Key o lima sutil o sutí, muy común en el Paraguay en esa época.

La constatación oficial de la cancrrosis en el Paraguay data de 1965, en el departamento de Itapúa (introducción de cepas del grupo A). Se presume que la enfermedad fue introducida al Paraguay por material de propagación infectado, traído por inmigrantes japoneses al Brasil o directamente al Paraguay (Sanches, 1971). Las autoridades paraguayas implementaron en un principio un plan de erradicación, el cual fue suspendido ante el avance de la enfermedad (Domato et al., 1977; González S. y Villalba, 2001). En los últimos años se iniciaron nuevamente plantaciones comerciales de cítricos en Paraguay y se realiza un manejo integrado de la cancrrosis según las recomendaciones de Argentina.

1.2.1.5.3 Uruguay

A mediados de la década de 1950, se registraron en Uruguay focos de cancrrosis de los citrus, probablemente de cancrrosis B. Ya en la década de 1970 la epidemia ocurrida en el noreste argentino también comenzó a afectar a Uruguay, inmediatamente se implementó un programa de erradicación para evitar el establecimiento de la enfermedad y diseminación de la bacteria (Arocena y Favaro,

1981). A pesar de estar actualmente en vigencia este programa, se ha observado un aumento de la enfermedad en los últimos años (Scattolini et al., 2005).

1.2.1.5.4 Argentina

Según F. Valiela (1975), las primeras referencias sobre cancrrosis de los citrus en Argentina son de 1927 (Gotuzzo, 1965) se observaron lesiones de cancrrosis en muestras de plantas de limón.

En 1928, Juan B. Marchionatto, encontró lesiones de cancrrosis en limón en la provincia de Santa Fé (Condado, 1942). En ese mismo año, Zeeman, detectó cancrrosis en limón en las provincias de Misiones y Corrientes (citado por Domato et al., 1977). En 1935, el Laboratorio de Fitopatología de Bella Vista (Ministerio de Agricultura de la Nación) determinó la presencia de cancrrosis en muestras procedentes de Concordia (Entre Ríos), todas estas determinaciones fueron basadas en los síntomas y no fué aislado el agente causal ni cumplido los postulados de Koch.

En 1937, H. Fawcett y A. Bitancourt, diferenciaron por primera vez los tipos de cancrrosis: la cancrrosis sudamericana y la asiática, introducida y caracterizada en EEUU y Asia. Ellos llamaron cancrrosis B a la encontrada en Argentina y Paraguay y cancrrosis A a las que causaron las epidemias de principios del siglo XX en diversos lugares (Condado, 1942; Domato et al., 1977). En 1950, se aisló e inoculó bacterias amarillas de los síntomas de falsa cancrrosis o tipo B, con el objeto de reproducir síntomas de la enfermedad en cítricos (Du Charme, 1950); pero no pudieron cumplirse los postulados de Koch. El organismo causal de la cancrrosis tipo B fue descrito en 1967 por Gotuzzo y Rossi cuando trabajaron con muestras de cancrrosis en naranja y otros cítricos enviadas desde Corrientes. Estas autoras aislaron cepas de *Xanthomonas* de las diversas muestras y consideraron a algunas como atípicas pues no provocaron licuefacción de gelatina ni producción de ácido sulfhídrico (Gotuzzo y Rossi, 1967). Sin embargo, estas autoras no identificaron diversos grupos ya que en inoculaciones cruzadas obtuvieron síntomas con todas las cepas tanto en el

hospedante original como en otros. Se cumplió con el postulado de Koch y se concluyó que los síntomas de cancrrosis en el noreste argentino estaban causadas por *Xanthomonas citri* y algunas cepas podían considerarse atípicas.

La forma de introducción del tipo B, al igual que su origen nunca fue determinado. Las cepas causantes de cancrrosis B desaparecieron entre 1978-90 después de la introducción de las cepas causantes del tipo A, mucho más agresivas (Canteros, 2005).

La introducción de las cepas causantes de cancrrosis Tipo A en Sudamérica se produjo por el ingreso de plantas y material de propagación desde Japón, introducido con el objeto de realizar nuevas plantaciones en Brasil en colonias de inmigrantes japoneses. En las áreas limítrofes con Argentina, las lesiones producidas por éstas cepas fueron evidentes en el año 1974 (Hogg, 1985). La agresividad de la enfermedad era mucho mayor, sin embargo, la imposibilidad de diferenciar las cepas del grupo B de aquéllas del grupo A hicieron difícil la toma de decisiones sobre las plantas a erradicar en los primeros años. La diseminación de las cepas A fue rápida entre 1977 y 1980, para luego ser lenta pero constante en los años subsiguientes (Canteros, 1984a). En 1990 se consideró a esta enfermedad endémica para la región NEA, declarándose al noroeste argentino (NOA) zona libre de cancrrosis. A finales de 1999, se encontró sobre naranja síntomas de cancrrosis de los citrus en los estados bolivianos de Cochabamba y Santa Cruz (Braithwaite, 2002). La enfermedad se observó en el NOA en el año 2000 (Canteros, 2004; Rivadeneira, et al., 2004a y b).

Trabajos realizados por investigadores argentinos han colaborado con el entendimiento de la enfermedad (Canteros, 2001a) y el diseño de estrategias de manejo y control (Canteros, 2005).

Diversas líneas de investigación realizaron aportes al conocimiento de la enfermedad mediante la realización de trabajos de caracterización del patógeno (Canteros et al., 1985; Canteros y Naranjo, 2002; Haelterman et al., 2005) y del

hospedante (Canteros, 1992; Zubrzycki, 1997), dinámica de la población bacteriana (Danos et al., 1992; Rybak y Canteros, 2001), control de la enfermedad y manejo integrado (Stall et al., 1979a; Rosillo et al., 1981, Canteros, 2000).

1.3. ANTECEDENTES DE CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO PATÓGENO

1.3.1 Caracterización del género *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* está comprendido en su mayoría por bacterias fitopatógenas (Young et al., 1992; Swing y Civerolo, 1993) aunque, contrariamente a lo que se creía antes, también existen *Xanthomonas* saprófitas. En la década de 1980, el 90% de las especies de bacterias fitopatógenas pasaron a ser parte de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Schaad et al., 2000).

La caracterización de las distintas especies que comprenden este género (Maes, 1993; Louws et al., 1994; Leite et al., 1994; Vauterin et al., 1996b) produjo continuas revisiones taxónomicas (Dye, 1962; Vauterin et al., 1990). En los últimos años, se ha publicado trabajos de revisión sobre el género y especie (Young et al., 1996; Vauterin y Swing, 1997; Vauterin et al., 2000; Schaad et al., 2000).

Hauben et al., en 1997, realizaron una clasificación de todas las especies de *Xanthomonas* comparando el nivel de similitud de los segmentos 16S de ADN ribosómico (rDNA). Se encontró un alto nivel de similaridad entre las especies analizadas (98,2%). Se realizó, además, una comparación de la secuencia de cada una de las especies con su respectivo organismo tipo. La cepa de *X. axonopodis* pv. *citri* analizada mostró apenas 7 nucleótidos (de 1500) diferentes con respecto al organismo tipo. Trabajos posteriores, los cuales profundizaron las investigaciones de este grupo, confirmaron el alto nivel de similaridad entre especies de *Xanthomonas*, al secuenciar 18 regiones intergénica 16S-23S (ITS), aunque no incluyeron en su análisis al organismo causal de la cancrrosis de los cítricos (Gonçalves et al., 2002).

En 2005, Rademaker, utilizando primers Rep, ERIC y BOX realizó una clasificación de distintos géneros de *Xanthomonas*. Como resultado se concluyó que el grupo de *X. axonopodis* era el más diverso al separarse a su vez en 6 subgrupos. En esta clasificación, se ubicaron en distintos subgrupos el patovar *citri* del *citrumelo* y ambos del *aurantifolii* (aunque las cepas del grupo C y B presentaron divergencia interna, ésta no fue suficiente para justificar la separación en distintos subgrupos).

Naranjo et al. (2005), realizaron repPCR utilizando primers específicos REP, BOX y ERIC en cepas de cancrrosis de los cítricos y mancha bacteriana. Los resultados obtenidos permitieron separar en distintos grupos los grupos A, B/C y *X. axonopodis* pv *citrumelo*. Las cepas de los grupos B y C formaron dos subgrupos dentro de ese agrupamiento.

1.3.2 Caracterización del organismo causal de la cancrrosis de los citrus

El avance en el conocimiento de los patógenos y los cambios en los criterios taxonómicos hizo que esta bacteria sea denominada en forma diferente a través de los años. Inicialmente fue clasificada como *Pseudomonas citri* (Hasse, 1915), posteriores revisiones han modificado su ubicación y nomenclatura (*Bacterium citri* (Hasse) Doidge, 1916; *Bacillus citri* (Hasse) Holland, 1920; *Phytomonas citri* (Hasse) Bergey, et al., 1923; *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, 1939; *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye, 1978; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al., 1995. Como cepa de referencia, se acepta a: NCPPB 409 (cepa Tipo); CFBP 2525. NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, CSL York, UK. CFBP = Collection Française de Bacteries Phytopathogènes, INRA, Angers, F. (Bayer computer code: XANTCI); categorización fitosanitaria: EPPO A1 list no. 1; EU Annex designation II/A1

Existen propuestas para cambiar la denominación de esta bacteria. Gabriel et al., en 1989, sugirió volver a designar a *Xanthomonas citri* como una especie y no como un patovar: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Esta propuesta, cuestionada por

algunos autores (Vauterin et al., 1991) fue rechazada en 1995 por el ICSB (Subcommittee on the Taxonomy of the Genus *Pseudomonas* and Related Organism) (*Fuente*: BACTERIO; ICSB, 1995).

El nombre aceptado en el *International Journal of Systematic Bacteriology* (publicado por *The Society for General Microbiology* de Inglaterra) para esta especie bacteriana es *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1985), Dowson, 1939) pv. *citri*. El patovar es una subdivisión creada para uso exclusivo de los fitopatólogos pues para los bacteriólogos puros la patogenicidad no es un atributo suficiente para diferenciación taxonómica. Existe una propuesta (Vauterin y Swings, 1997) para el uso del específico *axonopodis* aunque no se acepta aún la inclusión de otros patovares (Schaad et al., 2000).

En el año 2005, Schaad et al., sugirieron cambiar nuevamente la denominación de Xac por *X. smithii* subsp. *citri*; también se sugirió el cambio de denominación para *X. c.* pv. *citrumelo* por el de *X. smithii* subs. *malvacearum* y para las *Xanthomonas* causales de la cancrrosis tipo B y C a *X. fuscans* subs. *aurantifolii*. Su propuesta, basada en la comparación de las respuestas obtenidas entre 40 cepas de 19 especies y patovares de *Xanthomonas*, se realizó utilizando diversas técnicas: ensayos de afinidad de ADN, comparación de secuencias amplificadas del espacio intragénico (ITS) ribosomal 16S-23S, primers universales 1493f y 23r, análisis comparativos utilizando AFLP (digestión de ADN total de 44 cepas de los 5 grupos conocidos que causan cancrrosis de los citrus con enzimas de restricción EcoRI y MseI) y amplificación utilizando primers EcoRI+0 y MseI+C. Se compararon caracteres fenotípicos como ser crecimiento en medios YDC, FS, mSX, hidrólisis de almidón en medio NSCA, producción de pigmentos en medios YDC y NBY, producción de alcali mediante utilización de ácido sacárico y ácido aspártico, hidrólisis de gelatina, digestión de caseína utilizando Litmus milk, degradación de pectato utilizando el método de pH de Hildebrand. Las cepas de los grupos B y C causales de la cancrrosis de los citrus tipo B y C, presentaron

susceptibilidad al fago Cp3, no susceptibilidad al los fagos Cp1 y Cp2, utilizaron lactosa, manitol, celobiosa y produjeron precipitación en Litmus milk, en medio YDC y FS produjeron colonias más lentamente que las cepas del grupo A (Schaa et al., 2005).

En el año 2006, este mismo grupo de trabajo, al revisar sus postulados y compararlos con los del Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes (Lapage et al., 1976), declaró ilegítima la especie *X. smithii* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006)

En la actualidad, la denominación de este organismo varía según el autor (Brunings y Gabriel, 2004; Graham et al., 2004).

Las cepas del grupo B, presentes en la provincia de Corrientes desde 1929 hasta 1980 y en Entre Ríos hasta hace 10 años producían ataques esporádicos en limón (*Citrus limon* (L.) Burm.). El tipo A, más agresivo, ingresó en Argentina en la década del '70 (Canteros, 1984).

Fawcett y Bitancourt, en 1937, separaron la cancrrosis A de la B, basándose exclusivamente en observaciones de campo sobre la agresividad diferencial en diversas especies de citrus pero nunca aislaron cepas del organismo causal de la cancrrosis que llamaron B o falsa cancrrosis. En 1965-66 ocurrió un ataque muy fuerte de cancrrosis en Saladas y Bella Vista, en Corrientes. Esto llevó a que en 1967, Gotuzzo y Rossi caracterizaran biológicamente las cepas obtenidas en el ataque y en otras plantas para dilucidar si se estaba en la presencia del tipo A. Por primera vez encontraron que el agente causal de todos los síntomas (nuevos y viejos) en las muestras recibidas era *Xanthomonas*, al ser aisladas de citrus eran *Xanthomonas citri* según la terminología de entonces, aunque consideraron que algunas cepas eran "atípicas". Estudios posteriores intentaron separar o unir los tipos A y B (Alcaraz, 1980; Messina, 1980a, 1980b; Rossi et al, 1980; Goto et al, 1980; Civerolo, 1985). En 1979 Stall et al. describieron experimentalmente la diferente patogenicidad y la dificultad de crecimiento del tipo B en agar nutritivo como forma de separar los tipos. Luego

(Canteros et al, 1985) se desarrolló un medio de cultivo específico para el tipo B que permitió el crecimiento de todas las cepas y facilitó los trabajos posteriores.

Las cepas del grupo C fueron descritas en Brasil y caracterizadas serológicamente por Namekata y Oliveira en 1971. Se propuso inicialmente como *Xanthomonas citri* fsp. *aurantifoliae* Namekata & Oliveira, 1971, debido a su capacidad de infectar solamente lima Key (Namekata y Oliveira, 1971). Las cepas del Tipo C nunca fueron encontradas en Argentina.

Como se ha descrito más arriba, las diferencias observadas en infecciones naturales dieron lugar a diferenciación de diversos grupos de cepas (llamados patotipos por algunos autores) causantes de diversos tipos de cancrrosis de los citrus. Estudios posteriores moleculares, serológicos, de ácidos grasos y de utilización de sustratos, entre otros, permitieron separar los grupos hasta ciertos niveles. Esta diferenciación nunca se había buscado en los lugares donde la cancrrosis estaba presente desde tiempos remotos sino partió específicamente desde la descripción del tipo B y desde allí para cada nueva epidemia (Goto et al., 1980; Gabriel et al., 1989; Hartung y Civerolo, 1989; Verniere et al., 1991; Verniere et al., 1993; Haelterman et al., 2005 y 2006; Naranjo et al., 2005; Schaad et al., 2005; Canteros, comunicación personal)

Según la mayoría de los investigadores que trabajan en el tema, las bacterias pertenecientes a la especie *Xanthomonas axonopodis* que causan síntomas de cancrrosis en citrus están separadas en los siguientes grupos

Grupo A (Hasse, 1915); A *Miami* (Schubert et al., 1996); A* (Verniere et al., 1998), A *Manatee* (Schubert y Sun, 2003); A^w (Sun et al., 2004),

Grupo B (Fawcett y Bitancourt, 1937; Stall et al., 1981b; Gotuzzo y Rossi, 1967),

Grupo C (Namekata y Oliveira, 1971),

Grupo D (García P. y Barreto V., 1984; Palm y Civerolo, 1994),

Xanthomonas axonopodis pv. *citrumelo*; (ex grupo E), (Graham y Gottwald, 1991).

Algunos autores han propuesto cambiar la denominación de los actuales grupos en base a estudios moleculares comparativos (Gabriel et al., 1989; Vauterin et al., 1995; Schaad et al., 2005). Primero se propuso reagrupar las cepas de los grupos B y C dentro de un solo patovar (*Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel et al., 1989). Posteriormente, otros autores propusieron la denominación de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Vauterin et al., 1995). En los últimos años, se sugirió denominar a las cepas aislados sólo en Sudamérica como *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel et al., 1989) (Schaad et al., 2005).

Estas propuestas tuvieron sus correspondientes réplicas por parte de otros investigadores (Young et al., 1991; Vauterin et al., 1991; Schaad et al., 2000). Actualmente la denominación de estas bacterias varía dependiendo del grupo de trabajo (Bruning y Gabriel, 2003; Graham et al., 2004).

Las restricciones cuarentenarias exigen denominaciones exactas (Stall y Civerolo, 1994; Vauterin et al., 2000). Las Normas OEPP (EPPO Standards), las cuales regulan el diagnóstico y las medidas sanitarias de control para enfermedades aún no presentes en países europeos, determinó como organismo bacteriano cuarentenario a todas las *Xanthomonas* que infectan citrus, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al., (1995) (sin= *Pseudomonas citri* Hasse, *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, *Xanthomonas citri* f.sp. *aurantifoliae* Namekata y Oliveira, *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye 1978, *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel et al., *Xanthomonas citri* (ex Hasse) nom. rev. Gabriel et al., *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Vauterin et al., (Posición taxonómica: Bacteria: Gracilicutes) (OEPP/EPPO, 2005).

Las cepas de los grupos B y C han sido parcialmente caracterizadas mediante determinación del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) (Hartung y Civerolo, 1989), perfiles metabólicos utilizando distintas fuentes de carbono (técnica de Biolog®)

(Verniere et al., 1993), análisis de secuencias amplificadas por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) relacionadas con genes *hrp*- (Leite et al., 1994), comparación de secuencias de ADN mediante PCR, utilizando primers universales para *Xanthomonas*, basados en la región ITS del operon ribosomal bacteriano y genes *pthA* (Cubero y Graham, 2002), repPCR con los iniciadores ERIC, BOX y REP (Naranjo et al., 2005), otros perfiles metabólicos, de ácidos grasos (fatty acid methyl ester –FAME) (Vauterin et al., 1991; Vauterin et al., 1996a), e hibridación de ADN (experimentos de reasociación) (Egel, 1991; Egel et al., 1991; Vauterin et al., 1990; Vauterin et al., 1991; Sun et al., 2004). Aunque estos estudios no estuvieron enfocados específicamente en la diferenciación de los grupos B y C, pudo observarse en los resultados que existen diferencias entre los grupos B y C (ver adelante) y surge la necesidad de definir si deberían estar en el mismo patovar.

Se han realizado diversos estudios de las cepas de *Xanthomonas* patógenas de citrus aisladas en Sudamérica mediante inoculaciones cruzadas y ocurrencia a campo. Las conclusiones no siempre fueron coincidentes, especialmente en los primeros trabajos (Gotuzzo y Rossi, 1967; Namekata y Oliveira, 1971; Alcaraz, 1977, Rossi et al., 1980; Stall et al, 1981b; Goto et al., 1980; Canteros, 1985; Naranjo y Canteros, 2001; Canteros y Naranjo, 2002; Naranjo et al., 2004; Naranjo et al., 2005); también se utilizaron métodos serológicos y moleculares (Haelterman et al, 2005 y 2006; Naranjo et al., 2005). Los resultados indicaron diferencias en cuanto a la agresividad y diversidad genética para las cepas de los grupos B y C.

En 1977, Rossi et al., determinaron la heterogeneidad de poblaciones de *Xanthomonas* patógenas de citrus provenientes de distintos aislamientos o cepas de la zona del litoral argentino, en sus trabajos todas las cepas aisladas eran consideradas en forma conjunta sin diferenciación previa de tipos pues no había un método para separarlas ni el convencimiento de que fueran diferentes. Se estudiaron 17 cepas de aislamientos realizados en distintos cítricos de Misiones, Corrientes y Entre Ríos,

caracterizándolas por métodos bioquímicos (licuefacción de gelatina, acidificación de azúcares), serológicos (pruebas de doble difusión bidimensional en agar, test de Ouchterlony con anticuerpos provenientes de la inoculación de conejos con dos cepas de características disímiles, respectivamente) y pruebas de patogenicidad en hojas *in vitro* de distintos cítricos.

No se observó respuesta diferencial (especificidad) para las cepas probadas e inoculadas en varias especies, tanto la de origen como otras (inoculaciones cruzadas). Se observó una correlación positiva entre la incapacidad de licuefacción de gelatina y reacciones serológicas con respecto a menor virulencia en las pruebas de patogenicidad, únicamente. Las autoras concluyeron que las cepas analizadas correspondían al género *Xanthomonas* y como fueron aisladas de citrus eran *Xanthomonas citri* y diferenciaron a algunas cepas como "atípicas".. Estas no se conservaron y por ello no pudieron analizarse con los métodos desarrollados más recientemente.

En 1980 Goto et al., caracterizaron distintas cepas de los grupos A y B, provenientes de Entre Ríos (Argentina) y de Japón, mediante la comparación de las propiedades patogénicas, fisiológicas, serológicas y por susceptibilidad a fagos. La separación preliminar de los grupos se hizo en base a las características observadas a campo, especialmente diferencias en agresividad. En este trabajo los autores sugirieron que las cepas B deberían ser denominadas como perteneciente a un patovar distinto del patovar *citri*, especialmente para evitar el tratamiento cuarentenario de las cepas B, menos agresivas que las A. Las cepas B se diferenciaron de las A porque producían colonias de pequeño tamaño, tenían un período de crecimiento más lento en medio líquido, crecían a menor temperatura que las A y no utilizaban lactosa ni maltosa, y eran susceptibles sólo al bacteriofago Cp3 y no al Cp1 ni Cp2. La utilización de malonato fue diferencial en las B (10/ 21 aislamientos positivos), aunque todas las cepas A utilizaron este sustrato. La utilización de manitol fue diferencial en las A (11/

21 aislamientos positivos), mientras que todas las cepas B utilizaron este sustrato. En el crecimiento en leche tornasol (prueba de Litmus milk) se observó alcalinización y peptonización del medio tanto en las cepas A como en las B. Se observó que las cepas B poseían menor agresividad y producían menos lesiones que las A en todas las inoculaciones realizadas (se utilizó pulverización del inóculo e inoculación con heridas (método de pin prick). Estos autores informaron que la f. sp. *aurantifolia* (tipo C, recientemente descubierta en esos años), poseía caracteres patológicos, fisiológicos y serológicos que lo hacían diferente de los otros tipos. Esta variante (f. sp.) que se presentó como altamente virulenta (agresiva) en lima Key, fue poco patogénica en lima Tahití y no virulenta (patogénica) en otros citrus.

En ese mismo año (1980) en Entre Ríos (Argentina) Messina diferenció mediante inmunofluorescencia bacterias pertenecientes preliminarmente a los grupos A/ B y B/ C. La metodología empleada (utilización de bacterias provenientes de cultivos en agar y tejidos con síntomas provenientes de campo) no permitió separar las cepas A del C.

Messina y Garrán (1980) inocularon por aspersión distintos cítricos con cepas bacterianas provenientes de síntomas de cancrrosis de la zona de Entre Ríos y observaron variaciones en la respuesta entre las cepas causantes de cancrrosis B y A. Estas variaciones en virulencia (agresividad), mostraron que las cepas causantes del tipo B es igual o menos patogénico (agresivo) que el A.

En 1989 Gabriel et al., sugirieron un reinstalamiento de la especie *X. citri* (para las cepas del grupo A) y la denominación de *X. campestris* pv *aurantifolii*, para los grupos B y C, esta es la primera mención al nombre *X. campestris* pv *aurantifolii* para los tipos B y C en forma conjunta. La única mención anterior había sido la de Namekata (1973) como *X. aurantifolia* para la C pero no para la B. Nunca se había propuesto un nombre diferente para las cepas causantes de la cancrrosis tipo B con respecto a las cepas causantes de la cancrrosis tipo A. Esta propuesta se basa principalmente en los resultados obtenidos al comparar fragmentos de RFLPs (digestiones enzimáticas de

ADN genómico de las bacterias en estudio) hibridados con sondas de ADN específicas para *X. c. pv. malvacearum* y *X. c. pv. citrumelo*. La utilización de esta metodología agrupó las cepas que producían cancrrosis en cítricos dentro de dos grupos. Trabajos posteriores no encontraron suficiente sustento para la propuesta por la metodología empleada por estos autores (Young et al., 1991; Vauterin et al., 1991), considerando inapropiado el cambio de denominación basado únicamente en RFLP.

Hartung y Civerolo, en 1989, mediante un análisis de RFLP (con sondas preparadas en base a secuencias genómicas de *Xac*) y utilizando cepas de distintos grupos patogénicos de *Xanthomonas* causantes de síntomas en citrus, observaron que *X. axonopodis* pv *citrumelo* era mas variable que las cepas de la cancrrosis tipo A. El objetivo del trabajo fue mostrar diferencias entre *X. axonopodis* pv *citrumelo* y patovares causantes de síntomas típicos de cancrrosis. Al observar los coeficientes de similitud para los RFLPs utilizados, se pudo ubicar a todos los patovares causantes de lesiones de cancrrosis de los cítricos dentro del mismo grupo y se diferenciaron en un grupo distinto las cepas que causan mancha bacteriana (bacterial spot). Las cepas del grupo C se ubicaron dentro del subgrupo del tipo B con las sondas seleccionadas por dichos investigadores. En 1990 Graham et al., inocularon 56 cepas de *Xanthomonas* saprófitas o de hospedante desconocido, obtenidas del filoplano de plantas que no eran cítricos; se observó que 13 de éstas produjeron síntomas similares a los obtenidos con *X. axonopodis* pv *citrumelo*, con lo cual se sugirió la idea de no dar a este organismo el rango de patovar o considerarlo saprófito oportunista. El género *Xanthomonas* se consideraba que estaba formado exclusivamente por bacterias patógenas hasta que en las últimas décadas se encontraron cepas que estaban como epífitas sobre plantas sin causar enfermedad. La presencia del gen *hrp* separa a las cepas patogénicas de las no patogénicas (Stall y Minsavage, 1990).

Vauterin et al., en 1991, compararon 61 cepas de *Xanthomonas* pertenecientes a los grupos A, B, C y *X. c. pv. citrumelo* (denominadas inicialmente según el criterio de

los que proveyeron las cepas) utilizando diferentes metodologías: análisis de extractos totales de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-Page), análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (FAME) e hibridaciones de ADN-ADN. Los autores concluyeron que, utilizando estas metodologías, se pudo separar en diferentes grupos las cepas A de las de *X. c. pv. citrumelo*. Las cepas correspondientes B y C, distintas de todas las demás, no pudieron ser diferenciadas conjuntamente en un grupo, debido a su diversidad intraclase.

En 1991 Alvarez et al., realizaron un análisis comparativo utilizando anticuerpos monoclonales para diferenciar los grupos A, B, C y *X. campestris pv. citrumelo* (causantes de CBS). Los anticuerpos antiA (A1, A2 y A3) reaccionaron solo con cepas A, *X. manihotis* y algunas cepas de CBS. Los anticuerpos antiB (B1, B2 y B3) mostraron una respuesta heterogénea y reconocieron solo a algunas de las cepas B (B1 y B3) y a algunas cepas B y C (B2), así como cepas de *X. phaseoli* y *X. diffenbachiae*. Los anticuerpos antiC solo reconocieron un epítipo (sensible al calor), asociado a una molécula de una enzima proteolítica de la cepa C. Los anticuerpos anti-citrumelo reconocieron cepas de CBS; y no reconocieron cepas causantes de cancrrosis de los citrus, *X. alfalfae* o *X. vitians*.

Stall y Civerolo publicaron en 1991 una revisión sobre la historia y el avance del conocimiento de la cancrrosis de los citrus en Florida luego de los repetidos ataques de la enfermedad en ese estado de EE. UU. Revisaron trabajos publicados por otros investigadores y por ellos mismos. Identificaron los distintos grupos por sus caracteres fisiológicos y patogénicos y sugirieron separar sub-específicamente el grupo A del B y apoyaron la denominación del grupo C como f. sp. *aurantifolia* (Namekata y Oliveira, 1972; Stall y Civerolo, 1991).

Según los autores mencionados la f. sp. *aurantifolia* sólo produjo lesiones en lima Key y no mostró susceptibilidad a los fagos Cp1 y Cp2 (los cuales sí reconocieron a las cepas del grupo A) y se observaron además diferencias serológicas entre los

grupos A y B. Según los autores, las cepas B, desplazadas en Sudamérica por las A, que es más agresivo, presentaba dificultades en su aislamiento y no crecía en medios simples como el agar nutritivo como sí lo hacían las A (Stall et al., 1979b; Canteros de Echenique et al., 1985).

En 1985, Civerolo publica sus resultados sobre caracterización de plásmidos en cepas de los grupos A, B y C de *Xanthomonas* patógenas de citrus. Este autor trabajó con 6 cepas de distinta procedencia, las cuales presentaron al menos 7 plásmidos distintos, con masas moleculares que variaron entre 12 y 53 Megadaltons. No se observaron fenotipos específicos que permitieran diferenciar las bacterias en grupos, aunque cada cepa presentó bandeos distintos entre sí. Este autor sugirió profundizar estos resultados realizando estudios comparativos, como ser digestiones de estos plásmidos con enzimas de restricción para determinar polimorfismos.

Posteriormente, Hartung y Civerolo, en 1987, caracterizaron cepas de bacterias que producen cancrrosis en citrus pertenecientes a los grupos A, B y *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* realizando digestiones de ADN con enzimas de restricción (RFLPs) en geles de poliacrilamida. Sus resultados permiten discernir, observando los patrones de bandeos obtenidos, que las cepas de los grupos A y B son diferentes y estas a su vez de las cepas de *Xa* pv. *citrumelo*,

Pruvost et al., en 1992, estudiaron los plásmidos y obtuvieron perfiles de plásmidos por tamaño y sitios de restricción con el objeto de distinguir entre los distintos grupos de *Xanthomonas* patógenas de citrus. El análisis permitió separar las cepas A, B y C en grupos distinguibles entre sí. En este trabajo, los autores usaron una sonda obtenida de ADN genómico de *Xac*, que hibridaron con ADN genómico de éstos tipos digerido con enzimas de restricción y observaron hibridación fuerte para las cepas A; la B hibridizó débilmente de manera diferencial en dos bandas de alto peso molecular; la cepa C presentó una señal débil de hibridación en una sola banda de 3,6 kilobases.

Verniere et al., en 1993, evaluaron la capacidad de identificación de las cepas de los diferentes grupos con la técnica Biolog® de caracterización de variaciones metabólicas entre cepas: Trabajaron con cepas A (provenientes de 24 países), B y C (de Argentina y Brasil, respectivamente). Luego de suplementar la base de datos con información de 54 cepas de *Xanthomonas* causantes de cancrrosis y 43 cepas de *Xanthomonas* asociadas con CBS, los autores lograron identificar correctamente 70% de las cepas analizadas, que correspondían en todos los casos a los grupos A, B y C. Se propuso en este trabajo la utilización de L-fucosa, D-galactosa y alaninamida como marcadores para diferenciar cepas en cada uno de los grupos. Las cepas del tipo A utilizaron α -Lactosa y ácido láctico mientras las B no utilizaron estos nutrientes. La cepa C degradó sólo ácido láctico. Los productos de degradación de la lactosa (ácido butírico y propiónico) fueron diferencialmente utilizados por la A (α -hidroxi-butírico y propiónico), B (ac. propiónico) y C (α y β -hidroxi-butírico y ác. propiónico) (Verniere et al., 1993).

Leite et al., en 1994, utilizaron iniciadores de PCR (primers) basados en genes *hrp* de *X. c. pv. vesicatoria* (grupo B, C y D). Estos iniciadores RST fueron desarrollados por R. E. Stall (Bonas U.; Stall R.E., comunicación personal). Leite et al., probaron distintas *Xanthomonas* y entre ellas las causantes de enfermedades en citrus (cepas A, B, C y cepas de *X. axonopodis pv citrumelo* de agresividad diversa). La digestión de los productos de amplificación de PCR con la enzima *Hae* III, dió el mismo patrón de bandas para las cepas B y C y poca divergencia entre estas dos y las A (60% de similitud en la hibridación de ADN total entre los tres patotipos). Las distintas cepas de *X. axonopodis pv citrumelo* no presentaron grandes diferencias entre sí ni con *X. fici* (80% de similitud en la hibridación de ADN total entre cepas de *X. axonopodis pv citrumelo*) y se diferenciaron de las cepas causantes de cancrrosis de los citrus tipos A, B y C.

En 1998 Vernière et al., realizaron una caracterización de distintas cepas de *Xac* (A*) aisladas en el sudoeste de Asia (Arabia Saudita, Omán, India y Pakistán); las cepas fueron comparadas con otras cepas A, B y C consideradas típicas. Para las A se realizaron pruebas de patogenicidad y de inoculación de hojas *in vitro* de lima Key y pomelo Marsh con el objetivo de observar la morfología de los síntomas y el crecimiento bacteriano. Los autores observaron diferencias morfológicas en los síntomas obtenidos con las cepas A y las A*, aunque no se observaron diferencias en la dinámica del crecimiento de las bacterias. Se obtuvo crecimiento en medios con CINa 3% únicamente de las cepas A. Las cepas B y C, a diferencia de las A, no hidrolizaron gelatina. Las cepas C, pero no las B, hidrolizó caseína. El perfil de utilización de sustratos de carbono mediante Biolog® no permitió diferenciar entre las distintas cepas A pero sí a las A de las B y de *X. axonopodis* pv. *citrumelo*. Las cepas A y B, pero no C, utilizaron alaninamida; A y C, pero no B, utilizaron D-Galactosa y L-Fucosa. En las pruebas de sensibilidad con fagos se observó que la B fué susceptible solamente al fago Cp3 (originario de Japón) (Goto et al., 1980). Las pruebas de ELISA indirecto con anticuerpos policlonales anti- *X. axonopodis* A, B y C no mostraron alta afinidad para las cepas A*, ni reacciones cruzadas entre los tipos A, B y C. Las pruebas moleculares con RFLP de productos de iniciadores (primers) de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) diseñados para *Xac* por Hartung et al., 1993, mostraron que las cepas A* pertenecen al grupo de *Xac* (Vernière et al., 1998).

En 2002, Cubero y Graham, observaron diferencias entre cepas B y C en el análisis molecular con iniciadores universales de PCR, los ERIC y BOX (Louws et al., 1995). Se observó también alta similitud en las secuencias de ADN ribosómico para los segmentos 16S y 23S entre A, B, C y *X. axonopodis* pv *citrumelo* (ex tipo E). La amplificación de segmentos de ADN mediante iniciadores basados en el gen *pthA* mostró alta similitud entre las cepas A y sus variantes A^w y A* y diferencias con B y C.

En éstos, se observó reconocimiento diferencial de los iniciadores y divergencia para las cepas B.

En 1985 Canteros de Echenique et al., desarrollaron un medio de cultivo que permitió el crecimiento del tipo silvestre (natural) de las bacterias que causaban cancrrosis B. Estos autores, determinaron que las cepas del grupo A, capaces de crecer en medio King B, agar nutritivo, Wakimoto y SMB, se diferenciaban de las cepas del grupo B, las cuales sólo pudieron crecer en medio SMB que tiene como ingredientes a agar purificado, caldo nutritivo, sulfato de magnesio y fosfato dipotásico (Canteros de Echenique et al., 1985). Otras diferencias encontradas entre los grupos fueron en cuanto a su capacidad para realizar proteólisis de la leche y tolerancia al CINa (positivo en ambas casos para el grupo A y negativo para el grupo B). Se observó además, poca movilidad en agar triptona y susceptibilidad ante el bacteriófago Cp3 para las cepas del grupo B, mientras que las del grupo A fueron susceptibles a los bacteriófagos Cp1 y Cp2. Se registró diferencias en la composición de ácidos grasos, perfil de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa y serología, para las cepas de los grupos A y B. Las cepas del grupo B presentaron menor virulencia que las del grupo A al ser inoculadas por infiltración en hojas jóvenes de pomelo (Canteros, 2001b).

Canteros y Naranjo, en 2002, caracterizaron bioquímica y patogénicamente las cepas A, B y C y obtuvieron como resultado el crecimiento de cepas A en medios con más de 2% CINa y la reacción de proteólisis de la leche en medio de cultivo con leche descremada y extracto de levadura (las cepas B y C no crecieron en 2%. Las cepas B fue menos patogénicas que las A en todos los citrus inoculados (lima Key, naranja, pomelo, mandarina y limón). Solo se produjeron lesiones con cepas C en lima Key y naranjo agrio. Al cuantificar el crecimiento en las hojas inoculadas, se observó un crecimiento 100 veces menor en las cepas B y C en lima Key respecto de las A. La

cepa C dejó de crecer, en el mesófilo de hojas inoculadas de pomelo Duncan, luego del 6to día.

Brunings y Gabriel (2003) realizaron una revisión sobre el organismo causal de la cancrrosis de los cítricos. En dicho trabajo se distinguieron dos grupos filogenéticos, el grupo asiático compuesto por las cepas pertenecientes a *X. axonopodis* pv. *citri* (cepas A, A* y A^w) y el grupo sudamericano compuesto por cepas B y C (que fueron clasificados como un mismo patovar, *X. axonopodis* pv. *aurantifoli*). Debido a la similitud de síntomas supusieron que poseen un mecanismo patogénico similar. Al determinar el rango de hospedantes se indica al A como el más patogénico y que el A^w produce reacción de hipersensibilidad (HR) al inocular hojas de pomelo. Las cepas B son definidas como menos agresivas y sin restricción en cuanto a rango de hospedantes. Las cepas C están definidas como causantes de síntomas de cancrrosis sólo en lima Key y causante de HR en naranja dulce, pomelo y limón (Brunings y Gabriel, 2003)

Además, Brunings y Gabriel (2003) describieron las características moleculares de los distintos grupos. Las cepas A posee tres alelos del gen *pthA*, dos de ellos funcionales y uno no funcional. El primero de estos genes *pth*, aislado por Swarup et al., en 1991, elicitó la formación de canchros por las cepas A y suponen que es ese alelo el necesario para generar esta clase de síntomas (canchros). Al transferir este gen a *X. campestris* pv. *citrumelo* y a otras especies de *Xanthomonas* no patogénicas en citrus (como *X. c. alfalfae* y *X. c. cyamopsidis*) lograron obtener en pomelo Duncan síntomas similares a los producidos por las cepas A.

Las cepas A^w poseen una sola copia del gen *pthW*. Las cepas B y C poseen los genes *pthB* y *pthC*, respectivamente. Estos genes, aunque actúan para restringir la infección en algunos tipos de citrus, no actúan para restringir la formación de síntomas en otras especies (Brunings y Gabriel, 2003).

Las cepas B con las que trabajaron poseen un plásmido auto transmisible llamado pXcB, similar al plásmido pXAC64 presente en las cepas A. Ambos plásmidos tienen un cluster de genes similar y presentan genes con secuencias en parte homólogas las cuales codificarían para un sistema de secreción de tipo IV (T4S) o sistema de conjugación adaptada. En el plásmido pXcB, que es un componente del genoma de las cepas B, se encuentra la secuencia del gen *pthB* (Brunings y Gabriel, 2003; El Yacoubi y Gabriel, 2004). Brunings y Gabriel hipotetizaron que en el pasado, una Xac A pudo haber transferido en un evento de conjugación mediado por T4S, el plásmido pXAC64 con una copia diferente del gen *pthA*, a una *Xanthomonas* no patogénica. Este hecho, una vez producido y con oportunidad de diverger, explicaría la aparición del patovar *aurantifolii*. Esta hipótesis debería aún ser confirmada en el futuro, mediante la comparación de los genomas de los grupos patogénicos ya que lo enunciado es sólo una hipótesis no probada (Brunings y Gabriel, 2003).

