

TAKAO NAMEKATA
Engenheiro Agrônomo, M. S.
Seção de Micologia Fitopatológica
INSTITUTO BIOLÓGICO
SÃO PAULO

Estudos comparativos entre XANTHOMONAS CITRI
[Hasse] Dow., agente causal do «Cancro Cítrico» e
XANTHOMONAS CITRI [Hasse] Dow., N. F. S.P.
AURANTIFOLIA, agente causal da
«Cancrose do Limoeiro Galego».

Tese apresentada à
Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”
para a obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR EM AGRONOMIA

PIRACICABA — ABRIL — 1971

TAKAO NAMEKATA
Engenheiro-Agrônomo, M.S.

Seção de Micologia Fitopatológica
Instituto Biológico - São Paulo

ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE XANTHOMONAS CITRI (HASSE) DOW.,
AGENTE CAUSAL DO "CANCRO CÍTRICO" E XANTHOMONAS CITRI (HAS-
SE) DOW., N. F. SP. AURANTIFOLIA, AGENTE CAUSAL DA "CANCRO-
SE DO LIMOEIRO GALEGO".

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia.

PIRACICABA - ESTADO DE SÃO PAULO

Abril - 1971

A meus pais, irmãos e espôsa,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos sinceros:

Ao Prof. Dr. Eric Balmer, Docente da 11ª- Cadeira, Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela orientação, sugestões e revisão do original;

ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, Professor Assistente do Departamento Bioquímico da Universidade de Campinas pela orientação da parte da serologia, sugestões, críticas, revisão do original e apóio;

ao colega, Eng. Agr. Mário Barreto Figueiredo, - Assistente da Direção do Instituto Biológico, pelas sugestões, auxílio na execução dos trabalhos e na redação;

ao Prof. Dr. Ferdinando Galli, Catedrático da 11ª- Cadeira, Fitopatologia e Microbiologia Agrícola e Diretor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelas sugestões apresentadas;

ao Dr. Elliot W. Kitajima, Assistente da Seção de Virologia do Instituto Agrônômico de Campinas, pelo auxílio no exame morfológico através de microscopia eletrônica;

ao Dr. Antônio F.P. de Castro, Assistente da Direção do Instituto Biológico pelas críticas e sugestões apresentadas;

ao Dr. Antônio L.P. Gonçalves, Chefe da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo

auxílio nos testes bioquímicos e fornecimento de culturas de bactéria;

à Dra. Victória Rossetti, Diretora da Divisão de Patologia Vegetal do Instituto Biológico, pelas facilidades proporcionadas na execução dos trabalhos;

ao Sr. Francisco Muniz, funcionário desta Seção pelo preparo de meios de cultura, durante a execução dos trabalhos;

aos Drs. S. Yamada e M. Koizumi, Técnicos do Departamento de Fitopatologia do Ministério da Agricultura - do Japão (Okitsu) pelo fornecimento de bacteriófagos e respectivos antissôros;

ao Colega Eng. Agr. Jorge Teranishi, pelo auxílio na datilografia dos originais;

ao Colega Eng. Agr. Arilton A. Frenhani, pelo fornecimento de culturas bacterianas;

à Profª. E.A. Gotuzzo e à Pesquisadora L.A. Rossi, respectivamente, do Departamento de Patologia Vegetal e Instituto de Patologia Vegetal (INTA) da Argentina, pelo fornecimento de culturas de bactérias isoladas de cancrose daquele país;

a todos que direta ou indiretamente colaboraram e contribuíram para a realização do presente trabalho.

Í N D I C E

pg

1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	4
2.1. Revisão sôbre os tipos de cancrose dos citros .	4
2.2. Considerações sôbre a sistemática de bactérias fitopatogênicas e algumas técnicas utilizadas na classificação de bactéria pertencente ao gê- nero <u>Xanthomonas</u>	5
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	10
3.1. Meios de cultura	10
3.2. Substrato para manutenção das plantas	11
3.3. Culturas de bactérias utilizadas nos diferentes testes	11
3.4. Plantas cítricas utilizadas nos testes de pato- genicidade	11
3.5. Linhagens de bacteriófagos utilizadas nos tes- tes de relação fagos-bactérias	14
3.6. Técnicas de isolamento de culturas puras de bactérias	14
3.7. Identificação de bactérias	15
3.7.1. Características morfológicas	15
3.7.2. Testes diferenciais em meios de culturas	16
3.7.3. Estudo do efeito da temperatura	16
3.7.4. Testes com bacteriófagos	17
3.7.5. Estudos de patogenicidade	18
3.7.5.1. Preparo das plantas	18
3.7.5.2. Técnicas de inoculação	18
3.7.5.3. Avaliação do grau de patogenicidade	19
3.7.6. Estudos serológicos	20
3.7.6.1. Preparo dos antígenos	20

	pg
3.7.6.2. Preparo e conservação de antissôro	21
3.7.6.3. Testes usados para observar reações serológicas	22
3.7.6.4. Aplicação de testes serológicos de dupla difusão em ágar no diagnóstico rápido da doença ...	22
4. <u>RESULTADOS</u>	24
4.1. Isolamento de bactéria	24
4.2. Identificação das bactérias	24
4.2.1. Caracteres morfológicos	24
4.2.2. Testes diferenciais em meios de cultura	24
4.2.3. Efeito da temperatura	26
4.2.4. Testes com bacteriófagos	26
4.2.5. Testes de patogenicidade	29
4.2.5.1. Inoculação com ferimentos	29
4.2.5.2. Inoculação sem ferimentos	29
4.2.6. Estudos serológicos	32
4.2.6.1. Título dos antissôros	32
4.2.6.2. Determinação de concentração ótima do antígeno.	32
4.2.6.3. Testes de precipitação em tubos com diferentes isolamentos	32
4.2.6.4. Testes de precipitação em tubos, com absorção .	35
4.2.6.5. Testes de dupla difusão em ágar, sem absorção .	35
4.2.6.6. Testes de dupla difusão em ágar, com absorção .	38
4.2.6.7. Testes de imunoeletroforese	39
4.2.6.8. Aplicação de testes de dupla difusão em ágar no diagnóstico rápido de patógeno, em macerado de fôlhas	39
5. <u>DISCUSSÃO</u>	40
6. <u>CONCLUSÕES</u>	52
7. <u>RESUMO</u>	53

	pg
8. <u>SUMMARY</u>	56
9. <u>LITERATURA CITADA</u>	58

1. INTRODUÇÃO

Desde sua identificação, em 1915, por Hasse, a bactéria Xanthomonas citri (Hasse) Dow., agente causal do Cancro Cítrico ou Cancrose A, tem sido objeto de estudo em várias partes do mundo.

Devido sua alta parogenicidade para citros em geral, esta bactéria tem sido pesquisada de uma forma especial, em diversas regiões do globo, principalmente, no que se refere ao método de controle. Na Ásia, onde já foi constatada desde há muito tempo, em quase toda área citrícola, têm-se procurado o controle através de tratamentos químicos, porém em outras regiões onde a doença não é considerada endêmica, têm-se aplicado apenas os métodos de erradicação.

Na Argentina, Paraguai e Uruguai é conhecida a ocorrência de uma cancrose em citros, chamada Cancrose B, a qual foi considerada uma doença de pouca importância econômica, segundo FAWCETT e BITANCOURT (1940).

No Brasil, X. citri foi relatada pela primeira vez por BITANCOURT (1957). Desde então, os Governos da União e do Estado de São Paulo, vêm-se empenhando em campanha de erradicação desse patógeno. De acordo com a Portaria do Ministério da Agricultura, o sistema de erradicação do Cancro Cítrico, envolve a eliminação de pomares que se situam dentro de um raio de 1 quilômetro, a partir do foco para evitar a disseminação da bactéria. Apesar disso, o Cancro Cítrico constitui-se num dos problemas mais graves para a citricultura brasileira, uma vez que esta doença pode comprometer seriamente a nossa citricultura que na produção to

tal ocupa o 3º lugar no cenário mundial.

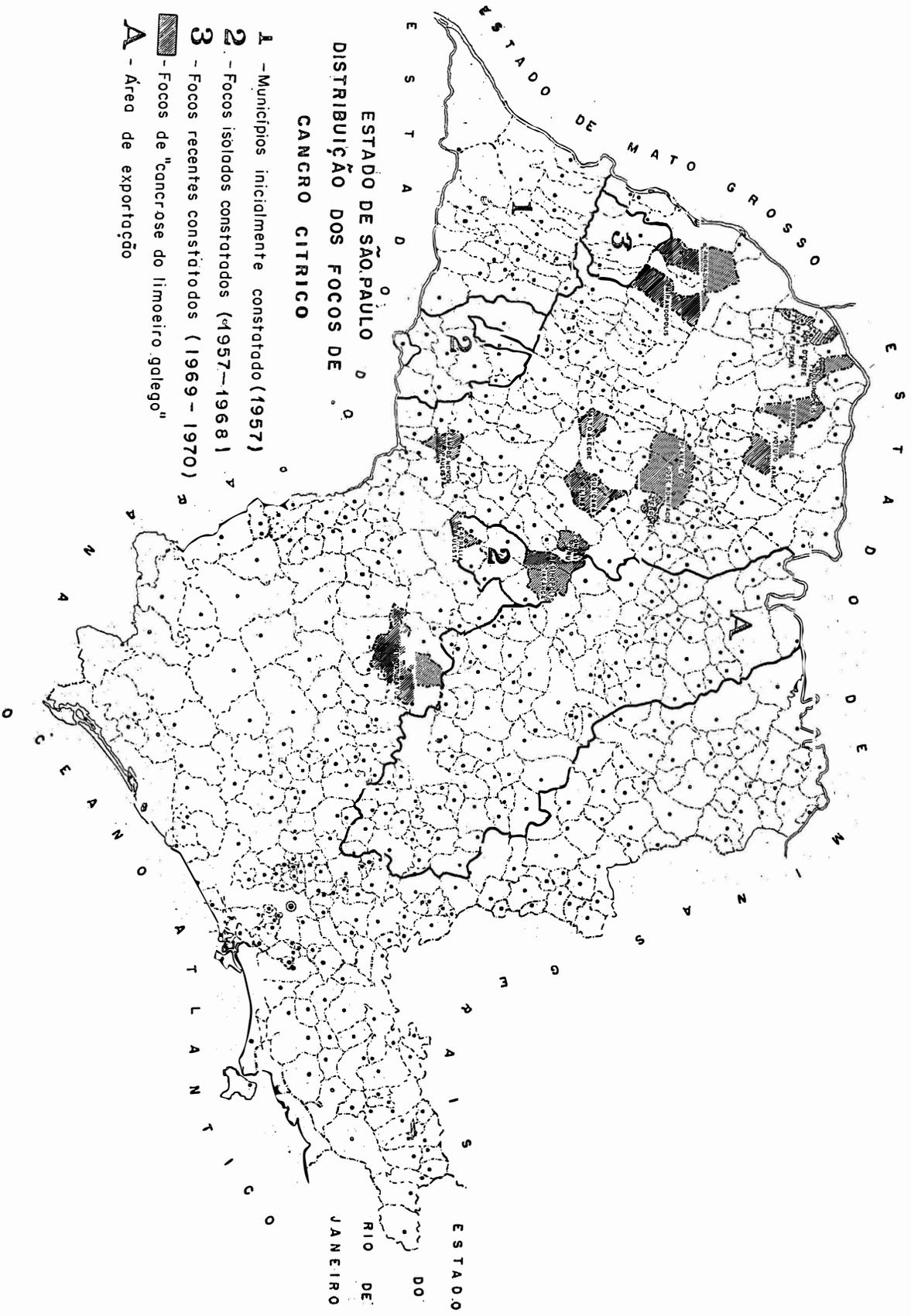
A partir de 1963, uma cancrose com características idênticas às cancrose A e B, mas observada apenas em limoeiro Galego, em pomares muitas vezes constituídos de diversas variedades cítricas, tem sido constatada em diversos municípios do Estado de São Paulo. Este fato sugere a ocorrência de uma nova doença, causada por um patógeno que difere dos agentes causais das Cancrose A e B, já conhecidas na literatura mundial.