Graham et al., en 2004, también realizaron una descripción de las cepas de *Xanthomonas* que causan lesiones en cítricos. Definen a la cancrrosis B como una enfermedad causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, y las cepas C dentro de ese mismo patovar. Además, diferencian a las B de las C porque las B poseen un rango de hospedantes más amplio que las C, mientras que las C estaría limitado solo a lima Key y naranjo agrio. Uno de los problemas para estudios más completos es el escaso número de cepas C que están disponibles ya que sólo se han encontrado en Brasil. Por otro lado, las cepas B ya se extinguieron en la naturaleza y sólo se mantienen en colecciones. Sin embargo, aún se consideran cuarentenarios.

Sun et al., en 2004, realizaron una comparación de patovares que incluyó a cepas A y sus variantes (A típico, A^w y A*), cepas B y *X. axonopodis* pv *citrumelo*. Realizaron caracterizaciones serológicas y moleculares y diferenciaron las cepas A del B y de *X. axonopodis* pv *citrumelo*. La utilización del test de ELISA, PCR (basadas en iniciadores para Xac desarrollados por Hartung et al., en 1993), análisis de ácidos

grasos, electroforesis de campo pulsante de ADN genómico y pruebas de especificidad en distintos hospedantes les permitieron separar las cepas A de las A^w y A*. Se intentó diferenciar mediante Biolog® las cepas A de las B y de *X. axonopodis* pv *citrumelo*, pero no se obtuvieron resultados concluyentes. Se obtuvo un dendograma con los perfiles obtenidos por digestión de ADN genómico total con enzimas de restricción *Xba* I y *Spe* I, que permitió separar al tipo B de los demás. Las pruebas de hibridación de ADN genómico total diferenciaron agrupamientos entre cepas A, B y *X. axonopodis* pv *citrumelo* (Sun et al., 2004).

En 2005 Cubero y Graham usaron RT-PCR y cuantificaron e identificaron las *Xanthomonas* patógenas de citrus en lesiones de cancrrosis y mancha bacteriana (citrus bacterial spot). En este estudio utilizaron iniciadores para el gen *pthA* de *Xac* y un gen ribosomal para *X. axonopodis* pv *citrumelo*. Como resultado observaron una diferenciación altamente específica entre cepas, destacándose la sensibilidad de este procedimiento para la detección e identificación de organismos patógenos cuarentenarios.

Dickstein et al., (2005) utilizaron análisis de ácidos grasos y ribotipificación (*ribotyping*), realizaron hibridaciones de ácidos nucleicos entre distintas cepas de *Xanthomonas* patógenas de citrus con sondas de genes de ARN ribosomal y obtuvieron patrones de asociación con los cuales indentificaron indistintamente las cepas A, B y C. Los agrupamientos obtenidos mostraron a las cepas B como cercanas a las A y ambos distintos a las C. Los autores suponen que el bajo número de cepas que se utilizaron pudo haber influido en el patrón de agrupamiento obtenido con las diferentes cepas y que podrían modificarse analizando mayor número de cepas de cada tipo (Dickstein et al., 2005).

De Souza C. et al., (2005) en Brasil caracterizaron la diversidad genética de *Xac* A comparando el tamaño y número de plásmidos, perfiles del ADN de plásmidos obtenido luego de cortes con enzimas de restricción (*Xba* I y *Vsp* I) y electroforesis de

campo pulsante y perfiles de ADN genómico. Con estas metodologías observaron altos coeficientes de similitud entre cepas aisladas de la misma región (entre 0,83 a 1 para cepas aisladas en 7 estados brasileños y entre 0,62 a 0,83 para cepas de Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay). Se observó también diversidad de plásmidos en cuanto a tamaño, aunque esta no fue elevada (solo 5 clases de plásmidos de entre 57,7 a 83 kilobases).

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* Y LOS HOSPEDANTES CÍTRICOS. LA REACCIÓN DE PATOGENICIDAD Y DE HIPERSENSIBILIDAD.

Uno de los tipos de defensa que se inducen en el hospedante ante la presencia del patógeno es la respuesta hipersensible (HR). La interacción incompatible entre un hospedante y un patógeno dá lugar a la producción de HR como resultado de un gen de avirulencia en el patógeno y un gen de resistencia en la planta hospedante.

Esta reacción, observada como una respuesta ante ciertos hongos en plantas por Ward en 1902 y Marryat en 1907, fue determinada por Stakman (1915) y caracterizada por Gäumann en 1950. En bacterias, aunque observada por Thiers y Blank (1949), y Logan (1960), fue descrita por primera vez por Klement et al., en 1964 (Goodman y Novacky, 1994). La técnica de infiltración del mesófilo de las hojas, desarrollada por Klement en 1963, facilitó la caracterización de esta reacción en bacterias. Se ha determinado esta reacción en diversos hospedantes para diversas especies de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia* (Llácer et al., 2000).

La causa de esta reacción de defensa es en primer lugar debida al reconocimiento del patógeno por parte del hospedante (Klement et al., 1964). Este reconocimiento, producido por la interacción entre un inductor (o elicitor) del patógeno y un elemento constitutivo del hospedante (Bonas et al., 1991; Wei et al., 1992)

desencadena una serie de procesos que determinan la muerte de los tejidos invadidos con la consiguiente muerte del patógeno. Ambas partes, las cuales median este reconocimiento, se producen por determinados genes denominados genes de *avirulencia* (genes *avr*) en el patógeno y de *resistencia* (genes R) en el hospedante (Flor, 1946, Staskawicz et al., 1984, Willis et al., 1991). Cuando esta interacción se debe al reconocimiento singular de un grupo de genes, se denomina *interacción gen por gen* entre hospedante y patógeno (Flor, 1946; Staskawicz et al., 1984). Cuando la interacción se produce debido al reconocimiento de más de un gen, se denomina *interacción gen a genes* por parte de los participantes según una propuesta de Gabriel (Gabriel y Rolfe, 1990).

Las bacterias fitopatógenas poseen factores de virulencia, los cuales pueden ser a su vez factores de patogenicidad. Estos factores de virulencia y los genes *avr* están bajo el comando de los genes *hrp* (por *hypersensitive response and pathogenicity*). Se puede desencadenar HR cuando un gen *avr* es reconocido por la planta (Keen, 1990; Willis et al., 1991). Se ha determinado la presencia de genes *avr* en *Xac* (gen *pthA*). Este gen presentó semejanzas a nivel de secuencia con la familia de genes *avrBs3* (Bonas y Staskawicz, 1988; Bonas et al., 1990; Kelemu y Leach 1990; Bonas et al., 1991; Canteros et al., 1991; Swarup et al., 1991). Esta familia de genes se supone responsable de producir HR en otros sistemas (Boucher et al., 1987; Lindgren et al., 1988; Arlet et al, 1991; Beer et al., 1991; Knoop et al., 1991; Willis et al., 1991; Vivian y Gibbon, 1997).

Hasta el momento no se ha determinado ningún cítrico que produzca HR ante las cepas A típicas y B de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus. En 1982, Stall et al., realizaron una caracterización de la patogenicidad de las cepas A, B y C en hojas de pomelo y registraron necrosis similares a HR para la cepa C. Algunos autores sugirieron que la cepa C puede provocar HR en otros citrus (Brunings y Gabriel, 2003), aunque no hay comprobación experimental publicada para estos supuestos. Stall et

al., en 1982 supusieron una reacción de HR en pomelo por la cepa C de Xac en inoculaciones de brotes de diferente edad aunque no caracterizaron la reacción.

Recientemente, se ha caracterizado en Xac-A^w un gen de avirulencia (*avrGf1*) el cual determinó HR en hojas de pomelo. Se supone la existencia de otro gen *avr* en Xac-A^w para pomelo, aunque no a sido aún caracterizado en su totalidad (Rybak et al, 2005).

Al ser inoculada en hojas de tomate, la cepa Xac-A produce HR (*fuentes*: Citrus Canker Diagnostic Checkpoints, 2005; R. E. Stall, comunicación personal; Sun et al., 2004; Rybak, 2005). Algunos autores han comunicado la ocurrencia de HR al inocular Xac-A en hojas de plantas usualmente no hospedantes, como ser: poroto, algodón (Swarup et al., 1992) y tabaco (Dunger et al., 2005). La confirmación de estas reacciones no ha sido confirmada o caracterizada por otros grupos de trabajo o por demostración experimental.

La caracterización de una HR es fundamental para su posterior utilización como herramienta en planes de mejoramiento (Hibberd et al., 1987a). La observación en el hospedante de necrosis dentro del área inoculada no es suficiente para confirmar presencia de HR (Ercolani, 1973; Rudolph, 1975). Entre las diversas metodologías para caracterizar esta reacción (Goodman y Novacky, 1994), algunos caracteres pueden ser útiles a la hora de determinar una HR. Entre estos caracteres están la cuantificación de la dinámica poblacional del patógeno (Stall y Cook, 1968) y la determinación de alteraciones en la membrana celular del hospedante (Cook y Stall, 1968, Hibberd et al., 1987b), mediante medición de la pérdida de electrolitos luego de la infiltración de altas concentraciones de la bacteria en el mesófilo de las hojas (Cook y Stall, 1968, Hibberd et al., 1988).

1.5. ANTECEDENTES SOBRE MEJORAMIENTO PARA RESISTENCIA A CANCROSIS DE LOS CITRUS

Existen diversos trabajos sobre evaluación de resistencia de distintos cítricos ante esta enfermedad (Stall et al., 1979c; Koizumi, 1981; Leite y Mohan, 1984). La resistencia es cuantitativa en variedades comerciales sometidas a infección natural y es desde muy susceptibles (pomelo (*Citrus paradisi* Macf), lima Key (*C. aurantifolia* Swing)) a muy resistentes (algunas mandarinas (*C. reticulata* Blanc; *C. unshiu*) y otros géneros de Rutáceas) (Civerolo, 1984; Zubrzycki y D. de Zubrzycki, 1988; Leite, 2000; Das, 2003).

Trabajos desarrollados con anterioridad en otros modelos demostraron la importancia de la edad de los hospedantes con respecto a la severidad de algunas enfermedades. Puede destacarse la resistencia de planta adulta (RPA) caracterizada en arroz para *X. orizae* pv. *orizae* (Kaul y Sharma, 1987; Goel y Gupta, 1990) y en goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) para *X. campestris* pv. *cyamopsidis* (Gandhi y Chad, 1988). Con respecto a RPA para cancrrosis de los cítricos, la misma se caracterizó tanto en hojas (Stall et al., 1981a; Stall et al., 1982) como en frutos (Canteros, 1992).

Se ha caracterizado en numerosas oportunidades resistencia a cancrrosis en diversas especies del género citrus y otras especies de Rutáceas (Dar, 2003). Diversas metodologías (Graham et al., 1992; Kitagawa et al., 1992; McCollum et al., 2006) se utilizaron para cuantificar la respuesta a cancrrosis en los distintos hospedantes (Shiotani et al., 2000; Xu et al., 2004), con el objetivo de utilizar ese material vegetal en planes de mejoramiento (Reddy, 1997; Gonzalez R. et al., 2005)

Los pomelos son muy susceptibles a esta enfermedad (Stall et al., 1981b) por lo que se necesitan substitutos más resistentes o bien nuevas fuentes de resistencia provenientes de otros cítricos o especies emparentadas, para ser usados en planes de mejoramiento (Roose, 2000).

El Dalan Dan ó Dalandan (*Citrus sp*) es cultivado en la provincia de Misiones (Argentina); produce frutos similares al pomelo, con buen comportamiento a campo (Agostini, comunicación personal) y alta resistencia cuantitativa (Gochez y Canteros, 2004). Procedente de Filipinas, fue introducido en Brasil en el año 1967 por el profesor Ary A. Salibe (Pompeu, J. comunicación personal) y está en la Colección de Germoplasma Cítrico de Campinas (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeiropolis, SP). Estudios moleculares de este cítrico, mostraron semejanzas a nivel genético con distintas especies de pomelo (Corazza-Nunes et al., 2002). La calidad de los frutos en Corrientes también es buena (Rinsdahl et al., 2006).

El kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swing)), conocido en Argentina erróneamente como quinoto o chinoto (nombre que corresponde a otra especie), es una especie poco cultivada en Argentina de manera comercial y en mayor grado como ornamental. La caracterización de esta especie no es muy amplia (Rahman y Nito, 1994) aunque en los últimos años algunos autores ahondaron en el conocimiento molecular (Abkenar et al., 2004; Jung et al., 2005), citológico (Ollitrault et al., 2000) y reproductivo (D'Onghia et al., 2000; Luro et al., 2000). Esta especie de Rutácea afín al género *Citrus*, no presenta lesiones a campo y comienza a ser usada en otros países en programas de mejoramiento para resistencia a cancrrosis, mediante la búsqueda de los genes responsables (Deng et al., 1992; Gmitter et al., 2004; Guo et al., 2004; Vilorio et al., 2004). Sin embargo, existen antecedentes de obtención de lesiones en hojas separadas de kumquat, mediante inoculación artificial de altos títulos bacterianos utilizado como método de diagnóstico (Cercos, 1980). Resultados preliminares obtenidos recientemente, confirmaron que se forman lesiones al inocular por infiltración del mesófilo, hojas jóvenes de plantas de kumquat (Canteros y Naranjo, comunicación personal, Gochez y Canteros, 2005).

Existen diversos trabajos en los cuales se trató de obtener plantas resistentes a la cancrrosis mediante mutaciones (Zubrzycki y D. de Zubrzycki, 1982), hibridación artificial (P. de C. Costa et al., 2003) y transgénesis (Chandrika y Gabriel, 2003), aunque no se registraron avances utilizando estos métodos. En el año 2003 Chandrika y Gabriel transformaron plantas de pomelo con el objeto de obtener expresión constitutiva en el citosol de anticuerpos sensibles a una proteína específica de Xac (PthA). Estos autores registraron como resultado la no expresión de la proteína transgénicamente insertada en la planta.

Capítulo 1.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, PATOGENICA Y DE OTROS CARACTERES FENOTÍPICOS DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* DE LOS GRUPOS B Y C

1.1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ((Hasse)Vauterin et al., 1995) (Xac) es el agente causal de la cancrrosis de los citrus.

Las diferencias observadas en infecciones naturales a campo en el Litoral argentino en 1937 (Bitancourt y Fawcett, 1937) especialmente en plantas de limón (*C. limon* (L.) Burm.) y otros hospedantes fué la base para la descripción de diferentes tipos de cancrrosis. Bitancourt y Fawcett (1937) llamaron falsa cancrrosis o cancrrosis B a la enfermedad observada en la zona solamente en limón, como contraposición a la cancrrosis A (de asiática) que ellos habían observado en otros lugares del mundo y que afectaba a numerosos cítricos. Con el tiempo se continuó con esta diferenciación que aún aparece en algunos libros. Cuando Namekata (1971) describió la cancrrosis en Brasil que afectaba el limonero gallego o lima Key (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) la denominó C y con cada nueva epidemia se llegó a describir el tipo D (en México) y el E (en Florida) y luego las diversas variantes de la A. Durante muchos años se careció de una metodología adecuada para diferenciar las cepas de *Xanthomonas* causantes de estas diferentes enfermedades lo que causó numerosos problemas de identificación y manejo. Posteriormente, se desarrollaron medios de cultivo especiales para las cepas del grupo B (Canteros de Echenique et al., 1985) y luego se investigó extensivamente mediante caracterización molecular por determinación de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) (Hartung y Civerolo, 1989), análisis de secuencias amplificadas por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) relacionadas con genes *hrp*- (Leite et al., 1994), comparación de secuencias de ADN

mediante PCR, utilizando primers universales para *Xanthomonas* basados en la región ITS del operon ribosomal bacteriano y genes *pthA* (Cubero y Graham, 2002), repPCR con los iniciadores ERIC, BOX y REP (Naranjo et al., 2005), hibridación de ADN (experimentos de reasociación) (Egel, 1991; Egel et al., 1991; Vauterin et al., 1990; Vauterin et al., 1991; Sun et al., 2004); fisiológica: perfiles metabólicos utilizando distintas fuentes de carbono (técnica de Biolog®) (Verniere et al., 1993); y bioquímica: utilizando otros perfiles metabólicos y de ácidos grasos (fatty acid methyl ester – FAME) (Vauterin et al., 1991; Vauterin et al., 1996a) para cada grupo de cepas

Las cepas del grupo B, presentes en la provincia de Corrientes desde 1929 hasta 1980 y en Entre Ríos hasta hace 1991 producían ataques esporádicos en limón y sólo muy ocasionalmente se podía observar síntomas en otras especies en lotes linderos de los de limón. Las cepas A, más agresivas, ingresaron en Argentina entre 1973 y 1976 (Canteros, 1984).

La cancrrosis C fue descrita en Brasil y las cepas sólo se aislaron de lima Key, llamada limonero gallego en Brasil y que corresponde a *C. aurantifolia* (Namekata y Oliveira, 1971). Las cepas del grupo C nunca fueron encontradas en Argentina ni en otros países.

Algunos autores han propuesto cambiar la denominación de los actuales grupos de cepas causantes de cancrrosis basados en estudios moleculares comparativos (Gabriel et al., 1989; Vauterin et al., 1995; Schaad et al., 2005). Estas propuestas tuvieron sus correspondientes réplicas por parte de otros investigadores (Young et al., 1991; Vauterin et al., 1991; Schaad et al., 2000). Actualmente, la denominación de estas bacterias varía dependiendo del grupo de trabajo (Bruning y Gabriel, 2003; Graham et al., 2004). Una característica de estas propuestas es la ubicación de las cepas de los grupos B y C en un mismo patovar.

Las restricciones cuarentenarias exigen denominaciones exactas (Stall y Civerolo, 1994; Vauterin et al., 2000). La caracterización de las cepas A y B de

Argentina y C de Brasil contribuiría a clarificar su denominación y a determinar la relación entre las cepas del grupo B y del grupo C.

El objetivo de este trabajo fue comparar cepas de *Xanthomonas axonopodis* del grupo B y del grupo C mediante la evaluación de la respuesta a la inoculación de diferentes plantas de la familia Rutáceas y de caracterizaciones bioquímicas y moleculares.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Caracterización bioquímica y fisiológica

1.2.1.1. Cepas bacterianas

Se usaron cepas del grupo A: Xc03-1635, CuS aisladas de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) en la zona de Bella Vista; del grupo B: Xc06-2975-22-1, Xc06-2980-00 y Xc06-2988 aisladas entre 1978 y 1891 y Xc04-1891 de muestras de Entre Ríos aislada en 1990, todas de muestras procedentes de limón; grupo C: Xc04-1966 aislada en Brasil de lima Key (enviada por el DPI de Florida en 2004) y Xc99-1316 aislada en Brasil de lima Key (enviada por Victoria Rosetti, Instituto Biológico en 1978). Todas las cepas pertenecen a la Colección de Bacterias y Hongos Fitopatógenos de la EEA INTA Bella Vista (INTA-BV) (ver ANEXO 1).

1.2.1.2. Medios de cultivo y preparación de inóculo

Las cepas bacterianas están mantenidas en la Colección de la EEA INTA Bella Vista en microviales con agua de río filtrada, esterilizada y a temperatura ambiente. Las de uso más frecuente también se mantienen en Agar Lima Bean (ALB), el cual se prepara utilizando una infusión de 62,5 g de porotos manteca en 1 litro de agua destilada, 15 g de Chubut-Agar comercial y ajuste de pH a 7,0 mediante KOH 1N, adicionado con cicloheximida o clorotalonil, en heladera a 10°C (Canteros, 1994).

Las cepas seleccionadas fueron repicadas en cajas de Petri con medio ALB fresco, cultivadas en estufa a 28° C durante 24 h antes de cada experimento. A partir

de los cultivos frescos se realizaron suspensiones de los cultivos en agua de canilla estéril obtenida de perforación de tercera napa, sin cloro y con alto contenido de calcio. La concentración de cada suspensión se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Baush y Lomb Spectronic 20 a longitud de onda de 600nm y por recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)/ ml mediante siembras en cajas de Petri con ALB (Stall et al., 1982)

1.2.1.3. Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Se realizaron los tests fisiológicos y bioquímicos de caracterización en bacteriología utilizados anteriormente por otros autores en las cepas utilizadas en este trabajo para determinar diferencias o similitudes entre los distintos grupos. Los tests utilizados fueron: susceptibilidad al cloruro de sodio (crecimiento en caldo nutritivo adicionado con ClNa de 0 a 5%); proteólisis de leche (Goto et al., 1980; Canteros, 1985) y reacción en leche Tornasol (Canteros, comunicación personal). Todas las pruebas se realizaron por duplicado. El crecimiento en los medios líquidos (caldo nutritivo adicionado con ClNa o con leche Tornasol) se determinó observando la turbidez de los medios y posterior siembra de una alícuota en cajas con ALB.

1.2.2. Caracterización patogénica

1.2.2.1. Inoculaciones

Las cepas se inocularon en plantines mantenidos en cámara de cría, a 28° C y fotoperíodo de 16 h-luz. Se infiltró el mesófilo de hojas de 17-20 días con jeringa y aguja hipodérmica de tamaño 27. Se inocularon hojas de pomelo Duncan; pomelo "Grande", lima Key; limón Eureka; mandarina Murcott (Tangor= *C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.); cidra (*C. medica* L.); Dalan Dan (*C. sp.* o *C. pseudoparadisii*); Pummelo (*C. maxima* (Burm.) Merr.); mandarina Sun-chu-sha (*C. reticulata* Blanco), mandarina Satsuma (*C. unshiu* (Mak.) Marc.); naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osb) variedades Valencia, Coco y Petrópolis; naranjo agrio (*C. aurantium* L.); limón Volkameriano (*C. limonia* Osb.); citranges (*C. sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata*

(L.) Raf.) Troyer, Carrizo F24P7, MTX y C35; kumquat Nagami (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle).

Las cepas de los grupos B y C fueron inoculadas por el método de infiltración del mesófilo (Klement et al., 1990) utilizado por Stall et al., 1982. Se infiltró en una mitad del envés de las hojas, suspensiones bacterianas de concentración similar a 5×10^3 y 5×10^4 bact/ml utilizando jeringas de plástico de 3 ml y agujas de tamaño 27. También se utilizó el método de pin-prick, mediante heridas con aguja e hisopado de inóculos bacterianos de concentración similar a 5×10^8 bact/ml (Rossi et al., 1980; Goto et al., 1980; Verniere et al., 1998; Koizumi 1976a). Se determinó el número de lesiones por centímetro cuadrado (n^0 de les/cm²) obtenido utilizando el método de conteo de puntos de Marshall (1968). Los datos fueron transformados por el $\log(\text{les/cm}^2+1)$ con el objetivo de normalizar los datos y calcular regresiones lineales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software InfoGen/P 2006i.1 V1.0 (UNC).

1.2.2.2. Tamaño de lesiones y n^0 de bacterias/ lesión

Se comparó el tamaño de las lesiones obtenidas al inocular hojas de distintos hospedantes mediante el método de pin-prick (heridas con aguja e hisopado del inóculo). Se midió el diámetro (mm) de cada lesión obtenida utilizando una regla transparente. Se cuantificó el n^0 de bacterias/ lesión (cancro) mediante el triturado de cada lesión obtenida en 1 ml de agua de canilla estéril, diluciones seriadas y siembra de alícuotas para recuento en cajas de petri con ALB de las UFC (unidades formadoras de colonias) por duplicado. Se trituró por separado, dos lesiones en cada experimento y se promediaron los datos de dos repeticiones para cada grupo bacteriano.

1.2.2.3. Determinación del n^0 bacterias/ cm²

Se determinó la dinámica poblacional de las cepas del grupo B y del grupo C de *Xanthomonas* patógenas de citrus y se compararon los patrones obtenidos con los del grupo A en lima Key y pomelo Duncan. Se determinó las células bacterianas (n^0 cel./cm²) en hojas infiltradas con soluciones bacterianas de concentración conocida,

utilizando dos repeticiones en cada experimento y para cada especie. Se trituró, en 1 ml de agua de canilla estéril, trozos de tamaño definido de las hojas inoculadas, con un sacabocado, a distintas horas luego de la inoculación y se determinó el UFC/cm² mediante diluciones y siembra en cajas de petri con medio ALB.

1.2.2.4. Respuesta en otros hospedantes

Se comparó la respuesta producida en distintos hospedantes al inocular suspensiones de alta concentración (5×10^8 bact/ml) de cepas del grupo B y grupo C. Se infiltró el mesófilo de hojas jóvenes de lima Key, pomelo Duncan, tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv Platense y Coloso; pimiento (*Capsicum annum*) cv Primore y Festo; mirto (*Muraya paniculada* (L.) Jack.); tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) criollo y cv Burley y nicotiana silvestre (*Nicotiana sp.*). Se inoculó 3 hojas de cada una de las especies utilizando una concentración de bacterias de 5×10^8 UFC/ ml. Se realizó una caracterización visual de la respuesta obtenida al inocular cepas de los grupos B y C en distintos hospedantes y se compararon con los obtenidos con la cepa del grupo A. Se inoculó por infiltración del mesófilo hojas jóvenes con soluciones bacterianas de concentración conocida (5×10^8 bact/ ml) (Klement, 1963). Se registró la respuesta obtenida mediante la utilización de una cámara digital Fujifilm FinePix A345.

1.2.3. Caracterización molecular

La caracterización molecular de cepas de los grupos A, B y C que causan lesiones de canchros en citrus se realizó mediante la comparación de los perfiles de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN genómico, obtenidos utilizando varias enzimas de restricción. Se utilizaron distintos métodos de extracción de ADN de cultivos bacterianos de 24 h de crecimiento en medio líquido con agitación; con el objetivo de obtener la mayor cantidad posible de ADN. Se utilizó el método para bacterias de Ausubel (1987) utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (C-TAB- cetyl trimethyl ammonium bromide); el método de extracción total mediante varilla de vidrio

de Marmur (1961), extracción directa mediante fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Finalmente se utilizó el método de Ausubel, modificado por Minsavage y Stall, el cual se detalla a continuación:

- 1- Crecer las bacterias en medio líquido, caldo nutritivo, u otro medio adecuado según la bacteria. X a citri tipo B en lima bean caldo pH 7.0.
- 2- Ajustar el cultivo a una OD de 0,3 a 600 nm (corresponde a 50% transmitancia). Esto da una suspensión de 5×10^8 cel/ ml; usar el medio líquido en el que se creció como blanco; Generalmente 1 ml de suspensión de 10^8 bact/ml da de 5-20 microgramos de ADN.
- 3- Centrifugar en microcentrífuga 1,5 ml de la suspensión a velocidad máxima (14000xg) durante 2 minutos; Descartar el sobrenadante.
- 4- Resuspender el pellet en 1 ml de agua destilada, centrifugar nuevamente a velocidad máxima durante 2 minutos.
- 5- Resuspender el pellet en 582 microlitros (μ l) de Buffer TAE mediante pipeteado repetitivo; agregar 15 μ l de 20% SDS y 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), mezclar bien mediante movimiento suave del tubo (volcar repetidamente), incubar a 37 grados durante 1-1, 30 horas.
- 6- Agregar 100 μ l de 5M CINA y mezclar bien suavemente.
- 7- Agregar 80 μ l de solución precalentada de (C-TAB/ Cl Na (4,1 g de Cl Na y 10 g C-TAB en 100 ml agua), mezclar bien e incubar 10-15 minutos a 65 grados.
- 8- Agregar 700 μ l de cloroformo: isoamil-alcohol (24:1), mezclar bien durante 10 minutos y centrifugar luego durante 5 minutos en un microtubo.
- 9- Remover el sobrenadante acuoso (generalmente 800 μ l) y colocar en un microtubo nuevo.
- 10- Agregar 500 μ l de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1), mezclar bien durante 10 minutos.

- 11- Centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad.
- 12- Transferir 300-500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo, si se formó una interfase blanca repetir desde el paso 11.
- 13- Agregar 0,6 volúmenes (180-300 µl según lo obtenido en 13) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Agitar el tubo de un lado a otro hasta que un precipitado blanco (ADN) se pueda ver.
- 14- Incubar durante 10 minutos a –70 grados o durante 4 horas a –20 grados (puede dejarse toda una noche a –20)
- 15- Centrifugar durante 20-25 minutos a máxima velocidad. Descartar el líquido. Conservar el pellet. Cuidar de no perderlo.
- 16- Lavar el ADN con 900 µl de etanol 70%.
- 17- Centrifugar durante 10 minutos a velocidad máxima para conseguir un nuevo pellet.
- 18- Descartar el sobrenadante cuidadosamente (usando una pipeta) y secar el pellet. Cuidar de no perder el ADN.
- 19- Redisolver el pellet en 25-100 µl de buffer TE (durante 1 hora).
Guardar a 4° C o usarlo.

Se realizaron digestiones del ADN genómico utilizando las enzimas de restricción: *Eco* RI, *Pst* I, *Xba* I; *Xho* I (Fermentas); *Eco* RI y *Pvu* I (Promega). Las digestiones se realizaron durante 2 horas a 37° C según las especificaciones de los proveedores. El producto de estas digestiones se sometió a electroforesis en geles de agarosa Biodynamics (0,8%), se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz UV utilizando una mesa UV/White Light Fluorescent Table (Vilber Lourmat) y se documentó con un digitalizador DigiDoc-It Imaging System (UVP).

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Caracterización bioquímica y fisiológica

Los resultados en los tests de tolerancia a cloruro de sodio y proteólisis de la leche (Cuadro 1.1) fueron similares a los observados para A y para B por Zagory y Canteros en 1983 (Canteros, 2001b)

Cuadro 1.1. Pruebas bioquímicas realizadas a cepas de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus pertenecientes a los grupos A, B y C.

Test	Grupo		
	A	B	C
Tolerancia ClNa	5%	3%	3%
Proteólisis leche	Si	No	No
Leche tornasol	Reducción ácida	Reducción neutra	No reducción

1.3.1.1. Tolerancia al ClNa

Las cepas del grupo A crecieron en ClNa de 0 a 5%, las cepas de los grupos B y C sólo hasta el 2% de ClNa (Figura 1.1).

1.3.1.2. Proteólisis de la leche

Las cepas del grupo A produjeron un halo de proteólisis en el medio adicionado con leche descremada. Las cepas de los grupos B y C no produjeron halo de proteólisis.

1.3.1.3. Reacción en leche tornasol

Las reacciones observadas fueron: Grupo A: reducción ácida positiva, Grupo B: reducción neutra, Grupo C: reducción acida negativa (no reducción) (Figura 1.2).

Los resultados obtenidos indican diferencias en cuanto a tolerancia al ClNa para el grupo A con respecto al B y al C y en leche tornasol entre los tres grupos.

El crecimiento diferencial observado en el medio adicionado con ClNa (Gochez y Canteros, 2006) demostró mayor tolerancia para las cepas del grupo A con respecto al crecimiento en medios con alta concentración de ClNa.

Se observó proteólisis del medio adicionado con leche (producción de halo de proteólisis), únicamente para el grupo A. Las cepas de los grupos B y C crecieron en el medio sin producir halo de proteólisis (no utilizaron la caseína del medio). El crecimiento diferencial en el medio de leche tornasol mostró una respuesta diferente para cada grupo.

Las cepas del grupo A fermentaron la lactosa presente en el medio (reducción ácida). Se observó cambio de color en el medio, lo que demuestra la presencia de ácido láctico, subproducto de la utilización de la lactosa (Capuchino y Sherman, 1987).

Las cepas del grupo B produjeron reducción neutra o peptonización del medio leche tornasol (proteólisis). El grupo B no utilizó la lactosa del medio, sino aminoácidos de la degradación de las diversas proteínas presentes (Capuchino y Sherman, 1987). El color caseoso (blanco) del precipitado demuestra la no utilización de caseína (al igual que en la prueba de proteólisis). Diversos trabajos apoyan este resultado (Canteros, 1997). Estos resultados se corresponden con los presentados por otros autores, los cuales han observado en cepas del grupo A, capacidad para hidrolizar caseína, mientras no utilización de lactosa en cepas del grupo B (Goto et al., 1980). Verniere et al. (1993, 1998), determinaron diferencias para las cepas de los grupos B y C en cuanto a capacidad para degradar galactosa (hexosa que junto a la glucosa conforma la lactosa). En dichos trabajos, las cepas del grupo B fueron incapaces de degradar galactosa, a diferencia del grupo C que si lo hicieron. Ambas cepas, B y C, no degradaron lactosa.

El grupo C produjo crecimiento y no reducción del medio leche tornasol (reacción alcalina). Este desarrollo se debió a la utilización de péptidos y aminoácidos del medio (Capuchino y Sherman, 1987). Este grupo no utilizaría lactosa (Goto et al., 1980; Verniere et al., 1993) ni caseína (resultados crecimiento medio ALB adicionado con leche).

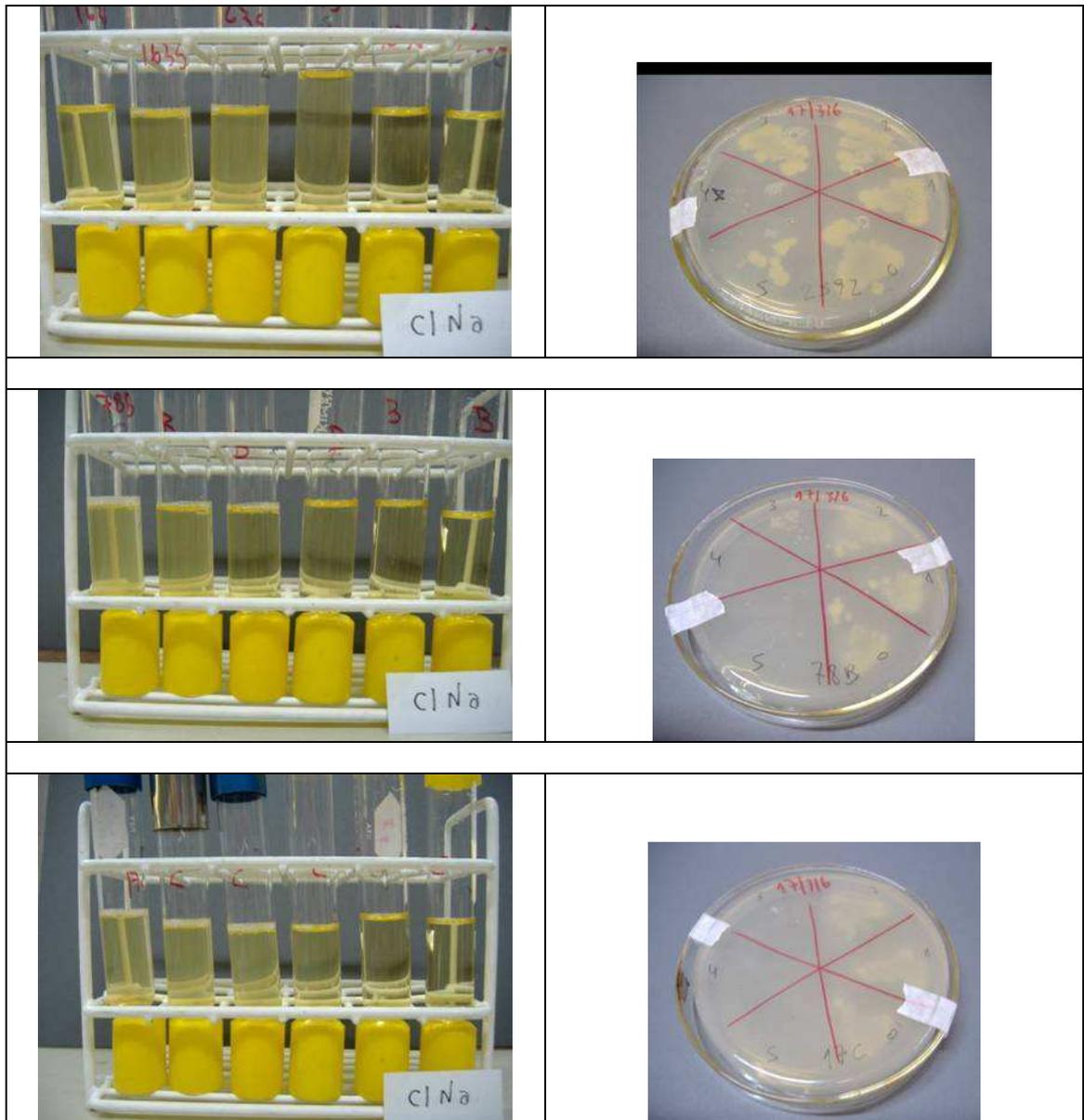


FIGURA 1.1. Prueba de tolerancia al CINa en cepas de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus. Columna izquierda: crecimiento en caldo nutritivo adicionado con 0- 5% CINa; derecha: control de crecimiento en placas de petri con ALB. Puede observarse crecimiento en todas las concentraciones para la cepa del grupo A (superior), y desde 0 a 3% para las cepas del grupo B (medio) y C (inferior).



FIGURA 1.2. Prueba de crecimiento de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus en leche tornasol. Puede observarse reducción ácida producida por la cepa del grupo A (izquierda), reducción neutra producida por la cepa del grupo B (centro) y no reducción para la cepa del grupo C (derecha).

1.3.2. Patogenicidad de las cepas de los distintos tipos

1.3.2.1. Comparación del diámetro de las lesiones obtenidas en distintos hospedantes

Las inoculaciones realizadas con cepas de los grupos A y B en pomelo Duncan, limón Eureka y kumquat mostraron diferencias significativas en cuanto al tamaño de lesiones. No se obtuvieron lesiones típicas de cancrrosis con la cepa C en otras Rutáceas excepto en lima Key.

Las cepas inoculadas en lima key por el método de pin-prick se diferenciaron ($p < 0,0001$) mediante ANOVA y test de Duncan, en el diámetro de la lesión obtenida (Cuadro 1.2). Inoculaciones realizadas con los tipos A y B en pomelo Duncan, Dalan Dan, naranjo Agrio, mandarinas Murcott, Sun-chu-sha y Satsuma, limón Eureka, Cidra, trifolio MTX y kumquat presentaron diferencias al comparar el tamaño de las lesiones obtenidas. Excepto en lima Key, no se observaron lesiones al inocular cepas del grupo C en otras Rutáceas (Cuadro 1.1).

CUADRO 1.2. Resultados de las inoculaciones realizadas en distintas especies cítricas utilizando el método de pin-prick (diámetros en mm). Se inocularon distintas *Xanthomonas* patógenas de *Citrus* (cepas A, B y C) para una concentración de 5×10^8 bact/ml.

Especie	Tipo	Nº lesiones	media (mm)	Error est (mm)	N	bact/ lesión	Error est
Lima Key	A	18	3,53	0,25	8	$1,56 \times 10^7$	$2,48 \times 10^6$
	B	12	1,34	0,19	2	$4,27 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$
	C	12	0,67	0,09	2	$1,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$
Duncan	A	15	2,70	0,21	8	$1,29 \times 10^7$	$2,13 \times 10^6$
	B	12	1,06	0,19	4	$1,43 \times 10^6$	$2,73 \times 10^5$
	C	12	0,00	0,00	1	0	-
Dalan Dan	A	12	1,33	0,11	8	$2,07 \times 10^6$	$4,35 \times 10^5$
	B	9	0,79	0,11	4	$9,55 \times 10^4$	$4,02 \times 10^4$
	C	9	0,00	0,00	1	0	-
Agrio	A	6	2,75	0,31	6	$8,34 \times 10^5$	$2,22 \times 10^5$
	B	6	0,50	0,00	4	$2,14 \times 10^3$	$9,02 \times 10^2$
	C	6	0,00	0,00	1	0	-
Murcott	A	6	0,31	0,03	4	$1,32 \times 10^7$	$1,25 \times 10^6$
	B	6	0,11	0,01	4	$6,13 \times 10^5$	$3,19 \times 10^5$
	C	6	0,00	0,00	1	0	-
Sun-chu-sha	A	6	0,28	0,03	4	$5,86 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$
	B	6	0,14	0,02	1	$2,00 \times 10^3$	-
	C	6	0,00	0,00	1	0	-
Satsuma	A	6	0,33	0,03	4	$8,65 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$
	B	6	0,13	0,02	3	$3,43 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$
	C	6	0,00	0,00	1	0	-
Cidra	A	6	0,52	0,12	4	$2,21 \times 10^7$	$2,29 \times 10^6$
	B	3	0,22	0,04	falta		
	C	3	0,00	0,00			
MTX (4)	A	9	0,20	0,02	2	$1,08 \times 10^7$	$2,65 \times 10^6$
	B	4	0,10	0,00	falta		
	C	4	0,00	0,00			
Limón Eureka	A	12	2,96	0,23	4	$1,58 \times 10^7$	$7,86 \times 10^5$
	B	12	1,21	0,13			
	C	12	0,00	0,00			
Kumquat	A	25	1,54	0,07	5	$1,39 \times 10^6$	$5,86 \times 10^5$
	B	21	0,50	0,07			
	C	21	0,00	0,00			

CUADRO 1.3. Análisis de la varianza y test de Duncan ($p < 0,0001$) para los datos obtenidos en las inoculaciones realizadas con *Xanthomonas* patógenas de Citrus correspondiente a los grupos A, B y C en lima Key (*C. aurantifolia*). Los cálculos fueron realizados utilizando el software estadístico InfoGen v1.0 (UNC).

Análisis de la varianza (Datos= LimaKey)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
mm	42	0,73	0,72	38,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68,24	2	34,12	53,72	<0,0001
Tipo	68,24	2	34,12	53,72	<0,0001
Error	24,77	39	0,64		
Total	93,01	41			

Test:Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,6352 gl: 39

Tipo	Medias	n			
C	0,67	12	A		
B	1,34	12		B	
A	3,53	18			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

1.3.2.2. Comparación del nº de lesiones obtenidas en distintos hospedantes

Las infiltraciones en hojas con concentraciones bacterianas de 5×10^5 ; 5×10^4 ; 7×10^3 ; 5×10^3 ; 3×10^3 células bacterianas/ml causaron para la cepa B: 76.25 ± 35.99 ; 7.41 ± 8.93 ; 5.52 ± 3.87 ; 3.93 ± 3.68 y 1.88 ± 1.26 les/cm² respectivamente, mientras que para C se observó: 21.46 ± 16.35 ; 20.3 ± 1.47 ; 0.39 ± 0.8 ; 1.29 ± 2.23 y 0 les/cm² respectivamente (Cuadro 1.4). Se obtuvieron lesiones en Duncan luego de infiltrar con cepas del grupo B. El grupo C no produjo lesiones en pomelo, observándose al inocular altas concentraciones reacciones similares a hipersensibilidad (Canteros, 1997) (Figura 2.2- pomelo Duncan, Capítulo 2).

Las cepas del grupo B presentaron patogenicidad diferencial con respecto a las cepas C en lima Key (Cuadro 1.1, Cuadro 1.2 y Cuadro 1.3).

Se obtuvieron lesiones en todos los *Citrus* inoculados con la cepa B (lima Key, pomelo Duncan, pomelo "Grande", Dalan Dan, Pummelo, cidra, Murcott y Sun-chusha, limón Eureka, naranjas Valencia, Coco, Petropolis, naranjo Agrio, limón Volkameriano, citranges Troyer, Carrizo F24P7, MTX y C35). La cepa C sólo produjo lesiones típicas de cancrrosis en lima Key.

Puede observarse, al comparar los datos del Cuadro 1.3, diferencias en cuanto a patogenicidad y capacidad de infección entre las cepas de los grupos B y C. Estos resultados no mostraron diferencias con los expuestos en otros trabajos (Canteros y Naranjo, 2002; Naranjo et al., 2004; Gochez y Canteros, 2006a).

CUADRO 1.4. Medias de los valores de 3 hojas inoculadas en distintos cítricos para diferentes concentraciones.

Concentración		5×10^5 bact/ ml		5×10^4		7×10^3		5×10^3		3×10^3	
Tipo	Especie	media	Desv est	media	desv est	media	desv est	media	desv est	media	desv est
C	Lima Key	21,46	16,35	20,30	1,47	0,39	0,80	1,29	2,23	0,00	0,00
B	Lima Key	76,25	35,99	7,41	8,93	5,52	3,87	3,93	3,68	1,88	1,26
	Duncan	2,55	2,45			0,00	0,00			0,12	0,12
	Grande	3,93	4,99	2,15	0,76			0,00	0,00		
	Dalan Dan	0,00	0,00	0,19	0,33			0,00	0,00		
	Pummelo	0,00	0,00	0,40	0,57			0,00	0,00		
	Cidra	11,73	17,42	5,91	6,60	1,42	1,67	1,55	0,00		
	Murcott			6,40	7,27	1,17	0,82			2,28	0,76
	Sunchusha	3,89	6,31	0,94	0,40	0,56	0,56	0,27	0,46	0,00	0,00
	Eureka					0,97	0,59	2,01	3,49	0,30	0,26
	Valencia	2,89	1,59							0,00	0,00
	Coco	4,79	6,45			0,11	0,20				
	Petropolis	2,37	3,68			3,17	1,67				
	Agrio	0,84	0,89			0,74	0,93				
	Volkameriano			1,51	2,01			0,06	0,11		
	4 MTX									1,44	0,81
	C. Troyer									1,49	0,00
	C. Carrizo F24P7									1,33	0,88
	C. C35									1,14	0,95

1.3.2.3. Comparación de la dinámica poblacional en los distintos hospedantes

Se cuantificó la variación para n° de células bacterianas por cm^2 (n° cel./ cm^2) en las hojas de citrus infiltradas con 5×10^4 cel./ ml.

Se registró para lima Key valores de $1,47 \pm 0,03$ a $5,09 \pm 0,11$ ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar) utilizando la cepa A para 1 y 7 días respectivamente.

La variación observada en lima Key al utilizar la cepa B fue de $1,82 \pm 0,17$ a $4,93 \pm 0,12$ ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar) para 1 y 7 días respectivamente.

De la misma manera, al inocular lima Key con la cepa C se cuantificaron valores de $0,71 \pm 0,06$ a $2,21 \pm 0,19$ ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar) para 1 y 7 días respectivamente.

En pomelo Duncan se observó al inocular utilizando la cepa A, $2,10 \pm 0,43$ a $4,88 \pm 0,01$ ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar). para 1 y 7 días respectivamente.

La cepa B, inoculada en hojas de pomelo Duncan, presentó valores que variaron entre $1,77 \pm 0,89$ a $3,86 \pm 0,18$ ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar) para 1 y 7 días respectivamente.

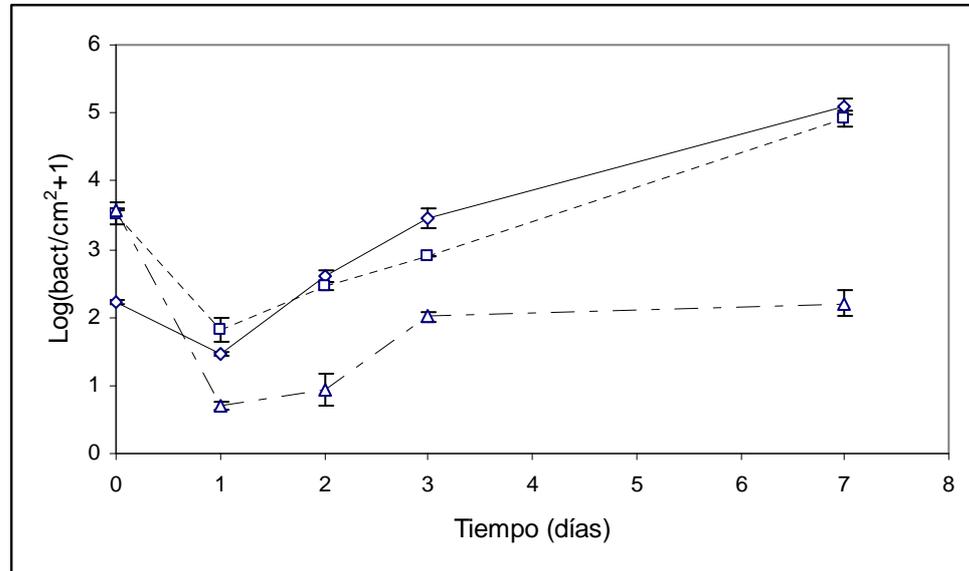
La cepa C, inoculada también en hojas de pomelo Duncan, presentó un decrecimiento en su ($\text{Log}(n^{\circ} \text{ cel./ cm}^2 + 1) \pm$ error estándar) el cual varió entre $0,32 \pm 0,16$ a $1,08 \pm 0,08$ para 1 y 7 días respectivamente.

Puede diferenciarse en base a sus tasas de crecimiento cada una de las cepas en cada uno de los hospedadores inoculados.

Se observó en lima Key y pomelo Duncan una disminución del n° bact/ cm^2 para todas las cepas luego de las primeras 24 h posteriores a la inoculación. Ambos modelos se diferenciaron en el menor crecimiento obtenido en las cepas C (Figura 1.3).

Las cepas A y B comenzaron, hacia el 3^{er} día, un aumento exponencial para el n° de bact/ cm^2 , mientras que la cepa C redujo su crecimiento incluso en lima Key (Figura 1.3).

A. Lima Key



B. Pomelo Duncan

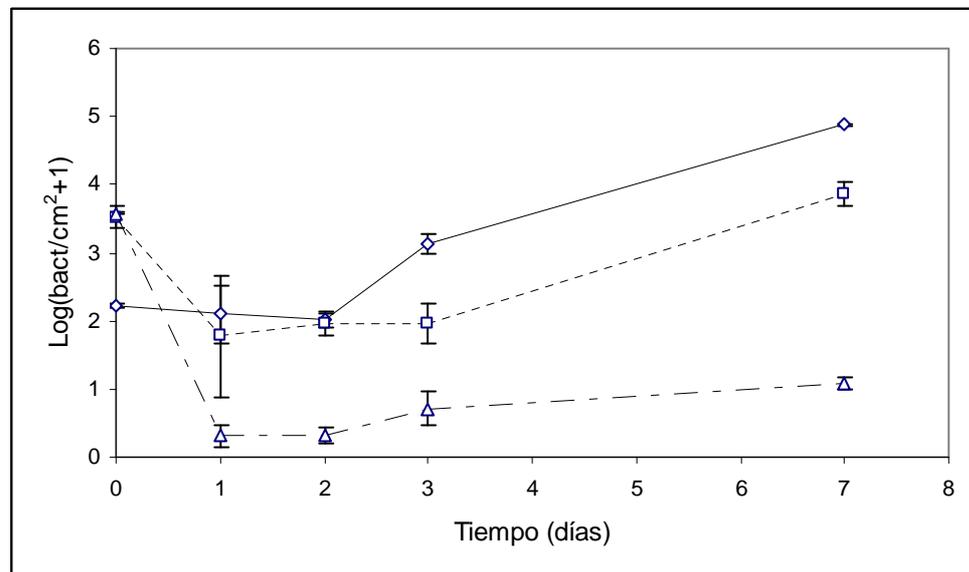


FIGURA 1.3. Desarrollo del n° de bacterias por cm^2 en hojas de A: lima Key (*C. aurantifolia*) y B pomelo Duncan (*C. paradisi*), inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus en concentraciones de aproximadamente 5×10^4 bact/ml (\diamond = cepa A; \square = cepa B; Δ = cepa C). Datos promedios de dos muestras en cada caso con dos repeticiones para cada tipo bacteriano \pm error estándar.

La cuantificación del nº de bact/ lesión, en cada una de las especies infiltradas, mostró para las cepas C en lima Key la menor tasa de crecimiento ($1,00 \times 10^4 \pm 4,00 \times 10^3$ bact/ lesión). Las cepas A y B presentaron en lima Key tasas de crecimiento mayores ($1,56 \times 10^7 \pm 2,48 \times 10^6$ y $4,27 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^4$ bact/ lesión respectivamente) (Cuadro 1.4).

No se observó presencia de lesiones típicas de cancrrosis para las cepas C en pomelo en ninguna de las concentraciones inoculadas (ver Figura 1.4). La cepa B produjo lesiones típicas de cancrrosis en todas las especies cítricas inoculadas (Figura 1.6), aunque en todos los casos su nivel de patogenicidad fue diferente en comparación al compararlo con la cepa C (Figura 1.5). Estos resultados se ajustan a la respuesta observada para la cepa B en otros trabajos publicados (Goto et al., 1980, Naranjo et al., 2004).

CUADRO 1.5. Regresiones lineales de los valores $\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular hojas jóvenes de lima Key (*C. aurantifolia*) con distintas concentraciones ($2,8 \times 10^3$ bact/ml; 3×10^3 ; 5×10^3 ; $6,8 \times 10^3$ $4,4 \times 10^4$ para el tipo B y $4,8 \times 10^3$; $5,1 \times 10^3$; 8×10^3 ; $9,6 \times 10^3$; $4,8 \times 10^4$ para el tipo C). Se inocularon 3 hojas para cada concentración (excepto para $9,6 \times 10^3$ bact/ml en el tipo C= 2 hojas). gl= grados de libertad del modelo (Y= Intercep + "Incremento bact/ml" X); CME= cuadrado medio del error; p= probabilidad del estadístico F; R^2 = ajuste del modelo.

Tipo	Inoculo (bact/ml)	Gl	Intercep	Incremento (bact/ml)	CME	p	R^2
B	$2,8 \times 10^3$ a	14	0,56	$2,8 \times 10^{-6}$	0.05	<.0001	0.84
	$4,4 \times 10^4$						
C	$4,8 \times 10^3$ a	13	0,09	$2,4 \times 10^{-6}$	0.05	<.0001	0.83
	$4,8 \times 10^4$						

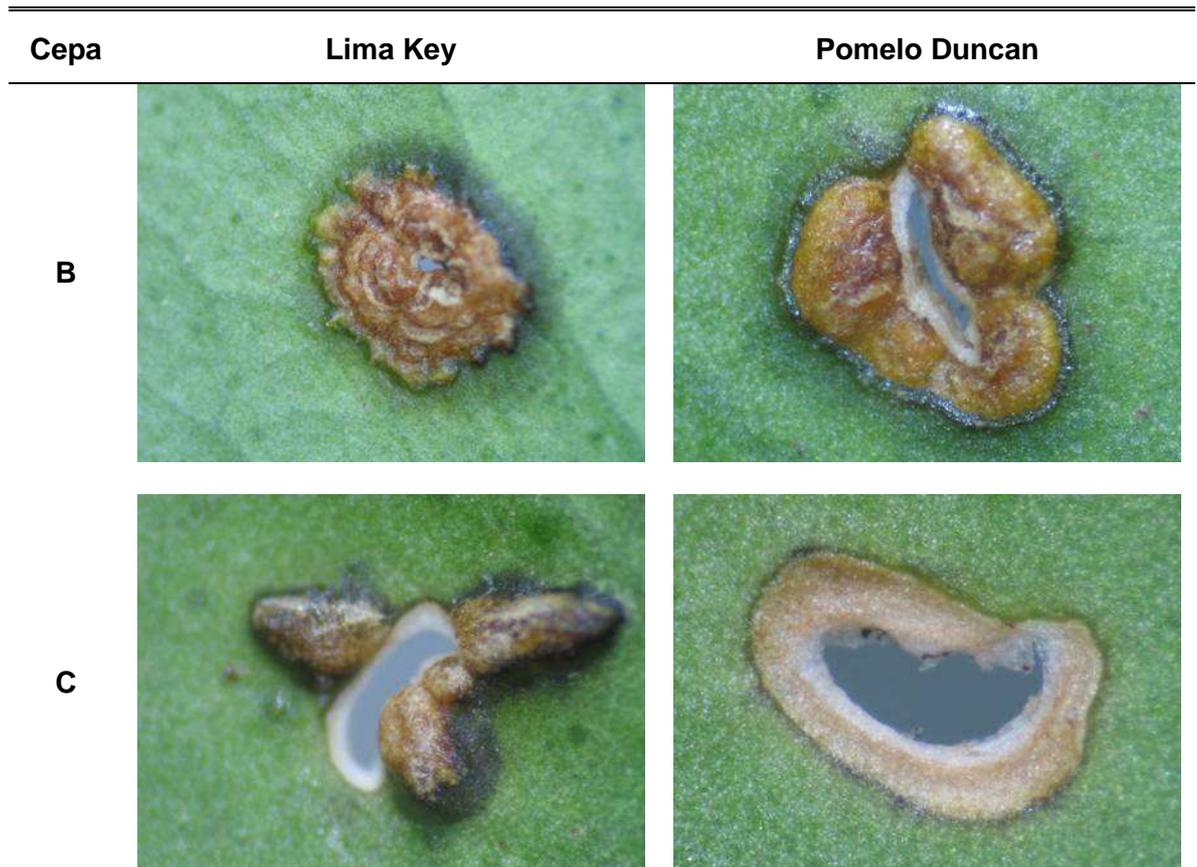


FIGURA 1.4. Comparación de forma y tamaño de lesiones de cancrisis obtenidas al inocular mediante método de pin prick en hojas de lima Key y pomelo Duncan con *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus grupo B y C.

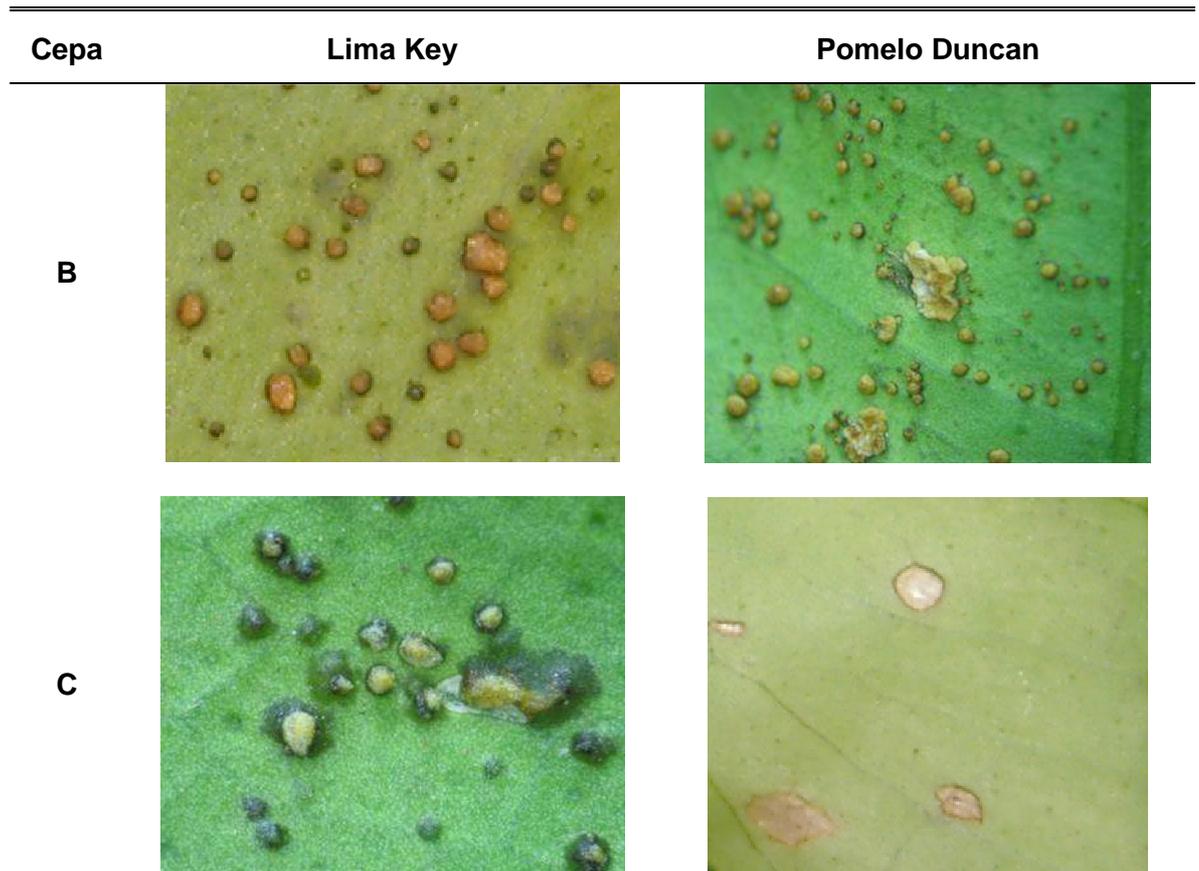


FIGURA 1.5. Comparación de forma y tamaño de lesiones de cancrisis obtenidas al inocular mediante infiltración del mesófilo de hojas de lima Key y pomelo Duncan con *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus grupo B y C (5×10^4 bact/ml).

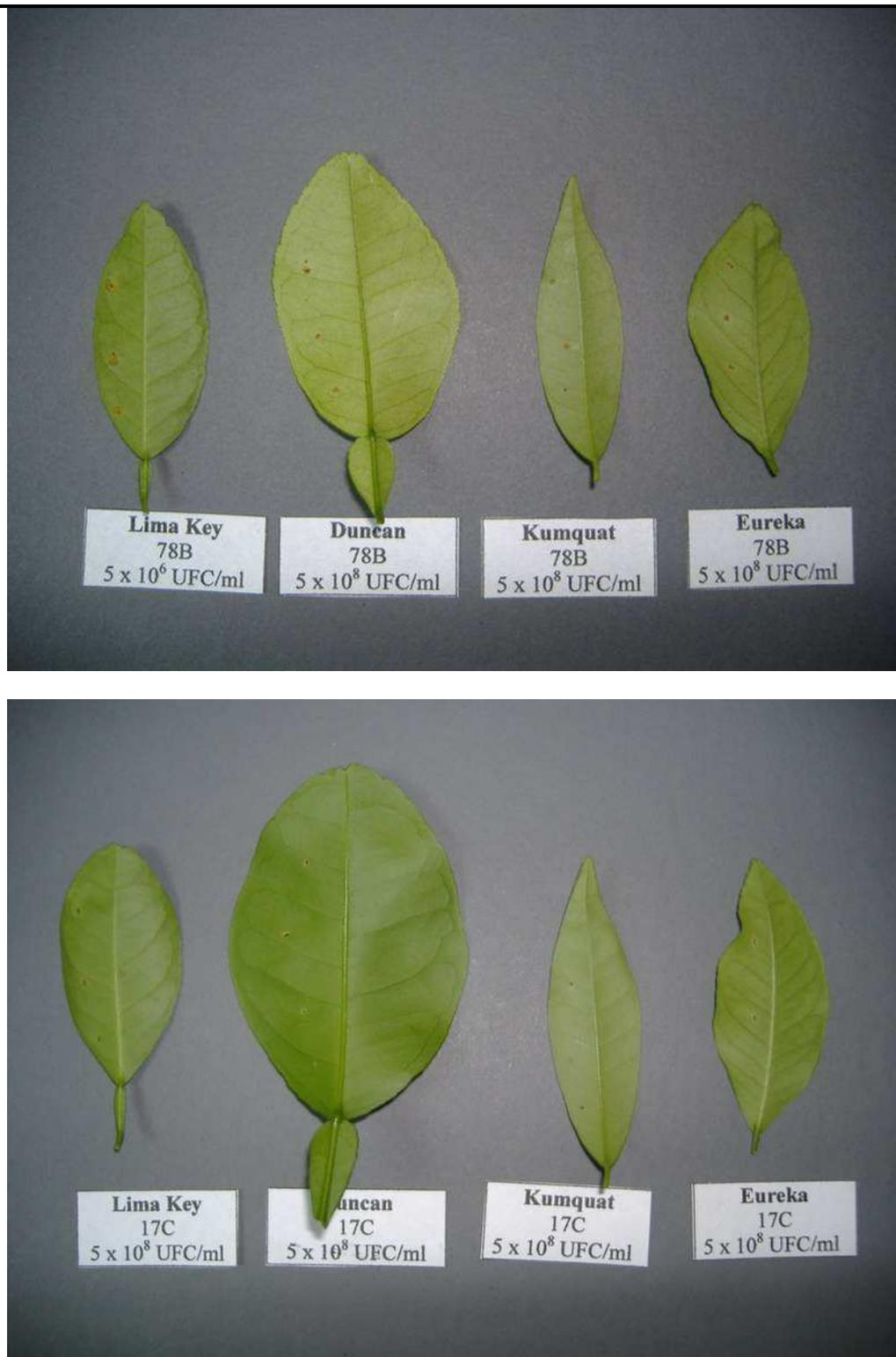


FIGURA 1.6. Comparación de las lesiones obtenidas al inocular mediante el método de pin prick hojas de distintas Rutaceas con *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus grupo B y C (5×10^8 bact/ml).

1.3.2.4. Caracterización de la respuesta observada al inocular cepas de los grupos A, B y C en diferentes hospedadores

El seguimiento periódico de las inoculaciones realizadas permitió observar diferencias en las respuestas obtenidas para cada grupo (Figura 1.7).

Los grupos A y B presentaron lesiones en lima Key y pomelo Duncan. La cepa C solo produjo lesiones de cancrrosis en lima Key y necrosis similares a reacción de hipersensibilidad (HR) en pomelo Duncan a partir del 4^{to} día después de la inoculación con altas concentraciones bacterianas.

Para las otras especies vegetales inoculadas, el grupo A produjo HR solamente en hojas de tomate. Se observaron lesiones en pomelo Duncan y lima Key y reacciones diversas para el resto de las especies inoculadas: manchas necróticas en tabaco y mirto; y sin respuesta observable en pimiento y *Nicotiana sp.*

La cepa del grupo B no produjo HR en ninguna de las especies vegetales inoculadas, destacándose únicamente manchas necróticas en tabaco y mirto.

La cepa C solo produjo HR en pomelo Duncan; las otras especies vegetales inoculadas presentaron manchas necróticas en tabaco y cambios de color dentro del área inoculada en hojas de mirto (Figura 1.7).

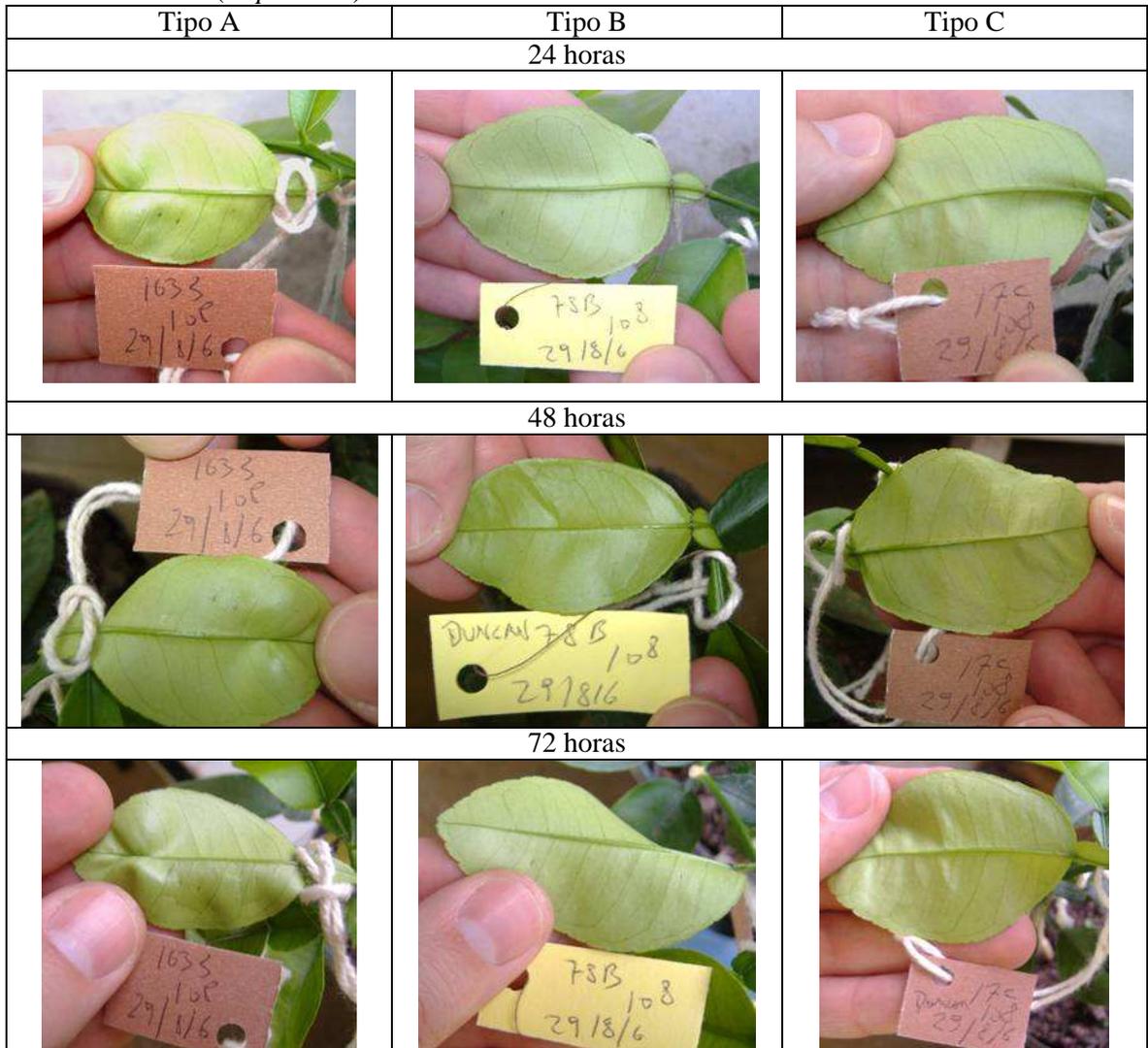
A diferencia de los resultados obtenidos por otros grupos de trabajos, los cuales observaron HR en tabaco luego de infiltrar suspensiones bacterianas de cepas Xac (Dunger et al., 2005), nuestros resultados no nos permiten confirmar estas observaciones. La reacción observada para nuestro caso en tabaco se correspondió con manchas necróticas que surgieron en distintos momentos para cada cepa infiltrada. Estas manchas necróticas presentaron aspecto diferente al observado en una HR. Se observaron diferencias tanto en la manera en la que se produjo la necrosis como en la coloración de las manchas obtenidas, lo cual no nos permite afirmar el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad para nuestro caso en tabaco.

En tomate se observó, luego de infiltrar la cepa perteneciente al grupo A, manchas necróticas similares a las de una HR. La reacción de hipersensibilidad producida por Xac en tomate es conocida y utilizada como método de diagnóstico por diversos grupos de trabajo (R. E. Stall, comunicación personal).

La ausencia de respuesta al infiltrar hojas de pimiento y *Nicotiana sp.*, así como la respuesta diferencial observada en las distintas cepas infiltradas para los otros hospedadores, podría utilizarse de manera comparativa al momento de determinar estas cepas bacterianas patógenas de citrus (Figura 1.7).

FIGURA 1.7. Inoculaciones realizadas en distintas especies con *Xanthomonas axonopodis* (páginas 24- 38)

Pomelo Duncan (*C. paradisi*)



Pomelo Duncan (*C. paradisi*) (continuación)

Tipo A	Tipo B	Tipo C
8 días		
		
9 días		
		
10 días		
		
30 días		
 <p style="text-align: center;">Duncan Tipo A 5x10⁸ bact/ ml</p>	 <p style="text-align: center;">Duncan Tipo B 5x10⁸ bact/ ml</p>	 <p style="text-align: center;">Duncan Tipo C 5x10⁸ bact/ ml</p>

Lima Key (*C. aurantifolia*)

Tipo A	Tipo B	Tipo C
48 horas		
		
72 horas		
		
8 días		
		

Lima Key (*C. aurantifolia*) (continuación)

Tipo A	Tipo B	Tipo C
9 días		
 <p>1635 108 29/8/6</p>	 <p>Lima Key 78 B 108 29/8/6</p>	 <p>175 108 29/8/6</p>
10 días		
 <p>1635 108 29/8/6</p>	 <p>Lima Key 78 B 108 29/8/6</p>	
30 días		
 <p>Lima Key Tipo A 5x10⁸ bact/ ml</p>	 <p>Lima Key Tipo B 5x10⁸ bact/ ml</p>	 <p>Lima Key Tipo C 5x10⁸ bact/ ml</p>

Mirto (*Muraya paniculata*)

0 horas					
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">17 C (Tipo C)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Xcc 03-1635 (Tipo A)</td> <td style="text-align: center;">78-4-3 (Tipo B)</td> </tr> </table>			17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
24 horas					
48 horas					
72 horas					

Mirto (*Muraya paniculata*) (continuación)

<p>8 días</p> <table border="1" data-bbox="304 560 614 728"> <tbody> <tr> <td data-bbox="304 560 459 622"></td> <td data-bbox="459 560 614 622">17 C (Tipo C)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="304 622 459 728">Xcc 03- 1635 (Tipo A)</td> <td data-bbox="459 622 614 728">78-4-3 (Tipo B)</td> </tr> </tbody> </table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03- 1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03- 1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p>9 días</p>					
<p>10 días</p>					

Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

<p>24 horas</p> <table border="1" data-bbox="304 495 639 658"><tbody><tr><td data-bbox="304 495 472 555"></td><td data-bbox="472 495 639 555">17 C (Tipo C)</td></tr><tr><td data-bbox="304 555 472 658">Xcc 03- 1635 (Tipo A)</td><td data-bbox="472 555 639 658">78-4-3 (Tipo B)</td></tr></tbody></table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03- 1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	 A photograph of a tomato leaf held by a hand. The leaf is green and shows some minor damage or discoloration. A yellow tag is attached to the stem.
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03- 1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p>48 horas</p>	 A photograph of a tomato leaf held by a hand. The leaf is green and shows some minor damage or discoloration. A yellow tag is attached to the stem.				
<p>72 horas</p>	 A photograph of a tomato leaf held by a hand. The leaf is green and shows some minor damage or discoloration. A yellow tag is attached to the stem.				

Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (continuación)

<p style="text-align: center;">8 días</p> <table border="1" data-bbox="304 591 807 723"> <tbody> <tr> <td data-bbox="304 591 557 656"></td> <td data-bbox="557 591 807 656">17 C (Tipo C)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="304 656 557 723">Xcc 03-1635 (Tipo A)</td> <td data-bbox="557 656 807 723">78-4-3 (Tipo B)</td> </tr> </tbody> </table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p style="text-align: center;">9 días</p>					
<p style="text-align: center;">10 días</p>					

Pimiento (*Capsicum annuum*)

<p>24 horas</p> <table border="1" data-bbox="304 560 852 694"><tr><td data-bbox="304 560 579 622"></td><td data-bbox="579 560 852 622">17 C (Tipo C)</td></tr><tr><td data-bbox="304 622 579 694">Xcc 03-1635 (Tipo A)</td><td data-bbox="579 622 852 694">78-4-3 (Tipo B)</td></tr></table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p>48 horas</p>					
<p>72 horas</p>					

Pimiento (*Capsicum annuum*) (continuación)

8 días		
	17 C (Tipo C)	
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
9 días		
10 días		

Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

<p style="text-align: center;">24 horas</p> <table border="1" data-bbox="304 562 852 696"> <tr> <td data-bbox="304 562 579 629"></td> <td data-bbox="579 562 852 629">17 C (Tipo C)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="304 629 579 696">Xcc 03-1635 (Tipo A)</td> <td data-bbox="579 629 852 696">78-4-3 (Tipo B)</td> </tr> </table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p style="text-align: center;">48 horas</p>					
<p style="text-align: center;">72 horas</p>					

Tabaco (*Nicotiana tabacum*) (continuación)

8 días					
	<table border="1"> <tbody> <tr> <td></td> <td>17 C (Tipo C)</td> </tr> <tr> <td>Xcc 03-1635 (Tipo A)</td> <td>78-4-3 (Tipo B)</td> </tr> </tbody> </table>			17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
9 días					
10 días					

Nicotiana sp.

<p>24 horas</p> <table border="1" data-bbox="304 560 852 694"><tr><td data-bbox="304 560 579 622"></td><td data-bbox="579 560 852 622">17 C (Tipo C)</td></tr><tr><td data-bbox="304 622 579 694">Xcc 03-1635 (Tipo A)</td><td data-bbox="579 622 852 694">78-4-3 (Tipo B)</td></tr></table>		17 C (Tipo C)	Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)	
	17 C (Tipo C)				
Xcc 03-1635 (Tipo A)	78-4-3 (Tipo B)				
<p>48 horas</p>					
<p>72 horas</p>					

Nicotiana sp. (continuación)

8 días		
Xcc 03-1635 (Tipo A)	17 C (Tipo C) 78-4-3 (Tipo B)	
9 días		
10 días		

1.3.3. Caracterización molecular

El método más efectivo para extraer ADN de este tipo de bacterias fue la metodología de C-TAB utilizada por Ausubel con modificaciones de Minsavage y Stall, UF, USA (R. E. Stall, comunicación personal) (ver Anexo 1). Posteriormente se realizaron ensayos de restricción con distintas enzimas (*Eco* RI, *Pst* I, *Xba* I, *Pvu* I, *Xho* I).

Puede observarse en las Figuras 2.8, 2.9 y 2.10 que el nivel de corte en el ADN fue alto debido a la presencia de múltiples sitios de restricción en la secuencia de estas bacterias (Hartung y Civerolo, 1987; Mahuku, 2004). El ensayo de restricción con las enzimas *Xho* I; *Pvu* I y *Xba* I permitió discernir un patrón de corte diferente entre las cepas de los grupos B y C.

Se encontró variación entre las cepas B. Las cepas C fueron idénticas entre ellas pero diferentes a las B y las A diferentes a ambas (Figuras 1.8, 1.9 y 1.10). El perfil de restricción obtenido fue característico para cada grupo de cepas (A, B y C) y para cada enzima de restricción empleada (*Xho* I; *Pvu* I y *Xba* I). Los resultados permitieron diferenciar visualmente a cada grupo, por lo que pudo reconocerse a simple vista diferencias de tamaño en el perfil de los fragmentos de restricción de mayor peso molecular. Las enzimas que permitieron una diferenciación más precisa entre grupos de cepas fueron *Xho* I y *Pvu* I (Figuras 1.8 y 1.9). El perfil obtenido con la enzima *Xba* I es únicamente diferencial para las cepas del grupo B en este caso en particular y para estas cepas (Figura 1.10).

La utilización de esta metodología ha permitido evaluar la diversidad genética de otros organismos fitopatógenos (Bloom et al., 1989), sin embargo, estos resultados obtenidos deberían ser validados además, mediante la utilización de otras técnicas que permitan una mayor resolución de las bandas obtenidas. A futuro, estos resultados de caracterización e identificación, podrían profundizarse mediante el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida (Hartung y Civerolo, 1987) y/o técnicas de

mayor especificidad para los segmentos de restricción obtenidos, utilizando hibridación con sondas por el método de Southern (1975) (Hartung y Civerolo, 1989; Pruvost et al., 1992; Canteros et al., 2004; Naranjo et al., 2004). La utilización de técnicas moleculares de mayor especificidad, servirán para relacionar con mayor exactitud los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas.