Em virtude da semelhança do quadro sintomatológico, os pomares nos quais ela foi constatada vinham recebendo o mesmo tratamento empregado para o Cancro Cítrico no que se refere ao método de erradicação. Este fato poderia constituir sério problema aos citricultores, uma vez que os focos dessa doença se localizam, principalmente, nas áreas próximas aos grandes centros de produção citrícola do Estado (Figura 1).

Por essa razão, o melhor conhecimento desta Cancrose e seu agente causal, passou a ser assunto de grande importância para o esclarecimento das relações que existem entre este agente patogênico e *X. citri*, de ocorrência já conhecida no Brasil.

No presente trabalho é feito um estudo comparativo entre agente causal do Cancro Cítrico e aquele causador da Cancrose do limoeiro Galego. Estes patógenos foram estudados empregando-se os testes usuais para identificação de bactérias, testes de patogenicidade, testes serológicos, tendo-se recorrido inclusive às técnicas envolvendo a utilização de bacteriófagos. Os aspectos morfológicos foram estudados com o auxílio de microscópio eletrônico.

Figura - 1



Neste trabalho, a nova doença observada sôbre o limoeiro Galego, e o seu agente causal serão denominados, respectivamente, Cancrose do limoeiro Galego - CLG - e a bactéria do limoeiro Galego - BLG. Também para facilitar a terminologia, a bactéria X. citri será representada por sigla - XC.

oooo000oooo

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Revisão sôbre os tipos de cancrose dos citros

A primeira citação de uma cancrose dos citros diferente daquela causada por X. citri, foi relatada por ZEMAN (1934), em material proveniente da província de Corrientes-Argentina. FAWCETT (1936) confirmou a existência desta nova forma de cancrose na Argentina como também no Uruguai. Segundo Fawcett, estudos realizados no Departamento da Agricultura dos Estados Unidos revelaram que a referida cancrose era causada por outro agente patogênico, recebendo, portanto, a denominação de Falsa Cancrose. FAWCETT e BITANCOURT (1940) relataram a ocorrência de Falsa Cancrose, no Paraguai e denominaram-na de Cancrose B ou Cancrose Sul-Americana, para distingui-la daquela causada por X. citri a qual denominaram de Cancrose A ou Cancrose Asiática. Os referidos autores aventaram a hipótese de que se tratasse de uma raça de X. citri e que, além desta, seria possível a ocorrência de outras raças. Os autores também consideraram a Cancrose B, menos prejudicial, uma vez que seus principais hospedeiros, limões, limas e laranjas Azêdas, têm menor valor comercial. BITANCOURT (1957) observou em 1939, a Cancrose B em um pé de limoeiro Galego, no município de São Borja-Rio Grande do Sul. DU CHARME (1950) isolou de lesões de Cancrose B, uma bactéria cujas colônias apresentavam uma pigmentação amarela. DU CHARME (1951), posteriormente, conseguiu a reprodução de sintomas em citros, inoculando a bactéria isolada por meio de ferimento nas folhas. No mesmo trabalho, o referido autor mencionou existir diferenças culturais entre a bactéria isolada e X. citri. No entanto, não identificou o agente patogênico isolado. ROSSETTI e col. (1965), em inspeções realizadas em pomares da provín-

cia de Corrientes-Argentina, observaram lesões de cancrose em fôlhas de Pomelo (Citrus paradisi) em locais onde ocorria Cancrose B em limoeiros verdadeiros. Os citados autores atribuíram êste fato ao agente causal da Cancrose B, que teria penetrado nas fôlhas por ferimentos provocados pelo impacto de grãos de areia levantado por ventos fortes. Segundo FAWCETT e BITANCOURT (1940) e BITANCOURT (1957), o Pomelo, normalmente, se mostrava bastante tolerante à esta doença. FOGUET (1967), mais tarde confirmou as observações feitas por ROSSETTI e col. (1965) no tocante à ocorrência da Cancrose B em Pomelo. GOTUZZO e ROSSI (1967), na Argentina, isolaram uma bactéria causadora de uma cancrose que estava ocorrendo em diversas espécies cítricas, nas províncias de Corrientes e Entre Rios. A aplicação de testes usuais para identificação das bactérias revelou a identidade entre as bactérias dos diversos isolamentos feitos e a bactéria X. citri, por essa razão, concluíram ser Cancrose B ou Cancrose Sul-Americana causada por X. citri.

2.2. Considerações sôbre a sistemática de bactérias fitopatogênicas e algumas técnicas utilizadas na classificação de bactérias pertencentes ao gênero Xanthomonas.

Segundo as considerações feitas por STARR (1959), até a primeira metade dêste século, as bactérias fitopatogênicas eram objeto de estudo dos fitopatologistas, os quais procuravam classificá-las baseando-se principalmente na sintomatologia. A metodologia era inadequada pois consistia, em grande parte, na adoção de técnicas utilizadas em micologia. Conseqüentemente, muitas das contribuições iniciais sôbre bactérias fitopatogênicas consistiram de uma caracterização da doença acompanhada por dados incompletos sôbre o patógeno. Starr, no mesmo trabalho, fez uma revi-

são do conhecimento sobre a sistemática das bactérias fitopatogênicas abordando problemas referentes ao gênero e espécie, aplicação da serologia, utilização de bacteriófagos, metabolismo, citologia, genética e variabilidade. O autor fez uma crítica até certo ponto severa, sobre a tendência geral de se procurar descobrir e descrever novas espécies baseando-se em dados incompletos. Também criticou os métodos usuais para de terminação das espécies, os quais, a seu ver, não inspiram confiança, resultando na necessidade da utilização simultânea de outros recursos tais como: a serologia, emprêgo de bacteriófagos específicos, patogenicidade em diversos hospedeiros, estudos de metabolismo, além de outros métodos modernos.

Os testes bioquímicos, baseados no metabolismo das bactérias vêm sendo utilizados, há muito tempo, como principal método de classificação de bactérias. Entretanto, com a evolução das pesquisas, muitos pesquisadores começaram a duvidar da validade dos mesmos, quando empregados isoladamente. HAGBORG (1942), no seu estudo sobre a revisão das espécies em Xanthomonas translucens Dow., verificou que um mesmo isolamento através de passagens sucessivas em diferentes meios de cultura sintéticos deu origem a culturas que apresentaram características bioquímicas diferentes. GOTO (1962), estudando 302 isolamentos de X. citri, demonstrou que se pode formar 5 grupos diferentes dentro dessa espécie levando-se em consideração para três açúcares, Manose, Manitol e Lactose, sendo que estas diferenças não apresentaram qualquer relação com a patogenicidade. DYE (1962) estudando comparativamente, 57 espécies de Xanthomonas fitopatogênicas oriundas de 209 isolamentos, verificou que sendo o gênero Xanthomonas bastante uniforme do ponto de vista cultural, fisiológico e bioquímicos, os métodos usuais aplicados aos estudos comparativos não permitiram o estabelecimento de diferenças significativas.

WERNHAN (1948), estudando 17 espécies do gênero Xanthomonas quanto à patogenicidade, demonstrou haver grande especificidade, em relação aos hospedeiros. DYE (1958), fazendo inoculações sucessivas de várias espécies de Xanthomonas - em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.), demonstrou a reprodução de sintomas neste hospedeiro por patógenos classificados como espécies diferentes. No entanto, KLEMENT e col. (1964) e KLEMENT e GOODMAN (1967), estudando o problema da hipersensibilidade, criticaram o resultado apresentado por DYE (1958) como sendo falta de observação sobre a reação de hipersensibilidade do hospedeiro.

A técnica da utilização de bacteriófagos para classificação de bactérias fitopatogênicas também foi desenvolvida e discutida por diversos pesquisadores, entre eles FULTON (1950), KATZNELSON e SUTTON (1951, 1953), KATZNELSON e col. (1954), EISENSTARK e BERSTEIN (1955) e OKABE (1961). Alguns resultados mostraram-se promissores, quando as relações entre bactérias e bacteriófagos eram específicas. Entretanto SUTTON e col. (1958) verificaram a existência de bacteriófagos polivalentes, o que também foi demonstrado por STOLP e STARR (1964), trabalhando com grande número de isolamentos da bactéria do gênero Xanthomonas. Mais recentemente, GOTO (1970) verificou resultados semelhante incluindo-se X. citri.

A primeira constatação de um bacteriófago em X. citri foi feita por UPPAL (1933) e, segundo GOTO (1962) e WAKIMOTO (1967), MATSUMOTO e OKABE (1937) foram os primeiros a verificar a sua especificidade utilizando-o no estudo dessa bactéria. WAKIMOTO (1961, 1963 e 1967) verificou a existência de dois tipos de bacteriófagos em X. citri - Citrus phage-1 (Cp-1) e Citrus phage-2 (Cp-2) demonstrando não existir qualquer relação entre lisotipos e patogenicidade. Atualmente,

êstes bacteriófagos estão sendo utilizados no estudo da ecologia de X. citri por KOIZUMI e col. (1966-a, b e 1969).

Segundo LINK e SHARP (1927) e GOLDSWORTHY (1928), a aplicação de serologia na bacteriologia vegetal foi iniciada por Zipfel, na Alemanha, em 1912. Posteriormente, diversos pesquisadores procuraram utilizá-la na classificação de bactérias fitopatogênicas.

ELROD e BRAUN (1947-a) revelaram pouca confiança nos métodos usuais empregados na classificação de gênero Xanthomonas como também consideraram o uso da serologia até então aplicada para sistemática desse gênero incompleta e dispersiva. Os autores trabalhando com 36 espécies e sub-espécies do gênero Xanthomonas, fizeram uma revisão da literatura sobre o assunto e iniciaram uma série de trabalhos aperfeiçoando várias técnicas. A eliminação prévia das substâncias mucilaginosas, encontradas nas células bacterianas que interferiam nos resultados, associada com a técnica de absorção do antissoro permitiu a determinação de 5 serotipos: vascularum, phaseoli, campestris, translucens e pruni. ELROD e BRAUN (1947-b), estudando as reações serológicas das espécies e sub-espécies pertencentes à X. translucens e comparando-as também com outras espécies do mesmo gênero, chegaram à conclusão de que todas as espécies e sub-espécies de X. translucens formavam um único serotipo e havia pouca relação entre patogenicidade e serotipos. Estes resultados, em parte, estão em desacôrdo com aquêles obtidos por WERHHAN (1948) que conseguiu relacionar patogenicidade e serotipos no estudo de X. translucens.

ELROD e BRAUN (1947-c) estudaram também as divisões imunológicas do gênero Xanthomonas para os serotipos, vascularum, phaseoli e campestris, levando-se em consideração as re-

lações inter e intra-grupos. Os testes de absorção permitiram aos autores a concluir que os componentes do serotipo vascularum estão ligados por uma multiplicidade de fatores antigênicos. Já os componentes do serotipo phaseoli possuem componentes antigênicos comuns, enquanto que X. campestris (Pam.) Dow. e X. barbareae Burk., eram idênticos entre si. - MUSHIN e col. (1959) usando diferentes técnicas serológicas para bactérias fitopatogênicas e chegaram a conclusão que, - estas são de grande importância na classificação e identificação das mesmas. Pois, a diferenciação serológica concordava com a variação patogênica determinada pelos hospedeiros,

COWELL e LISTON (1961), estudaram por meio de taxonomia numérica, 40 microrganismos diferentes, entre os quais foram incluídas 16 espécies do gênero Xanthomonas. Quando os microrganismos foram comparados ao nível do gênero, as características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas mostraram diferenças bem evidentes, porém dentro do gênero Xanthomonas, as 16 espécies, somente puderam separar em 2 sub-grupos. Verificaram ainda os autores que, os resultados obtidos através de taxonomia numérica para Xanthomonas concordam com as diferenciações serológicas obtidas por ELROD e BRAUN (1947-a, b, c), particularmente, com relação a separação de X. phaseoli (Erw. Smith) Dow. de X. carotae (Kend.) Dow. e X. begoniae (Tak.) Dow.; e a semelhança de X. malvacearum (Doidge) Dow. com X. campestris verificada serologicamente por LINK e LINK (1928) e FANG (1942).

oooo000oooo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura

Para os isolamentos, manutenção de culturas e obtenção de populações bacterianas para fins de estudos foram utilizados os meios sólido e líquido de Wakimoto (meio W) WAKIMOTO (1962) cuja composição do meio sólido é a seguinte:

Batata	300,0 g
Sacarose	15,0 g
Peptona	5,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1.000,0 ml

O meio líquido tem a mesma composição acima referida excetuando-se ágar. O pH para ambos os meios, após a autoclavagem foi de 6,8.

Em certos casos o inóculo foi obtido usando-se o meio líquido de Rottingar.

Os estudos dos principais caracteres culturais e bioquímicos, foram baseados no trabalho de DYE (1962), como também nas técnicas recomendadas no "Manual of Microbiological Methods" da Sociedade Americana de Bacteriologistas (1957). Os meios utilizados para os diferentes testes recomendados foram os seguintes: Ágar chumbo, Ágar glicerinado, Ágar nitrado, Água de peptona, Gelatina, Leite tornasolado, Leite, Thioglicolato e os meios basais constituídos, separadamente, de hidratos de carbono: Arabinose, Dulcita, Galactose, Glicose, Lactose, Maltose, Manose, Manitol, Rafinose, Ramnose,

Sacarose, Salicina e Xilose.

3.2. Substrato para manutenção das plantas

As plantas utilizadas para o reisolamento de bactérias como também, em testes de patogenicidade, foram cultivadas em vasos de barro, contendo um substrato constituído de uma mistura de aproximadamente, uma parte de esterco de curral e três partes de um solo argiloso.

3.3. Culturas de bactérias utilizadas nos diferentes testes

As culturas de bactérias obtidas de material apresentando cancrozes, procedentes de diferentes regiões, como as demais culturas utilizadas em diversos testes feitos são apresentados no Quadro I.

3.4. Plantas cítricas utilizadas nos testes de patogenicidade

As espécies e variedades de citros utilizadas no presente trabalho foram as seguintes:

3.4.1. Citrus aurantifolia (Christm.) Swing., variedades - limão Galego, lima da Pérsia e limão Tahiti.

3.4.2. Citrus aurantium L., variedade - laranja Azêda.

3.4.3. Citrus limon (L.) Burm., variedades - limão Eureka e limão Siciliano.

3.4.4. Citrus paradisi Macf., variedade - Pomelo.

3.4.5. Citrus reticulata Blanco, variedades - Mexerica e tangerina.

Quadro 1. Relação das culturas de bactérias utilizadas.

Cultura Nº	Procedência		Hospedeiro Variedade	Cultura Nº	Procedência		Hospedeiro Variedade
	Município	Estado			Município	Estado	
T-6739	São Jorge	PR	Lar. Caipira	T-6905	Alto Piquiri	PR	Lar. Caipira
T-6743	Bataguauçu	MT	" "	T-6906	Fátima do Sul	"	" "
T-6746	"	"	" "	T-6907	Bataiporã	MT	" "
T-6748	"	"	" "	T-6908	Glória de Dourados	"	" "
T-6801	Indiana	SP	Limão Galego	T-6910	Alto Paraná	PR	" "
T-6802	Avaí	"	Lar. Caipira	T-6911	Mandaguauçu	"	" "
T-6803	Bataguauçu	MT	Tang. Ponkan	T-6912	Dracena	SP	Limão Galego
T-6804	"	"	Lar. Hamlin	T-6913	"	"	" "
T-6805	"	"	" Piralima	T-6914	Junqueirópolis	"	" "
T-6806	"	"	" Lima	T-6915	"	"	" "
T-6807	"	"	" Azéda	T-6916	"	"	" "
T-6808	Dourados	"	" Caipira	T-6917	"	"	" "
T-6809	Reginópolis	SP	Limão Galego	T-6918	"	"	" "
T-6810	Bataguauçu	MT	Lar. Caipira	T-6919	"	"	Lar. Caipira
T-6811	Dourados	"	" "	T-6920	"	"	" "
T-6902	Altônia	PR	" "	T-6921	"	"	" "
T-6903	Maria Helena	"	" "	T-6922	"	"	" "
T-6904	Umuarama	"	" "	T-6923	"	"	" "

Continua

Continuação

Cultura Nº	Procedência Município	Estado	Hospedeiro Variedade	Cultura Nº	Procedência Município	Estado	Hospedeiro Variedade
T-6924	Londrina	PR	Lar. Caipira	T-7004	Bauru	SP	Limão Galego
T-6925	Corrientes	AG	Limão Eureka	T-7005*	Alto Alegre	"	"
T-6926	"	"	Lar. Doce	T-7006	Pacaembu	"	"
T-6927	Entre Rios	"	Tangerina	T-7007	Avaí	"	"
T-6928	Corrientes	"	Pomelo	T-7008*	Santa Rita D'Oeste	"	"
T-7001	Piratininga	SP	Lar. Caipira	T-7009*	Sant'ana da P. Pensa	"	"
T-7002	Duartina	"	"	T-7010*	Turmalina	"	"
T-7003	"	"	"	T-7011*	Mirandópolis	"	"
(X.ca.)	<u>Xanthomonas carotae</u>	(Kend.) Dow.	- Seção de Bact. Fitopatológica	- I.B. S. Paulo			
(X.ma.)	<u>Xanthomonas manihotis</u>	(Arth. e Berth.) Bondar	- Seção de Bact. Fitopatológica	- I.B. S. Paulo			
(X.ph.)	<u>Xanthomonas phaseoli</u>	f. fuscans (Burk.) Starr e Burk.	Seção de Doenças de Plantas	Alimentícias Básicas e Olerícolas			
(X.v.)	<u>Xanthomonas vesicatoria</u>	(Doidge) Dow.	- ídem anterior				
(P.sol.)	<u>Pseudomonas solanacearum</u>	Erw. Smith	"				

* Culturas de bactéria obtidas de pomares constituídos de diferentes variedades cítricas porém, sintomas de cancrose ocorrendo, apenas em limoeiro Galego.

3.4.6. Citrus sinensis (L.) Osbeck., variedades - Baianinha, Caipira, Pera, Piralima e Valência.

3.4.7. Híbrido, variedade - limão Cravo.

3.5. Linhagens de bacteriófagos utilizados nos testes de reações, fagos-bactérias.

As linhagens Citrus phages, Cp-1 e Cp-2 cujas siglas derivam das palavras Citrus phage, foram utilizadas para verificar a suscetibilidade ou não dos isolamentos de X. citri (XC) e BLG aos referidos bacteriófagos.

3.6. Técnicas de isolamentos de culturas puras de bactérias

Três métodos de isolamentos foram testados para o isolamento da bactérias, agentes causais da Cancrose do limoeiro Galego (CLG) e do Cancro Cítrico. Os materiais dos quais se procurou isolar as bactérias apresentaram lesões relativamente novas de cancrose, as quais foram recortadas das folhas com o auxílio de uma tesoura. Os tecidos contendo o patógeno foram submetidos ao seguinte tratamento: imersão em álcool a 70%, durante 2 minutos, transferência posterior para solução de sublimado corrosivo a 0,1%, durante 2 minutos, e, finalmente, lavagem em água estéril.

Após essa operação foram testados os seguintes métodos de isolamento:

Método-1. Os pedaços de tecidos, com lesões novas de cancrose, foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio W líquido. Após, incubação a 28°C, durante 18 a 24 horas, seguiu-se o plaqueamento da suspensão bacteriana em meio W

sólido com o auxílio de uma alça de Drigalsky.