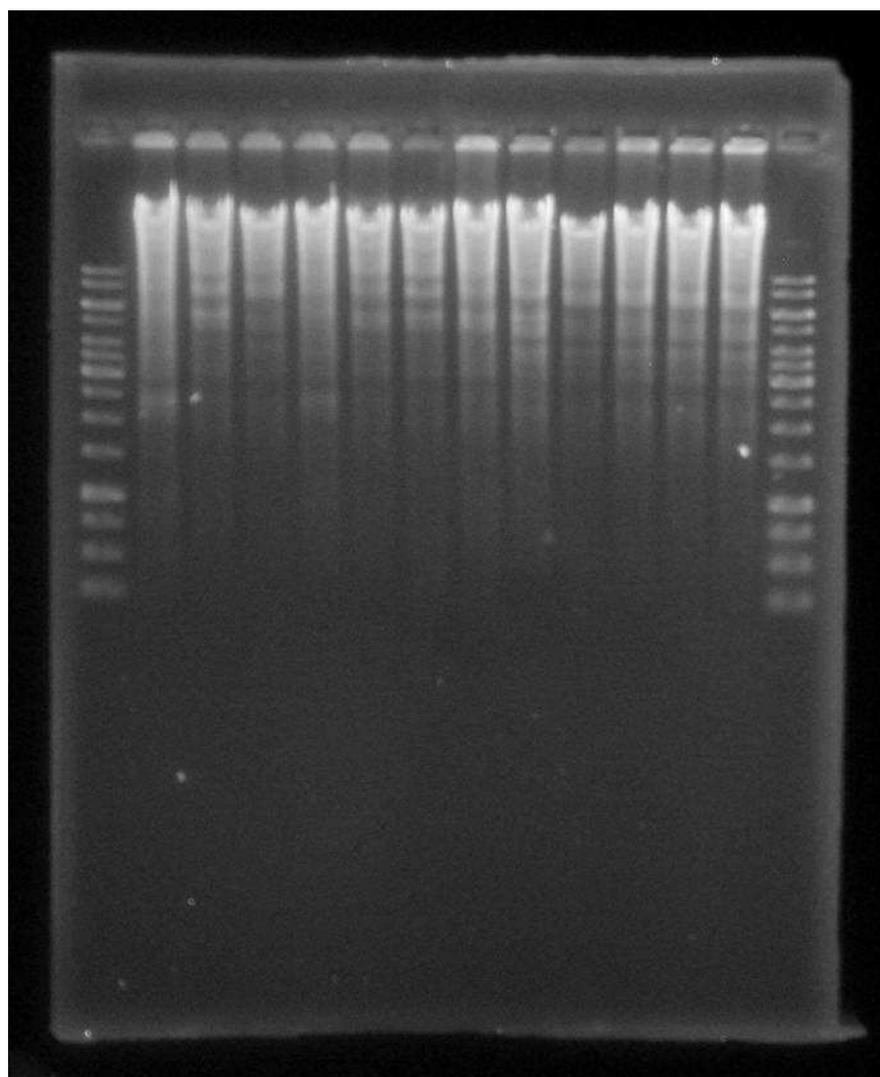


FIGURA 1.8. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus utilizando *Xho* I. Línea 1 y 4, cepas perteneciente al grupo A; líneas 2 y 5, grupo B aisladas en Entre Ríos; líneas 6 y 7 grupo B aisladas en Bella Vista (Ctes); líneas 3 y 8 y 9 a 12 cepas grupo C aisladas en Brasil

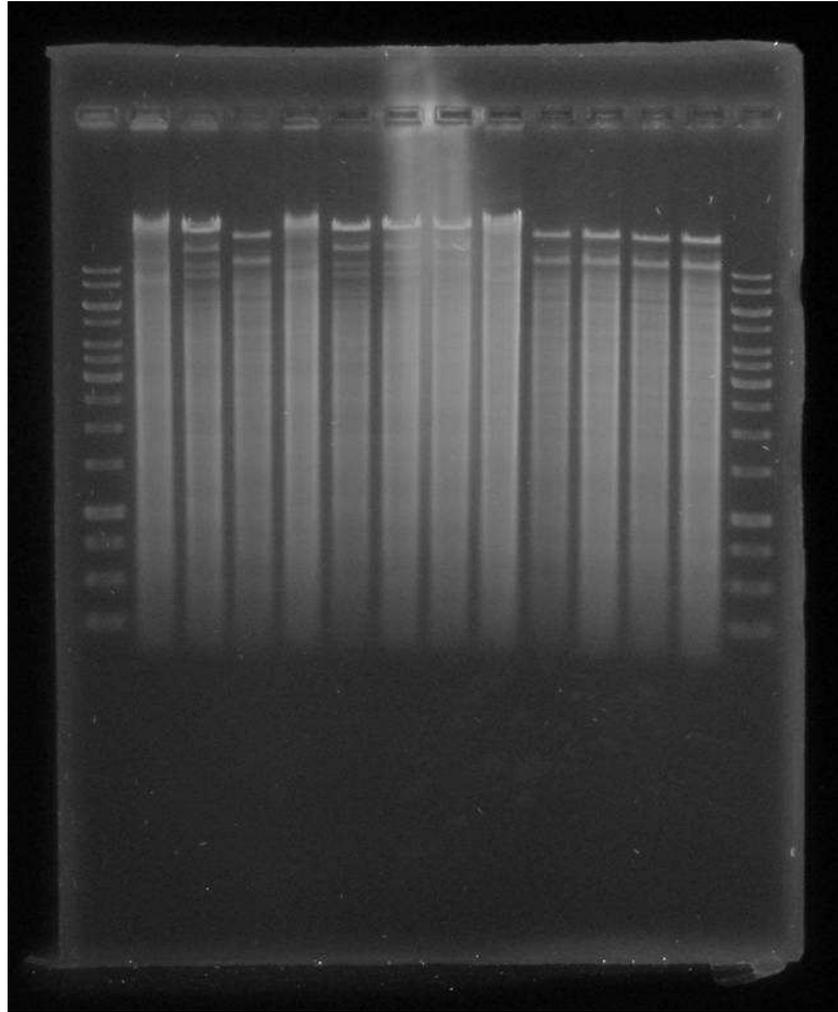


FIGURA 1.9. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus utilizando *Pvu* I. Línea 1 y 4, cepas perteneciente al grupo A; líneas 2 y 5, grupo B aisladas en Entre Ríos; líneas 6 y 7 grupo B aisladas en Bella Vista (Ctes); líneas 3 y 8 y 9 a 12 cepas grupo C aisladas en Brasil

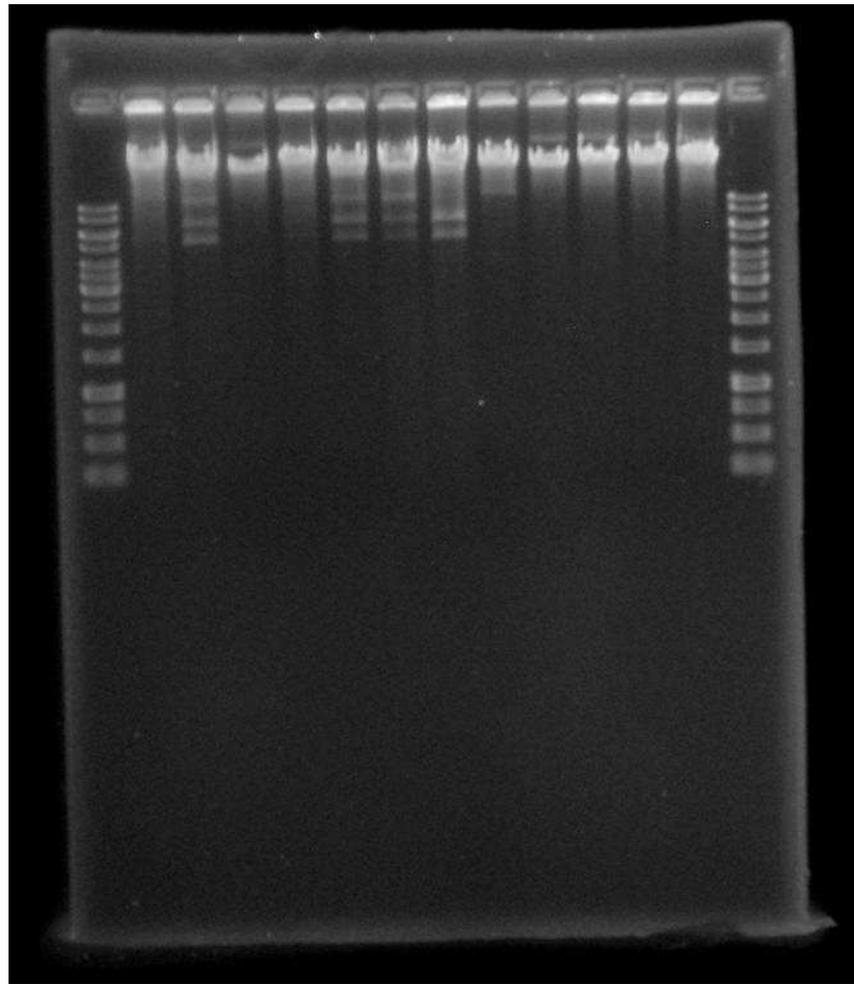


FIGURA 1.10. Perfiles de RFLPs obtenidos por medio de digestión de ADN total de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus utilizando *Xba* I. Línea 1 y 4, cepas perteneciente al grupo A; líneas 2 y 5, grupo B aisladas en Entre Ríos; líneas 6 y 7 grupo B aisladas en Bella Vista (Ctes); líneas 3 y 8 y 9 a 12 cepas grupo C aisladas en Brasil

Se observaron diferencias bioquímicas para utilización de lactosa y susceptibilidad al CINA en las cepas de los distintos grupos.

Se demostraron diferencias de patogenicidad para las cepas de los grupos B y C de *Xanthomonas axonopodis* que causan lesiones de cancrrosis en citrus. Todos los citrus inoculados con las cepas del grupo B presentaron lesiones. Sin embargo, las cepas del grupo C sólo produjeron lesiones en lima Key y no en otras Rutáceas. El pomelo Duncan produjo necrosis similares a HR para altas concentraciones de las cepas grupo C inoculados mediante infiltración. El N° de les/cm² se relacionó positivamente con la concentración de inóculo. Se demostró que la resistencia en el mesófilo en estas Rutáceas difirió para las cepas de los grupos B y C.

Se observaron diferentes patrones de polimorfismos en los fragmento obtenidos mediante corte con enzimas de restricción para los distintos grupos bacterianos. Los resultados preliminares indican diferencias entre las cepas a nivel molecular, además de la patogenicidad, lo cual servirá para fundamentar las identificaciones para restricciones cuarentenarias.

Capítulo 2.

**CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD PRODUCIDA
EN POMELO DUNCAN POR UNA CEPA DEL GRUPO C DE *XANTHOMONAS*
AXONOPODIS PATÓGENA DE CITRUS**

2.1. INTRODUCCIÓN

La cancrrosis de los citrus es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac). Diferencias observadas en infecciones naturales permitieron la identificación de grupos. El grupo B observado sobre limón (*Citrus limon*) en el nordeste argentino (NEA) desde 1929, fue desplazado por el grupo A, más agresivo, entre 1973-76. El grupo C, fue aislado en cercanías de São Paulo, Brasil en 1963, únicamente sobre lima Key, llamado también limonero gallego (*C. aurantifolia*) (Rossetti, 1977). En 1971 Namekata y Oliveira caracterizaron serológicamente las cepas patógenas solo en lima Key y las describieron como un grupo diferente. Las cepas del grupo C nunca se aislaron en Argentina ni en otro lugar que no sea Brasil (Grahm et al., 2004; Schaad et al., 2005).

Uno de los mecanismos de defensa que se inducen en el hospedante ante la presencia de un patógeno es la reacción de hipersensibilidad (HR). Esta reacción fue descrita en bacterias por Klement et al. en 1964 (Goodman y Novacky, 1994). La reacción de hipersensibilidad está generalmente gobernada por un solo gen en el patógeno que interactúa con un sólo gen en el huésped dando lugar a la reacción gen-por-gen (Flor, 1946) y que fué demostrada molecularmente por primera vez en el patosistema *Pseudomonas glycines*-soja (Staskawicz, 1984). La HR es, por lo tanto, una demostración fenotípica de la resistencia cualitativa. En los últimos años, algunos autores sugirieron clasificar a la HR como un tipo de resistencia denominada de “no hospedante”, la cual produce necrosis de los tejidos del hospedador en altas concentraciones de inóculo (Heath, 2000; Mysore y Choong-Min, 2004)

En 1982, Stall et al., caracterizaron la patogenicidad de cepas pertenecientes a los grupos A, B y C en hojas de pomelo, registrando necrosis similares a HR para las cepas del grupo C. Recientemente, se ha caracterizado en una cepa A^w relacionada con el grupo A Xac-A^w un gen de avirulencia (*avrGf1*) el cual produce HR en hojas de pomelo (Rybak, 2005).

Además de la observación de necrosis en el área inoculada, es necesario, para determinar una HR, la cuantificación de la dinámica poblacional del patógeno (crecimiento *in planta*) (Stall y Cook, 1968) y la determinación de alteraciones en la membrana celular del hospedante (Stall y Cook, 1966; Hibberd et al., 1987b), mediante el registro de la pérdida de electrolitos en los tejidos previamente infiltrados con el patógeno (Cook y Stall, 1968; Hibberd et al., 1988).

El objetivo de este trabajo fué caracterizar la reacción obtenida al inocular cepas de *Xanthomonas axonopodis* pertenecientes al grupo C en pomelo Duncan y determinar si corresponden a una reacción de hipersensibilidad. El conocimiento de esta interacción ayudará a comprender el fenómeno de resistencia de los citrus a *Xanthomonas* cuando es gobernada por un sólo gen.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Cepa bacteriana y medio de cultivo

Se utilizó la cepa Xc04-1966 perteneciente al grupo C, aislada de lima Key en Brasil en 1978, perteneciente a la Colección de la EEA-INTA-Bella Vista.

2.2.2. Medios de cultivo y preparación de inóculo

La cepa bacteriana fue mantenida por largo tiempo en microviales con agua de río a temperatura ambiente y por corto tiempo en cajas con Agar Lima Bean adicionada con cicloheximida o clorotalonil en heladera a 10°C. Para cada experimento la cepa fue cultivada en medio Agar Lima Bean (ALB) en estufa a 28° C

durante 24 h (Canteros, 1994). Se prepararon suspensiones bacterianas en agua de canilla estéril. Cada concentración bacteriana se ajustó utilizando un espectrofotómetro Spectronic 20 a 600nm de longitud de onda y se cuantificó mediante recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) en ALB (Stall et al., 1982).

2.2.3. Medición de pérdida de electrolitos

Se inocularon hojas jóvenes (brotes de 17-21 días) en plantines de pomelo Duncan, lima Key y limón Eureka mantenidos en cámara de cría a 28°C y 16 h de fotoperíodo diario. La inoculación se hizo por inyección-infiltración en el mesófilo de una suspensión de 5×10^8 UFC/ml. Se utilizaron jeringas de plástico de 3 ml y agujas hipodérmicas de tamaño 27 (Stall et al., 1982; Klement et al., 1990).

Se cuantificó la pérdida de electrolitos en el espacio intercelular midiendo la conductividad en muestras compuestas de discos de hojas extraídos utilizando un sacabocados de 1 cm de diámetro (tamaño de cada disco: $0,7854 \text{ cm}^2$). Cada muestra (4 discos = $3,1 \text{ cm}^2$) fue puesta en un tubo de ensayo con 3 ml de agua destilada, sometidas a vacío (-1 kg/cm^2 durante 1 minuto), por medio de una estufa de vacío y una bomba Pascal PXC100 y puestas en agitación (170 RPM durante 2 h) utilizando un agitador Vicking 6007. Se midió la conductividad de las muestras ($\mu\text{S} = \mu\text{mho}$) antes de la aplicación de vacío y luego de la agitación, utilizando un conductímetro Antares II. Se registró diariamente el valor de μmho para cada muestra durante las primeras 72 h en tres experimentos con tres repeticiones.

2.2.4. Curvas de crecimiento bacteriano

Se utilizaron hojas jóvenes de plantines de pomelo Duncan, lima Key y limón Eureka mantenidos en cámara de cría a 28°C y 16 h de fotoperíodo diario. La inoculación se hizo por infiltración del mesófilo con una suspensión de 5×10^6 UFC/ml. Para las inyecciones-infiltraciones se utilizaron jeringas de plástico de 3ml y agujas hipodérmicas de tamaño 27 (Stall et al., 1982; Klement et al., 1990).

Se determinó el número de células bacterianas n° cel./ cm² en las hojas infiltradas con las soluciones bacterianas de concentración conocida. Durante un período de 7 días se colectó en cada medición 3 muestras procedentes de distintas hojas inoculadas en cada tipo de citrus. Se trituró cada muestra en 1 ml de agua de canilla estéril, estas muestras eran obtenidas con un sacabocado de 0,5 cm de diámetro (tamaño de la muestra 2,22 cm² de hoja). Se realizaron diluciones y se sembraron alícuotas de 0,5 microlitros, por duplicado en cajas de Petri con ALB. Las cajas fueron incubadas en estufa a 28°C por 48-72 horas hasta que se contaron las colonias desarrolladas para registrar el N° de UFC/ml y N° de células por centímetro cuadrado.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Pérdida de electrolitos

Las inoculaciones con la cepa C en pomelo Duncan presentaron valores que variaron entre 16,97±1,84 a 140,39±14,24 (µmhos) para 24 y 72 h respectivamente. Se observó que la conductividad de las muestras durante este lapso aumentó más que en los otros hospedantes.

Las inoculaciones con la cepa C en hojas de lima Key, mostraron valores que variaron entre 9,83±1,69 a 22,17±6,27 (µmhos) para 24 y 72 h respectivamente.

Las inoculaciones realizadas en limón presentaron valores que variaron entre 11,44±1,86 a 24,5±6,13 (µmhos) para 24 y 72 h respectivamente.

Ambas respuestas observadas, tanto en lima Key como en limón, presentaron un menor incremento para los valores de conductividad en las muestras de hojas. Los valores obtenidos durante el tiempo de respuesta registrado (Figura 2.1), permiten observar una marcada diferencia en la respuesta de los hospedantes susceptibles o no susceptibles (lima Key y limón Eureka) y hospedantes resistentes (pomelo Duncan).

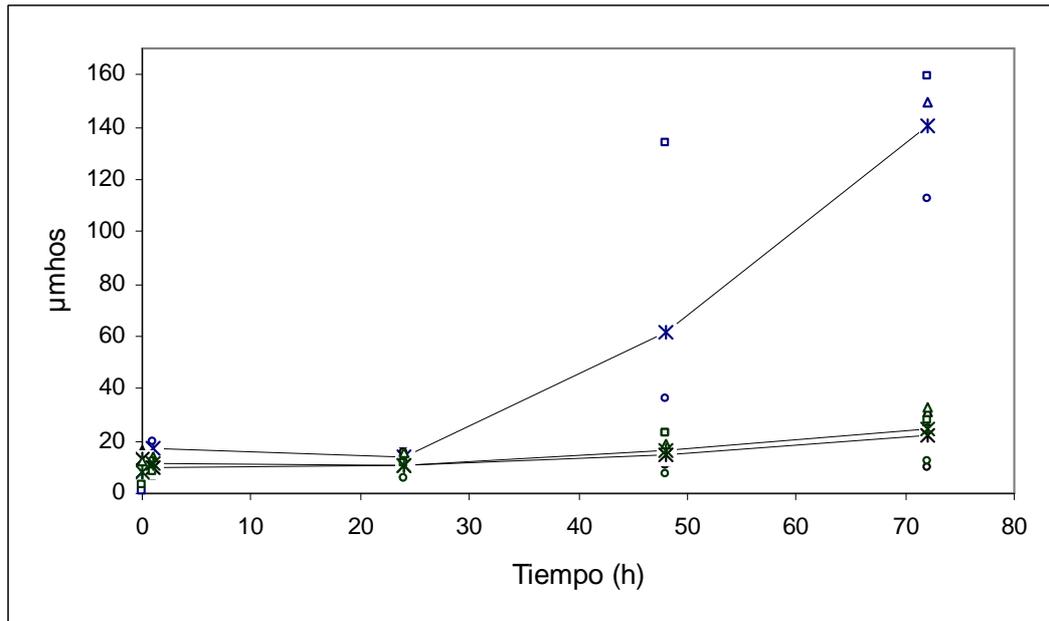


FIGURA 2.1. Determinación de la pérdida de electrolitos (μmhos) presentes en muestras de hojas de distintos citrus inoculados por infiltración del mesófilo con *Xanthomonas axonopodis* perteneciente al grupo C. Se realizaron 3 ensayos con 3 repeticiones para cada especie inoculada. Valores promedios obtenidos entre ensayos para lima Key (); pomelo Duncan (-.-.-) y limón Eureka (-----).

Los valores de conductividad fueron diferenciales entre hospedantes y para ambos grupos de cepas. La ocurrencia de este fenómeno, registrado en otros modelos de interacción patógeno- hospedante es una demostración de incompatibilidad para los organismos implicados en esas interacciones, en las cuales también se presenta HR al inocular altos títulos bacterianos en las hojas (Hibberd et al., 1988, Canteros et al., 1991; Rybak, 2005),

Otros autores han registrado previamente incrementos de los valores de conductividad (μmoh) en hojas de distintos citrus inoculados con Xac (Goto et al., 1979). Los aquí presentados mostraron diferencias mayores entre los valores obtenidos al comparar la respuesta de las especies susceptibles y resistentes a la cepa C, y las diferencias observadas entre hospedantes susceptibles a las cepas A obtenidas en el estudio de Goto et al en 1979. Los valores diferenciales para el incremento de la pérdida de electrolitos entre los hospedantes es similar a los resultados preliminares presentados por otros autores (Stall et al., 1981) y confirman el postulado de HR para esta interacción. La observación de necrosis en este caso confirma nuestras observaciones, aunque no es necesariamente la prueba definitiva para confirmar, en ningún modelo, presencia de HR. La necrosis observada es la consecuencia, no la causa, de la reacción producida entre el hospedante y el patógeno (Grabriel y Rolfe, 1990). Las altas concentraciones de inóculo bacteriano infiltrados en las hojas, al ser reconocidos por el hospedante, ocasionan la muerte de las células vegetales implicadas en este reconocimiento. La observación de necrosis en las hojas del hospedante susceptible se debe al gran nº de células vegetales que reconocieron al patógeno. La inoculación de bajos títulos bacterianos no produciría necrosis visibles en el hospedador.

2.3.2. Dinámica poblacional

La inoculación de hojas de lima Key con la cepa C utilizando 5×10^6 cel./ml registró un crecimiento del nº de bacterias de $2,20 \pm 0,02$ a $4,34 \pm 0,14$ ($\text{Log}(\text{cel./cm}^2 + 1)$) para 1 y 7 días.

Las inoculaciones con la cepa C en hojas de pomelo Duncan permitieron recuperar entre $2,45 \pm 0,04$ a 0 ($\text{Log}(\text{cel./cm}^2 + 1)$) para 1 y 7 días, mientras que en hojas de limón se recuperó entre $2,46 \pm 0,04$ a 0 (cel./cm^2) para el mismo período de tiempo.

Puede observarse en todos los casos (Figura 2.2), que aunque se registró aumento del nº de bacterias en el mesófilo de todos los hospedantes durante los primeros días, la dinámica poblacional fue diferente para lima Key (susceptible) con respecto al pomelo Duncan y limón Eureka (no susceptibles). En pomelo, la reacción de resistencia (HR), la cual se produce aunque no se observe necrosis en el área inoculada (5×10^6 cel./ml), detiene el crecimiento bacteriano. En limón, tampoco se recuperaron bacterias de la cepa C luego de 7 días. No se ha observado HR en hojas de limón al infiltrar altas concentraciones de esta cepa; por lo que existiría otro tipo de resistencia en este caso.

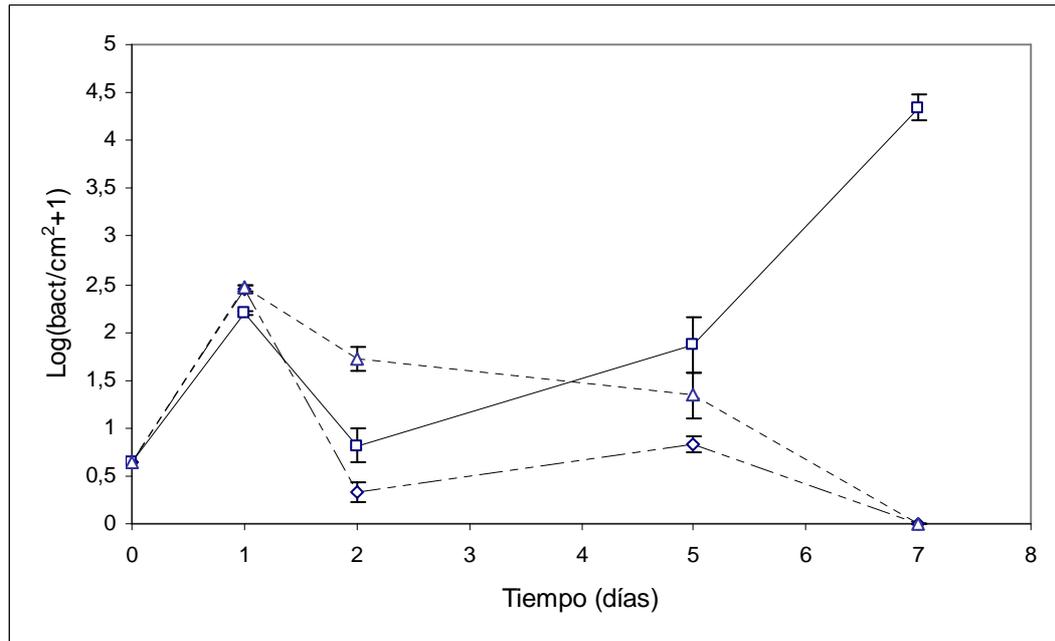


FIGURA 2.2. Log del N° del bacterias por $\text{cm}^2 + 1$ ($\text{Log bact}/\text{cm}^2 + 1$), determinado para distintas fechas (durante 7 días), luego de infiltrar el mesófilo en hojas de lima Key (—); pomelo Duncan (-.-.-.-.) y limón Eureka (-----) utilizando una suspensión de *Xanthomonas axonopodis* perteneciente al grupo C (2.2×10^3 bact/ml). Valores promedio \pm error estándar para 3 muestras colectadas en hojas distintas en c/ especie inoculada, cuantificadas por duplicado para cada fecha.

Los resultados obtenidos, apoyan las observaciones presentadas por otros autores (Canteros y Naranjo, 2002); y confirman las primeras observaciones realizadas por Namekata y Balmer, en 1973, referidas a la patogenicidad de estas cepas de *Xanthomonas*, las cuales no desarrollan lesiones típicas de cancrrosis en hojas de cítricos, exceptuando a lima Key. El único hospedante que permitió el crecimiento de la cepa C de *Xanthomonas axonopodis* fue la lima Key. El desarrollo de la bacteria en lima Key permitió la observación de lesiones típicas de cancrrosis en este hospedante (Figura 2.3).

Luego de 14 días, al procesarse toda el área infiltrada en las hojas inoculadas, se recuperaron tanto en pomelo como en limón algunas pocas bacterias (2-3 bact/cm²) pertenecientes a la cepa C (datos no mostrados). La dinámica de estas bacterias dentro de los tejidos del hospedante dependería en primer lugar de la concentración de inóculo del patógeno, observándose una necrosis y colapso del tejido ante altas concentraciones de inóculo (Stall y Cook, 1968) y/o una inhibición en el crecimiento para inóculos menores (Allington y Chamberlain, 1949, citados por Stall y Cook, 1966). Nuestros datos apoyan las observaciones realizadas por otros grupos de trabajo, en los cuales se registró una disminución gradual en el n° de bacterias y la imposibilidad de desarrollo bacteriano en el hospedante no susceptible. Asimismo, existirían sectores en el tejido foliar de estos hospedantes, los cuales permitirían la sobrevivencia de algunas bacterias, no su desarrollo, durante más tiempo (Laub y Stall, 1967).



FIGURA 2.3. Hojas de pomelo Duncan (derecha) y lima Key (izquierda) infiltradas con distintas concentraciones (5×10^5 , 5×10^6 y 5×10^8 bact/ ml) de *Xanthomonas axonopodis* grupo C patógena de citrus.

Las hojas de limón inoculadas con la cepa C no presentaron HR ni crecimiento bacteriano. Dado que en lima Key el crecimiento bacteriano de esta cepa produjo lesiones típicas, podemos notar que la susceptibilidad de estos citrus ante la cepa C es diferente. Este tipo de respuesta puede observarse, encontrarse en menor grado, al infiltrar distintos tipos de rutáceas con cepas del grupo A, observándose que algunos hospedantes son mas susceptibles al patógeno que otros (Capítulo 3; Gottwald *et al*, 1993). El entorno que ofrece el mesofilo de las hojas de limón no sería el más adecuado para el desarrollo de las cepas del grupo C.

En pomelo la presencia de HR responde al tipo de resistencia denominada como “resistencia de no hospedador” (Mysore y Choong.Min, 2004), en el cual la bacteria no puede multiplicarse debido al reconocimiento gen a gen entre el patógeno y el hospedador.

Tanto el pomelo Duncan como el limón Eureka son resistentes a la cepa C. Dado que la cepa C de *Xanthomonas axonopodis* patógena de citrus produce HR al ser inoculada en pomelo pero no en limón, esta respuesta diferencial en ambos hospedantes ante la misma bacteria indicaría presencia de dos tipos de resistencia actuando en estos sistemas.

La cepa C posee algún tipo de molécula inductora (la cual se denomina *elicitor*, del inglés elicit: *sacar*) que al ser reconocida mediante algún tipo de interacción por las células de pomelo, determinan la ocurrencia de HR (Dixon *et al.*, 2007). La determinación de éste o estos *elicitores* en el futuro no ayudaría en la caracterización de este patógeno, dado que esta respuesta en pomelo no es observada con las cepas A y B de *Xanthomonas* patógenas de citrus. El entendimiento de los mecanismos de interacción entre hospedador y patógeno, a través de la caracterización de los genes *avr* en el patógeno y *R* en el hospedador, ha sido de fundamental importancia en otros modelos al momento de implementar planes de mejoramiento (Hibberd *et al.*, 1987; Yu

et al., 1995, Chang et al., 2000). Hasta la fecha no existen referencias de aislamiento de genes de R a *Xanthomonas* en citrus.

No se conoce aún en las cepas de *Xanthomonas axonopodis* del grupo C la naturaleza del factor inductor de HR en pomelo. En otros modelos de interacción gen a gen, se ha determinado y caracterizado estos factores mediante métodos moleculares (Bonas et al., 1989; Michelmore, 1995). La caracterización molecular de los factores elicitors de HR han favorecido al entendimiento de los mecanismos de agresividad (Bal et al., 2000; Kaewnum et al., 2005) y especificidad (Scortichini et al., 2003) en las reacciones de interacción hospedador patógeno.

En *Xanthomonas* patógenas de citrus solo se ha aislado y caracterizado un gen *avr* en cepas A^w (*avrDf1*) el cual produce avirulencia en pomelo. Este gen (*avrDf1*) se supone podría ser parte de un complejo de genes *avr* aún no determinado (Rybak, 2005).

La demostración de ocurrencia de HR en el hospedador (Goodman y Novacky, 1994), sumados a la identificación y caracterización de los genes de avirulencia y resistencia implicados en esta interacción son los principales pasos a seguir al momento de caracterizar la interacción gen a gen entre patógeno y hospedador (Staskawicz et al., 1984; Staskawicz et al., 1987)

Los resultados permiten demostrar ocurrencia de HR en pomelo causada por la cepa C, indicando la presencia de genes de avirulencia en la bacteria y de resistencia en pomelo (al menos uno en cada organismo). La determinación y aislamiento de estos genes puede ayudar a caracterizar en mayor grado a estas cepas bacterianas y proporcionar información sobre los mecanismos de defensa del hospedante ante el patógeno.

Capítulo 3.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA DE DALAN DAN (*CITRUS SP*) Y KUMQUAT (*FORTUNELLA MARGARITA* (LOUR) SWING) A LA INFECCIÓN CON *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI*

3.1. INTRODUCCIÓN

La cancrrosis de los citrus, enfermedad bacteriana cuarentenaria endémica en Argentina, es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac).

La resistencia de los hospedantes cítricos a esta enfermedad es cuantitativa. Se ha determinado en variedades comerciales sometidas a infección natural que el rango de susceptibilidad/resistencia va desde muy susceptibles (pomelo, lima Key) a muy resistentes (mandarinas Ponkan, Okitsu) (Civerolo, 1984; Zubrzycki y D. de Zubrzycki, 1988; Leite, 2000; Das, 2003, Stall et al., 1981).

Diversos trabajos han propuesto y validado métodos de evaluación para caracterizar la resistencia de los hospedantes a esta enfermedad (Das, 2003). Algunos autores evaluaron la resistencia de distintos cultivares y especies emparentadas al género citrus enfocándose principalmente en los mecanismos de defensa externos del hospedante (los estomas) y cuantificando, además, el crecimiento poblacional de la bacteria luego de inocularlas en hojas de diferentes edades (Graham et al., 1992). Otros métodos de caracterización del desarrollo de la bacteria en distintos hospedantes fue propuesto por Kitagawa et al. (1992), los cuales utilizaron inmunomarcación para cuantificar el desarrollo del nº bacteriano en lesiones.

La caracterización de la resistencia en especies no usadas comercialmente, ha sido realizada utilizando distintos métodos. Algunos autores compararon la resistencia observada en el campo entre especies poco susceptibles a cancrrosis, como por ejemplo calamondin (*C. madurensis* Lour.) (Reddy, 1997) o híbridos naturales (Viloria et al., 2004; Xu et al., 2004) y artificiales (Carvalho C. et al., 2003) con el objetivo de

determinar nuevas fuentes de germoplasma utilizable en mejoramiento convencional. Otros trabajos utilizaron métodos moleculares (PCR) para caracterizar el desarrollo de distintas cepas de Xac, inoculadas en hojas de diversas especies del género citrus; estos autores además determinaron el grado de variación entre cepas, con el objetivo de relacionar las diferencias encontradas con la resistencia observada (Shiotani et al., 2000).

Todos los pomelos (*C. paradisi*) son muy susceptibles a cancrrosis (Stall et al., 1981b). Algunos investigadores utilizaron herramientas moleculares con el objetivo de determinar el grado de resistencia a cancrrosis en algunas variedades de pomelo, sin resultados significativos (McCollum et al., 2006). Se necesitan substitutos más resistentes o la incorporación de nuevas fuentes de resistencia (Roose, 2000). El Dalan Dan (*Citrus sp*), produce frutos similares a pomelo y muestra en el campo alta resistencia cuantitativa (Gochez y Canteros, 2004). Procedente de Filipinas, fue introducido en Brasil en el año 1967 por el profesor Ary A. Salibe (Pompeu, J. comunicación personal) y está en la Colección de Germoplasma Cítrico de Campinas (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeiropolis, SP). Luego de ser ingresado a Argentina y comenzado a cultivar por productores citricotas en la provincia de Misiones fue ingresado a la Colección Cítrica de la EEA INTA Concordia bajo el n° de accesión CCC 618 - DALAN DAN (pomelo híbrido). Estudios moleculares de este cítrico, mostraron semejanzas a nivel genético con distintas especies de pomelo (Corazza-Nunes et al., 2002). La calidad de los frutos en Corrientes también es buena (Rinsdahl et al., 2006).

El kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swing)) (también conocido erróneamente como quinoto), es una especie de Rutácea poco cultivada comercialmente en Argentina. No se ha visto en el campo síntomas de cancrrosis en esta planta, aunque resultados preliminares obtenidos indicaron que se forman

cancros típicos al inocular artificialmente las hojas (Gochez y Canteros, 2005). Recientemente se ha comenzado a utilizar esta especie en programas de mejoramiento para resistencia a cancrrosis, con el objetivo de aislar algún gen o grupo de genes responsables de esta resistencia con resultados aún no concluyentes (Deng et al., 1992; P. de C. Costa et al., 2003; Gmitter et al., 2004; Guo et al., 2004; Vilorio et al., 2004).

Se necesita información que permita el empleo de las Rutáceas más resistentes en programas de mejoramiento y el desarrollo de métodos más eficaces para caracterizar resistencia a cancrrosis de los citrus en otras especies o nuevos cultivares o híbridos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la interacción entre Xac y Dalan Dan y Xac y kumquat y al mismo tiempo desarrollar métodos más adecuados para determinar resistencia a cancrrosis.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Inoculación de hojas

Se inoculó, por infiltración del mesófilo con aguja y jeringa hipodérmica (Stall et al., 1979), los cítricos DalanDan, kumquat Nagami y, como testigo susceptible, pomelo Duncan, pomelo Red Blush y lima Key, con las cepas de Xac Xc03-1635-A (susceptible a cobre, CuS) y Xc05-2592-A (resistente a cobre, CuR), aisladas de pomelo en Bella Vista. Las cepas bacterianas fueron repicadas en cajas con medio Agar Lima Bean (ALB) (Canteros, 1994 y mantenidas en estufa (28° C) durante 24 horas antes de su utilización. Se realizaron suspensiones bacterianas en agua de canilla estéril. Cada suspensión se ajustó mediante la utilización de un espectrofotómetro Spectronic 20 a 300nm de longitud de onda y se cuantificó mediante la realización de siembra en cajas de petri con ALB (Stall et al., 1982,

Canteros, 1995)

Se marcó en cámara de cría y campo brotes con 4 hojas de aproximadamente la misma edad. Se inocularon tres niveles de inóculo de concentración bacteriana conocida en hojas de cuatro edades distintas: de 15 a 36 días y luego de 15 a 28 días desde inicio de desarrollo del brote.

Se colectaron las hojas inoculadas y se determinó el área inoculada de cada hoja utilizando el método del conteo de puntos de Marshall (1968) (Stall et al., 1979a). Se determinó para cada hoja el número de lesiones por centímetro cuadrado (les/cm²) en cada uno de los brotes inoculados. Debido a que la concentración del inóculo no fue exactamente igual en cada fecha, los datos para cada repetición se ajustaron según la concentración determinada por medio del recuento de colonias en cajas de petri con ALB. Para la estandarización se multiplicó el nº les/cm² por la proporción de células bacterianas que se pretendía utilizar (según conocimiento anterior) sobre el nº de células (ufc/ml) que realmente se utilizó en la inoculación (Stall et al., 1982).

Los datos de les/cm² fueron transformados por el $\text{Log}(\text{les/cm}^2)+1$ para linealizar las curvas de respuesta obtenidas.

Se analizó por regresión lineal la infección obtenida para cada nivel de inóculo ($Y = \text{Log}(X \text{ les/cm}^2)+1$; $X = \text{tiempo-días desde inicio de desarrollo del brote}$).

Se realizaron regresiones lineales con los valores medios de los datos en cada uno de los ensayos, para cada fecha y para las tres últimas fechas de inoculación.

3.2.2. Inoculación de frutos

Se prepararon suspensiones de Xac de concentración conocida con las cepas Xc03-1635-A (CuS) y Xc05-2592-A (CuR), aisladas de pomelo en Bella Vista de la misma manera que para la inoculación de hojas.

Se seleccionaron frutos de aproximadamente el mismo tamaño en cada inoculación. Se inoculó mediante el método de pulverización del inóculo y presión con

tapón de goma (Koizumi, 1976; Canteros, 1992) diversos frutos de plantas ubicadas en distintos lotes de la EEA INTA Bella Vista. Se inocularon frutos de Dalan-Dan, kumquat, pomelo Red Blush y lima Key con las cepas de Xac en distintas fechas.