Método-2. Segmentos de fôlhas contendo o patógeno, foram macerados em um cadinho de porcelana, prèviamente esterilizado e o macerado assim obtido, diluído em água estéril numa proporção aproximada de uma parte de macerado para 9 partes de água estéril. Em seguida, uma gota dessa suspensão foi transferida para diversos tubos de ensaio contendo o meio W líquido, seguindo-se incubação do material a 28°C por 18 a 24 horas. Após a incubação foi feito o plaqueamento da suspensão como já foi referida no método anterior.

Método-3. O macerado obtido e diluído como no método 2, foi diretamente plaqueado com auxílio da alça de Drigalsky, sobre meio W sólido contido em placas de Petri.

Através dos métodos acima descritos, nem sempre foi possível isolar o patógeno. Por essa razão, para cada tentativa de isolamento foram feitas paralelamente, inoculações com mesmo macerado em fôlhas novas prèviamente feridas, em plantas da mesma variedade da qual procurava isolar o patógeno. A partir das lesões obtidas eram feitas novas tentativas de isolamentos, utilizando-se os métodos já descritos.

3.7. Identificação de bactérias

3.7.1. Características morfológicas

Para o estudo morfológico comparativo das duas bactérias, XC (T-6924) e BLG (T-7005) foram feitas observações ao microscópio eletrônico, seguindo-se o método de contrastação negativa. Neste estudo foram utilizadas culturas de bactérias desenvolvidas em meio W sólido, mantidas a 28°C durante 72 horas. Foi feito também o teste de Gram.

3.7.2. Testes diferenciais em meios de cultura

Os inóculos iniciais utilizados no presente estudo, foram culturas com 24 horas de idade obtidas em meio líquido de Rottinger e incubadas a 28°C as quais foram transferidas, em seguida, para os tubos de ensaio contendo os diferentes meios a serem testados. Estes também foram incubados a 28°C. As leituras e observações para os diferentes testes foram iniciadas 48 horas após a repicagem e repetidas a cada 7 dias. Para alguns meios, principalmente, aqueles contendo carboidratos, a última leitura foi realizada 30 dias após a inoculação. Para avaliação dos testes foram seguidas as recomendações contidas no "Manual of Microbiological Methods" da Sociedade Americana de Bacteriologistas (1957).

3.7.3. Estudos do efeito da temperatura

Segundo GOTO (1962), a temperatura ótima para o desenvolvimento de XC, varia de acordo com os autores. Baseado neste fato, procurou-se determinar comparativamente a temperatura ótima do crescimento das duas bactérias em questão, utilizando-se os isolamentos, T-6924 e T-7005. Nestes testes foram utilizadas temperaturas entre 30°C a 36°C com intervalos de 3°C, exceto a inclusão de uma temperatura de 28°C. O inóculo constituído de bactérias incubadas a 28°C, durante 24 horas, cultivadas em meio W líquido foi transferido mediante uma pipeta estirada para o centro das placas de Petri contendo meio W sólido. Para cada tratamento foram utilizadas 5 repetições. As observações foram iniciadas a partir de 48 horas após a repicagem e repetidas com intervalos de 24 horas, por um período de 5 dias.

As mesmas culturas foram utilizadas no estudo referente à temperatura letal. A técnica seguida foi aquela des

crita por PELTIER (1959) e consistiu, de modo geral, no tratamento térmico de suspensões bacterianas em água estéril, por 5 minutos, seguindo-se o plaqueamento em meio W sólido. As placas foram então incubadas a 28°C e as observações da viabilidade das bactérias, iniciadas 24 horas após o plaqueamento, sendo repetidas a cada 24 horas, durante 4 dias. As temperaturas utilizadas foram as seguintes: 43, 45, 47, 49, 50, 51, 52, 53; 54, 55, 56, 57 e 58 °C, sendo a testemunha uma suspensão bacteriana não submetida ao tratamento térmico.

3.7.4. Testes com bacteriófagos

Trinta e quatro isolamentos de XC, provenientes de diferentes locais dos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Paraná, além de 5 isolamentos de BLG e 4 da Cancrose B foram testados com as 2 linhagens de bacteriófagos, Cp-1 e Cp-2. A técnica seguida foi aquela descrita por KOIZUMI e col. (1966-a) e consistiu de maneira geral no seguinte: Um ml da suspensão bacteriana cultivada em meio W líquido, durante 48 horas, ajustada para uma concentração de 10^8 células bacterianas por ml foi, primeiramente, colocadas em tubos de ensaio, previamente esterilizado. Em seguida, foi adicionada 0,1 ml de uma suspensão de bacteriófago à concentração de 10^7 fagos por ml. A mistura foi agitada e deixada em repouso durante 5 minutos, tempo suficiente para que ocorresse a penetração das partículas de fagos no interior das bactérias. Findo este prazo, foram adicionados à suspensão de bactéria e fago, cerca de 10 ml de meio W sólido, fundido e ajustada a temperatura para 48 a 50°C. O conteúdo do tubo, ligeiramente agitado, foi vertido em placas de Petri as quais foram incubadas à temperatura de 28°C, por 15 a 18 horas, quando se procedeu a contagem das placas de lise formadas. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições e uma testemunha sem bacteriófago.

3.7.5. Estudos de patogenicidade

3.7.5.1. Preparo de plantas

Para a realização dos testes de patogenicidade das bactérias XC e BLG assim como agente da Cancrose B, foram utilizadas as espécies e variedades cítricas relatadas no ítem 3.4.

As plantas eram enxertadas, cultivadas em vasos de barro, contendo os substratos citados no ítem 3.2, apresentando idades diferentes e mantidas em condições de estufa. Estas plantas eram adubadas periodicamente, com uma mistura de adubo mineral, a fim de se manter o vigor das mesmas. Cerca de 1 mês antes das inoculações, as plantas eram podadas com a finalidade de se obter brotações novas, as quais eram utilizadas para as inoculações dos patógenos em questão.

3.7.5.2. Técnicas de inoculação

Foram realizadas inoculações por ferimentos em todos os testes de patogenicidade envolvendo os isolamentos, T-6924, T-6928 e T-7005. A técnica de inoculação seguida foi aquela recomendada por KOIZUMI (1966) e consistiu em ferir-se as folhas, na página inferior, mediante o uso de uma agulha fina. Em seguida, eram colocadas algumas gotas da suspensão bacteriana (inóculo) sobre uma das extremidade de uma rôlha de borracha a qual era justaposta na página inferior da folha e pressionada com outra rôlha semelhante, colocada na página superior da folha, a fim de se obter a penetração da bactéria no parênquima foliar.

O inóculo foi preparado, utilizando-se isolamentos bacterianos cultivados em meio W líquido, durante 48 horas a

28°C. A concentração do inóculo foi ajustada para 10^8 células bacterianas por ml. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos plásticos para se obter condições de câmara úmida, por um período de 72 horas. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em um compartimento separado dentro da estufa, com a finalidade de se evitar possíveis contaminações de outras plantas cítricas, existentes no local de trabalho, pelas cancores.

As inoculações sem ferimentos foram utilizadas somente para os testes de patogenicidade envolvendo o isolamento T-7005 e plantas de limoeiro Galego. A técnica de inoculação consistiu na pulverização da suspensão bacteriana em folhas com 15 a 20 dias de idade, obtidas mediante a poda prévia do hospedeiro. A concentração do inóculo, bem como outras operações após a inoculação foram idênticas às mencionadas acima.

3.7.5.3. Avaliação do grau de patogenicidade

As reações dos diferentes hospedeiros (variedades cítricas) aos patógenos foram classificadas em 5 graus, assim interpretado:

Grau - 0 - Ausência de qualquer lesão causada pelo patógeno.

Grau - 1 - Lesões esparsas, não definidas, restritas aos ferimentos provocados.

Grau - 2 - Lesões esparsas, definidas, sobre ferimentos provocados.

Grau - 3 - Lesões definidas, ocorrendo em grande quantidade sobre os ferimentos e de maneira esparsa sobre

o limbo foliar.

Grau . 4 - Lesões definidas, ocorrendo em grande quantidade, tanto sôbre os ferimentos como sôbre o limbo foliar, resultando em muitos casos, na coalescência das lesões.



Grau-0.



Grau-1.



Grau-2.



Grau-3.



Grau-4.

3.7.6. Estudos serológicos

3.7.6.1. Preparo dos antígenos

As culturas utilizadas para obtenção de antígenos foram cultivadas a 28°C por um período de 48 a 72 horas, em placas de Petri contendo meio W sólido. Após o desenvolvimento, as colônias foram removidas do substrato, por raspagem, mediante o uso de uma alça de Drigalsky, sendo as bactérias transferidas em seguida, para uma solução salina a 0,85% previamente esterilizada.

Para o uso de bactérias intactas como antígeno, a fim de eliminar parcialmente, a substância mucilaginosa, presente nas células bacterianas, procedeu-se a filtração da suspensão bacteriana através de papel de filtro (S & S No - 602) Os filtrados assim obtidos foram, em seguida, centrifugados a 8.000 rpm (Spinco) durante 10 minutos, sendo a parte decantada foi suspensa novamente em solução salina a 0,85%, ajustando-se posteriormente, a concentração da suspensão, segundo às finalidades a que estas se destinavam.

No preparo de antígenos para grupos antigênicos com extrato de bactéria, cêrca de 200 ml de cada suspensão bacteriana a ser estudada, com aproximadamente, 10^{12} células bacterianas por ml, eram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos. O sedimento foi tratado com uma solução de ácido acético a 0,03% e, posteriormente, aquecido a 100°C (banho-maria), durante 30 minutos. Em seguida, o material foi submetido a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm (Spinco) e o sobrenadante, utilizado como antígeno.

Além do processo de extração acima descrito, também foi utilizado antígeno oriundo de sobrenadante da suspensão bacteriana em solução salina, extraída pelo aquecimento da mesma a 100°C (banho-maria), durante 45 a 60 minutos, sem qualquer tratamento mencionado acima.

3.7.6.2. Preparo e conservação de antissôro

Antígenos provenientes de preparações de bactérias intactas e bactérias inativadas pelo calor (60°C por 10 minutos) foram utilizados no processo de imunização. Coelhos pesando em média, 3.000 g foram utilizados no preparo de antissôros específicos. Os antígenos, emulsionados (V/V) em adjuvante incompleto de Freund (Difco) foram injetados por via intramuscular. Um total de 8 injeções foram feitas, sendo de 10 dias o intervalo entre as mesmas. Antes da primeira injeção do antígeno, fêz-se uma sangria, e o sôro normal (SN) foi guardado no congelador para posteriormente ser utilizado como contrôle nas reações serológicas. Dez a doze dias após a última injeção do antígeno, fêz-se uma sangria e preparou-se os antissôros (AS). Os AS foram distribuídos em ampolas de vidro (2 a 3 ml por ampola) e conservado em congelador. Os coelhos continuaram sendo inoculados periódicamente, (cada 30 a 40 dias) para manter o título dos antissôros. Foram realiza-

das sangrias periódicas para obtenção dos AS em quantidade suficientes para a realização dos diferentes testes serológicos.

3.7.6.3. Testes usados para observar reações serológicas

Testes de aglutinação em tubos (MUSHIN e col.-1959), microprecipitina em caixas de Petri (van SLOGTEREN -1955), precipitação em tubos, dupla difusão em ágar (OUCHTERLONY -1949, 1958, 1962; BALL -1961; OLIVEIRA -1967) e imunoeletroforese foram utilizados para observar as reações serológicas entre os diferentes isolamentos de XC, BLG e agente da Cancrose B, assim como diversas reações cruzadas com outras bactérias. Os testes de dupla difusão em ágar foram feitas segundo as técnicas recomendadas por OLIVEIRA (1967). Para os testes de imunoeletroforese foi seguida a técnica recomendada por OLIVEIRA, recomendação pessoal, que consistiu no seguinte: Dois tipos de solução tampão, fosfato (PBS) e Veronal, foram prepara dos adicionando-se 0,1% de ágar (Difco), sendo em seguida, ajustados para pH 8,0 e autoclavados. Para cada lâmina de microscópio, foram distribuídos 5 ml de tampão-ágar preparado da maneira citada anteriormente. Depois de solidificado o tampão-ágar, foi preparado esquema de distribuição de antígeno e antissôro. Distribuídos os antígenos nos seus respectivos orifícios, as lâminas foram levadas para uma câmara de eletroforese, procedendo-se a passagem de uma corrente elétrica de 30 mA por lâmina durante 90 minutos. Retiradas as lâminas, os antissôros foram colocados nas canaletas para a verificação das reações posteriores.

3.7.6.4. Aplicação de testes serológicos de dupla difusão em ágar no diagnóstico rápido da doença

Com a finalidade de verificar a possibilidade de se utilizar um teste rápido para identificação da presença do a-

gente patogênico, foram preparados macerados de fôlhas de ci-
tros os quais serviram como antígenos para os testes de du-
pla difusão em ágar, conforme técnica descrita por MORTON -
(1965) para diagnose de X. vesicatoria em pimentão (Capsicum
annuum L.). Para êste teste foram preparados os materiais
que seguem: Lesões velhas de Cancro Cítrico; parte sadia de
fôlhas com sintomas de Cancro Cítrico; parte de fôlhas, de
planta livre de Cancro Cítrico; lesões da Leprose dos citros,
lesões da Verrugose dos citros. A quantidade do material u-
tilizado (2 g) para a obtenção dos diferentes macerados foi
a mesma em todos os casos. Os diferentes macerados, assim
obtidos, foram diluídos, separadamente, num volume constante
de água estéril. Os materiais preparados foram filtrados em
gaze e testados em relação a um contrôle, constituído de cul-
tura pura de XC.

oooo000oooo

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento de bactérias

Para os isolamentos feitos a partir de folhas com lesões novas, os métodos 1, 2 e 3, respectivamente, incubação de pedaços de tecidos em meio W líquido; maceração do tecido contendo lesões com posterior diluição em água estéril seguindo de plaqueamento e incubação do macerado em meio W líquido, mostraram uma alta eficiência. Para o caso de isolamentos realizados a partir de lesões velhas, o método 2, maceração e plaqueamento direto do macerado diluído, mostrou-se mais eficiente na obtenção de culturas puras. Os outros métodos não deram bons resultados devido ao grande número de bactérias contaminantes que se desenvolviam no meio de cultura.

4.2. Identificação das bactérias

4.2.1. Caracteres morfológicos

Os estudos comparativos referentes à morfologia das bactérias, XC e BLG através de microscopia eletrônica, revelaram que no tocante à forma e ao número de flagelos, as duas bactérias são idênticas. Porém, quanto ao tamanho, BLG é ligeiramente maior que XC. O teste de Gram revelou que ambas apresentam uma reação negativa (Quadro 2).

4.2.2. Testes diferenciais em meios de cultura

Os resultados obtidos para XC e BLG, em diferentes meios de cultura usados nos testes usuais para a classificação de bactérias, revelaram identidade com relação à produção de H₂S, aerobiose, não produção de nitrato a partir do

Quadro 2. Características morfológicas das bactérias, XC e BLG, observadas através de exame ao microscópio e submetidos ao teste de Gram.

Caracteres	Bactérias	
	XC (T-6924)	BLG (T-7005)
Tamanhos extremos de 50 indivíduos em μm	1,10-2,36x0,43-0,57	1,14-2,63x0,53-0,71
Número de flagelo	um flagelo polar	um flagelo polar
Teste de Gram	negativo	negativo

nitrito, hidrólise do amido, liquefação da gelatina, utilização de caseína e digestão do leite, e a peptonização do leite. A produção de amônia foi verificada apenas para XC. Com relação aos hidratos de carbono testados foi verificado que XC e BLG reagiram de maneira diferente em algumas das fontes de carbono. Foi observado que XC produziu ácido em Arabinose e Maltose enquanto que o mesmo não foi notado para BLG. No tocante a Galactose e Rafinose o teste foi positivo para BLG e negativo para XC e para restante ambas as bactérias reagiram de maneira idêntica (Quadro 3).

4.2.3. Efeito da temperatura

Ambos os isolamentos, T-6924 e T-7005, cresceram melhor à temperatura ao redor de 28°C. Não foram observadas diferenças significativas com relação ao crescimento, entre as duas bactérias na faixa de 27 a 30°C (Quadro 4).

Nos testes de temperatura letal, foi observada uma pequena diferença entre as duas bactérias. XC (T-6924) resistiu a 53°C, durante 5 minutos, enquanto que BLG (T-7005) resistiu somente a 51°C, por mesmo período de tempo. Acima dessas temperaturas não foi observada qualquer desenvolvimento da bactéria, mostrando assim, a perda total da vitalidade.

4.2.4. Testes com bacteriófagos

Os testes realizados com as linhagens de bacteriófagos específicos, Cp-1 e Cp-2 para XC revelaram que a maioria dos isolamentos existentes são suscetível a Cp-2, apenas um isolamento se mostrou suscetível a Cp-1 e os demais apresentaram imunes a ambas as linhagens de bacteriófago.

Os isolamentos de BLG, assim como suposto agente

Quadro 3. Resultados do comportamento das bactérias, XC e BLG em meios diferenciais.

Meios diferenciais	Reações	Isolamentos	
		XC (T-6924)	BLG (T-7005)
Ágar chumbo	produção de H ₂ S	+	+
Ágar glicerinado	aerobiose	+	+
Ágar nitratado	produção de nitrito	-	-
Água de peptona	produção de amônia	-	+
Amido	hidrólise do amido	+	+
Gelatina	liquefação	+	+
Leite tornasolado	utilização de casei na e digestão	+	+
Leite simples	peptonização	+	+
Thioglicolato	aerobiose	+	+

Meios de hidratos de carbono para verificar a produção de ácido.

Meios	Isolamentos		Meios	Isolamentos	
	XC(T-6924)	BLG(T-7005)		XC(T-6924)	BLG(T-7005)
Arabinose	+	-	Manitol	-	-
Dulcita	-	-	Rafinose	-	+
Galactose	-	+	Ramnose	-	-
Glicose	+	+	Sacarose	+	+
Lactose	+	+	Salicina	-	-
Maltose	+	-	Xilose	-	-
Manose	+	+			

+ = reação positiva. - = reação negativa.

Quadro 4. Diâmetro médio, em centímetro das colônias de bactérias XC e BLG desenvolvidas em meio W sólido, em diferentes temperaturas. As leituras foram realizadas 5 dias após a repicagem.

Temperatura Cº

Culturas

	3	6	9	12	15	18	21	24	27	28	30	33	36
XC (T-6924)	0,0	1,0	2,0	2,0	2,5	2,5	3,0	3,2	3,5	4,0	3,5	3,2	2,5
BLG (T-7005)	0,0	0,5	1,5	1,5	2,0	2,0	2,5	3,0	3,5	3,5	3,2	3,0	1,0

causa da Cancrose B, não mostraram sensibilidade a quaisquer dos bacteriófagos testados (Quadro 5).

4.2.5. Testes de patogenicidade

4.2.5.1. Inoculação com ferimentos

Em tôdas as variedades cítricas inoculadas com isolamento de XC (T-6924) os sintomas começaram a ser observados, a partir do 7º dia e se desenvolveram rapidamente, daí por diante. Conforme as variedades empregadas, foi notada uma diferença na evolução de sintomas. A suscetibilidade das variedades para XC, em ordem decrescente foi a seguinte: Pomelo, limão Siciliano, laranjas Doces, limão Tahiti, limão Galego, laranja Azêda, Tangerina e Mexerica. Enquanto que a suscetibilidade para o agente da Cancrose B, em ordem decrescente foi a seguinte: limões verdadeiros, laranjas Doces, limas, Tangerina Mexerica e Pomelo (Quadro 6).

As lesões resultantes da inoculação feita com BLG (T-7005) começaram aparecer em limoeiro Galego, cerca de 12 dias após a inoculação, enquanto que nas outras variedades suscetíveis (limão Tahiti, lima da Pérsia, limões Eureka e Siciliano) os sintomas aparecem aproximadamente, 20 dias após a inoculação, porém, essas lesões não se evoluíram. Apesar das inoculações sucessivas feitas, jamais foi verificado desenvolvimento do patógeno em outras variedades ou espécies cítricas utilizadas (Quadro 6).

4.2.5.2. Inoculação sem ferimentos

Quando o isolamento T-7005 (BLG) foi inoculado em limoeiro Galego, sem ferimentos, as primeiras lesões apareceram, aproximadamente, após 20 dias, porém, somente nas partes

Quadro 5. Resultado do comportamento das bactérias, XC, BLG e o agente da Cancrose B face às linhagens Cp-1 e Cp-2 de fagos.