Se realizaron dos ensayos de inoculación; uno con 2 repeticiones (entre diciembre/2005 y febrero/2006) y otro con una repetición (entre octubre y - diciembre de 2006). Las inoculaciones se realizaron en fechas consecutivas (cada 15 días) a partir de la primera fecha de inoculación. En cada fecha se inocularon 5-6 frutos de aproximadamente el mismo calibre, con tres concentraciones de Xac (5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^6 ufc/ ml) para las repeticiones realizadas entre diciembre/ 2005 y marzo/ 2006; y 5×10^4 , 5×10^5 y 5×10^6 ufc/ ml de Xac en el ensayo realizado entre octubre y - diciembre de 2006).

Los frutos fueron cosechados aproximadamente a los dos meses de inoculados. Se determinó el área inoculada en centímetros cuadrados (cm^2) mediante la utilización de la fórmula del área del círculo (Canteros, 1992). Se contó el número de lesiones en cada fruto y se obtuvo el nº de les/ cm^2 de área inoculada. Los datos para cada repetición se ajustaron según la concentración previamente determinada por recuento en caja. Se multiplicó el nº de les/ cm^2 por la proporción de células bacterianas que se había calculado utilizar sobre el número de células que realmente se utilizó en la inoculación (Stall et al., 1982).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Desarrollo de lesiones en hojas

En los resultados de las inoculaciones secuenciales realizadas entre 15 y 36 días (Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4) se observa una disminución del número de lesiones por centímetro cuadrado (les/ cm^2) para cada una de las concentraciones bacterianas en todos los cítricos infiltrados.

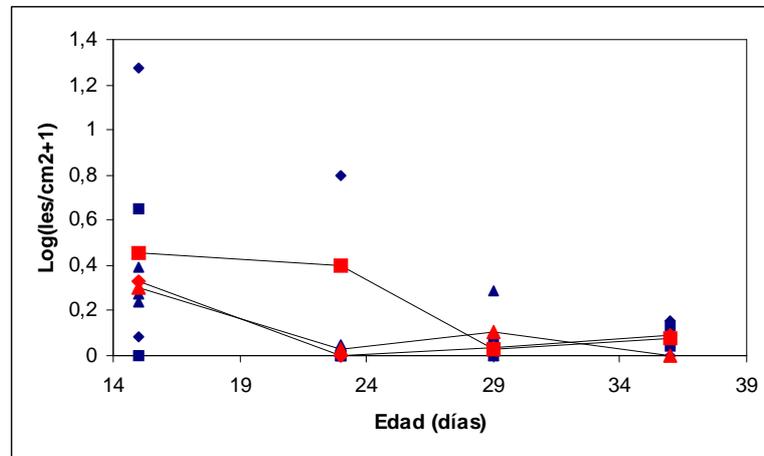
Se calcularon ecuaciones de regresión para cada especie y para cada

concentración bacteriana inoculada, con el objetivo de caracterizar la razón de cambio entre las variables “nº de les/cm²” y “edad de la hoja” (Cuadro 3.1). Se observó que las ecuaciones con mejores ajustes se obtuvieron en las especies más susceptibles a cancrrosis (pomelo Duncan y lima Key). Se utilizaron diversas transformaciones con el objetivo de obtener mejor ajuste en las ecuaciones (transformación logarítmica de una y/o ambas variables). Se observó una tendencia en todas las repeticiones a disminuir el nº de les/cm² con la edad de la hoja (alto R² de los modelos). Únicamente se observaron modelos significativos ($p < \alpha = 0,05$) en Duncan (5×10^2 y $2,5 \times 10^3 = \text{rep II}$) y lima Key ($5 \times 10^2 = \text{rep I}$; $2,5 \times 10^3 = \text{rep III}$).

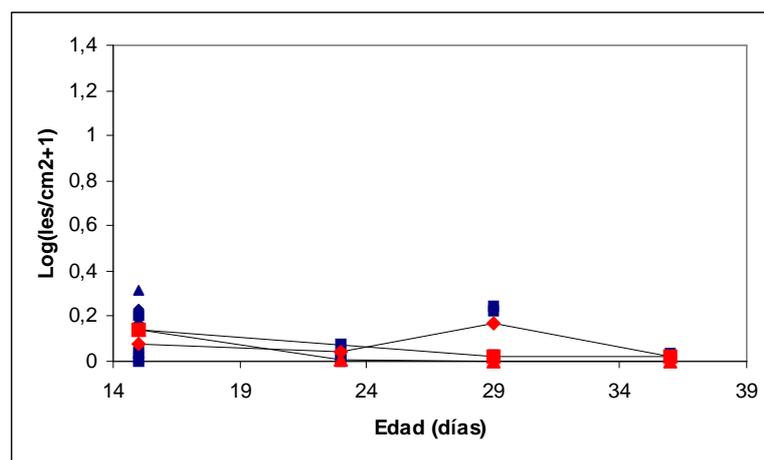
Se calcularon regresiones lineales con los últimos tres datos de les/cm² para todos los cítricos infiltrados, en cada una de las concentraciones bacterianas inoculadas (Cuadro 3.2). El objetivo de este análisis fue obtener más información que explique la variabilidad observada utilizando como referencia los períodos de inoculación usados en estudios previos (Stall et al., 1982). Aunque las ecuaciones obtenidas explican mejor cada modelo en base a las rectas de regresión de la Cuadro 3.2, los valores p obtenidos son mayores que en la Cuadro 3.1 (aceptando estos modelos se podría cometer Error de Tipo I).

Dado que las especies que presentaron mayor resistencia a cancrrosis (Dalan Dan y kumquat) no se ajustaron significativamente a ninguno de estos modelos, se repitió el ensayo de inoculación infiltrando esta vez las hojas de los brotes durante lapsos menores.

A



B



C

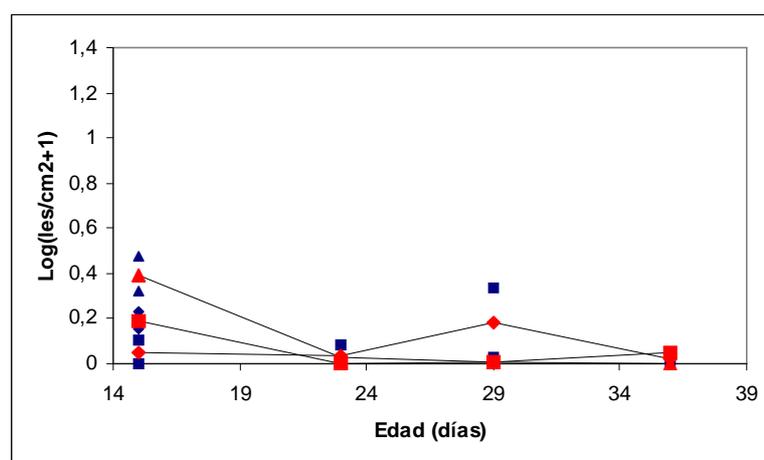
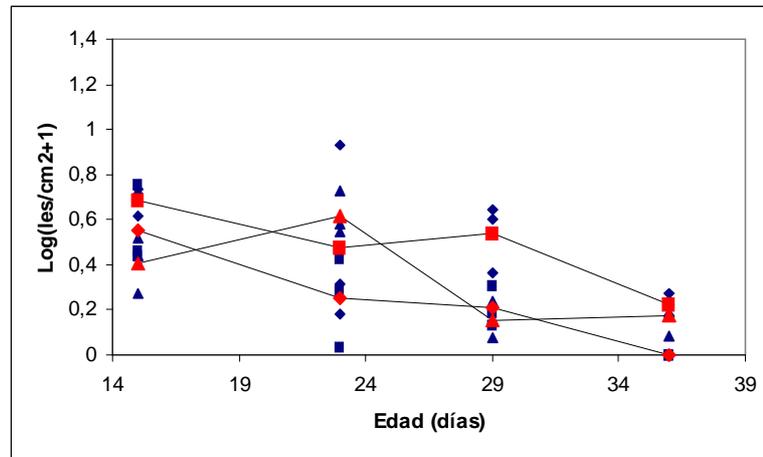
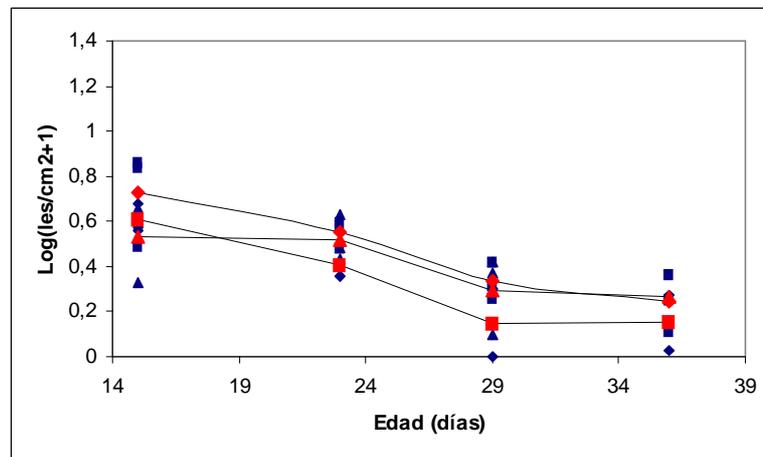


FIGURA 3.1. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de citrus Dalan Dan de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=2,5x10³ y C=5x10³ bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

A



B



C

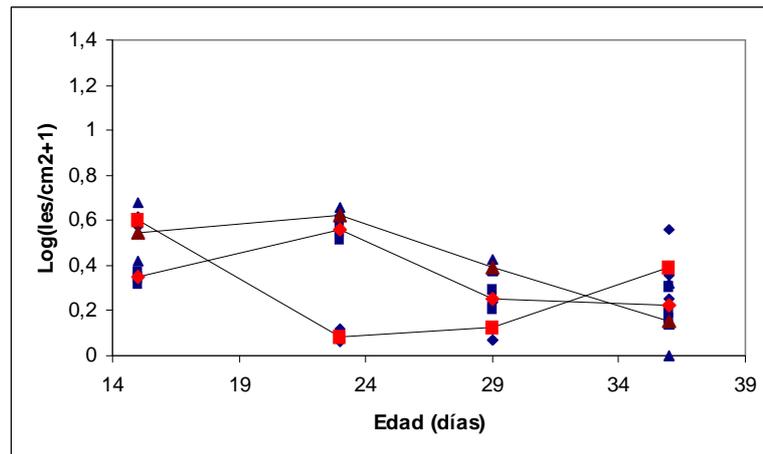
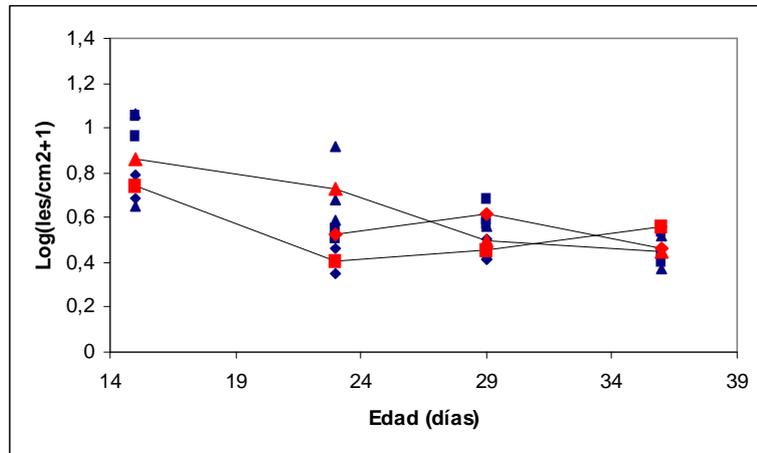
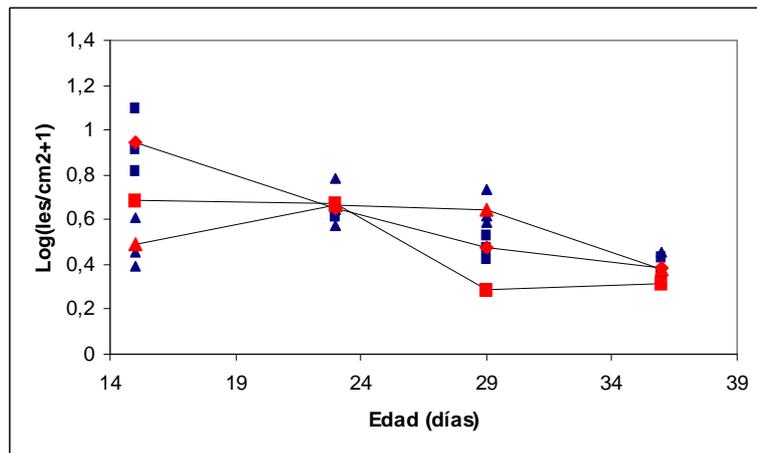


FIGURA 3.2. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de pomelo Duncan de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= $2,5 \times 10^3$ y C= 5×10^3 bact/ml). (\diamond = repetición 1; \square = rep2; \triangle = rep3; $-\diamond$ = medias rep1; $-\square$ = medias rep2; $-\triangle$ = medias rep3).

A



B



C

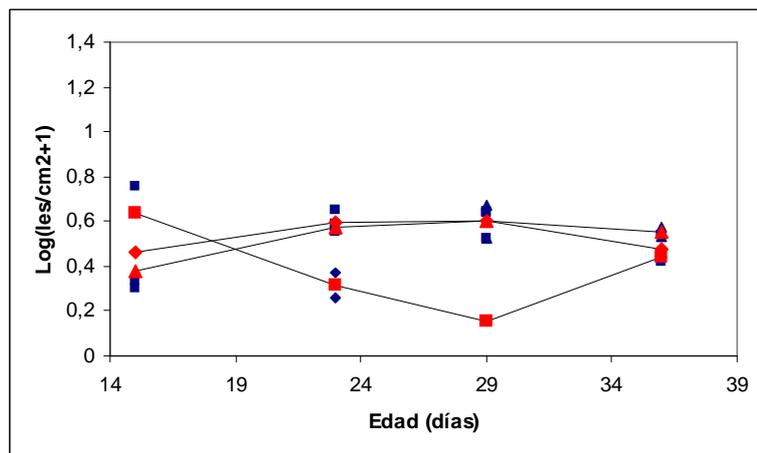
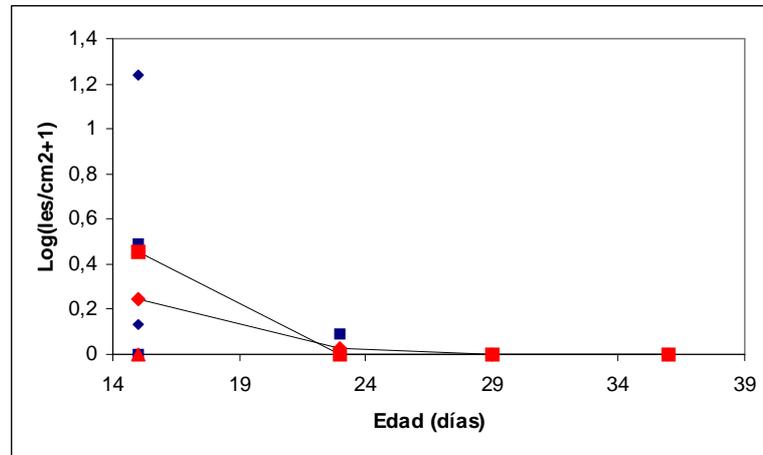
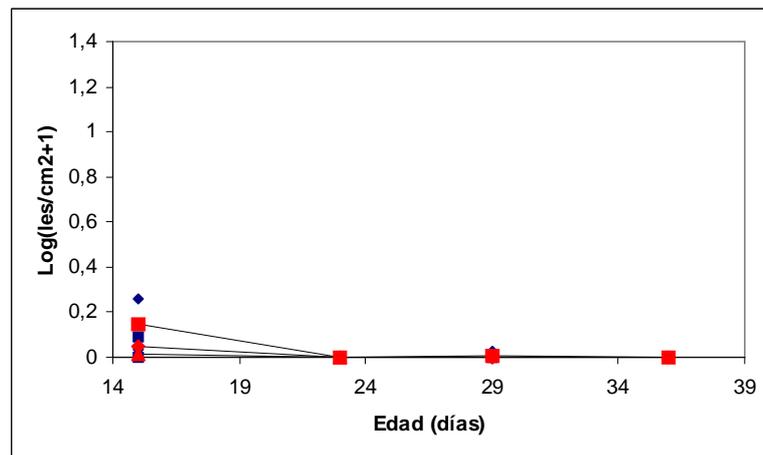


FIGURA 3.3. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de lima Key de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= $2,5 \times 10^3$ y C= 5×10^3 bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3).

A



B



C

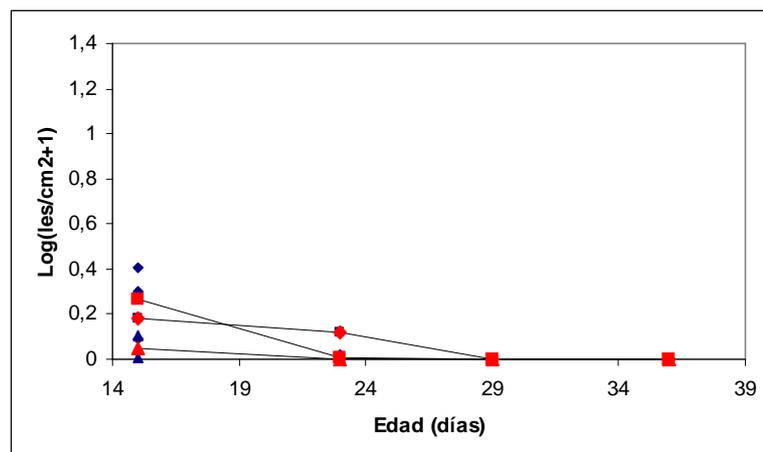


FIGURA 3.4. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de kumquat Nagami de distintas edades (desde 15 a 36 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= $2,5 \times 10^3$ y C= 5×10^3 bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

CUADRO 3.1. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas secuencialmente entre 15 y 36 días de edad. Rep= repetición; gl= grados de libertad del modelo ($Y = \text{Intercep} + \text{Edad } X$); CME= cuadrado medio del error; p= probabilidad del estadístico F; R^2 = ajuste del modelo.

Especie	Concentración (bact/ ml)	Rep	gl	Intercep	Edad	CME	p	R^2
DalanDan	5×10^2	I	3	0,78715	-0,02130	0,01720	0,1288	0,7589
		II	3	0,38099	-0,01042	0,01950	0,3680	0,3994
		III	3	0,43086	-0,01246	0,00915	0,1817	0,6695
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,22933	-0,00633	0,00101	0,2038	0,9009
		II	3	0,09582	-0,00072456	0,00616	0,8996	0,0101
		III	3	0,19744	-0,00627	0,00216	0,1726	0,6847
	5×10^3	I	3	0,22360	-0,00629	0,00663	0,3549	0,4161
		II	3	0,05341	0,00072802	0,00831	0,9131	0,0076
		III	3	0,57043	-0,01800	0,01659	0,1635	0,6998
Duncan	5×10^2	I	3	0,98199	-0,01945	0,01052	0,0994	0,8111
		II	3	0,89859	-0,02504	0,00367	0,0236	0,9533
		III	3	0,75130	-0,01601	0,04124	0,3474	0,4259
	$2,5 \times 10^3$	I	3	0,92985	-0,02336	0,00770	0,0543	0,8943
		II	3	1,08897	-0,02425	0,00202	0,0141	0,9720
		III	3	0,76903	-0,01426	0,00485	0,0871	0,8333
	5×10^3	I	3	0,54544	-0,00953	0,07643	0,6475	0,1243
		II	3	0,58103	-0,00916	0,02445	0,4608	0,2907
		III	3	0,94079	-0,01986	0,01699	0,1428	0,7348
LimaKey	5×10^2	I	3	0,74170	-0,00781	0,02479	0,5234	0,2271
		II	2	0,69217	-0,00535	0,00995	0,7082	0,1958
		III	3	1,17470	-0,02106	0,00341	0,0307	0,9395
	$2,5 \times 10^3$	I	3	1,03547	-0,02119	0,01799	0,1347	0,7488
		II	3	1,31016	-0,02704	0,00390	0,0216	0,9572
		III	3	0,66048	-0,00448	0,02523	0,7054	0,0868
	5×10^3	I	3	0,68044	-0,01139	0,04798	0,5059	0,2441
		II	3	0,51285	0,00089496	0,00830	0,8933	0,0114
		III	3	0,31348	0,00828	0,00699	0,2654	0,5396
Kumquat	5×10^2	I	3	0,64500	-0,02061	0,02785	0,1966	0,6454
		II	3	0,35985	-0,01132	0,00556	0,1436	0,7334
		III	0	-	-	-	-	-
	$2,5 \times 10^3$	I	3	0,20284	-0,00639	0,00267	0,1965	0,6456
		II	3	0,06488	-0,00207	0,00028178	0,1966	0,6454
		III	1	-	-	-	-	-
	5×10^3	I	3	0,37835	-0,01205	0,00884	0,1862	0,6623
		II	3	0,31894	-0,00949	0,00137	0,0584	0,8867
		III	3	0,07303	-0,00232	0,00031794	0,1817	0,6696

CUADRO 3.2. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas secuencialmente entre 22 y 36 días de edad. Rep= repetición; gl= grados de libertad del modelo ($Y = \text{Intercep} + \text{Edad} X$); CME= cuadrado medio del error; p= probabilidad del estadístico F; R^2 = ajuste del modelo.

Especie	Concentración (bact/ ml)	Rep	gl	Intercep	Edad	CME	p	R^2
DalanDan	5×10^2	I	2	0,87062	-0,02397	0,03347	0,4409	0,5923
		II	2	-0,15858	0,00682	0,00001696	0,0417	0,9957
		III	2	0,12333	-0,00264	0,00565	0,8009	0,0946
	$2,5 \times 10^3$	I	1	-	-	-	-	-
		II	2	0,12836	-0,00176	0,01218	0,9070	0,0212
		III	2	0,01810	-0,00053574	0,00000990	0,3616	0,7106
	5×10^3	I	2	-0,08997	0,00373	0,00009446	0,1758	0,9256
		II	2	0,12253	-0,00148	0,01599	0,9317	0,0115
		III	2	0,07301	-0,00211	0,00006160	0,2445	0,8596
Duncan	5×10^2	I	2	0,99745	-0,01995	0,02101	0,4255	0,6159
		II	2	0,72985	-0,01965	0,00352	0,2019	0,9028
		III	2	1,29079	-0,03324	0,04351	0,3810	0,6826
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,78704	-0,01880	0,01266	0,3672	0,7026
		II	2	1,06326	-0,02343	0,00396	0,1808	0,9215
		III	2	0,90986	-0,01876	0,00705	0,2882	0,8086
	5×10^3	I	2	-0,49976	0,02386	0,00659	0,2254	0,8798
		II	2	1,14519	-0,02574	0,00009592	0,0263	0,9983
		III	2	1,44361	-0,03592	0,00012604	0,0216	0,9988
LimaKey	5×10^2	I	2	0,13503	0,01157	0,00029642	0,1021	0,9745
		II	2	0,69217	-0,00535	0,00995	0,7082	0,1958
		III	2	1,17974	-0,02122	0,00681	0,2547	0,8483
	$2,5 \times 10^3$	I	2	1,21983	-0,02708	0,03143	0,3936	0,6640
		II	2	1,09949	-0,02031	0,00186	0,1446	0,9493
		III	2	1,22125	-0,02240	0,00836	0,2659	0,8355
	5×10^3	I	2	-0,00615	0,01054	0,03285	0,6872	0,2226
		II	2	0,83819	-0,00950	0,00242	0,3263	0,7595
		III	2	0,62756	-0,00175	0,00077159	0,6655	0,2516
Kumquat	5×10^2	I	2	-	-	-	-	-
		II	2	0,07372	-0,00218	0,00016412	0,3616	0,7106
		III	2	-	-	-	-	-
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,00409	-0,00003586	0,00005519	0,9717	0,0020
		II	2	-	-	-	-	-
		III	2	-	-	-	-	-
	5×10^3	I	2	0,01504	-0,00044505	0,00000683	0,3616	0,7106
		II	2	0,29850	-0,00883	0,00269	0,3616	0,7106
		III	2	0,00414	-0,00012253	5,176532E-7	0,3616	0,7106

Los resultados obtenidos en este nuevo ensayo (Figuras 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9) mostraron un período de susceptibilidad similar en forma, aunque no en período, para las especies más resistentes a cancrrosis (Dalan Dan y kumquat). Los valores de les/cm² indicaron que las especies más resistentes a cancrrosis (Dalan Dan y kumquat) disminuyen la susceptibilidad con una razón de cambio mayor a medida que pasó el tiempo, en comparación con las especies menos resistentes a cancrrosis como pomelo Duncan, Red Blush y lima Key. La inclusión de otra variedad de pomelo (Red Blush) permitió la comparación y caracterización de la respuesta no sólo con Dalan Dan sino entre ambas variedades de *C. paradisi*.

Pudo observarse para las variedades más resistentes a cancrrosis (Dalan Dan y kumquat) ajustes significativos para las respuestas obtenidas en todas las concentraciones bacterianas infiltradas (Cuadro 3.3). La variabilidad dentro de estas especies resultó alta, lo que dificultó la obtención de modelos más precisos. Únicamente se obtuvieron modelos significativos ($p < \alpha = 0,05$) en Dalan Dan ($2,5 \times 10^3 = \text{rep I, II y III}$; $5 \times 10^3 = \text{rep I}$), lima Key ($5 \times 10^3 = \text{rep III}$) y Red Blush (5×10^2 y $1 \times 10^3 = \text{rep I}$), aunque los valores de los Interceptos ($\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2 + 1)$) siempre fueron menores en Dalan Dan).

Las especies más susceptibles a cancrrosis (pomelo Duncan, pomelo Red Blush y lima Key) presentaron valores, en la mayoría de los casos, con menor variabilidad interna. Las respuestas para lapsos cortos mostraron regresiones no significativas para las variables utilizadas (no existirían cambios significativos entre “nº de les/ cm²” y “edad de la hoja” para los períodos analizados en las especies mas susceptibles a cancrrosis).

En todas las especies se observó una relación directamente proporcional entre concentración de inóculo infiltrado y nº de lesiones obtenidas/ cm². En Dalan-Dan y kumquat el nº les/cm² disminuyó desde los 15 a los 26 días de edad, en Duncan disminuyó sólo entre 15 y 36 días de edad. En pomelo Red Blush se observó una

menor susceptibilidad a cancrrosis con respecto a Duncan, aunque en todos los casos las respuestas de ambos pomelos presentaron mayor susceptibilidad que en Dalan Dan.

Las regresiones obtenidas al utilizar solamente los datos de las tres últimas inoculaciones reportaron mejor ajuste a los modelos obtenidos (Cuadro 3.4), aunque en la mayoría de los casos disminuyó la significancia del modelo ($p < \alpha = 0,05$) (Error de Tipo I). Pudo observarse una tendencia entre las especies *a priori* más resistentes a cancrrosis, a aumentar rápidamente dicha resistencia a medida que aumentaba la edad de las hojas.

El kumquat no presentó ajustes significativos ($p < \alpha = 0,05$) en los ensayos realizados inoculando hojas de entre 15 y 26 días de edad. Pudo observarse una tendencia al aumento rápido de la resistencia a cancrrosis en comparación con el resto de las especies estudiadas (incluyendo Dalan Dan).

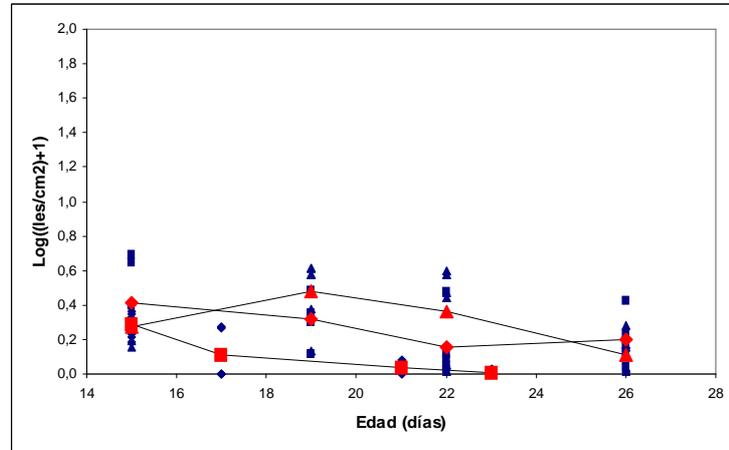
Se observó alta variabilidad en la respuesta del nº de les/cm² obtenido luego de la inoculación en Dalan Dan en comparación con los valores obtenidos en pomelo Duncan y Red Blush. Dado que no se conoce aún el grado de variabilidad genética de Dalan Dan, ni el grado de poliembrionía nucelar de sus frutos (Pompeu, J. comunicación personal), la variabilidad en la respuesta observada para Dalan Dan podría ser debida a heterogeneidad en el material genético utilizado, en contraste con la respuesta obtenida en pomelo Duncan, el cual procede de plantines de semilla que se saben proceden de poliembrionía nucelar (Saunt, 2000).

Como contraste a la idea expuesta Graham y Gottwald, en 1990, plantearon que existen diferencias en las respuestas obtenidas para las inoculaciones realizadas en cámara de cría y campo. La homogeneidad observada en los valores del nº de les/cm² para pomelo Duncan en las distintas repeticiones realizadas (en cámara de cría y campo), apoyan la hipótesis de existencia de homogeneidad de respuesta debida a uniformidad del material genético en pomelo Duncan. Por lo que la variabilidad

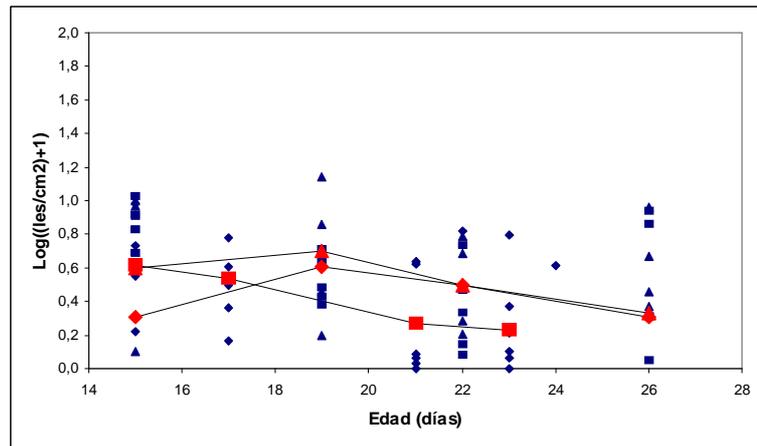
observada no se debería a diferencias producidas por la metodología empleada en la inoculación. Esta idea de homogeneidad de respuesta en hospedantes ha sido demostrada para otros patógenos bacterianos como ser *Erwinia amylovora* en manzano (Vanneste, 2000).

Asimismo, trabajos publicados sobre resistencia en el género *Malus* hacia el hongo causal de la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), muestran no solo variaciones en los resultados de inoculación entre variedades de manzano, sino también una relación para el nº de les/cm² y la edad de la hoja. Estos trabajos presentados por MacHardy (1996), son un ejemplo de la variación de la resistencia del hospedante a través del tiempo. En nuestros resultados se apoyan las afirmaciones de otros autores, los cuales comprobaron la relación entre edad de hoja y susceptibilidad a cancrisis (Stall et al., 1982) y grado de resistencia entre diferentes variedades y especies (Stall et al., 1981; Graham et al., 1992)

A



B



C

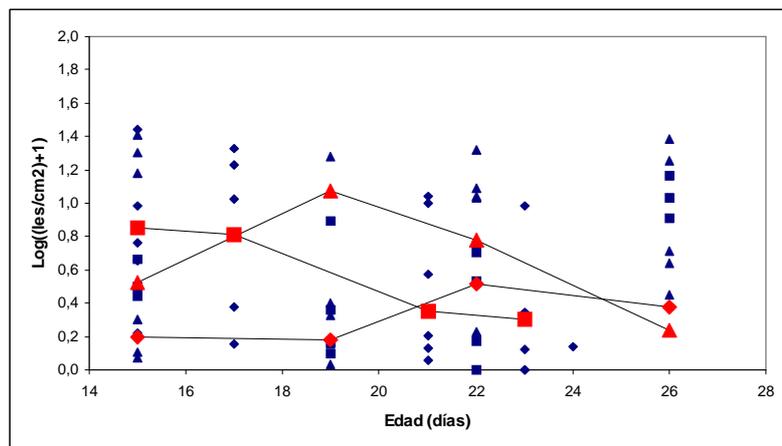
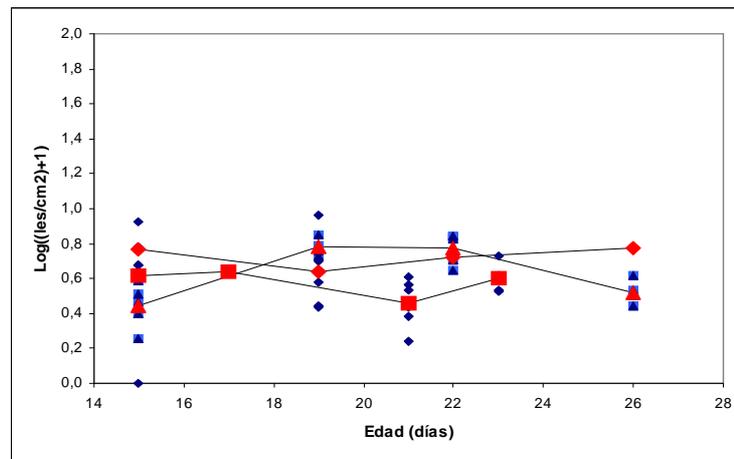
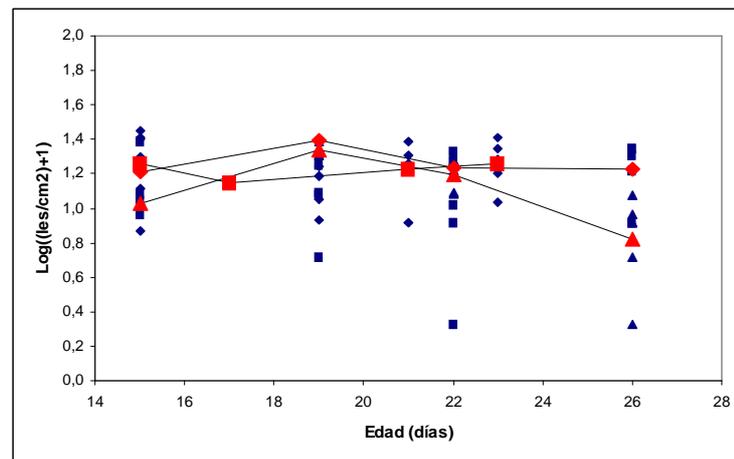


FIGURA 3.5. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de citrus Dalan de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=2,5x10³ y C=5x10³ bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3).