Cultura Nº	Cp-1	Cp-2	Test.	Cultura Nº	Cp-1	Cp-2	Test.
T-6739	-	+	-	T-6913	-	+	-
T-6743	-	+	-	T-6914	-	+	-
T-6746	-	+	-	T-6915	-	+	-
T-6748	-	+	-	T-6916	-	+	-
T-6801	-	+	-	T-6917	-	+	-
T-6802	+	-	-	T-6918	-	+	-
T-6803	-	+	-	T-6919	-	+	-
T-6804	-	+	-	T-6920	-	+	-
T-6805	-	+	-	T-6921	-	-	-
T-6806	-	+	-	T-6922	-	+	-
T-6807	-	-	-	T-6923	-	+	-
T-6808	-	+	-	T-6924	-	+	-
T-6810	-	+	-	T-6925	-	-	-
T-6902	-	+	-	T-6926	-	-	-
T-6904	-	+	-	T-6927	-	-	-
T-6905	-	+	-	T-6928	-	-	-
T-6906	-	+	-	T-7005*	-	-	-
T-6907	-	+	-	T-7008*	-	-	-
T-6908	-	+	-	T-7009*	-	-	-
T-6910	-	+	-	T-7010*	-	-	-
T-6911	-	+	-	T-7011*	-	-	-
T-6912	-	+	-				

- = ausência de lise
+ = presença de lise
* = isolamento de BLG

Quadro 6. Avaliação dos resultados obtidos nos testes de patogenicidade, com ferimentos, efetuados em espécies e variedades cítricas utilizando as bactérias, XC, BLG e agente da Cancrose B.

Espécies	Variedades	Bactérias			Test.
		XC(T-6924)	BLG(T-7005)	Canc.B(T-6928)	
<u>C. aurantifolia</u>	limão Galego	3	4	2	0
	limão Tahiti	4	1	3	0
	lima da Pérsia	4	1	3	0
<u>C. aurantium</u>	lar. Azêda	3	0	2	0
<u>C. limon</u>	limão Eureka	4	1	4	0
	" Siciliano	4	1	4	0
<u>C. paradisi</u>	Pomelo	4	0	2	0
<u>C. reticulata</u>	Mexerica	4	0	2	0
	Tangerina	4	0	2	0
<u>C. sinensis</u>	lar. Baianinha	4	0	2	0
	" Caipira	4	0	3	0
	" Pera	4	0	2	0
	" Piralima	4	0	3	0
	" Valência	4	0	3	0
Híbrido	limão Cravo	4	0	3	0

0 = ausência de qualquer lesão provocada pelo patógeno.

1 = lesões esparsas, não definidas, restritas aos ferimentos provocados.

2 = lesões esparsas, definidas, sobre os ferimentos provocados.

3 = lesões definidas, ocorrendo em grande quantidade sobre os ferimentos e de maneira esparsa sobre o limbo foliar.

4 = lesões definidas, ocorrendo em grande quantidade, tanto nos ferimentos como sobre o limbo foliar, resultando em muitos casos, na coalescência das lesões.

onde havia ferimentos acidentais. Em alguns casos, foram observadas lesões, provavelmente, decorrentes da penetração da bactéria através dos estômatos e que apareceram somente, cerca de 40 dias após a inoculação.

4.2.6. Estudos serológicos

4.2.6.1. Título dos antissôros

Os títulos para os diferentes antissôros, após 8 injeções foram bastante altos. Não foram verificadas diferenças nos títulos dos antissôros obtidos para XC e BLG quer quando bactérias intactas quer inativadas ao calor, quando testados por reações homólogas (Quadro 7).

4.2.6.2. Determinação de concentração ótima do antígeno

Para testes de aglutinação em tubos, assim como precipitação em tubos, os resultados obtidos demonstraram que a concentração ótima do antígeno para as duas bactérias está situada na faixa de 10^7 a 10^8 células bacterianas por ml (Quadro 8).

Para o mesmo tipo de teste, quando foi utilizado como antígeno, a bactéria com tratamento térmico (extrato), a velocidade das reações se mostrou muito mais lenta, embora o título final do antissôro (22 horas após) fôsse igual em todos os casos.

4.2.6.3. Testes de precipitação em tubos com diferentes isolamentos

Todos os isolamentos determinados como XC e os isolamentos de BLG foram testados contra seus respectivos anti-

Quadro 7. Número de injeções feitas, tipo de inóculo e título dos anti-séros obtidos para XC (T-6746) e BLG (T-7005).

Cultura	Coelho Nº	Injeção	Tipo de inóculo	Título* Intacta Extraída	Código de Antisséros
XC (T-6746)	108	8	intacta	5.120	AS-108-XC
	110	8	inativada	5.120	AS-110-BLG
BLG (T-7005)	7	8	inativada	5.120	AS-7-BLG
	8	8	intacta	5.120	AS-8-BLG

* Os títulos estão representados pelo inverso da diluição e referem-se as reações homogêneas.

Quadro 8. Resultado dos testes de aglutinação e de precipitação em tubos feitos para estabelecer as concentrações ótimas entre os reagentes homólogos.

Reação entre	Concentração de bacterias por ml	Diluição de antissôros								
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
XC (T-6924) X	10^{10}	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^9	2	1	1	0	0	0	0	0	0
	10^8	4	4	4	4	3	2	1	1	1
	10^7	4	4	4	3	1	1	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLG (T-7005) X	10^{10}	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^9	3	2	1	0	0	0	0	0	0
	10^8	4	4	4	3	3	2	2	1	1
	10^7	4	4	3	2	2	1	1	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = ausência de precipitação; 1 = precipitação fraca; 2 = precipitação média;

3 = precipitação forte; 4 = precipitação bem forte.

sôros e verificou-se que todos os isolamentos se mostraram títulos idênticos. Foram realizados também testes cruzados entre XC e antissôro preparado com BLG, como também entre esta bactéria e o antissôro de XC. Em ambos os casos, houve reações cruzadas, porém, os títulos obtidos foram muito baixos nestes testes, quando comparados com os títulos obtidos em testes homólogos (Quadro 9).

Os antissôros preparados com XC, BLG foram testados em relação a outras espécies de Xanthomonas (X. carotae, X. manihotis, X. phaseoli f. fuscans e X. vesicatoria) e Pseudomonas solanacearum. Incluiu-se também o agente causal da Cancrose B. Foram notadas reações cruzadas para os testes envolvendo os antissôros para XC e BLG quando testados com X. carotae e X. manihotis, além do agente da cancrose B, porém jamais foram observadas reações com demais bactérias testadas - (Quadro 9).

4.2.6.4. Testes de precipitação em tubos, com absorção

Feita a absorção dos antissôros, empregando-se antígenos homólogos e heterólogos, o complexo foi, em seguida, submetido à centrifugação a 4.000 rpm (Spinco), durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para novos testes com diferentes antígenos. Os resultados demonstraram que, no teste inicial, houve absorção total nos testes homólogos e absorção parcial nos testes heterólogos (Quadro 10).

4.2.6.5. Testes de dupla difusão em ágar, sem absorção

Todos os isolamentos considerados XC comportaram-se de modo idêntico quando testados com os antissôros preparados com o isolamento de XC, (AS-108-XC e AS-110-XC). O mesmo aconteceu com os isolamentos de BLG com relação aos antissôros

Quadro 9. Resultado dos testes serológicos de precipitação em tubos entre os antissôros, AS-110-XC e AS-8-BLG e as bactérias, XC, BLG, X. carotae, X. manihotis, X. phaseoli f. fuscans, X. vesicatoria e Pseudomonas solanacearum.

Antissôros	Bactérias						
	XC	BLG	X.ca.	X.ma.	Xph.	XV	P.sol.
As-110-XC	5.120*	320	160	320	0	0	0
As-8-BLG	320	5.120	320	160	0	0	0

* Os títulos estão representados pelo inverso da diluição.
XC = X. citri, BLG = bactéria do limoeiro Galego, X.ca. = X. carotae, X.ma. = X. manihotis, X.ph. = X. phaseoli f. fuscans, XV = X. vesicatoria e P.sol. = Pseudomonas solanacearum.

Quadro 10. Título dos antissôros após absorção cruzada em testes de precipitação em tubos.

Antissôro	Absorvido por	Antígeno			
		XC(T-6924)	BLG(T-7005)	<u>X.carotae</u>	<u>X.manihotis</u>
	----	5.120*	320	160	320
	XC(T-6924)	0	0	0	0
AS-110-XC	BLG(T-7005)	640	80	0	0
	<u>X.carotae</u>	640	80	0	0
	<u>X.manihotis</u>	640	80	0	0
	----	320	5.120	320	320
	XC(T-6924)	160	80	0	80
AS-8-BLG	BLG(T-7005)	0	0	0	0
	<u>X.carotae</u>	80	640	0	0
	<u>X.manihotis</u>	80	640	0	0

* Os títulos dos antissôros estão representados em número pelo in verso da diluição.

preparados com o isolamento dessa bactéria (AS-7-BLG e AS-8-BLG). Das quatro outras espécies de Xanthomonas testadas somente X. carotae e X. manihotis reagiram com todos os antissôros preparados, sendo, porém, notada diferença nas reações. Foram observadas reações cruzadas entre XC e os antissôros de BLG (AS-7-BLG e AS-8-BLG), assim como entre BLG e os antissôros de XC (AS-108-XC e AS-110-XC). Entretanto, nos testes cruzados as linhas de precipitação se cruzaram, mostrando assim, a diferença imunológica entre as duas bactérias em estudos (Figuras 2 e 3). O agente da Cancrose B reagiu com os antissôros para XC e BLG de uma forma um pouco diferente.

As duas outras espécies de Xanthomonas (X. phaseoli f. fuscans e X. vesicatoria) e P. solanacearum não apresentaram reações com qualquer dos antissôros. Para cada bactéria, os antígenos preparados com bactéria X extraída, pelo tratamento térmico, mostraram diferença apenas em relação à disposição das linhas de precipitação formadas, e, aparentemente, não foi observada alteração na especificidade antigênica. O tratamento térmico das bactérias acelerou a reação, e as linhas de precipitação formadas, tornaram-se bem mais nítidas que àquelas formadas por bactérias não tratadas.

4.2.6.6. Testes de dupla difusão em ágar, com absorção

Os resultados obtidos nestes testes foram os seguintes: AS-8-BLG absorvido com BLG, antígeno homólogo não apresentou reação com qualquer das demais bactérias testadas, porém, quando absorvido com XC, X. carotae e X. manihotis, antígenos heterólogos foi observada uma reação positiva para BLG. Resultados análogos foram observados com AS-110-XC quando testados, respectivamente, com os antígenos homólogos e heterólogos (Figuras 4, 5, 6 e 7).

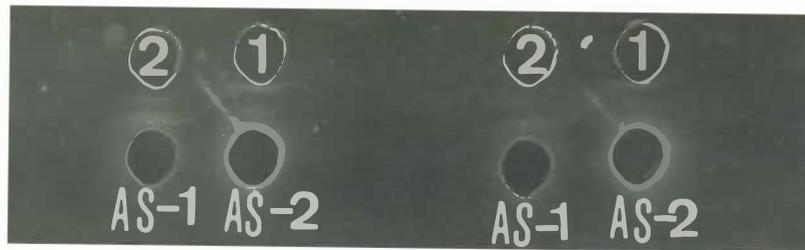


Figura 2. Teste serológico de dupla difusão em agar, reações cruzadas. 1 = XC; 2 = BLG; AS-1 = AS-110-XC; AS-2 = AS-8-BLG.

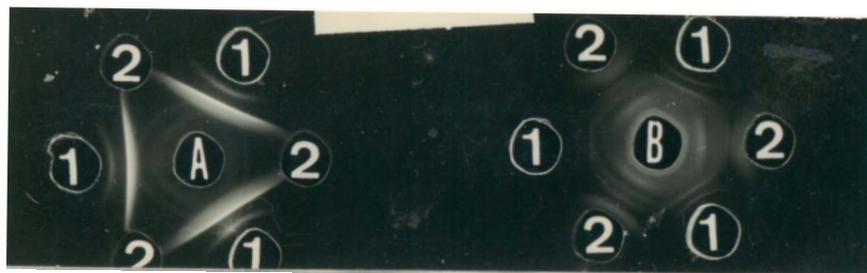


Figura 3. Teste serológico de dupla difusão em agar, reações cruzadas. A = AS-110-XC; B = AS-8-BLG; 1 = XC; 2 = BLG.

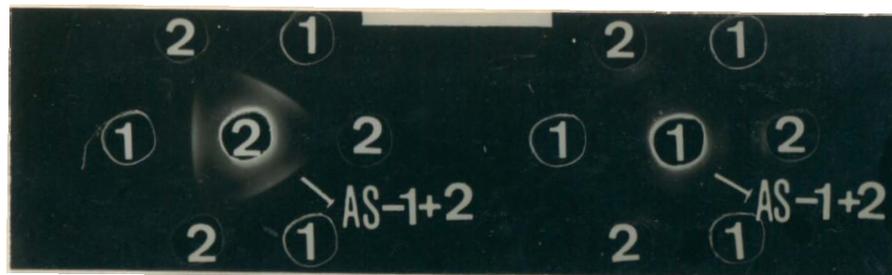


Figura 4. Teste serológico de dupla difusão em agar, absorção. Antissôro XC(AS-1) absorvido com XC (1); 2 = BLG; AS-1 + 2 = AS-110-XC e AS-8-BLG. Os antígenos 1 e 2 do centro foram colocados 8 horas antes de realizar reações antígeno - antissôro.

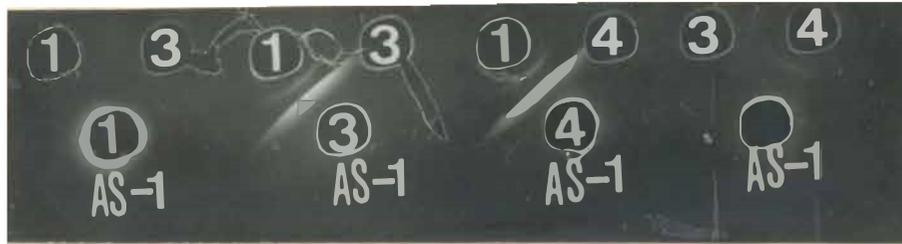


Figura 5. Testes serológicos de dupla difusão em agar, absorção. AS-110-XC(AS-1) foi absorvido com XC(1), X. carotae (3) e X. manihotis (4). 1, 3, 4 - respectivamente, antígenos XC, X. carotae e X. manihotis. AS-1 = AS-110-XC.



Figura 6. Testes serológicos de dupla difusão em agar, absorção. AS-8-BLG foi absorvido com an tígeno BLG, X. carotae (3) e X. manihotis (4). AS-2 = AS-8-BLG.



Figura 7. Testes serológicos de dupla difusão em agar, absorção. AS-110-XC e AS-8-BLG(AS-1 + 2) foram absorvidos com antígenos BLG(2), X. carotae(3) e X.manihotis(4). 1 = antígeno XC.

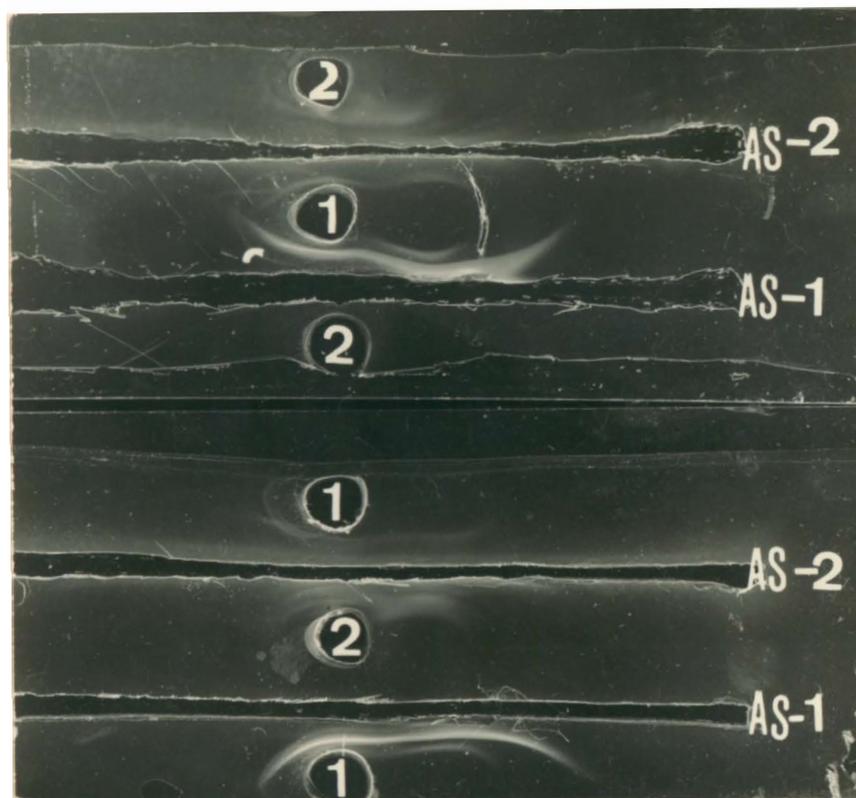


Figura 8. Testes de imunoeletroforese em tampão fosfato (PBS), 20 mA por 90 minutos. 1 = antígeno XC; 2 = antígeno ELG; AS-1 = AS-110-XC; AS-2 = AS-8-BLG.

4.2.6.7. Testes de imunoeletroforese

Os resultados obtidos revelaram diferenças nítidas entre as bactérias XC e BLG. O caminhamento de componentes antigênicos de ambas as bactérias, na sua maioria, foi para a direção do polo negativo. XC reagiu, embora de maneira diferente, tanto com AS-8-BLG, como AS-110-XC, porém BLG, embora tivesse reagido com o antissôro homólogo não reagiu com AS-110-XC (Figura-8). Não houve diferenças no tocante às diferentes soluções tampão utilizadas nos testes.

4.2.6.8. Aplicação de testes de dupla difusão em ágar no diagnóstico rápido de patógeno, em macerado de fôlhas.

Os testes com diversos tipos de macerados demonstraram que resultados positivos podem ser obtidos quando são utilizadas lesões novas com alta concentração de XC nos tecidos doentes. Macerados de lesões, causadas por outros agentes etiológicos, não apresentaram reações, quando testados com antissôro de XC (AS-110-XC),

oooo000oooo

5. DISCUSSÃO

O isolamento de cultura puras de bactérias, agentes causais das cancroses dos citros foi obtido com êxito, a partir de material com lesões novas. Portanto, quando se pretende isolamento dessas bactérias a partir de lesões velhas ou material provenientes de pomares distantes é recomendável, inicialmente, inocular em plantas mantidas em estufa e realizar reisolamento utilizando lesões novas resultantes de inoculações.

No presente trabalho, os exames morfológicos realizados através do uso de microscópio eletrônico revelaram existir pequena diferença entre XC e BLG, apenas no tocante às dimensões das células bacterianas (Quadro 2). Quando são confrontados estes dados com aqueles da literatura, as diferenças são pequenas. Os dados citados para XC por HASSE (1915), WOLF (1916) e GOTO (1962) foram respectivamente, 1,50 - 2,00 X 0,50 - 0,75 μm ; 1,50 - 2,50 X 0,50 - 0,75 μm e 1,00 - 2,00 X 0,50 - 0,70 μm . Entretanto, essas diferenças não deverão ser consideradas como sendo significativas, pois, pequenas diferenças notadas entre diversos pesquisadores poderão ser decorrentes da influência do meio ambiental e técnicas empregadas na medição.

A pequena diferença notada entre XC e BLG quanto às suas dimensões também não deve ser considerada significativa, uma vez que a variação observada está dentro dos limites apresentados na literatura para XC. Quanto à forma e número de flagelos as duas bactérias (XC e BLG) são idênticas.

Entre XC e BLG, com exceção para a produção de amônia, há concordância no tocante às reações apresentadas -

nos principais meios diferenciais utilizados (Quadro 3). Quanto à produção ou não de ácidos nos meios onde os açúcares foram utilizados como fonte de carbono houve discordância face à Arabinose, Galactose, Maltose e Rafinose.

Os resultados análogos de variação dentro da mesma espécie XC são apresentados por GOTO (1962) que demonstrou a existência de variação em relação a três açúcares, Manose, Manitol e Lactose. HAGBORG (1942), FANG (1950), STARR (1959), DYE (1962) e STOLP e col. (1955) demonstraram inúmeros exemplos da ocorrência de reações não específicas utilizadas por vários autores na classificação intra e inter-específica para bactérias do gênero Xanthomonas. Portanto, com base exclusiva nos testes usuais de diferenciação não se pode separar XC de BLG ao nível específico.