A



B



C

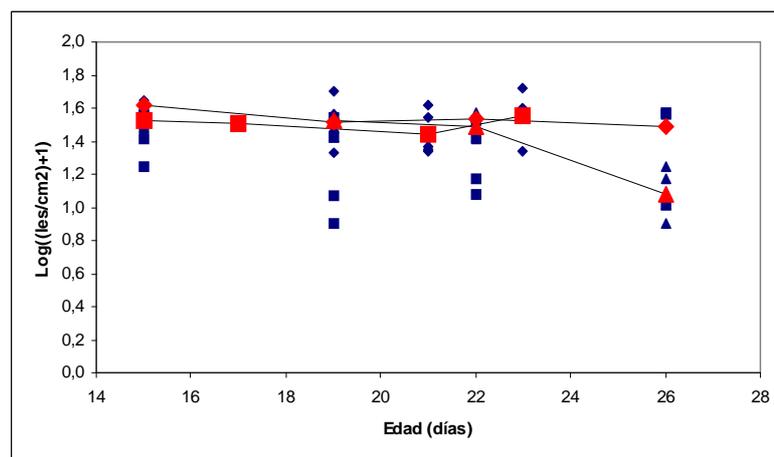
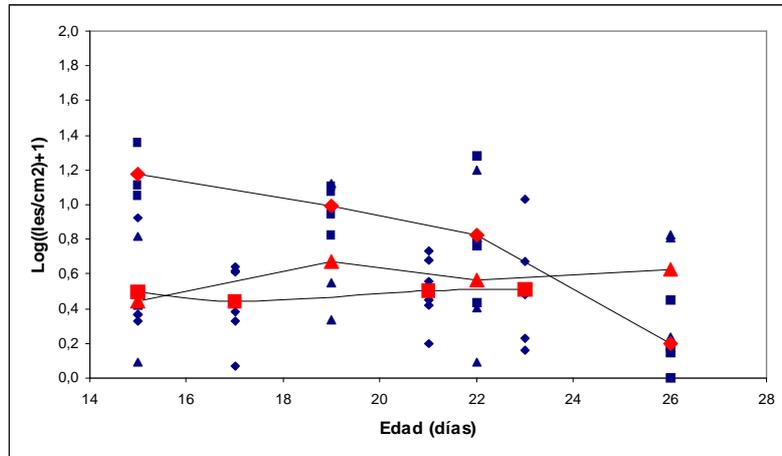
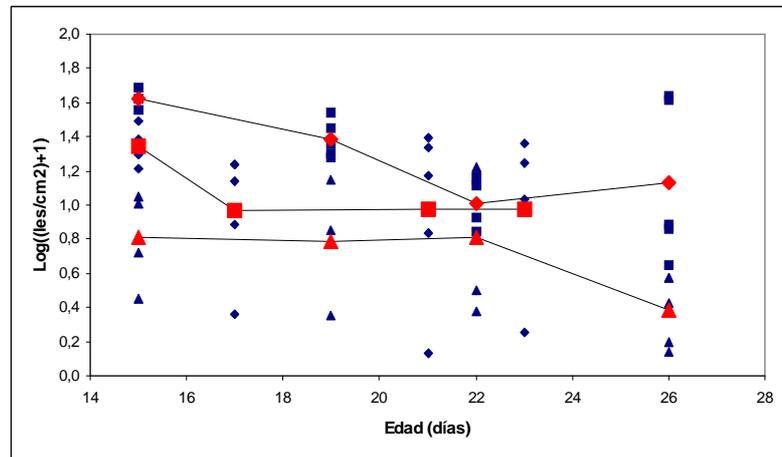


FIGURA 3.6. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de pomelo Duncan de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= $2,5 \times 10^3$ y C= 5×10^3 bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

A



B



C

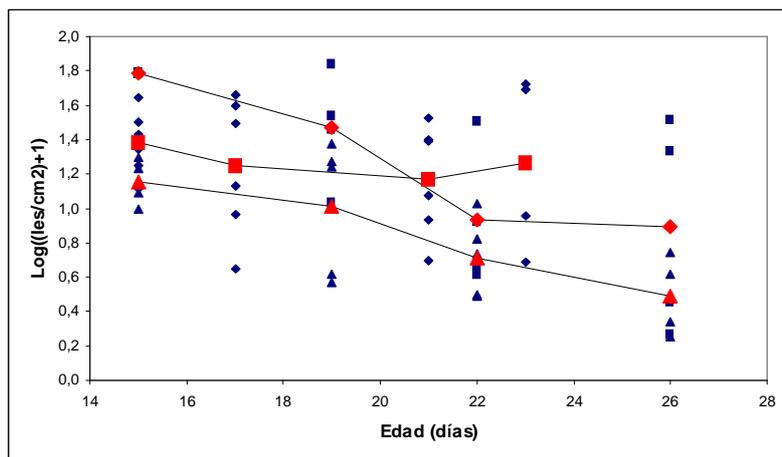
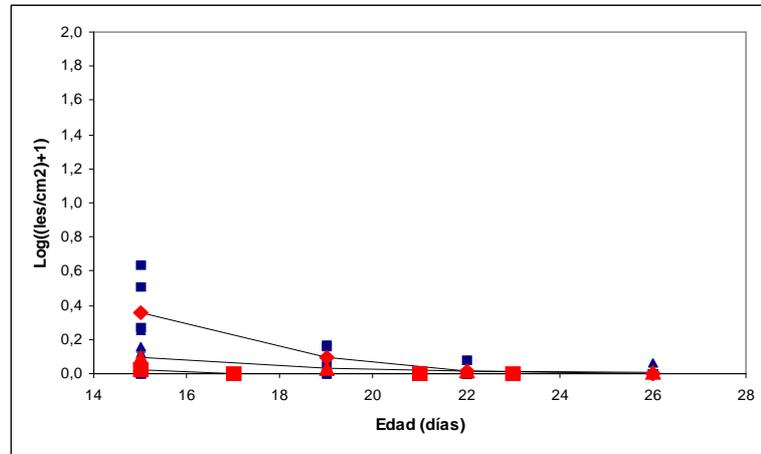
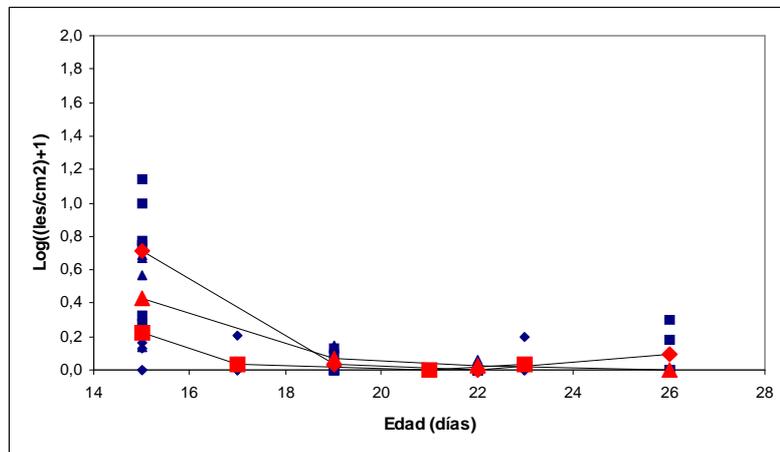


FIGURA 3.7. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de lima Key de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=2,5x10³ y C=5x10³ bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

A



B



C

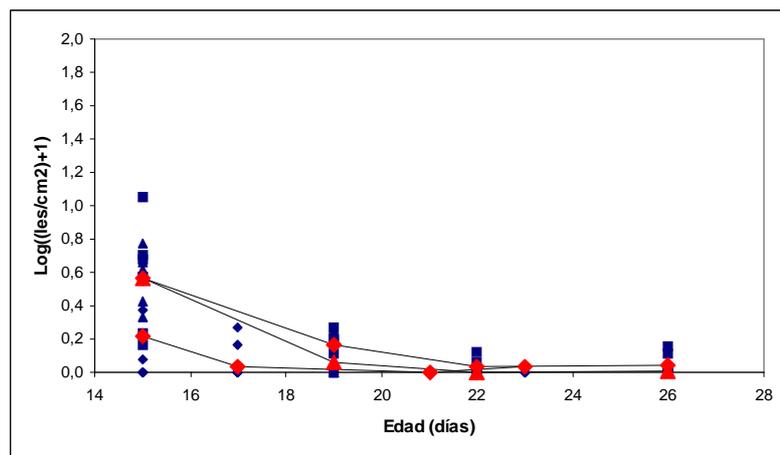
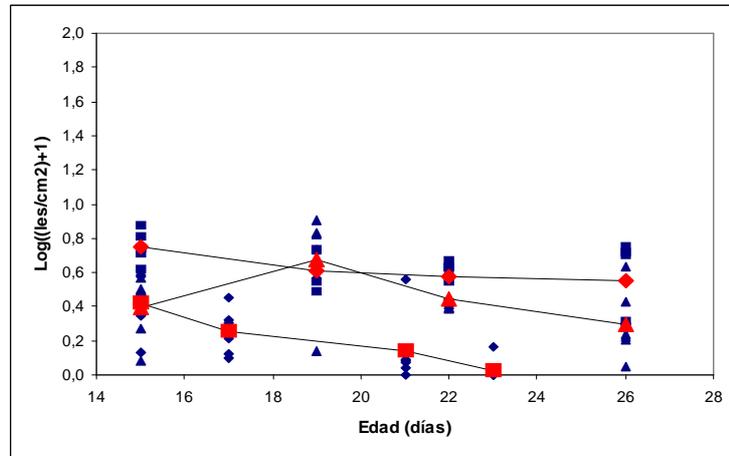
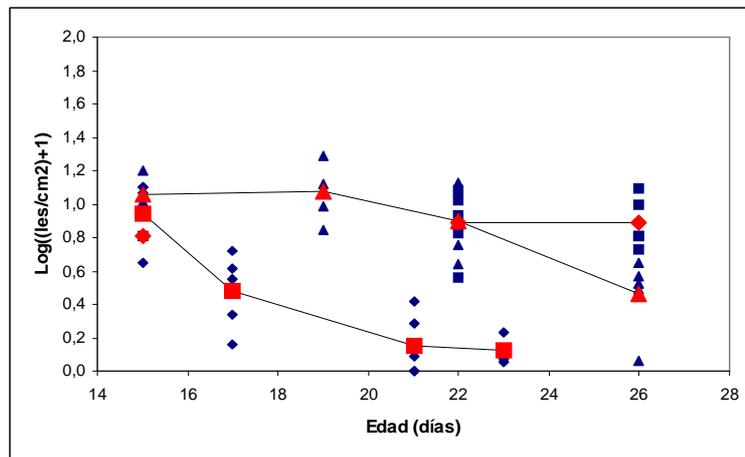


FIGURA 3.8. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de kumquat Nagami de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=2,5x10³ y C=5x10³ bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

A



B



C

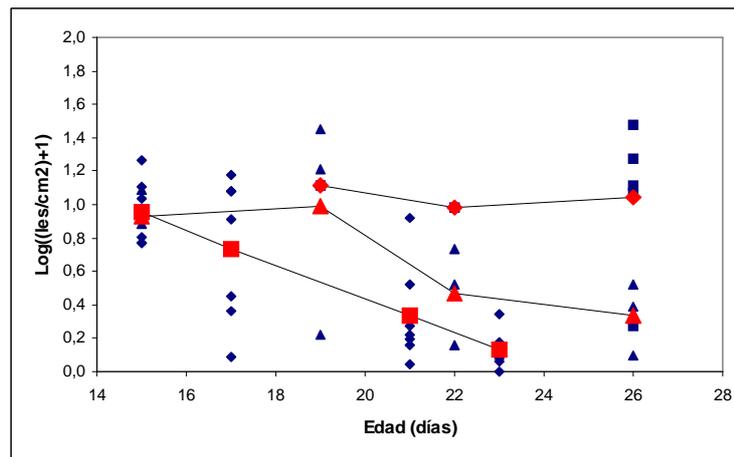


FIGURA 3.9. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular hojas de pomelo Red Blush de distintas edades (entre 15 y 26 días) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=2,5x10³ y C=5x10³ bact/ml). (◇= repetición 1; □= rep2; △= rep3; -◇= medias rep1; □= medias rep2; △= medias rep3)

CUADRO 3.3. Regresiones lineales de valores medios de Log(les/ cm²+1) obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas entre 15-26 días de edad. Rep=repetición; gl=grados de libertad del modelo (Y=Intercep+Edad X); CME=cuadrado medio del error; p=probabilidad del estadístico F; R²=ajuste del modelo.

Especie	Concentración (bact/ ml)	Rep	gl	Intercep	Edad	CME	p	R ²
DalanDan	5x10 ²	I	3	0,71018	-0,03160	0,00361	0,0797	0,8469
		II	3	0,91406	-0,03014	0,00891	0,1235	0,7682
		III	3	0,64246	-0,01634	0,02693	0,5063	0,2438
	2,5x10 ³	I	3	1,41101	-0,05259	0,00131	0,0117	0,9768
		II	3	1,78831	-0,05733	0,00080424	0,0037	0,9925
		III	3	1,24594	-0,03047	0,00320	0,0491	0,9041
	5x10 ³	I	3	0,08561	-0,07794	0,00733	0,0289	0,9431
		II	3	2,04753	-0,06710	0,03407	0,0994	0,8111
		III	3	2,33530	-0,07556	0,03979	0,0926	0,8234
Duncan	5x10 ²	I	3	0,77648	-0,01038	0,00755	0,5289	0,2220
		II	3	0,64653	0,00412	0,00534	0,7554	0,0598
		III	3	0,48823	0,00741	0,04398	0,8439	0,0244
	2,5x10 ³	I	3	1,19153	0,00152	0,00365	0,8582	0,0201
		II	3	1,31539	-0,00226	0,01085	0,8772	0,0151
		III	3	1,52632	-0,02098	0,06068	0,5633	0,1907
	5x10 ³	I	3	1,47568	0,00146	0,00356	0,8619	0,0191
		II	3	1,75832	-0,01072	0,00083881	0,0964	0,8165
		III	2	2,82401	-0,06534	0,01567	0,2344	0,8705
LimaKey	5x10 ²	I	3	0,39541	0,00488	0,00104	0,4386	0,3151
		II	3	2,81561	-0,10632	0,04464	0,0862	0,8351
		III	3	0,33426	0,01268	0,01099	0,5243	0,2263
	2,5x10 ³	I	3	1,71058	-0,03146	0,02007	0,2153	0,6157
		II	3	2,31620	-0,05016	0,02924	0,1418	0,7366
		III	3	1,42359	-0,03547	0,02498	0,2122	0,6207
	5x10 ³	I	3	1,50125	-0,01148	0,00684	0,3795	0,3850
		II	3	3,08106	-0,08829	0,03025	0,0548	0,8933
		III	3	2,14375	-0,06347	0,00423	0,0158	0,9687
Kumquat	5x10 ²	I	3	0,04426	-0,00206	0,00007415	0,2697	0,5333
		II	3	0,86376	-0,03926	0,00893	0,1195	0,7753
		III	3	0,21871	-0,00951	0,00057405	0,1287	0,7592
	2,5x10 ³	I	3	0,41072	-0,01652	0,00600	0,2277	0,5965
		II	3	1,28933	-0,05265	0,07812	0,2682	0,5356
		III	3	0,90034	-0,03754	0,01617	0,1403	0,7391
	5x10 ³	I	3	0,20443	-0,00815	0,00062246	0,1189	0,7764
		II	3	1,17105	-0,04729	0,02213	0,1244	0,7666
		III	3	1,13908	-0,04784	0,03499	0,1753	0,6801
RedBlush	5x10 ²	I	3	1,05381	-0,04442	0,00164	0,0202	0,9600
		II	3	1,02641	-0,02136	0,00253	0,1153	0,7827
		III	3	0,84858	-0,02087	0,02914	0,5202	0,2302
	2,5x10 ³	I	3	2,00805	-0,07725	0,02588	0,0607	0,8823
		II	3	0,69428	0,00789	0,00043850	0,2069	0,8981
		III	3	1,98877	-0,05453	0,02617	0,1129	0,7869
	5x10 ³	I	3	2,15995	-0,07907	0,00734	0,0176	0,9651
		II	3	1,24626	-0,00906	0,00707	0,6870	0,2229
		III	3	1,94746	-0,06167	0,03509	0,1174	0,7789

CUADRO 3.4. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular brotes de distintas especies cítricas entre 17 y 26 días de edad. Rep= repetición; gl= grados de libertad del modelo ($Y = \text{Intercep} + \text{Edad} X$); CME= cuadrado medio del error; p= probabilidad del estadístico F; R^2 = ajuste del modelo.

Especie	Concentración (bact/ ml)	Rep	gl	Intercep	Edad	CME	p	R^2
DalanDan	5×10^2	I	2	0,40138	-0,01724	2,441697E-7	0,0042	1,0000
		II	2	0,55415	-0,01480	0,00846	0,5708	0,3897
		III	2	1,49851	-0,05284	0,00091208	0,0729	0,9869
	$2,5 \times 10^3$	I	2	1,44311	-0,05408	0,00255	0,1355	0,9554
		II	2	1,81986	-0,05868	0,00154	0,0851	0,9822
		III	2	1,51636	-0,04200	0,00112	0,1011	0,9750
	5×10^3	I	2	2,31603	-0,08985	0,00969	0,1581	0,9396
		II	2	1,19535	-0,03076	0,01566	0,4369	0,5985
		III	2	3,36955	-0,11966	0,00229	0,0512	0,9936
Duncan	5×10^2	I	2	0,80071	-0,01151	0,01506	0,7550	0,1410
		II	2	0,27159	0,02156	0,00004395	0,0452	0,9950
		III	2	1,44833	-0,03724	0,01817	0,4439	0,5877
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,88708	0,01450	0,00059443	0,2078	0,8971
		II	2	1,79584	-0,02275	0,00503	0,3568	0,7174
		III	2	2,79740	-0,07517	0,00462	0,1147	0,9679
	5×10^3	I	2	1,30320	0,00881	0,00496	0,6461	0,2785
		II	2	1,63127	-0,00530	0,00051135	0,4518	0,5754
		III	2	2,82401	-0,06534	0,01567	0,2344	0,8705
LimaKey	5×10^2	I	2	0,24136	0,01205	0,00027370	0,1959	0,9082
		II	2	3,09429	-0,11929	0,08341	0,3252	0,7610
		III	2	0,82784	-0,01028	0,00354	0,5919	0,3577
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,96521	0,00032261	2,278015E-8	0,0598	0,9912
		II	2	1,90781	-0,03274	0,04643	0,5884	0,3629
		III	2	2,00185	-0,06012	0,02580	0,3142	0,7755
	5×10^3	I	2	1,14698	0,00363	0,00461	0,8348	0,0658
		II	2	2,84686	-0,07830	0,05654	0,3494	0,7279
		III	2	2,40058	-0,07442	0,00370	0,1038	0,9737
Kumquat	5×10^2	I	2	-	-	-	-	-
		II	2	0,37940	-0,01673	0,00010545	0,0898	0,9802
		III	2	0,09630	-0,00382	0,00001361	0,1400	0,9524
	$2,5 \times 10^3$	I	2	0,01662	0,00027864	0,00078152	0,9685	0,0024
		II	2	-0,16935	0,00954	0,00249	0,5163	0,4745
		III	2	0,23222	-0,00906	0,00008592	0,1294	0,9593
	5×10^3	I	2	0,24305	-0,00980	0,00114	0,3857	0,6757
		II	2	0,42822	-0,01562	0,00438	0,4497	0,5786
		III	2	0,16227	-0,00619	0,00103	0,5133	0,4792
RedBlush	5×10^2	I	2	0,88000	-0,03633	0,00099964	0,1265	0,9610
		II	2	0,76872	-0,00937	0,00003831	0,0966	0,9772
		III	2	1,72256	-0,06152	0,00044651	0,0505	0,9937
	$2,5 \times 10^3$	I	2	1,33244	-0,04845	0,01877	0,3295	0,7551
		II	1	-	-	-	-	-
		III	2	2,79866	-0,08906	0,00494	0,1003	0,9754
	5×10^3	I	2	2,27382	-0,08392	0,01375	0,1746	0,9267
		II	2	1,24626	-0,00906	0,00707	0,6870	0,2229
		III	2	2,61398	-0,09009	0,03807	0,2618	0,8402

Las regresiones obtenidas al utilizar solamente los datos de las tres últimas inoculaciones aportaron mayor ajuste (R^2) a los modelos (Cuadro 3.4), aunque disminuyó la significancia del mismo ($p < \alpha = 0,05$). Puede observarse una tendencia entre las especies más resistentes a cancrrosis a aumentar rápidamente la resistencia al aumentar la edad de sus hojas. Este cambio en la resistencia a cancrrosis no pudo observarse en las especies más susceptibles (Duncan, Red Blush, lima Key). Lima Key fue la especie con mayor susceptibilidad a cancrrosis, se obtuvieron en ésta altos valores del nº de les/cm² incluso en las inoculaciones realizadas en hojas de edad mayor (Figura 3.3 y 3.7).

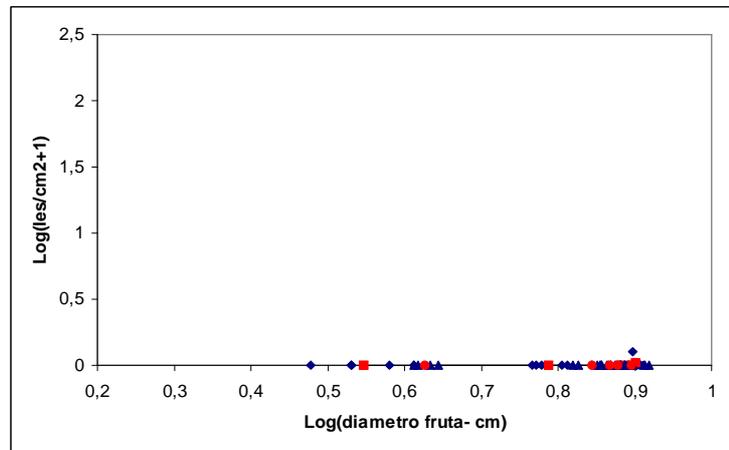
Se observa una alta variabilidad en la respuesta de las plantas más resistentes a cancrrosis para todas las concentraciones bacterianas inoculadas.

3.3.2. Desarrollo de lesiones en frutos

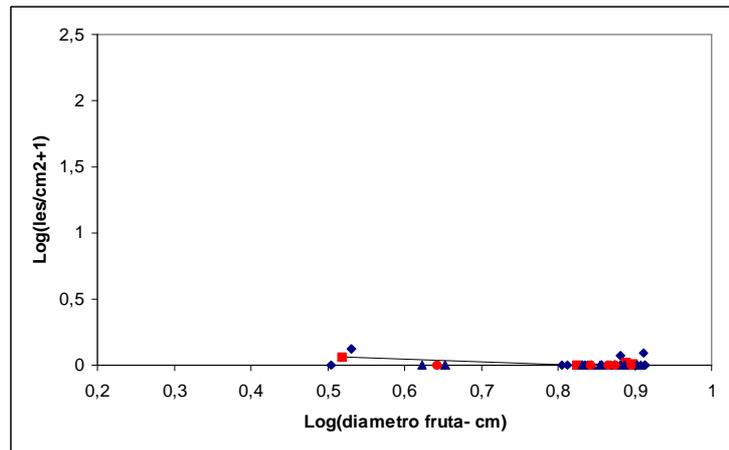
Se observó en el primer experimento (período Diciembre 2005 a Marzo 2006), bajo número de lesiones en pomelo Red Blush y Dalan Dan al utilizar las concentraciones de Xac más bajas: 5×10^2 y 5×10^3 bact/ ml (Figura 3.10, 3.11 y 3.12).

Se calcularon regresiones lineales para los resultados obtenidos en las dos repeticiones de las inoculaciones realizadas con las concentraciones mas elevadas (5×10^6 bact/ ml). Se observaron ajustes poco significativos para los resultados obtenidos (datos no mostrados). Los datos correspondientes a este ensayo presentaron además alta variabilidad. Estos resultados se deben a que se utilizaron en las inoculaciones frutos de pequeño diámetro pero de mucha edad (casi maduros). Por lo tanto se realizó un segundo experimento con frutos de menor edad (período Octubre a Diciembre 2006).

A



B



C

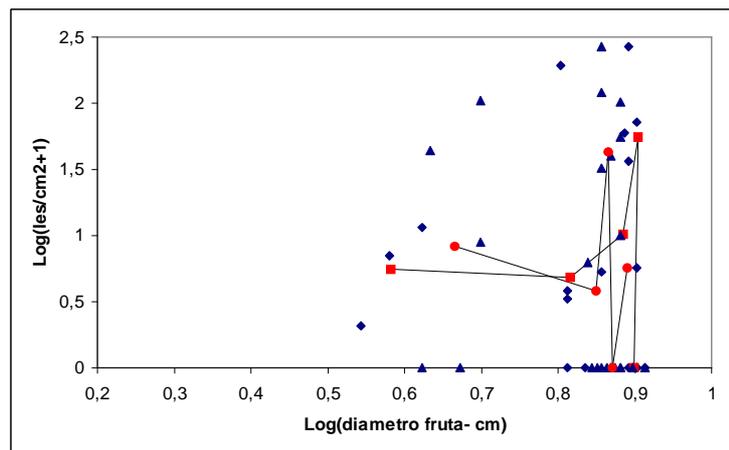
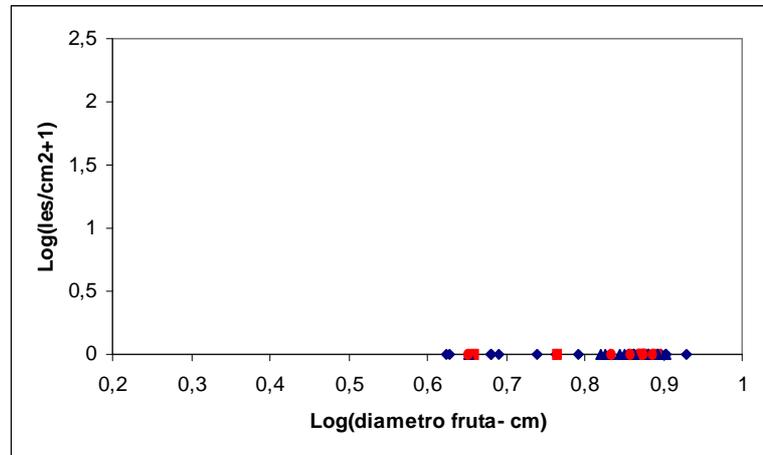
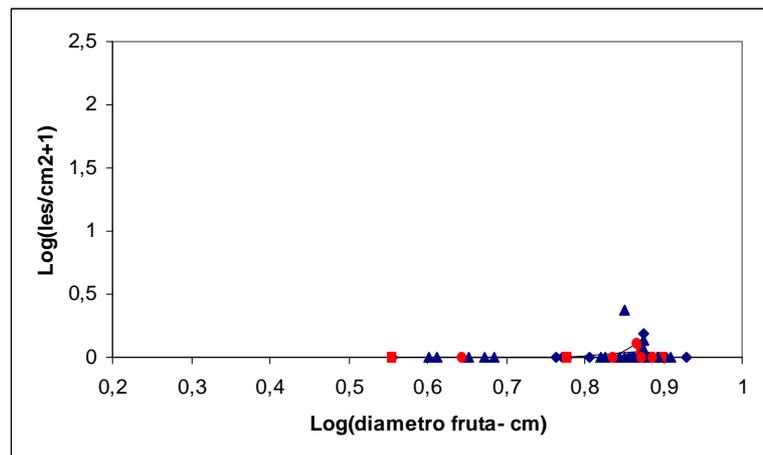


FIGURA 3.10. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de Dalan Dan de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10²; B=5x10³ y C=5x10⁶ bact/ml). (Δ = repetición 1; \circ = rep2; \square = medias rep1; \circ = medias rep2)

A



B



C

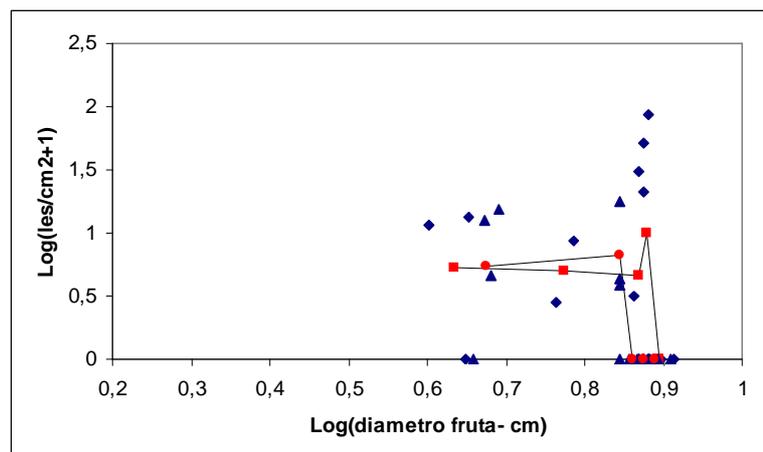
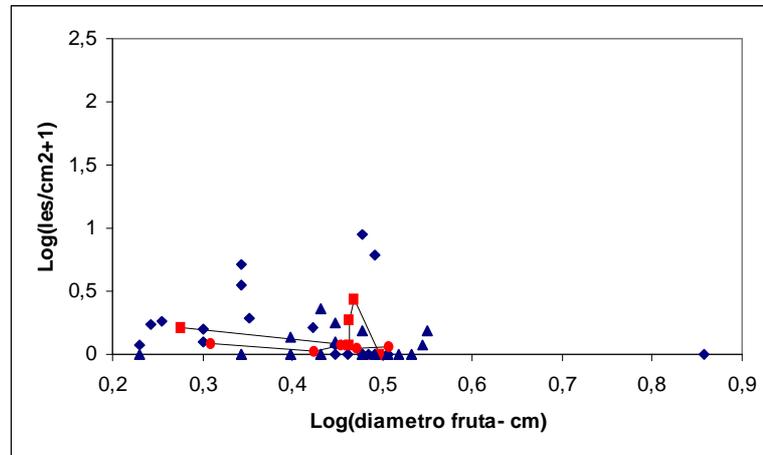
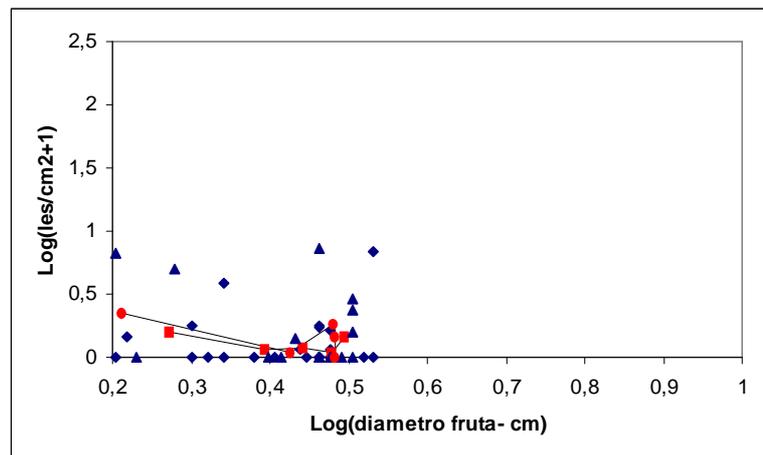


FIGURA 3.11. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de pomelo Red Blush de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= 5×10^3 y C= 5×10^6 bact/ml). (Δ = repetición 1; \circ = rep2; \square = medias rep1; \circ = medias rep2)

A



B



C

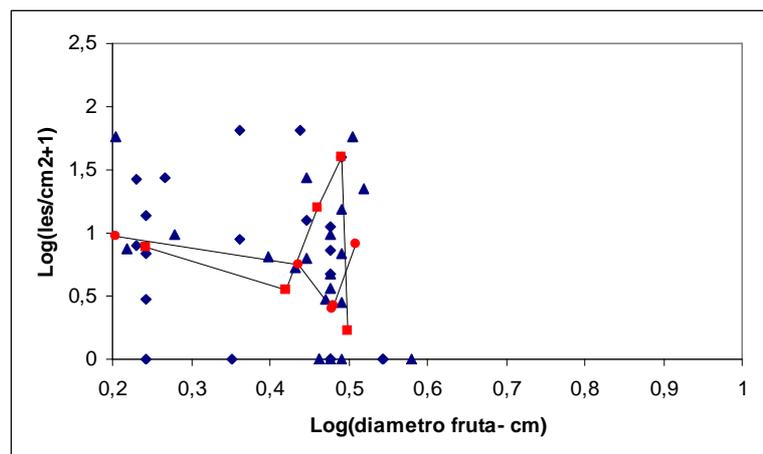


FIGURA 3.12. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de lima Key de diferentes edades (Log(díametros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A= 5×10^2 ; B= 5×10^3 y C= 5×10^6 bact/ml). (Δ = repetición 1; \circ = rep2; \square = medias rep1; \circ = medias rep2)

En este segundo experimento se observó una respuesta directamente proporcional para edad de fruto y nº les/cm² (Figura 3.13, 3.14 y 3.15).

En plantas de Dalan Dan, las inoculaciones con 5×10^4 bact/ ml en frutos de $5,82 \pm 0,14$ a $7,73 \pm 0,09$ cm de diámetro presentaron desde $1,33 \pm 0,51$ hasta 0 les/ cm² respectivamente. Utilizando concentraciones de 5×10^5 bact/ ml al inocular frutos de $4,04 \pm 0,19$ a $7,85 \pm 0,13$ cm de diámetro presentaron desde $4,62 \pm 1,85$ hasta $0,08 \pm 0,08$ les/ cm² respectivamente. Utilizando inóculos de 5×10^6 bact/ml al inocular frutos de $4,08 \pm 0,15$ a $7,08 \pm 0,13$ cm de diámetro se obtuvieron desde $7,57 \pm 2,25$ hasta $0,78 \pm 0,53$ les/ cm² respectivamente (Figura 3.13).

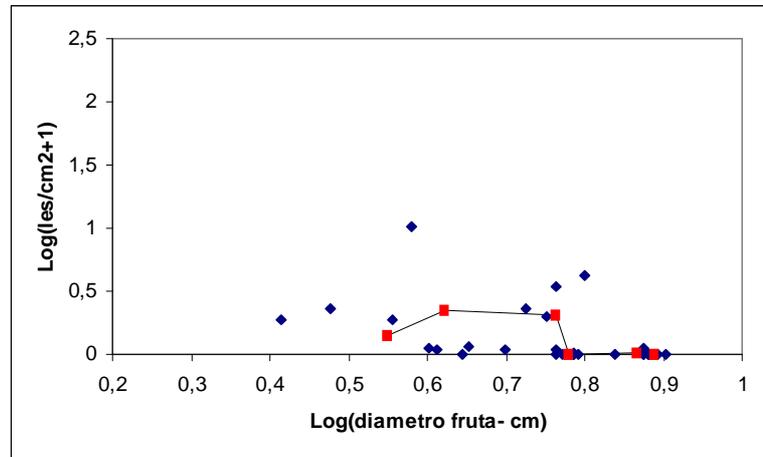
En plantas de pomelo Red Blush, las inoculaciones con 5×10^4 bact/ ml en frutos de $3,5 \pm 0,4$ a $7,08 \pm 0,14$ cm de diámetro presentaron desde $7,83 \pm 5,8$ hasta 0 les/ cm² respectivamente. Utilizando concentraciones de 5×10^5 bact/ ml al inocular frutos de $3,84 \pm 1,54$ a $7,08 \pm 0,14$ cm de diámetro presentaron desde $3,83 \pm 0,17$ hasta 0 les/ cm² respectivamente. Utilizando inóculos de 5×10^6 bact/ml al inocular frutos de $3,93 \pm 0,23$ a $7,39 \pm 0,09$ cm de diámetro se obtuvieron desde $9,24 \pm 0,21$ hasta $0,03 \pm 0,01$ les/ cm² respectivamente (Figura 3.14).

En pomelo lima Key, las inoculaciones con 5×10^4 bact/ ml en frutos de $2,71 \pm 0,1$ a $3 \pm 0,15$ cm de diámetro presentaron desde $0,45 \pm 0,17$ hasta $0,5 \pm 0,25$ les/ cm² respectivamente. Utilizando concentraciones de 5×10^5 bact/ ml al inocular frutos de $2,65 \pm 0,17$ a $2,63 \pm 0,13$ cm de diámetro presentaron desde $0,87 \pm 0,36$ hasta $0,19 \pm 0,03$ les/ cm² respectivamente. Utilizando inóculos de 5×10^6 bact/ml al inocular frutos de $2,75 \pm 0,1$ a $2,84 \pm 0,1$ cm de diámetro se obtuvieron desde $0,41 \pm 0,41$ hasta $0,17 \pm 0,05$ les/ cm² respectivamente (Figura 3.15).

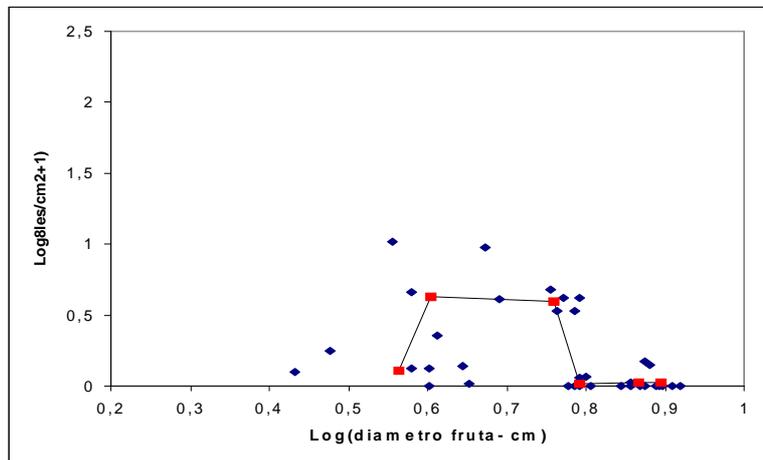
Se observó una respuesta directamente proporcional entre susceptibilidad de los frutos y concentración del inóculo en ambos ensayos.

No se obtuvo con la metodología utilizada, lesiones de cancrrosis en frutos de kumquat.

A



B



C

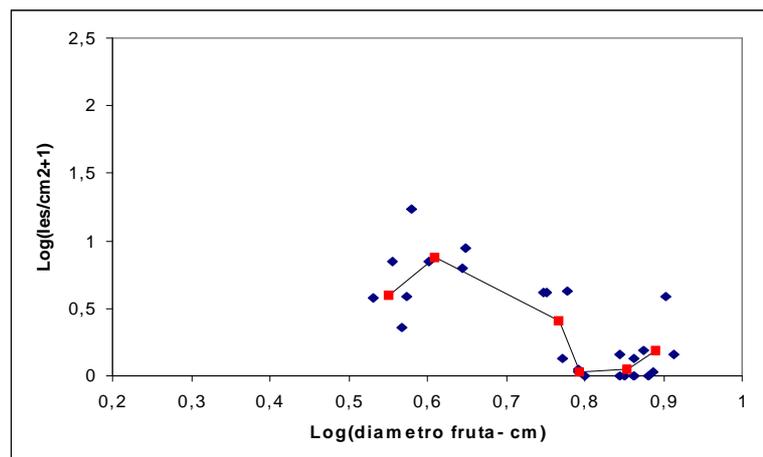
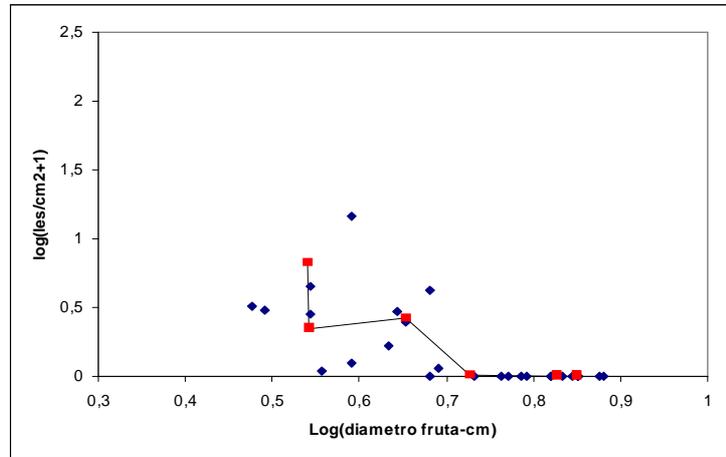
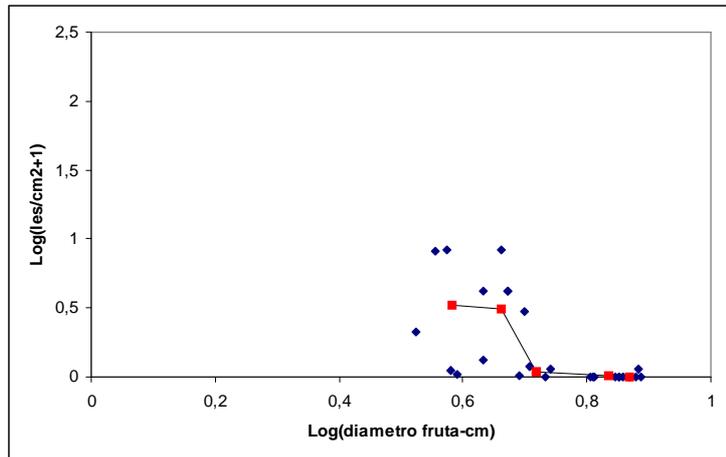


FIGURA 3.13. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de Dalan Dan de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10⁴; B=5x10⁵ y C=5x10⁶ bact/ml). (◇= repetición 1; □= medias rep1)

A



B



C

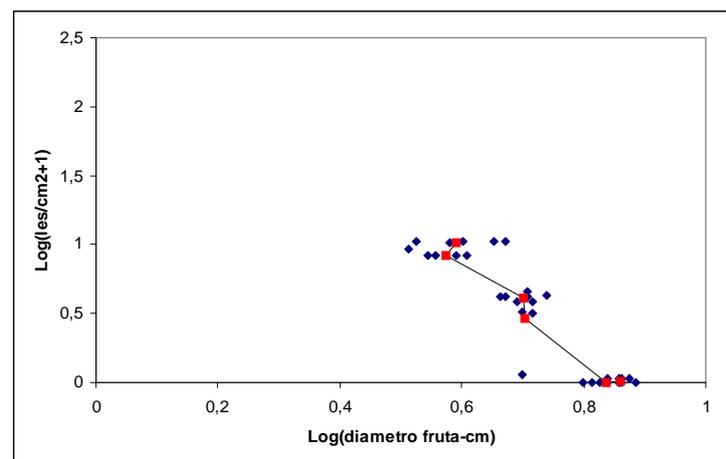
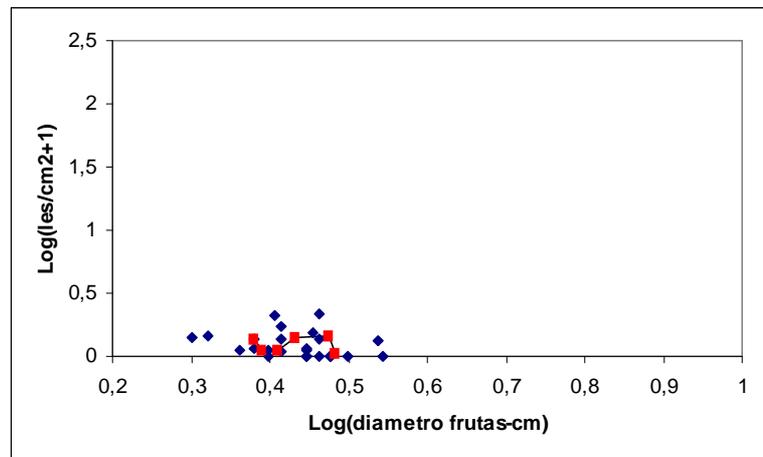
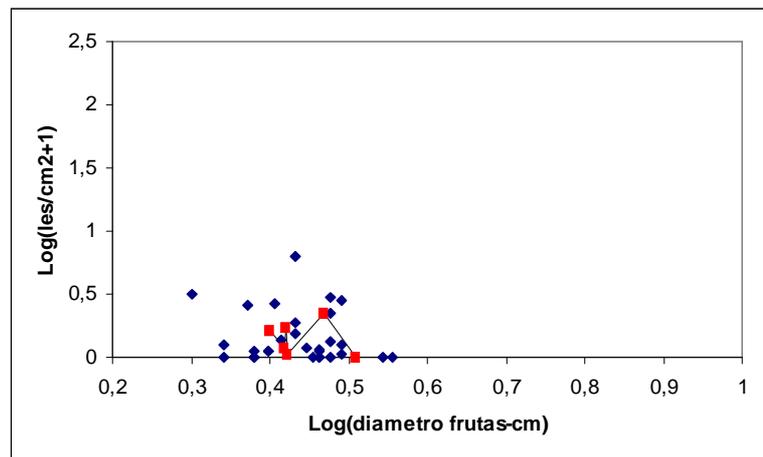


FIGURA 3.14. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de pomelo Red Blush de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10⁴; B=5x10⁵ y C=5x10⁶ bact/ml). (◇= repetición 1; □= medias rep1)

A



B



C

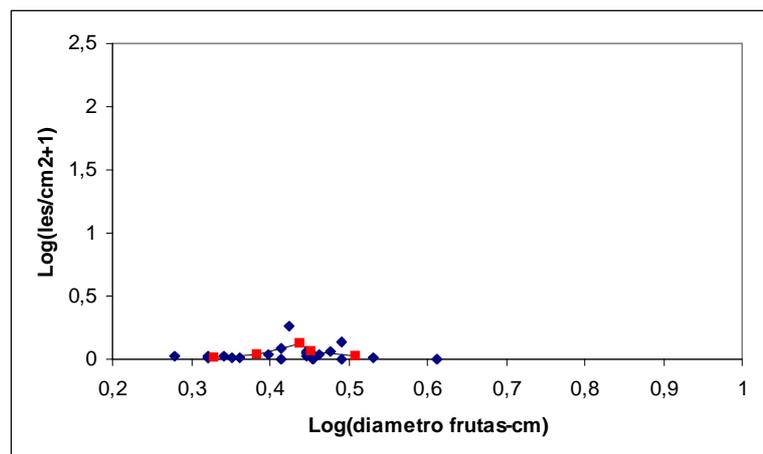


FIGURA 3.15. Log (les/cm²+1) obtenidas al inocular frutas de lima Key de diferentes edades (Log(diámetros fruta- cm)) con diferentes concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (A=5x10⁴; B=5x10⁵ y C=5x10⁶ bact/ml). (◇= repetición 1; □= medias rep1)

El Dalan Dan presentó menor susceptibilidad en comparación con pomelo Red Blush para las concentraciones bacterianas menores (5×10^4 y 5×10^5 bact/ ml). La respuesta para la concentración mayor (5×10^6 bact/ ml) es similar en ambos cítricos, aunque con menor variabilidad en pomelo Red Blush. La respuesta observada en lima Key para este ensayo es menor que en el ensayo anterior, aunque los datos presentaron menor variabilidad en este segundo ensayo.

Los resultados observados para Red Blush y Dalan Dan (Cuadro 3.5) se ajustaron adecuadamente para los modelos de regresión lineal calculados. Los resultados más representativos de este ensayo, fueron obtenidos al utilizar las concentraciones de inóculo mas elevadas (5×10^6 bact/ ml), en los cuales pudo observarse un valor $p < 0,05$ y un ajuste al modelo (R^2) alto. El valor del intercepto, fue menor en Dalan Dan que en pomelo Red Blush ($1,89634 \text{ Log}(\text{lescm}^2+1)$ vs $3,64260 \text{ Log}(\text{lescm}^2+1)$), el Dalan Dan fue más resistente a cancrisis en comparación con el Red Blush.

CUADRO 3.5. Regresiones lineales de los valores medios de $\text{Log}(\text{les}/\text{cm}^2+1)$, obtenidos al inocular frutos de distintas especies cítricas de diferentes edades; gl= grados de libertad del modelo ($Y = \text{Intercep} + \text{Log}(\text{diámetro fruta-cm}) X$); CME= cuadrado medio del error; p= probabilidad del estadístico F; R^2 = ajuste del modelo.

Especie	Concentración (bact/ ml)	gl	Intercep	Log(diámetro fruto- cm)	CME	p	R^2
DalanDan	5×10^4	5	0.66219	-0.70535	0.02075	0.2154	0.3508
	5×10^5	5	0.98538	-1.00482	0.08563	0.3568	0.2131
	5×10^6	5	1.89634	-2.06361	0.04257	0.0384	0.6978
Red Blush	5×10^4	5	2.48143	-2.82267	0.08728	0.1102	0.5114
	5×10^5	5	2.50787	-2.74108	0.06377	0.1474	0.5569
	5×10^6	5	3.64260	-3.96857	0.04404	0.0144	0.8109
LimaKey	5×10^4	5	0.11643	-0.05094	0.00471	0.9464	0.0013
	5×10^5	5	0.42287	-0.62365	0.02234	0.7241	0.0346
	5×10^6	5	-0.01651	0.16626	0.00284	0.6986	0.0571

Estos resultados presentan concordancia con el tipo de respuesta encontrada para otros hospedantes y enfermedades. En 1990, Becker presentó sus resultados de conteos realizados para n° de conidios producidos por *Venturia inaequalis* en frutos y hojas de manzano, se destaca en este trabajo la observación de un período de mayor desarrollo del hongo cuando estos tejidos son jóvenes (MacHardy, 1996). Trabajos previos realizados en cancrrosis de los citrus demostraron la influencia de diferentes niveles de inóculo de Xac, para lograr infección (Canteros, 1985, 1992). Este tipo de respuesta se registró también en otras enfermedades de los cítricos, como por ejemplo sarna (*Elsinoe fawcettii*) en mandarina Satsuma (Bernal, 2000). En nuestros resultados, las lesiones de cancrrosis en frutos se obtuvieron a partir de determinados niveles de inóculo (desde 5×10^4 bact/ ml), en forma similar a otros resultados (Canteros, 1992).

En hojas de Dalan Dan y kumquat, se determinó la ocurrencia de un muy corto período de susceptibilidad lo que seguramente disminuye la posibilidad de infección a campo. La incorporación de esta característica en otras variedades es un tema que puede resultar promisorio para el futuro. También se observó mayor resistencia a cancrrosis en comparación con los resultados obtenidos al inocular pomelo y lima Key.

Se obtuvo para la infiltración del mesófilo con diferentes inóculos y diferentes edades, una respuesta diferencial para Dalan Dan y kumquat, en comparación con la obtenida para otras especies cítricas evaluadas. Estas diferencias son importantes y deben ser consideradas en programas de mejoramiento.

Los resultados obtenidos en las inoculaciones de frutas muestran, al igual que lo observado en hojas, mayor resistencia de Dalan Dan a cancrrosis, así como una alta variabilidad en la respuesta de Dalan Dan en comparación a la respuesta observada en pomelo. Se destaca la importancia de las variables “edad del fruto” y “cantidad de

inoculo” como descriptores para determinar la resistencia a esta enfermedad en la evaluación de frutos de nuevo material vegetal.

Capítulo 4.

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIÓN

Las restricciones cuarentenarias exigen identificación y nomenclatura exactas para los organismos patógenos involucrados y la búsqueda de nuevos germoplasmas resistentes a estas enfermedades.

La existencia de metodologías de caracterización de bacterias (Gotuzzo y Rossi, 1967; Goto et al., 1980; Stall et al., 1979a; Hartung y Civerolo, 1989; Vernière et al., 1992; Canteros y Naranjo, 2002) y de material vegetal (Stall et al., 1982; Canteros, 1992; Gottwald et al., 1993; Gmitter et al., 2004 ; Guo y Grosser, 2004;), utilizadas por diversos autores y validadas por medio de su uso en numerosos trabajos, nos permitieron comparar nuestros resultados con lo anteriormente publicado en estas áreas.

El aporte realizado por el presente trabajo aporta nuevas ideas en el planteamiento de investigaciones a futuro; las cuales al ser mas específicas, podrían profundizar en cada tema.

La caracterización de las cepas bacterianas permitió observar diferencias bioquímicas para utilización de lactosa y susceptibilidad al CINa entre las cepas de los distintos grupos que causan cancrrosis en citrus.

Se demostraron diferencias de patogenicidad para las cepas de los grupos B y C de *Xanthomonas axonopodis* que causan lesiones de cancrrosis en citrus. Todos los citrus inoculados con las cepas del grupo B presentaron lesiones a diferencia de las cepas del grupo C, las cuales sólo produjeron lesiones en lima Key y no en otras Rutáceas. En pomelo Duncan se observó necrosis similar a HR al infiltrar en el mesófilo altas concentraciones de las cepas del grupo C. El N° de les/cm² se relacionó de manera positiva con la concentración de inóculo. Las cepas B presentaron

agresividad diferencial en comparación a las cepas C. Se demostró que la resistencia en el mesófilo en estas Rutáceas difirió para las cepas de los grupos B y C.

Se observaron diferentes patrones de polimorfismos en los fragmentos obtenidos mediante corte con enzimas de restricción para los distintos grupos bacterianos. Los resultados preliminares indican diferencias entre las cepas a nivel molecular. Se observó divergencia interna entre las cepas del grupo B para el patrón de bandas obtenido al utilizar enzimas de restricción de corte poco frecuente.

Además de la diferenciación en base a la patogenicidad en distintos hospedantes, la determinación de diferencias bioquímicas y moleculares entre las cepas de los grupos B y C podrán utilizarse para fundamentar la eliminación de restricciones cuarentenarias a la producción cítrica de Argentina.

Se pudo observar, con la metodología utilizada, diferencias a nivel patogénico, bioquímico y molecular de las cepas B y C de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus, por lo que estas cepas, al ser distintas, no deberían ser incluidas en un mismo patovar.

Las diferencias observadas entre las cepas de los grupos B y C de bacterias que causan lesiones de cancrrosis en citrus, es notable no solo en cuanto a la patogenicidad exclusiva del grupo C para lima key, sino también en su respuesta similar a HR al ser inoculada en altas concentraciones en hojas jóvenes de pomelo.

La caracterización de las cepas del grupo C presentaron valores diferenciales para los valores de conductividad y crecimiento poblacional entre hospedadores susceptibles (lima key) y pomelo Duncan. Los resultados permiten demostrar ocurrencia de HR en pomelo causada por la cepa C, indicando la presencia de genes de avirulencia en la bacteria y de resistencia en pomelo (al menos uno en cada organismo).

La determinación y aislamiento de estos genes puede ayudar a caracterizar en

mayor grado a estas cepas bacterianas y proporcionar información sobre los mecanismos de defensa de los hospedantes ante el patógeno.

El material vegetal utilizado de manera comercial presenta diferencias en cuanto a su susceptibilidad frente al organismo causal de la cancrrosis de los citrus. La búsqueda de nuevas fuentes de resistencia y la caracterización de esta en fuentes poco utilizadas y caracterizadas puede servir de ayuda en futuros planes de mejoramiento.

La evaluación de la susceptibilidad a cancrrosis en hojas de Dalan Dan y kumquat, determinó la ocurrencia de un muy corto período de susceptibilidad lo que disminuyó la posibilidad de infección. También se observó mayor resistencia a cancrrosis en comparación con los resultados obtenidos al inocular pomelo Duncan, Red Blush y lima Key.

Se obtuvo para la infiltración del mesófilo con diferentes inóculos y diferentes edades, una respuesta diferencial para Dalan Dan y kumquat, en comparación con lo registrado en otras especies cítricas evaluadas, las cuales resultaron (todas) más susceptibles a esta enfermedad. Estas diferencias son importantes y podrían ser consideradas a la hora de seleccionar nuevas fuentes de resistencia.

Los resultados obtenidos en las inoculaciones de frutas muestran, al igual que lo observado en hojas, mayor resistencia de Dalan Dan a cancrrosis, así como una alta variabilidad en la respuesta de Dalan Dan en comparación a la respuesta observada en pomelo. Se destaca la importancia de las variables “edad del fruto” y “cantidad de inóculo” como descriptores para determinar la resistencia a esta enfermedad en la evaluación de frutos de nuevo material vegetal.

Se concluye en este caso que existe una respuesta diferencial dentro de las Rutáceas evaluadas frente a *Xac* y que, algunas especies como por ejemplo Dalan

Dan, podrían utilizarse como fuentes de resistencia cuantitativa en base a su mayor resistencia cancrisis.

ANEXO 1. Cepas de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de *Citrus* utilizadas en el presente trabajo.

Grupo	Nombre	Origen geográfico	Hospedante de origen
A	Xc03-1635, CuS	Bella Vista (Corrientes), 2003.	Pomelo (<i>C. paradisi</i>)
A	Xc05-2592 CuR,	Bella Vista (Corrientes), 2003.	Pomelo (<i>C. paradisi</i>)
B	Xc06-2975-22-1	Bella Vista (Corrientes), 1981 (Xcc 30 B)	Limón (<i>C. limon</i>)
B	Xc06-2980-00	Bella Vista, 1978 (Xc 8)	Limón (<i>C. limon</i>)
B	Xc06-2988	Bella Vista, 1978 (Xcc 4 B)	Limón (<i>C. limon</i>)
B	Xc04-1891	Concordia (Entre Ríos). 1990 (Xc90-78-4-3)	Limón (<i>C. limon</i>)
C	Xc04-1966	Brasil (enviada por el DPI de Florida en 2004)	Lima Key (<i>C. aurantifolia</i>)
C	Xc99-1316	Brasil (enviada por Victoria Rosetti, Instituto Biológico). 1978. F2905.	Lima Key (<i>C. aurantifolia</i>)

BIBLIOGRAFIA

- ABKENAR, A. A.; ISSHIKI, I.; TASHIRO, Y. 2004. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. *Sci. Hortic.* 102 (2-1): 233-242.
- ACHOR, D. S.; BROWNING, H. ABRIGO, L. G. 1996. Anatomical and histochemical modification in citrus leaves caused by larval feeding of leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton). In Hoy, M. A. eds. *Managing the citrus leafminer*. pp. 69.
- ALCARAZ, L. F. de. 1980. Variability in *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. *Fitopatol.* 15: 7-12.
- ALIZADEH, A.; RAMHIMIAN, H. 1990. Citrus canker in Kerman province, Iran. *J. Plant Pathol* 26:42.
- ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A.; MIZUMOTO, C. Y.; POLLARD, L. W. CIVEROLO, E. L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 81:857- 865.
- ARLAT, M.; GOUGH, C. L.; BARBER, C. E.; BOUCHER, C.; DANIELS, M. J. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI.* 4 (6): 593- 601.
- AROCENA, G.; FAVARO, F. 1981. The program for control and prevention of citrus bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) in Uruguay. *Proc. 4th Int. Citrus Congr.*(Tokyo, Japan, 1981) pp. 409-414.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Curr Protoc Mol Biol.* John Wiley and Sons Inc. pp. 2.4.1 – 2.4.2.
- AYRES, A. J. 2001. Control de las enfermedades de los cítricos en Brasil. En: *Actas del Simposio Sobre Cítricos China/FAO 2001* (Beijing; República Popular China, 2001, may 14-17) p. 107-115.
- BACH, E. E.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; ROSSETTI, V. 1984. Efficiency of desinfestant compounds to exclude the citrus canker organism from collecting boxes. In: *5th Int. Citrus Congr.* (São Paulo, Brasil, 1984), p. 391-393.
- BACH, E. E.; ROSSETTI, V. 1984. A review of serological studies on *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Brazil. En: *5th Int. Citrus Congr.* (São Paulo, Brasil, 1984), p. 361-362.
- BADAWY, A. 1967. The morphology and biology of *Phyllocnistis citrella* Stainton; a citrus leaf-miner in the Sudan. *Bull. Soc. Entomol. Egypte* 51: 95-103.
- BAL, J.; CHOI, S.; PONCIANO, G.; LEUNG, H.; LEACH, J. E. 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute

- differently and specifically to pathogen aggressiveness. MPMI 13 (12): 1322- 1329.
- BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G. 1999. Incidência e distribuição de cancro cítrico no Estado de São Paulo. Jaboticabal, FUNEP 1:11.
- BEER, S. V.; BAUER, D. W.; JIANG, X. H.; LABY, R. J.; SNEATH, B. J.; WEI, Z. M.; WILCOX, D. A.; ZUMOFF, C. H. 1991. The *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora*. In: Proc. 5th Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact (Interlagos, Suiza, 1991, sept 9-14). p. 53- 60
- BELASQUE, J. JR.; PARRA PEDRAZZOLI, A. L.; RODRIGUES NETO, J.; YAMAMOTO, P. T.; CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; VINYARD, B. T.; HARTUNG, J. S. 2005. Adult citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) are not efficient vectors for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Plant Dis. 89:590- 594.
- BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L; LARANJEIRA, F.; GOTTWALD, T. R. 2000. Epidemiology of citrus canker in brasil with and without the asian citrus leafminer. In: Proc. Int. Citrus Canker Research Workshop. (Ft. Pierce; Florida, 2000, Junio 20-22) 1: 6.
- BERGER, E. W. 1914. Citrus Canker in the gulf coast country; with notes on the extent of citrus culture in the localities visited. In: Proc. Florida State Hort. Soc. (FL, May; 1914) 27: 1-6.
- BERGER, E. W.; STEVENS, H. E.; STIRLING, F. 1914. Citrus canker II. Bulletin 124:27-53
- BERNAL, R. P. 2000. Period of fruit susceptibilit of "Owari" Satsuma mandarin to scab. In: Proc. 9 Int. Soc. Citriculture. 2: 987- 989.
- BERTUS, L. S. 1931. Spraying against canker of citrus. Trop. Agr. Ceylon. 76: 337-339.
- BITANCOURT, A. A. 1957. O cancro citrico. O Biologico. 23: 101-111.
- BLOOM, R. A.; MULLIN, B. C.; TATE, R. L. 1989. DNA restriction patterns and DNA-DNA solution hibridization studies of *Frankia* isolates from *Myrica pensylvanica* (Bayberry). Appl. Environ. Microbiol.. 55 (9): 2155-2160.
- BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G. V.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. 1991. Isolation of gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. MPMI 4:81-88.
- BONAS, U.; KNOOP, V.; KOßMANN, J.; STALL, R. E.; STASKAWICZ, B. J. 1990. Genetic and molecular characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Plant Pathogenic Bacteria. Z. Klement eds. pp. 369-374.

- BONAS, U.; STALL, R. E.; STASKAWICZ, B. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. 218:127- 136.
- BONAS, U.; STASKAWICZ, B. J. 1988. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. R. Palacios, D.P. Verma eds. APS Press; USA.; pp. 275-276.
- BOUCHER, C. A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIS, P. A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitive on tobacco are clustered. J. Bacteriol. 169:5626- 5632.
- BRADBURY, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. p. 175-177.
- BRAITHWAITE, M.; LEITE, R. P.; SMITH, J. J.; BOA, E. SADDLER, G. S. 2002. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. Plant Pathology. 51: 383.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. 2004. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol Plant Pathology 4 (3): 141-157
- CÁCERES, S. 1996. El minador de las hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella* Stainton). INTA, EEA Bella Vista, Argentina. Hoja de divulgación N° 6. 4 p.
- CAMP, A. F. 1958. Citrus canker in Brazil. Citrus Industry. 20 (9): 10-22.
- CANTEROS, B. I. 2005. Ecología de la cancrrosis de los citrus en Argentina. En: Libro de resúmenes 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3 Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. (Villa Carlos Paz, 2005, abril 19-22) p. 57-60.
- CANTEROS, B. I. 2004. Management of citrus canker in Argentina. In: Proc. Int. Soc. Citricultura (Agadir, Marruecos, 2004, feb 15-20) pp. 696-704.
- CANTEROS, B. I. 2001a. Control of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* susceptible and resistant to copper. Phytopathology 92:S116.
- CANTEROS, B. I. 2001b. Informe final de investigación del proyecto cooperativos INTA-IFAS para el estudio de la cancrrosis de los citrus. INTA, EEA Bella Vista, Argentina. Serie Técnica N°1. 18 pag.
- CANTEROS, B. I. 2000. Citrus canker in Argentina: control; eradication; and current management. In: Int. Citrus Canker Research Workshop; (Fort Pierce, FL, 2000, jun 20-22) pp. 10-11.

- CANTEROS, B. I. 1997a. Manejo de la cancrrosis de los citrus en lotes de sanidad controlada. Bol. Recomendaciones para la Provincia de Corrientes.. Comisión Mixta Provincial del Citrus. 10 p.
- CANTEROS, B. I. 1997b. Informe Final de Investigación del Proyecto Cooperativo INTA - IFAS para el Estudio de la Cancrosis de los Citrus. INTA, EEA Bella Vista, Argentina.17 p.
- CANTEROS, B. I. 1995. Control de cancrrosis causada por cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* susceptibles y resistentes al cobre en plantines de pomelo. En: 6ta Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. FCA, UNNE (Corrientes, 1995, Agosto 1-4) p. 124.
- CANTEROS, B. I. 1994. Aislamiento y conservación de *Xanthomonas campestris* pv *citri* en Agar lima Bean. En: 5ta Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. FCA. UNNE (Corrientes, 1994, Agosto 3-5) p. 69.
- CANTEROS, B. I. 1993. Management of citrus canker in Argentina. In: Proc. 6º Int. Congr. Fitopat. (Montreal, Québec, 1993, Julio 28-Agosto 6) p. 246
- CANTEROS, B. I. 1992. Changes in the resistance of developing Citrus fruit to canker. Proc. Int. Soc. Citriculture. 2 (520): 825-827.
- CANTEROS, B. I. 1984. Disminuye la infección de cancrrosis en los montes cítricos. INTA, EEA Bella Vista, Argentina. Síntesis Tecnológica Nº 6. 2 p.
- CANTEROS, B. I.; CÁCERES, S. 2004. Métodos para evaluar insectos como portadores de la bacteria causal de la cancrrosis de los citrus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. [CD-ROM] Resúmenes de los trabajos presentados 15 Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas FCA UNNE. (Corrientes, 2004, ago. 4-6) P019.
- CANTEROS, B. I.; NARANJO, M. 2002. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* strains causing citrus canker in Argentina. Phytopathology 92:S116.
- CANTEROS, B. I.; NARANJO, M.; RYBAK, M. 2001. Production of fruits free of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in selected plots; in areas of endemic canker in Argentina. In: Proc 9 Int. Soc. of Citriculture (Orlando, Florida, 2000, dic 3-7) p. 1136-1137.
- CANTEROS, B.; MINSAVAGE, G.; BONAS, U.; PRING, D.; STALL, R. 1991. A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to avrBs3. MPMI 4:628-632.
- CANTEROS, B. I.; RYBAK, M.; NARANJO, M.; GOCHEZ, A.; MINSAVAGE, G.; JONES, J.; STALL, R E. 2004. Caracterización molecular de la resistencia al cobre en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. [CD-ROM] Resúmenes de los trabajos presentados. 15 Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas FCA UNNE (Corrientes, 2004, ago. 4-6) P-020.

- CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I.; ZAGORY, D.; STALL, R. E. 1985. A medium for cultivation of the B-strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*; cause of cancrrosis B in Argentina and Uruguay. *Plant Disease*. 69: 122-123.
- CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. 1987. *Microbiology a Laboratory Manual*. 2da ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company; Inc. pp. 161- 163.
- CARVALHO, M. L. V.; MALAVOLTA JR., V. A.; PALAZZO, D. A.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C. 1984. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE in soil in nonhost plants. In: 5th Int. Citrus Congr. (São Paulo, Brasil, 1984) 1987(2): 368-370.
- CERCOS, A. P. 1980. Infección artificial de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson; en hojas separadas de *Fortunella* (Konkuat). En: *Actas Segundo Congr. Nac. Citricultura*. INTA, EEA Concordia y JPCER,. pp. 21- 23.
- CHANDRIKA, R.; GABRIEL, D. W. 2003. Towards genetically engineered citrus plants with canker resistance. *Phytopathology* 93:S15.
- CHANG, J. H.; RATHJEN, J. P.; BERNAL, A. J.; STASKAWICZ, B.; MICHELMORE, R. W. 2000. *avrPto* enhances groth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* lines lacking either *Pto* or *Prf*. *MPMI* 13 (5): 568- 571.
- CHENG, Y. J.; GUO, W. W.; DENG, X. X. 2003. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep* 21:445- 451.
- CHENG, Z; CHENG, Z. S. 1998. Control of canker of citrus with copper-ammonium WC. *Journal of Zhejiang Forestry College*. 15: 108-110.
- CHOWDHURY, S. 1952. Some observations on citrus canker in Assam. *Sci Cult*. 18: 246-248.
- CIVEROLO, E. L. 1985. Indigenous plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Phytopatolgy* 75:524- 528.
- CIVEROLO, E. L. 1984. Bacterial canker diseases of citrus. *J. Rio Grande Valley Hortic. Soc.*; 37:127- 146.
- CLAUSEN, C. P. 1931. Two citrus leafminers of the far east. Washington: USDA; 1931. *Rev. Appl. Entomol.* 252 (19): 649.
- CONDADO, C. 1942. Cancrosis del limonero (Cancrosis "B"). Laboratorio de Fitopatología de Bella Vista. Ministerio de Agricultura de la Nación. Dirección de Sanidad Vegetal. INTA. Bella Vista, Corrientes 4 p.
- COOK, A. A. 1988. Association of citrus canker pustules with leaf miner tunnels in North Yemen. *Plant Disease*. 72: 546.

- COOK, A. A.; STALL, R. E. 1968. Effect of *Xanthomonas vesicatoria* on loss of electrolytes from leaves of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 58:617- 619.
- CORAZZA-NUNES, M. J.; MACHADO, M. A.; NUNES, W. M. C.; CRISTOFANI, M.; TARGON, M. L. P. N. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126: 169–176.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. 2005. Quantitative Real- Time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* 95:1333-1340.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3): 1257–1264.
- D'ONGHIA, A. M.; CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; DJELOUAH, K.; MARTELLI, G. P. 2000. Somatic embryogenesis from style culture: a new technique for the sanitation; conservation; and safe exchange of *Citrus* germplasm. In: Proc. 9 Congr.Int. Soc. Citriculture (Orlando, Florida, 2000, dic 3- 7). 1:147- 149.
- DA SILVA, A. C. R.; *et al.* 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417; 459- 463.
- DANOS, E.; BONAZZOLA, R. F.; RAYA, C. M. 1992. Advance in space of epidemic fronts of citrus canker in commercial groves. 7th International Citrus Congress (Acireale; Italy, 1992). 1994.(2): 821-824.
- DAS, A. K. 2003. Citrus canker - a review. *J. Appl. Hort.*;5(1):52-60.
- DAVIS, R. I.; HAILSTONES, D. L.; JACOBSON, S. C.; EICHNER, R. H.; GUNUA, T. G.; RAHAMMA, S.; BROADBENT, P. 2000. Surveillance for citrus canker disease in New Guinea and northern Australia. *Australasian Plant Pathology.* 29: 222-222.
- DE SOUZA CARVALHO, F. M.; PEREIRA, L. C. C.; LEITE JR., R. P. 2005. Genetics diversity of *Xanthomonas axonopodispv. citri* based on plasmid profile and pulse field gel electrophoresis. *Genet. Mol. Biol.* 28 (3): 446- 451.
- DENG, X. X.; GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. *Sci. Hortic.* 49 (1): 55-62
- DICKSTEIN, E.; JONES, J.; SUN, X.; JONES, D. 2005. Identification of citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) and related strains using

- ribotyping and fatty acid analysis. In: Proc. APS Annual Meeting (Austin, 2005, jul 30–Ago 3) p 207.
- DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.
- DOIDGE, E.M. 1916. The origin and cause of citrus canker in South Africa. *Union Dept. Agric. Sci. Bull.* 8:3-20.
- DOMATO, J.; DEL FRARI, H.; ESCOTORÍN, R.; RUDELLI, F. 1977. Bacteriosis de los cítricos (*Xanthomonas* spp.) Recopilación histórica de los principales actuados y situaciones en Argentina. [En CD-ROM] Resúmenes Histórico 5º Congreso Argentino de Citricultura (Concordia, 2005, nov 30 –dic 2) N° 068.
- DU CHARME, E. P. 1950. La causa de la cancrrosis del limón. *IDIA* 3, (33–34): 27-28.
- DUNGER, G.; ARABOLAZA, A. L.; GOTTIG, N.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in virus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology* 54:781- 788.
- DYE, D. W. 1966a. A comparative study of some atypical "xanthomonads". *N. Z. J. Agr. Res.* 9: 843-854.
- DYE, D. W. 1966b. Cultural and biochemical reactions of additional *Xanthomonas* spp. *N. Z. J. Agr. Res.* 9: 913-919.
- DYE, D. W. 1962. The inadequacy of the usual determinative test for the identification of *Xanthomonas* spp. *N. Z. J. Sci.* 5:393- 416.
- DYE, D. W. 1958. Host specificity in *Xanthomonas*. *Nature.* 182: 1813-1814.
- EDGERTON, C. W. 1914. Citrus canker. *Louisiana Bulletin* 150:1-10.
- EGEL, D. S. 1991. Pathogenic and genomic characterization of strains of *Xanthomonas campestris* causing diseases of citrus. Thesis Ph.D. University of Florida. Gainesville. 210 p.
- EGEL, D. S.; GRAHAM, J. H.; STALL, R. E. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of Citrus. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (9): 2724- 2730.
- EL GOORANI, M. A. 1989. The occurrence of citrus canker disease in United Arab Emirates (U.A.E.). *J. Phytopathol.* 125:257- 264.
- EL YACOUBI, B.; GABRIEL, D. W. 2004. Characterization of genes differentially regulated in canker infected leaves. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* p. 821.
- EPPO. 2002. PQR database [en línea]: version 4.1. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 35 (2): 289–294

- ERCOLANI, G. L. 1973. Two hypotheses on the aetiology of response of plant to phytopathogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 75:83- 95.
- FALICO DE ALCARAZ, L. 1974. Ensayo comparativo de productos terapéuticos para el control de la "cancrosis del limonero" (*Xanthomonas citri* (Hasse)) Dow. en Bella Vista (Corrientes). IDIA Setiembre Diciembre 1974. pp. 11- 14.
- FALICO DE ALCARAZ, L.; RODRIGUEZ, D. S. 1970. Cancrosis bacteriana en limoneros. Resultados de las primeras observaciones realizadas en la zona de Bella Vista, Corrientes. IDIA. Junio 1970: 23- 28.
- FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E.; 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopathology* 23:820-824.
- FAWCETT, H. S. 1936. Citrus canker. In: *Citrus diseases and their control*. McGraw-Hill Book Co. Inc.; New York and London; (12): 237- 249.
- FAWCETT, H.; BITANCOURT, A. A. 1937. Relatorio sobre as doencas dos citrus nos estados de Pernambuco, Bahía, Sao Paulo e Rio Grande do Sul. *Rodriguesia* 3 (2): 213- 236.
- FERGUSON, J.; SCHUBERT, T.; MILLER, J. 1984. Citrus canker. University of Florida; Agricultural Extensión Service; Gainesville. Fruit Crops Facts Sheet. 4 p.
- FLOR, H. H. 1946. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. Agric. Research* 73:335- 357.
- GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD, T. R. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:14- 22.
- GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:365-391.
- GAMBLEY, C. F.; BENHAM, M.; PARMENTER, K.; MILES, A. K.; DOOGAN, V. J.; RAMSDEN, M.; WHITTLE, P. J. L. 2005. The distribution of citrus canker in Emerald; Australia and bacterial survival in citrus trash. In: *Second International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop* (Orlando, Florida, 2005, nov 7-11) p 5.
- GANDHI, S. K.; CHAND, J. N. 1988. Plant age; temperature; and free moisture in relation to susceptibility of clusterbean to *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis*. In: *Proc. Indian Academy of Sciences, Plant Science.* 98: 49- 50.
- GARCÍA-PEÑA, J. R.; BARRETO-VILLALOBOS, A. 1984. Symptomatology description and fluctuation of the bacterial disease in Mexican lime at

- Colima; Mexico. In: Proc. 5th Int. Citrus Congr.(São Paulo; Brasil, 1984) 2: 319-323.
- GARIJO, C.; GARCIA, E. J. 1994. *Phyllocnistris citrella* (Stainton; 1856) (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) en los cultivos de cítricos de Andalucía (Sur de España): Biología; ecología y control de la plaga. Bol. Sanidad Veg. Plagas 20:815- 816.
- GARZA-LÓPEZ, J. G.; MEDINA-URRUTIA, V. M. 1984. Diseases of Mexican lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle in Mexico. In: Proc. 5th Int. Citrus Congr. (São Paulo; Brasil, 1984) 2: 311-315.
- GMITER, F. G.; DENG, Z.; XU, X.; HUANG, S.; ZHENG, Q. 2004. Resistance gene candidate (RGC) approaches to improving disease resistance in *Citrus*. In: Proc. 10th Congr. Soc. Int. Citr. (Agadir; Marruecos, 2004, feb 15- 20) p. 50.
- GOCHEZ, A. M.; CANTEROS, B. I. 2006a. Evaluación de la patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* Tipo B y C en Rutaceas. En: 12 Jornadas Fitosanitarias Argentinas (Catamarca, 2006, jun 28 -30) p. 215.
- GOCHEZ, A. M.; CANTEROS, B. I. 2006b. Caracterización fenotípica de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. [CD-ROM] 27 Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas FCA UNNE (Corrientes, 2004, ago 1- 4) p. 001..
- GOCHEZ, A. M.; CANTEROS, B. I. 2005. Caracterización de la interacción entre *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* y kumquat (*Fortunella margarita*). Fitopatología 40 (2): 57.
- GOCHEZ, A. M.; CANTEROS, B. I. 2004. Caracterización de la resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en Dalan Dan (*Citrus* sp.). J of BAG 16 (S): 96.
- GOEL, R. K.; GUPTA, A. K. 1990. Host age in relation to resistance in rice to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pathovar *orizae*. Trop. Agr. 67: 368- 370.
- GONÇALVES, E. R.; ROSATO. Y. B. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer sequences. Int. J. Syst. Ev. Micr. 52: 355–361
- GONZALEZ-RAMOS, J.; GRAHAM, J.; MIRKOV, T. 2005. Transformation of citrus cultivars with genes encoding potential resistance to citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). Phytopathology 95 (6): suppl.
- GONZÁLEZ SEGNANA, L. R.; VILLALBA, N. V. 2001. Cancrosis de los cítricos: detección serológica y biológica en el Paraguay. Revista de Ciencia y Tecnología UNA. 1 (3): 2001- 9.

- GOODMAN, R. N.; NOVACKY, A. J. 1994. The hypersensitive reaction in plant to pathogens. A resistance phenomenon. APS Press. pp. 117-187.
- GOTO, M. 1992a. Fundamental of bacterial plant pathology. Academic Press; Inc. pp:204- 206.
- GOTO, M. 1992b. Citrus canker. In: J. Kumar; H.S. Chaube; U.S. Singh; and A.N. Mukhopadhyay eds. Plant-diseases-of-international-importance.-v 3.-Diseases-of-fruit-crops. Prentice Hall; Englewood Cliffs; N.J. pp. 170- 208.
- GOTO, M. 1968. Studies on citrus canker in Japan. 1st Int. Citrus Symp. (Riverside; California, 1968) 3: 1251-1252.
- GOTO, M. 1962. Studies on citrus canker in Japan. Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. Itwada; Japan; 12: 3-72. In: Rev. Appl. Mycol. 44:1096 (1966).
- GOTO, M.; TAKAHASHI, T.; MESSINA, M. A. 1980. A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancrisis B in Argetnina. Ann. Phytopatol. Soc. Jpn. 46: 329- 338.
- GOTO, M.; TAKEMURA, I.; YAMANAKA, K. 1979. Leakage of electrolites and amino acids from susceptible and resistant citrus leaf tisúes infected by *Xanthomonas citri*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45:625-634.
- GOTO, M.; K. OHTA, OKABE, N. 1975. Studies on Saprophytic Survival of *Xanthomonas citri*. Annals of Phytopathological Soc. Japan. 41: 141-147.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. 2000. Canker. In: TIMMER; L. W; GARNSEY; S. M.; GRAHAM; J. H.; eds. *Compendium of citrus diseases*, 2n ed.) APS Press; pp. 5- 8.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. 1992. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathology 82:930- 935.
- GOTTWALD, T. R; GRAHAM, J. H.; CIVEROLO, E. L.; BARRETT, H. C.; HEARN, C. J. 1993. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. Plant Dis. 77:1004- 1009.
- GOTTWALD, T. R; GRAHAM, J. H.; RILEY, T.D. 1997. The influence of spray adjuvants on exacerbation of citrus bacterial spot. Plant Disease. 81 (11): 1305-1310.
- GOTTWALD, T.; GRAHAM, J.; RILEY, T.; SUN, X.; HUGHES, G.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.; BOCK, C.; IREY, M.; GILLIGAN, C.; SEEM, B. 2005. Estimating the increase and spread of citrus canker caused by the interaction of pedestrian versus catastrophic weather

- events; humans; and bad luck. In: Proc 2. International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop (Orlando, Florida, 2005, nov 7-11) C-3.
- GOTUZZO, A. E. de. 1975. Cancrosis de los citrus. En: Fernández Valiela M.V. Introducción a la Fitopatología. v. 2 INTA, Buenos Aires. pp 162-173.
- GOTUZZO, E. A. DE; ROSSI, L. 1967. Cancrosis de los cítricos. INTA Buenos Aires, Patología vegetal. 4 (5): 69- 81.
- GRAHAM, J.; GOTTWALD, T. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. *Plant Disease* 75: 1193- 1200.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. 1990. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with Citrus bacterial spot in Florida Citrus nurseries. *Phytopathology* 80:190- 196.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pat.* 5 (1): 1- 15.
- GRAHAM, J. H.; HARTUNG, J. S.; STALL, R. E.; CHASE, A. R. 1990. Pathological; restriction- fragment length polymorphism; and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus host. *Phytopatology* 80:829- 836.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology* 82 (11): 1319-1325.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; BRUCE, M. A. 1992. Susceptibility of citrus fruit to citrus bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology* 82: 454- 457.
- GUO, W. W.; GROSSER, J. W. 2004. Transgenic sweet orange plant regeneration by protoplast co-transformation with a potencial canker resistance gene and a GFP marker gene. *Proc. Int. Soc. Citricultura* pp. 132- 134.
- HAELTERMAN; R. M.; CANTEROS; B. I.; NOME; S. F.; DUCASSE; D. A. 2006. Diferenciación de *Xanthomonas axonopodis* Tipo A; B y C por métodos serológicos y moleculares.
- HAELTERMAN, R. M.; CANTEROS, B. I.; NOME, S. F.; DUCASSE, D. A. 2005. Detección de una cepa de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* serológicamente diferente. En: 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3er. Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos (Villa Carlos Paz, Cordoba, 2005, abr. 19-22), BET-3 p. 237.
- HAELTERMAN; R. M.; CANTEROS; B. I.; NOME; S. F.; DUCASSE; D. A. 2005. Producción de un antisuero para la detección de cepas de *Xanthomonas axonopodis* causante de la cancrrosis de los citrus tipo

- B. En: 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3er Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos (Villa Carlos Paz, Córdoba, 2005, abr.19-22), BET--4.p 238.
- HARTUNG, J. 2000. *Xylella* and *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* genomes. *Phytopathology* 90:S108.
- HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. *Phytopathology* 79:793: 799.
- HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L. 1987. Genomic fingerprint of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia; South America; and Florida. *Phytopathology* 77:282- 285.
- HARTUNG, J. S.; O.P. PRUVOST, I. VILLEMOT, ALVAREZ, A. 1996. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*. 86: 95-101.
- HASSE, C. H. 1915. *Pseudomonas citri* the cause of citrus canker. *J. Agric. Res.* 4:97.
- HAU, B. 2005. Epidemiology of citrus diseases applied to disease management. En: 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3er. Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos (Villa Carlos Paz, Córdoba, 2005, abr. 19-22). pp. 55-56.
- HAUBEN, L.; VAUTERIN, L. SWINGS, J.; MOORE, E. R. B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International journal of Systematic Bacteriology*. 47 (2): 328-335
- HEATH, M. C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:315- 319.
- HEPPNER, J. B. 1993. Citrus leafminer; *Phyllocnistis citrella*; in Florida. *Tropical Lepidoptera* 4 (1):49-64
- HIBBERD, A. M.; STALL, R. E.; BASSETT, M. J. 1988. Quantitatively assessed resistance to bacterial leaf spot in pepper that is simply inherited. *Phytopathology* 78:607- 612.
- HIBBERD, A. M.; STALL, R. E.; BASSETT, M. J. 1987. Different phenotypes associated with incompatible races and resistance genes in bacterial spot disease of pepper. *Plant Disease* 71:1075- 1078.
- HIBBERD, A. M.; BASSETT, M. J.; STALL, R. E. 1987. Allelism test of three dominant genes for hypersensitive resistance to bacterial spot of pepper. *Phytopathology* 77:1304- 1307.
- HILL, G. F. 1918. History of citrus canker in the Northern Territory. *N. Territ. Aust. Bull.* 18. p. 11.

- HOGG, D. R. 1985. Citrus canker in Argentina: a case history. In: Timmer, L. W. eds. Citrus canker: an international perspective. IFAS University of Florida; USA. pp. 8-10
- HSIE, S. I.; FONG, J. C.; LIN, L. P.; LIU, H. Y. 1974. Ultrastructural studies on Taiwan citrus canker disease. *Chin. J. Microbiol.* 7:150- 156.
- IBRAHIM, G.; BAYAA, B. 1989. Fungal; bacterial and nematological problems of citrus; grape and stone fruits in Arab countries. *Arab J. Plant Prot.* 7:190- 197.
- ICSB. 1995. Minutes of the meetings. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45; 877-878.
- IREY, M.; GOTTWALD, T.; GRAHAM, J.; CARLTON, C.; RILEY, T. 2005. Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model for future weather related spread. In: Proc. 2th Int. Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop (Orlando, Florida, 2005, nov 7-11) C-5.
- JOHNS, C. 2004. Citrus Industry Biosecurity Plan. Pest Risk Review. Plant Health Australia. p. 12.
- JONES, D. R.; MOFFETT, M. L.; NAVARATNAM, S. J. 1984. Citrus canker on Thursday Island. *Austral. Plant Pathol.*; 13: (4). 64- 65.
- JUNG, Y.; KWON, H.; KANG, S.; KANG, J.; KIM, S. 2005. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related species in Korea using plastid trnL-trnF sequences. *Sci. Hortic.* 104 (2): 179-188
- KAEWNUM, S.; PRATHUANGWONG, S.; BURR, T. J. 2005. Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by other plants. *Plant Pathology* 54:409- 415.
- KALITA, P.; BORA, L. C.; BHAGBATI, K. N. 1996. Phytoplasmic microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49: 134- 237.
- KAUL, M. L. H.; SHARMA, K. K. 1987. Bacterial blight in rice. A review. *Biol. Zentr. Bl.* 106: 141- 167.
- KAWAI, T. 1967. Can we realize to export satsuma mandarin to U.S.A.? *Kajitsu Nippon (Japan Fruit)* 22 (10): 20- 22.
- KEEN, N. T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24:447- 463.
- KELEMU, S.; LEACH, J. E. 1990. Cloning and characterization of an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *MPMI* 3 (2): 59-65.

- KISHORE, R.; CHAND, R. 1987. Studies on germoplasm resistance and chemical control of citrus canker. *Indian Journal Horticultural* 44: 126-32.
- KITAGAWA, T.; HU, J-G.; ISHIDA, Y.; YOSHIUCHI, H.; KUHARA, S.; KOIZUMI, M.; MATSUMOTO, R. 1992. A new immunoassay for *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and its application for evaluation of resistance in citrus plants. *Plant Disease* 76 (7): 708-712.
- KITAJIMA, H. 1965. Results of joint tests on controlling effect of some antibiotics against citrus canker. *Japan Plant Prot Assoc.* 40: 1-23.
- KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. 1990. Methods in Phytobacteriology. *Akadémiai Kiadó* eds. p. 101, 469-471.
- KLEMENT, Z.; FARKAS, G. L.; LOVREKOVICH, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54:474- 477.
- KNOOP, V.; STASKAWICZ, B. J.; BONAS, U. 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.* 173:7142- 7150.
- KOIZUMI, M. 1988. Mechanism of disease development and host resistance of citrus canker. In: Proc. Inter. Symposium of Citrus Canker; Declínio/Blight and Similar Diseases (Campinas, SP, 1988) pp 138-144.
- KOIZUMI, M. 1985. Citrus canker: the world situation. In: Timmer, L.W. eds. Citrus canker: An international perspective. University of Florida; Lake Alfred. pp. 2-7.
- KOIZUMI, M. 1983. Relationship between wound-healing process of citrus leaf tissues and successful infection through wounds by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE. *Ann Phytopath Soc Japan.* 49: 352-360.
- KOIZUMI, M. 1981. Resistance of citrus plants to bacterial canker disease: a review. In: Proc. 4th Int. Citrus Congress (Tokyo, Japan, 1981). (1):402-405.
- KOIZUMI, M. 1979. Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of Citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45: 635-644.
- KOIZUMI, M. 1977. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. In: Proc 2th Int. Citrus Congress (Orlando, Florida, 1977) 3: 924-928.
- KOIZUMI, M. 1976a. Behavior of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in the infection process I. Multiplication of the bacteria and histological changes following needle-prick inoculation. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42:407- 416.

- KOIZUMI, M. 1976b. II. Multiplication of the bacteria and histological changes of the host plant following rubber-block press or infiltration inoculation. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42:517- 525
- KOIZUMI, M. 1972. Studies on the symptoms of citrus canker formed on satsuma mandarin fruit and existence of causal bacteria in the affected tissues. *Bull. Hortic. Res. Stn.* 2:229- 244.
- KOIZUMI, M. 1969. Ecological studies on citrus canker caused by *Xanthomonas citri*. *Bulletin* 9:117-127.
- KOIZUMI, I. D.; GRIERSON, W. 1979. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 3:924- 928.
- KOIZUMI, M.; KIMIJIMA, E.; TSUKAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. 1996. Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: 8th Int. Citrus Congress (Sun City, South Africa, 1996) 1: 340-344.
- KUHARA, S. 1978. Present epidemic status and control of citrus canker disease *Xanthomonas citri* (Hase) Dow. in Japan. *Rev. Plant Prot. Res.* 11:132- 142.
- LAPAGE, S. P.; SNEATH, P. H. A.; LESSEL, E. F.; SKERMAN, V. B. D.; SEELINGER, H. P. R.; CLARK, W. A.; 1976. International Code of Nomenclature of Bacteria. *Bacteriological Code*; American Society for Microbiology; Washington; DC. 189 p.
- LATIF, A.; YUNUS, C. M. 1951. Food plants of citrus leafminers in Punjab. *Bull. Entomol. Res.* 42: 311-316.
- LAUB, C. A.; STALL, R. E. 1967. An evaluation of *Solanum nigrum* and *Physalis minima* as suscept of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Dis. Repr.* 51: 659- 661.
- LEE, C. Y. L. 1920. Action of some fungicides on the citrus canker organism. *Philippine J. Sci.* 17: 325-341.
- LEE, H. A. 1921a. The increase in resistance to citrus canker with the advance in maturity of citrus trees. *Phytopathology* 11:70- 73.
- LEE, H. A.; SHINO, A. 1922. Citrus canker control experiments in Japan. *Philippine J. Sci.* 20: 121-151.
- LEE, H. A. 1921b. Citrus Canker control: A progress report of experiments. *Philippine J. Sci.* 19: 129-171.
- LEITE, R. P. Jr. 2000. Surviving with *Citrus* canker in Brazil. In: *Proc 9th Int. Soc of Citriculture.* 2: 890- 896.
- LEITE JR., R. P.; MINSAVAGE, G. V.; BONAS, U.; STALL; R. E. 1994. Detection and identification of Phytopatogenics *Xanthomonas* strains

- by amplification of DNA sequences related the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol.* 60(4): 1068-1077
- LEITE JR., R. P.; MOHAN; S. K. 1984a. Evaluation of citrus cultivars for resistance to canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE in the State of Parana; Brazil. E: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo; Brasil, 1984) 2: 385-389
- LEITE JR., R. P.; MOHAN, S. K. 1984b. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE in soil and in association with some gramineous plants. In: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo; Brasil, 1984) 2 365-368.
- LI, W.; SONG, Q.; BRLANSKY, R. H.; HARTUNG, J. S. 2005. Genetic diversity and worldwide proliferation of Citrus bacterial canker pathogens identified in historic specimens. In: Proc. 2th Int. Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop (Orlando, Florida, 2005, nov 7-11) C-29.
- LINDGREN, P. B.; PANOPOULOS, N. J.; STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D. 1988. Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet.* 211:499- 506.
- LIU, K. C. 1966. Studies on the control of citrus canker. *Journal of Taiwan agricultural research-Nong ye yan jiu.* 15: 49-52.
- LLÁCER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. 2000. *Patología Vegetal 2^{da} ed.* M. V. Phytoma. España; S. L. Mundi-Prensa. pp. 559-586.
- LOPEZ, M. M.; NAVARRO, L. 1981. A new *in vitro* inoculation method for citrus canker diagnosis. In: Proc 4th Int. Citrus Congress (Tokyo, Japan, 1981) 1: 399-402.
- LOUCKS, K. W. 1934. Citrus canker and its eradication in Florida. *Archives of the Florida Department of Agriculture – Division of Plant Industry.* Gainesville. 110 p.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenics *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Env. Microb.* 60 (7): 2286- 2295.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528–536.
- LUPPIZ, V. J. 2005. Producción de cítricos en Argentina. Año 2004. Secretaría de Agricultura; Ganadería; Pesca y Alimentos. Buenos Aires.. 13 p.

- LURO, F.; MADDY, F.; OLLITRAULT, P.; RIST, D. 2000. Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid *Citrus* hybrids. In: Proc. 9th Int. Soc. Citriculture. 1: 168- 169.
- LUTHRA, J. C.; SATTAR, A. 1942. Citrus canker and its control in Punjab. Punjab Fruit J. 6 (1): 179- 182.
- MACHADO, M. A. 2004. Genoma funcional de bacterias fitopatogénicas. Fitopatologia Brasileira. 29 (S13).
- MACHARDY, W. E. 1996a. Apple Scab. Biology; Epidemiology; and Management. APS Press. pp. 104-116.
- MACHARDY, W. E. 1996b. Apple Scab. Biology; Epidemiology; and Management. APS Press. pp 190-192.
- MACKEY, J. P.; SANDYS, G. H. 1966. Diagnosis of urinary tract infections. Br. Med. J. 1:1173.
- MAES, M. 1993. Fast classification of plant- associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. FEMS Microbiology Letters 113: 161- 166.
- MAHUKU, G. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant; fungal; and bacterial DNA. Plant Mol. Biol. Rep. 22:71- 81.
- MALAVOLTA JR., V. A.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO, J.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. 1984. Reaction of different Citrus and relatives to bacterial canker C (*Xanthomonas campestris* pv. *citri* [Hasse] DYE). In: 5th Int. Proc Citrus Congress (São Paulo, Brasil, 1984) 2: 363-364.
- MARCÓ, G. M. 2004. Argentina's citrus industry: an outlook. In: Proc. 10th Congr. Soc. Int. Citricultura. (Añadir, Marruecos, 2004, feb 15-20). 1: 31. p. 31.
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. J. Mol. Biol. 3; 208- 218.
- MARSHALL, J. K. 1968. Methods for leaf area measurement of large and small leaf samples. Phytosyntetica 2:41-47
- MASSEY, A. B. 1914. Citrus canker. Phytopath. 4: 6; 397.
- MATSUMOTO, R.; OKUDAI, N. 1990. Inheritance of resistance to bacterial canker disease in *Citrus*. J Jpn Soc Hort Sci. 59: 9-14.
- MATTHEWS, M.; PRESSLER, C.; PRESSLER, J. 2005. The truth and facts pertaining to the handling of the citrus canker outbreak in Emerald; Australia from an Emerald citrus grower's perspective. In: Proc 2th Int..Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop (Orlando, Florida, 2005, nov 7-11). p. 7.

- MCCOLLUM, T. B.; BOWMAN, K. D.; GOTTWALD, T. R. 2006. Screening Citrus Germplasm for Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Hortscience Proceedings 41:1048-1049.
- MCLEAN, F. T.; LEE, H. A. 1922. Pressures required to cause stomatal infection with the citrus-canker organism. Phillipine J. Sci. 20:309- 321.
- MEDINA-URRUTIA, V. M. 1984. Spatial distribution patterns of citrus bacteriosis on Mexican lime trees and sample sizes for detecting the disease. In: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo, Brasil, 1984) 2: 315-318.
- MESSINA, M. A. 1980a. Los métodos serológicos en el estudio de la bacteria que produce la "Cancrosis Cítrica" en la Argentina. III. Diferenciación entre las bacterias de la "Cancrosis A" o "asiática" y de las de la "Cancrosis B" o "sudamericana" en el país. Inst. Nac. Tecnol. Agropec. Concordia; Entre Ríos. Argentina. Ser. Tec.Nº 50. 12 p.
- MESSINA; M. 1980b. Los métodos serológicos en el estudio de la bacteria que produce la cancrrosis cítrica en la Argentina. 4. La técnica de inmunofluorescencia. Su aplicación como elemento de diagnósticos de laboratorio [CD-ROM] 5º Congreso Argentino de Citricultura (Concordia, Entre Ríos, 2005, nov 30, dic 2), Nº 122.
- MESSINA, M. A.; GARRAN, S. A. 1980. Pruebas de patogenicidad en plantines con bacterias de la cancrrosis A y B de Argentina. [CD-ROM] 5º Congreso Argentino de Citricultura (Concordia, Entre Ríos, 2005, nov 30-dic 2), Nº 126.
- MICHELMORE, R. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. Annu. Rev. Phytopathol. 15:393- 427.
- MILLER; J. W., MARCO, G. M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. 1980. Canker of citrus. Coop. Project Tech. Rep. Nº 2; Bella Vista; Argentina. 117 p.
- MIYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, A. 1981. Citrus diseases in Japan. Japan Plant Protection Association; Tokyo; Japan. 64 p.
- MOHAMMADI, M.; MIRZAEI, M. R.; RAHIMIAN, H. 2001. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; the causal agent of citrus bacterial canker disease. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift. 149: 65-75.
- MOLINA, N.; LOMBARDO, E.; RAMÍREZ, A.; VALLEJOS, P.; VOLPATO, L. 2005. Informe cítrico de la Provincia de Corrientes. EEA INTA Bella Vista. Hoja de divulgación Nº 31. 12 p.
- MOREIRA, L. M.; DE SOUZA, R.; ALMEIDA, N. F.; SETÚBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. R. 2004. comparative genomic analyses of citrus associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 42:163-84.

- MYSORE, K. S.; RYU, C. 2004. Nonhost resistance: how much do we know?. *Trends Plant Sci.* 9 (2): 97-104.
- NAMEKATA, T. 1973. Bacteriophages; Cp-1 and Cp-2 behavior to the causal agents of different types of citrus canker. In: Proc 1st Congr. Mundial de Citricultura (España, 1973) 2: 663-664.
- NAMEKATA, T.; BALMER, E. 1973. Comparative studies on pathogenicity among causal agents of the three citrus canker. In: Proc 1st Congr. Mundial de Citricultura (España, 1973) 2: 659-662.
- NAMEKATA, T.; OLIVEIRA, A. R. 1971. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. In: Proc 3rd Int. Conf. Plant Pathog. Bact. (Wageningen, Holanda) pp. 151- 152.
- NARANJO, M; CANTEROS, B. I. 2001. Pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* strains isolated from citrus. *Phytopathology* 92: S128.
- NARANJO, M.; HAELTERMAN, R.; PERALTA, E. L.; LUIS, M.; DUCCASE, D.; CANTEROS, B. I. 2005. Diversidad genética de cepas de *Xanthomonas axonopodis* patógenas de citrus analizadas por repPCR. Resumen. En: Libro resúmenes 12 Congreso Latinoamericano y 28 Congreso Argentino de Horticultura (Gral Roca, Río Negro, 2005, set. 6- 8), FV 23.
- NARANJO, M.; PANTOJA, M.; RODRÍGUEZ, M.; CANTEROS, B. I. 2004. Titulación de infectividad de diferentes cepas de *Xanthomonas axonopodis* en hojas de lima mexicana. In: 44th APS Caribbean División Meeting (La Habana, Cuba, 2004) s/p.
- NARANJO, M.; PERALTA, E. L.; DUCCASE, D.; HAELTERMAN, R. M.; LUIS, M.; CANTEROS, B. I. 2005. Variabilidad genética de cepas de *Xanthomonas* causantes de la cancrrosis y la mancha bacteriana de los cítricos revelada por rep PCR. En: 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3 Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos (Villa Carlos Paz, Córdoba, 2005, abr 19-22) BET-5. p. 239.
- NIRVAN, R. S. 1961. Citrus canker and its control. *Horticulture Advances* 5: 171-175.
- NISHIURA, M.; UENO, I.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, T.; IWAMASA, M.; KIHARA, T. 1984a. 'Kiyomi' a new tangor in Japan. In: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo, Brasil, 1984) 1: 68-70.
- NISHIURA, M.; UENO, I.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, T. KIHARA, IWAMASA, M. 1984b. The 'Sweet Spring' hybrid in Japan. In: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo, Brasil, 1984) 1: 70-72.
- OEPP/EPPO. 2005. Bulletin OEPP/EPPO 35; 271-273.
- OKABE, N. 1932. Bacterial diseases of plant occurring in Formosa. I. *J. Soc. Trop. Agri.* 4:475- 477.

- OKABE, N. 1961. Studies on the lysogenics strains of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Papers in Commemoration of Dr. Takashi Matsumoto for His Thirty Years of Service as Professor of Plant Pathology; National Taiwan University; Taipei; Taiwan; R. O. C. p. 61-73.
- OLLITRAULT, P.; TREANTON, K.; DAMBIER, D.; D'HONT, A. 2000. *In situ* Hybridization for polyploid *Citrus* genome analysis. In: Proc 9th Int. Soc. of Citriculture. 1: 189- 190.
- OTA, T. 1983. Interaction *in vitro* and *in vivo* between *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. And antagonistic *Pseudomonas* sp. Annals of the Phytopathological Society of Japan; 49: 308- 315.
- PALAZZO, D. A.; NOGUEIRA, E. M. C.; CERAVOLO, L. C. 1988. Citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE): disease progress in time in the state of São Paulo; Brazil. In: Proc. 6th Int..Citrus Congress (Tel Aviv, Israel, 1988) 2: 1005-1011.
- PALAZZO, D.; MALAVOLTA JR., V. A.; NOGUEIRA, E. M. C.; ROSSETTI, V. 1984. Epidemiological observations on *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) DYE in relation to different citrus species and varieties. In: Proc. 5th Int. Citrus Congress (São Paulo; Brasil) 2: 382-385.
- PALM, M. E.; CIVEROLO, E. L. 1994. Isolation; pathogenicity; and partial host range of *Alternaria limicola*; causal agent of *mancha foliar de los citricos* in Mexico. Plant Disease 78:879- 883.
- PARSAI, P. S. 1959. Citrus canker. In: Seminar on Diseases of Horticultural Plants, p. 91- 95.
- PATEL, R. S.; DESAI, M. V. 1970. Control of citrus canker. Indian journal of Horticulture, 27: 93-98.
- PATEL, R. S.; PADHYA, A. C. 1964. Sodium Arsenite; copper sulphate spray for the control of the citrus canker. Current Science. 33: 87- 88;.
- PENNYCOOK, S. R. 1989. Plant diseases recorded in New Zealand. Plant Diseases Division; DSIR; Auckland; New Zealand. 1-3.
- PRASAD, M. B. N. V.; SINGH, R.; REKHA, A. 1997. ALH-77: An Interspecific hybrid lime with good fruit quality and resistance to citrus bacterial canker disease. In: National Symposium on Citriculture (Nagpur, India, 1997, nov 17- 19), p. 1.
- PRATES, H. S.; NAKANO, O.; GRAVERNA, S. 1996; "Minadora das folhas dos citros" *Phyllocnistis citrella*; Stainton; 1856. CATI Campinas. Comunicado Técnico Nº 129. páginas?
- PRUVOST, O.; BOHER, B.; BROCHERIEUX, C.; NICOLE, M.; CHIROLEU, F. 2002. Survival and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. Phytopathology. 92: 336-346.

- PRUVOST, O.; HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L.; DUBOIS, C.; PERRIER, X. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*; the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology* 82:485- 490.
- PRUVOST, O.; GOTTWALD, T. R.; BROCHERIEUX, C. 1999. The effect of irrigation practices on the spatio-temporal increase of Asiatic citrus canker in simulated nursery plots in Reunion Island. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 23-37.
- RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; BRUJIN, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95:1098- 1111.
- RAHMAN, M. M.; NITO, N. 1994. Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis. *Sci. Hortic.* 57 (1-2): 17-28.
- RAM, G.; NIRWAN, R. S.; SAXENA, M. L. 1972. Control of citrus canker. *Progressive Horticulture* 12: 240- 243.
- RAO, Y. P.; HINGORANI, M. K. 1963. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. *Indian Phytopathology*; 16: 362-364.
- REDDY, M. R. S. 1997. Sources of resistance to bacterial canker in citrus. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 27 (1): 80-81.
- REID, W.D. 1938. Citrus-canker in New Zealand. *NZ J Sci Tech.* 20: 55a-62a.
- REINACH, J. A. 2000. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Phytopathology* 90:S93.
- RHOADS, A. S. 1931. Diseases of citrus in Florida. *Fla. Agr. Exp. Sta. Bul.* 229.
- RINALDI, D. A. M. F.; LEITE JR, R. P. 2000. Adaptation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. In: 9th Int. Citrus Congress (Orlando, Florida, 2000), 2003.2: 1064. 2003
- RINSDHAL, C. M. A.; LEZCANO, A.; CANTEROS, B. I. 2006. Calidad del jugo del citrus Dalan Dan sobre dos portainjertos en Bella Vista, Corrientes. En: 13 Jornadas Científicas. Avocación de Biología de Tucumán (Tafí del Valle, Tucumán, Argentina, 2006, eet 28- 30). pp 287.
- RIVADENEIRA, M.; CANTEROS, B. I.; FLORES, C. 2004a. Efecto de los bactericidas cúpricos y desinfectantes para el control de la cancrrosis de los cítricos en el noroeste argentino. *Fitopatol. Bras.* 29 (S): 179 (569).
- RIVADENEIRA, M.; CANTEROS, B. I.; FLORES, C. 2004b. Momento oportuno y frecuencia de aplicaciones de bactericidas cúpricos para el

- control de la cancrrosis de los cítricos en frutos de pomelo del noroeste argentino. *Fitopatol. Bras.* 29 (S):178 (564).
- RODRIGUEZ, G.; S.; GARZA L., J. G.; STAPLETON, J. J.; CIVEROLO, E. L. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. *Plant Disease* 69:808- 810.
- ROOSE, M. L. 2000. Identification and use of genetic resistance and tolerance to new diseases. In: Proc 9th Int. Soc. of Citriculture (2): 952-954.
- ROSILLO, M. A.; RIVERA FLORES, S.; COLL, O. DEL R DE. 1979. Comprobaciones experimentales con insectos en la diseminación de la bacteria *Xanthomonas citri* spreading. En: 3ra Jornadas Fitosanitarias Argentinas (San M. De Tucuman, 1979) 1: 363- 405.
- ROSSETTI, V. 1977. Citrus canker in Latin America: a review. In: Proc.2th Int. Citrus Congr. (Orlando, Florida, 1977) 3: 918-924.
- ROSSI, L. A.; GOTUZZO, E. A. de. 1977. Cancrosis de los cítricos. Comportamiento de las cepas bacterianas e influencia de la temperatura en la manifestación de los síntomas. En: Actas del 1er Congr. de Citricultura (Tucuman, 1977, Set), 2: 603.
- ROSSI, L. A.; GOTUZZO, E. A. DE; ERBAGGI, D. N. 1977. Heterogeneidad de la población de *Xanthomonas citri*. [CD-ROM] 5th Congreso Argentino de Citricultura 2005 (Concordia, Entre Ríos, 2005, nov 30–dic 2) N° 125.páginas?
- RUDOLPH, K. 1975. Models of interaction between higher plants and bacteria. In: Wood, R. K. S., Graniti, A. eds. *Specificity in plant diseases*. Plenum Press. pp. 109- 129.
- RYBAK, M. A. 2005. Genetic determinants of host range specificity of the Wellington strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tesis PhD University of Florida. Gainesville.. 72 p.
- RYBAK, M.; CANTEROS, B. I. 2001. Populations of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in areas of endemic canker. In: De Boer, eds. *Plant Pathogenic Bacteria*. pp. 362- 370.
- SANCHES, D. 1971. Informe sobre la situación actual de la campaña de la erradicación de Cancrosis Asiática en el País. Archivos sociedad paraguaya de fitopatología. 4 p.
- SANCHEZ, J.; CERMELI, M.; MORALES, P. 2002. Ciclo biológico del minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Entomotropica*. 17 (2): 167-172.
- SÁNCHEZ-ANGUIANO, H.M.; FÉLIX-CASTRO, F. A. 1984. An overview of citrus canker (bacteriosis) on Mexican lime at Tecomán; Colima; Mexico. In: Proc. 5th Int. Citrus Congr. (São Paulo, Brasil, 1984) 1987 (2): 323-324.

- SAUNT, J. 2000. Citrus varieties of the world. 2th ed. Sinclair Int. Limited. 160 p.
- SCATTOLINI, A.; CASSANELLO, M. E.; PEREZ, E.; BENTACUR, O.; CRUZ, G. 2005. Epidemiología del cancro cítrico en limón en Uruguay. 13 Congreso Latinoamericano de Fitopatología. En: Libro de resúmenes 3th Taller de la Asoc. Arg. de Fitopatólogos (Villa Carlos Paz, Córdoba, 2005, abr 19-22), p. 234.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Syst. Appl. Microbiol. 29: 690- 695.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) DYE 1978 forms A; B/C/D; and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov.; and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and JONES) Gabriel et al.; 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) DYE 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and JONES; 1935) DYE 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al.; 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith; 1987) DYE 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 28 (6): 494-518.
- SCHAAD, N. W.; VIDAVER, A. K.; LACY, G. H.; RUDOLPH, K.; JONES, J. B. 2000. Evaluation of proposed attended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. Phytopathology 90:208- 213.
- SCHUBERT, T. S.; GOTTWALD, T. R.; RIZVI, S. A.; GRAHAM, J. H.; SUN, X.; DIXON; W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. Plant Disease 85 (4): 340 – 356.
- SCHUBERT, T. S.; SUN, X. 2003. Bacterial citrus canker. Plant Pathology Circular No. 377. 6 p
- SCORTICHINI, M.; MARCHESI, U.; DETTORI, M. T.; ROSSI, M. P. 2003. Genetic diversity; presence of the *syrB* gene; host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. Plant Pathology 52:277- 286.
- SERIZAWA, S. 1981. Recent studies on the behavior of the causal bacterium of the citrus canker. In: Proc 4th Int. Citrus Congr. (Tokyo; Japon, 1981) 1 395-397.
- SHERIZAWA, S.; INOUE, K. 1974. Studies on citrus canker; *Xanthomonas citri*. 3. The influence of wind on the infection of citrus canker. Bull. Shizuoka Prefect. Citrus Exp. Stn. 11: 54- 57.

- SINHA, M. K.; BATRA, R. C. UPPAL, D. K. 1972. Role of citrus leaf-miner (*Phyllocnistis citrella* Stainton), on the prevalence and severity of citrus canker (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson). Madras Agricultural Journal 59: 240-245.
- SHIOTANI, H.; OZAKI, K.; TSUYUMU, S. 2000. Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of pummelo (*Citrus grandis*). Phytopathology 90:1383-1389.
- SHIVAS, R. G. 1987. Citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) and banana leaf rust (*Uredo musae*) at Christmas Island, Indian ocean. Australasian Plant Pathology 16: (2) 38- 39.
- SOHI, G. S.; SANDHU, M. S. 1968. Role of citrus leaf miner (*Phyllocnistis citrella* Stainton) injury and citrus canker (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) incidence on citrus leaves. J. res. Punjab Agriculture 5:66-69.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 98:503-517.
- SRIVASTAVA, K. P.; AHLAWAT, Y. S. 1999. Pest Management in Citrus. Rainbow Processors & Printer. 320 p.
- STALL R. E., CIVEROLO, E. L. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 399-420.
- STALL, R. E.; COOK, A. A. 1968. Inhibition of *Xanthomonas vesicatoria* in extracts from hypersensitive and susceptible pepper leaves. Florida Agricultural Experiment Station Journal series N^o 2956. pp. 1584-1587.
- STALL, R. E.; COOK, A. A. 1966. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistant and susceptible pepper. Phytopathology 56:1152- 1154.
- STALL, R. B.; MINSAVAGE, G. V. 1990. The use of *hrp* genes to identify opportunistic xanthomonads. In: Proc 7th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria (Budapest, Hungría, 1989, jun 11- 16) pp. 369- 374.
- STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. 1983. Canker; a threat to citrus in the gulf coast states. Plant Disease 67:581-585.
- STALL, R. E.; DICKSTEIN, E. R; JONES, J. B. 2000. Analysis of fatty acid profiles of *Xanthomonads* pathogenic to citrus. In: Books of abstracts Int. Citrus Canker Research Workshop (Ft. Pierce, FL, 2000, jun 20-22). p. 16.
- STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS, B. I. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of citrus. Phytopathology: 1097-1100.
- STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS, B. I. 1981a. Mature-leaf resistance in *Citrus* to *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

Phytopathology 71:905.

- STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS, B. I. 1981b. Pathogenicity of three strains of the citrus canker organism on grapefruit. In: Proc 5th Int..Conf. Plant Pathog. Bact. (Cali, Colombia, 1981) pp. 334- 340.
- STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS, B. I. 1979a. Cancrosis de los citrus. Inform. Investig. Proyecto Cooperat. INTA-IFAS durante 1978-79. INTA Bella Vista, Corrientes Argentina. Informe Técnico N° 1. 122 p.
- STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS, B. I. 1979b. Diferencias patogénicas de tres razas de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Control por Resistencia Genética; En: STALL, R. E.; Marcó, G. M. y CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. 1979. Cancrosis de los citrus. 1979. Informe Investig. Proyecto Cooperat. INTA-IFAS durante 1978-79. INTA Informe Técnico N° 1.12 p.
- STALL, R. E.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I.; MARCÓ, G. M. Y ZUBRZYCKI; H. M. 1979c. Resistencia a *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson en hojas de citrus de diferentes variedades.. Control por Resistencia Genética. En: STALL, R. E.; MARCÓ, G. M. y CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. 1979. Cancrosis de los citrus. 1979. Informe Investig. Proyecto Cooperat. INTA-IFAS durante 1978-79. INTA Informe Técnico N° 1.24 p.
- STALL, R. E.; GOTTWALD, T. R.; KOISUMI, M.; SCHAAD, N. C. 1993. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In: Swings, J. G.; Civerolo, E. L. eds. *Xanthomonas*. pp. 265-299.
- STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. T. 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* determinates race-specific incompatibility on *Glycine max.* (L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6024-6028.
- SUN, X.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N.; SCHUBERT, T. S.; CHALOUX, P. H.; STROMBERG, V. K.; LACY, G. H.; SUTTON, B. D. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Dis. 88:1179-1188.
- SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene; *pthA*; pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhost. MPMI 5:204- 213.
- SWARUP, S.; DE FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology; 81: 802- 809.
- SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. 1993. *Xanthomonas*. TAKESHI, K. 2004. Episodes of citrus breeding. Foods Food Ingredients J. Jpn. 209 (3) . 48-49.

- TAYLOR, R. K.; TYSON, J. L.; FULLERTON, R. A.; HALE, C. N. 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: a case study involving canker- like symptoms on citrus. In: Proc 55th Conf. New Zealand Plant Protection Soc. Inc. pp. 53-57.
- TIMMER, L. W.; GOTTWALD, T. R.; ZITKO, S. E. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* 75:192- 195.
- TUNG, S. Y. KUO, T. T. 2000. Isolation and characterization of mutants of the citrus canker pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* that induce a distinct pattern of disease. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 78: 1002-1009.
- TUNG, S. Y.; KUO, T. H. 1999. Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5564-5570.
- VANNESTE; J. L. 2000. Fire Blight. The disease and its causative agent; *Erwinia amylovora*. p. 255.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.
- VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90:677-682.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MEW, T. W.; SCHROTH, M. N.; PALLERONI, N. J.; HILDEBRND, D. C.; STEAD, D. E.; CIVEROLO, E. L.; HAYWARD, A. C.; MARAITE, H.; STALL, R. E.; VIDAVER, A. K.; BRADBURY, J. F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3): 312- 316.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. 1996a. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:535- 542.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; ALVAREZ, A.; TAKIKAWA, Y.; ROTH, D.; VIDAVER, A. K.; STALL, R. E.; KERSTER, K.; SWINGS, J. 1996b. Identification of non- pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. *System. Appl. Microbiol.* 19:96- 105.
- VERNIERE, C. 1992. Le chancre bactérien des agrumes; (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): etude épidémiologique et écologique dans le cadre de l'île de la Réunion. Thèse Ph.D. Universidad de Paris-Sud (Centre D'Orsay). 155 p.
- VERNIERE, C.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L.; ALVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 477- 487.

- VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E. L.; GAMBIN, O.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; LUISETTI, J. 1993. Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and asses metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1): 243-249.
- VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; DUBOIS, C.; PERRIER, X.; COUTEAU, A.; LUISETTI, J. 1994. Variations among strains of *Xanthomonas campestris* isolated from citrus distinguished with their sensitivity to antibiotics. In: Proc 8th Int Conf Plant Path Bacteria (ORSTOM/ INRA; Paris, 1994) p. 247- 251.
- VILORIA, Z.; DROUILLARD, D. L.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. 2004. Screening triploid hybrids of "Lakeland" limequat for resistance to citrus canker. Plant Disease 88:1056- 1060.
- VIVIAN, A.; GIBBON, M. J. 1997. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons?. Microbiology 143; 693–704.
- WEI, Z. M.; LABY, R. J.; ZUMOFF, C. H.; BAUER, D. H.; HE, S. Y.; COLLMER, A.; BEER, S. V. 1992. Harpin; elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pthogen *Erwinia amylovora*. Science 257:85-88.
- WHITESIDE, J. O. 1986. Citrus canker: some facts; speculations and myths about this highly dramatized bacterial disease. Citrus & Vegetable Magazine 14: 55-56, 64.
- WILLIS, D. K.; RICH, J. J.; HABRAK, E. M. 1991. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. MPMI 4:132-138.
- WOLF, A. 1916. Citrus canker. Jour. Agr. Res. 6: 69-100.
- WU, C. W.; HONG, Y. R.; HUANG, C. M.; TAN, Y. Y.; LEE, C. I.; CHANG, S. F.; WANG, C. H.; HUANG, M. L. 1985. Phage- induced mutations in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Prot. Bull. 27:19- 33.
- WU, W. C. 1972a. Phage- induced alterations of cell disposition; phage adsorption and sensivity; and virulence in *Xanthomonas citri*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 38:333- 341
- WU, W. C. 1972b. Paghe- induced alteration of colony type in *Xanthomonas citri*. Ann. Phytopathol. soc. Japan 38:146- 155.
- WU, W. C.; HONG, K. T.; TZENG, K. C. 1976. Application of the soft agar stab method for preservation of *Xanthomonas citri*. Chin. J. Microbiol. 9:68- 72.
- WU, W. C.; MAA, H. I.; LEE, S. J. 1985. An agar medium suitable for growth of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Prot. Bull. 28:225- 228.
- WU, W. C.; YANG, B. C.; HUANG, M. L. 1981. ØXW116; a temperate phage for *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: Proc 4th Int. Citrus Congr. (Tokyo, Japon, 1981) 1982-1983 (1) 397-399.

- WU, W.C.; LEE, S. T.; KUO, H. F.; WANG, L. Y. 1993. Use of phages for identifying the citrus canker bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Taiwan. *Plant Path.* 42: 389-395.
- XU, J.; WENG, F.; KE, P. 2004. The biological characteristics of Kiyomi tangor citrus cultivar and its utilization in citrus breeding. *South China Fruits* 33 (5): 8-9.
- YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E.; TAKIKWA, Y.; VIDAVER, A. K. 1991. Comment on the reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) and *X. phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989: indication of the need for minimal standar for the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:172-177.
- YOUNG, J. M.; TAKIKAWA, Y.; GARDAN, L.; STEAD, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:67- 105.
- YU, Z. H.; WANG, J. F.; STALL, R. E.; VALLEJOS, C. E. 1995. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doige) DYE. *Genetics* 141:675- 682.
- ZUBRZYCKI, H. M.; ZUBRZYCKI, A. D. de. A. 1988. Canker fiel resistance (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) in citrus cultivars. In: *Proc. Int. Simposium of Citrus Canker, Declinio/ blight and similar diseases.* Fundación Cargill, Campinas, Sao Paulo, Brasil. p. 69- 91.
- ZUBRZYCKI, H. M.; ZUBRZYCKI, A. 1982. Induction of mutation in citrus for the development of resistance to *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *Induced Mutation in vegetatively propaged plant II.* International Atomic energy Agency; Vienna. p. 91- 110.

FUENTES Y PÁGINAS WEB CONSULTADAS:

- ADI. 2003. Agencia de Desarrollo e Inversiones. Análisis Sectorial Cítricos-Producción y Exportaciones. [en línea] <<http://www.inversiones.gov.ar>> [consulta: 15 febrero 2006]
- Austcitrus. 2006. [en línea] <<http://www.austcitrus.org.au/>> [consulta: 15 febrero 2006]
- BACTERIO: [en línea] <<http://www.bacterio.cict.fr/xz/xanthomonas.html>> [consulta: (26 julio 2006)]
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. [en línea] <<http://www.cme.msu.edu/bergeys/pubinfo.html#anchor21298>>. [consulta 02 marzo 2006]
- BIOS: Bacteriology Insight Orienting System. [en línea] <http://annual.sp2000.org/2006/show_species_details.php?record_id=103084> [consulta: 27 julio 2006]
- CAB International. 2002. Crop Protection Compendium; Global Module; 4th edition. CAB Internacional eds.
- CITRUS CANCKER DIAGNOSTIC CHECKPOINTS: Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Division of Plant Industry. Bureau of Entomology; Nematology; and Plant Pathology. Plant Pathology Section. March; 2005.
- DPI: Division of Plant Industry. [en línea] <<http://www.doacs.state.fl.us/pi/images/rule05B.pdf>> [consulta: 17 febrero 2006]
- FAPESP. São Paulo State Science Foundation. [en línea] <<http://watson.fapesp.br/xantho/main.htm>> y <<http://genoma4.iq.usp.br/>> [consulta: 05 enero 2006]
- REGLAMENTO CE N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo; de 28 de enero de 2002. Diario Oficial n° L 031 de 01/02/2002 pag: 0001-0024. [en línea] <<http://www.corenea.com.ar/marcos2.htm>> [consulta: 10 julio 2006]
- SAGPyA. Secretaría de Agricultura; Ganadería; Pesca y Alimentos. República Argentina. Producción de cítricos en Argentina. Año 2004. [en línea] <<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>> [consulta: 10 febrero 2006]
- SINAVIMO. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas Agrícolas. 2005. [en línea] <http://www.sinavimo.gov.ar/fito/asp_public/new_index.htm> [consulta: 10 febrero 2006]
- USDA: United Status Department of Agriculture. [en línea] <<http://www.doacs.state.fl.us/pdf/Canker%20-%20Bronson.pdf>> [consulta: 13 abril 2007]