Os estudos comparativos do efeito da temperatura para XC e BLG, utilizando-se o meio W, revelaram que ambas as bactérias se desenvolveram melhor à temperatura ao redor de 28°C (Quadro 4). Entretanto, notou-se ser XC mais tolerante à variação de temperatura que BLG. Segundo a literatura, os intervalos de temperatura ótima para o crescimento de XC são variáveis. Para os pesquisadores, PELTIER (1920), LOUCKS (1930), OKABE (1932) e GOTO (1962) foram respectivamente de 20 a 30°C; 29,5 a 34,5°C; 25 a 34°C; e 25 a 30°C. Segundo GOTO (1962) já é conhecida, dentro da mesma espécie de bactéria, a existência de tipos diferentes quanto ao comportamento em relação à temperatura ótima para o crescimento e acredita o referido autor que o caso semelhante fôsse ocorrer também em XC. Por outro lado, STEVENS (1915) observou para XC, uma interação entre o efeito da temperatura e os meios nos quais era cultivada a bactéria. Como se verifica, o resultado do presente trabalho se assemelha mais àquêle obtido por GOTO (1962) que utilizou o mes-

mo meio W, confirmando observações feitas por Stevens. Em face dos dados apresentados, embora XC tivesse revelado ser mais tolerante que BLG à variação de temperatura, essa diferença não deve ser tomada como base para diferenciação entre as duas bactérias.

Quanto à temperatura letal, XC resistiu a 53°C por 5 minutos e BLG a 51°C, por mesmo período de tempo. Segundo GOTO (1962), existe pouca concordância entre diversos autores, no que se refere à temperatura letal para XC. Por exemplo, para STEVENS (1915) foi de 55 a 60°C, por 5 minutos; para WOLF (1915) 65°C por 10 minutos, para PELTIER (1920) 49 a 52°C por 5 minutos, para LOUCKS (1930) 48°C por 5 minutos e para próprio GOTO (1962) 52°C por 5 minutos. Existem portanto, variações consideráveis dependendo dos autores e locais onde foram desenvolvidas as pesquisas. Os resultados obtidos no presente trabalho aproximaram-se daqueles obtidos por GOTO (1962), que também utilizou o meio W. Foi verificada pequena diferença entre XC e BLG, porém, esta diferença não deve ser considerada como válida para separação das espécies, uma vez que, a diferença observada foi menor que a amplitude discutida por Goto.

Com relação aos bacteriófagos, foram encontrados 3 lisotipos para XC, respectivamente, sensível a Cp-1, sensível a Cp-2 e resistente a ambos. Para BLG, assim como para os isolamentos do agente da Cancrose B, jamais foi observada a formação de lise por qualquer das linhagens de fagos utilizados (Quadro 5.). Este fato leva a crer que tanto BLG como agente da Cancrose B, provavelmente diferem lisotipicamente de XC, agente da Cancrose A, tomando-se por base a frequência da constatação de resistência aos 2 fagos testados. WAKIMOTO (1967) determinou para XC, lisotipos A, B, e C, respectivamente, sensível a Cp-1, sensível a Cp-2 e re-

sistente a ambos. Portanto, o mesmo fenômeno é verificado também com os isolamentos de XC utilizados no presente trabalho.

STOLP e STARR (1964) demonstraram a polivalência de vários fagos para diferentes espécies do gênero Xanthomonas e baseados nesse trabalho os autores duvidam da especificidade de vários bacteriófagos utilizados na sistemática. Recentemente, GOTO (1970) demonstrou a formação de lise por 2 bacteriófagos isolados testados para 12 espécies do gênero Xanthomonas, incluindo-se XC. Embora até o momento, não se conheça qualquer trabalho que invalide a especificidade dos fagos, Cp-1 e Cp-2 para XC, os dados obtidos neste trabalho não são suficientes para diferenciar XC de BLG ou agente causal da Cancrose B, principalmente, quando os dados são tomados isoladamente. No entanto, esta característica pode ser de grande utilidade, quando associada a outros métodos de diferenciação.

Os resultados das inoculações para o isolamento de XC, quando inoculado por ferimentos, revelaram ser ele bastante patogênico aos hospedeiros testados. Considerando as espécies e variedades cítricas utilizadas nas inoculações experimentais, os resultados obtidos foram semelhantes àquêles obtidos e citados, respectivamente, por GOTO (1962) e BITANCOURT (1957). Em inspeções realizadas, nas diversas oportunidades, em diferentes regiões dos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Paraná, foi observada uma certa variação na suscetibilidade entre diferentes espécies e variedades cítricas a XC. Entretanto, o método de inoculação empregado neste trabalho, tornou essa variação bastante reduzida. Este fato, provavelmente, poderá ser explicado como sendo a suscetibilidade ou resistência das plantas cítricas relacionada à morfologia dos estômatos, -

fato êste demonstrado por Mc LEAN (1921) e GOTO (1962). Neste caso, a resistênciã está condicionada a um fator fisiológico inerente à planta. Provavelmente, êste fator é anulado quando se utiliza método de inoculação com ferimentos e pressão, desta maneira, forçando a penetração da bactéria nos tecidos da planta hospedeira.

O agente causal da CLG, quando inoculado com ferimento, comportou-se de uma maneira bastante diferente de XC no tocante à patogenicidade. O limoeiro Galego foi o único dos hospedeiros testados que se mostrou altamente suscetível à BLG, enquanto que quatro outras variedades, limão Eureka, limão Siciliano, limão Tahiti e lima da Pérsia apresentaram uma suscetibilidade bastante moderada. Os sintomas nestas 4 variedades eram bem diferentes daquêles observados sôbre o limoeiro Galego, havendo sôbre os ferimentos provocados no ato da inoculação, a formação de lesões pouco definidas que, praticamente não se evoluíram. Êstes dados parecem explicar os casos de observações do campo, onde a doença foi constatada como ocorrendo sômente em limoeiro Galego, nos diferentes pomares cítricos. A dificuldade da obtenção de sintomas em limoeiro Galego, quando as inoculações foram feitas sem ferimentos, poderia explicar o fato da fraca evolução da doença nessa variedade, em condições de campo.

O isolamento de bactéria proveniente da Argentina e suposto agente da Cancrose B, com exceção para o Pomelo, Mexerica e Tangerina apresentou nas demais variedades cítricas testadas, um grau de patogenicidade igual ou ligeiramente inferior àquêle apresentado por XC.

Considerando os resultados obtidos para os testes de patogenicidade, observações realizadas recentemente pelo autor na Argentina e as considerações feitas por BITANCOURT

(1957), foram notadas diferenças na intensidade da doença causada por XC, BLG e agente da Cancrose B, nas diferentes espécies e variedades cítricas testadas. GOTUZZO e ROSSI (1967), através de testes bioquímicos e patogenicidade, identificaram o agente causal da Cancrose B, como sendo X. citri, portanto, idêntico ao agente causal da cancrose A. Os testes realizados pelos referidos autores não foram suficientes para demonstrar diferenças ao grau de especialização do patógeno em questão, uma vez que não foi realizado um estudo comparativo detalhado. Isto pode, provavelmente ser explicado, pois DYE (1962) demonstrou que um número elevado de Xanthomonas classificado como espécies diferentes se comportam de forma idêntica, com relação a certos testes bioquímicos. Por outro lado, GOTO (1962) demonstrou que dentro da espécie XC é possível separar 5 tipos bioquimicamente distintos. A grande maioria dos taxonomistas defendem o ponto de vista de que os testes bioquímicos quando tomados, isoladamente, não são suficientes para uma classificação segura das bactérias.

A diferença em patogenicidade observadas para XC, BLG e agente da Cancrose B, no presente trabalho sugerem a existência de especialização fisiológica para os isolamentos de uma espécie bacteriana. Com base nos testes de patogenicidade efetuados e pelo fato de BLG ser bastante específica para limoeiro Galego e pouco patogênica para as demais variedades cítricas, conclue-se que a medida de erradicação para este patógeno deverá ser diferente daquela recomendada para XC, agente causal da Cancrose A. Quanto ao agente causal da Cancrose B, serão necessários outros estudos para que se possa determiná-lo com segurança.

Os estudos serológicos realizados no presente trabalho verificaram que nos testes de aglutinação, assim como nos testes de precipitação simples, as reações heterólogas apre-

sentaram títulos bastante baixos em relação àquêles obtidos nas reações homólogas (Quadro 9). LINK e col. (1929), BRAUN (1940) e ELROD e BRAUN (1947-a) demonstraram que testes de aglutinação em tubos, muitas vêzes, não permitem determinar diferenças entre bactérias fitopatogênicas, quando os títulos obtidos nas reações homólogas e heterólogas forem igualmente, elevados. No presente caso, a diferença dos títulos entre reações homólogas e heterólogas foi bastante significativa.

Nos testes de precipitação com absorção, a diferença imunológica observada nas reações de precipitação simples tornou-se bastante evidente, jamais ocorrendo qualquer reação com as bactérias testadas, após ter sido feita a absorção do antissôro com o antígeno homólogo (Quadro 10). ELROD e BRAUN (1947-c), nos testes de aglutinação em tubos fizeram a absorção de antissôro com o antígeno homólogo e algumas vêzes, verificaram a ocorrência de reações positivas, quando o resultante da primeira reação era novamente testado com o mesmo antígeno. Provavelmente, neste caso, deve ter havido excesso do antissôro em relação ao antígeno, pois, teoricamente, se houvesse a absorção total não deveria ocorrer novamente a reação positiva. Isto demonstra a importância da metodologia, a fim de evitar resultados que possam criar dificuldades nas interpretações de reações obtidas.

Os testes de dupla difusão em ágar, tanto nos casos, com e sem absorção, permitiram uma melhor diferenciação entre XC e BLG do que os testes de aglutinação ou precipitação em tubos. Os testes cruzados de dupla difusão em ágar revelaram linhas de precipitação específicas e comuns para XC e BLG (Figuras 2 e 3). Os testes de dupla difusão em ágar com absorção, através da absorção dos componentes -

antigênicos comuns demonstraram com maior clareza os componentes antigênicos específicos das duas bactérias em estudo (Figura 4). Os mesmos testes realizados com os antissôros para XC e BLG em relação aos antígenos de X. carotae e X. manihotis demonstraram que estas bactérias, também possuem alguns componentes antigênicos comuns a XC e BLG. Pelos resultados obtidos, verificou-se que, embora existam componentes antigênicos comuns em várias espécies consideradas diferentes dentro do gênero Xanthomonas, os testes serológicos revelaram reações específicas correspondentes às especializações fisiológicas observadas nos testes de patogenicidade (Figuras 5, 6, e 7).

Os testes de imunoeletroforese também permitiram diferenciar, serologicamente, XC de BLG, baseando-se nas posições das linhas de precipitação formadas, após o caminhar dos componentes antigênicos, em consequência da troca iônica (Figura 8).

Não foram observadas diferenças nos componentes antigênicos para uma mesma bactéria nos testes serológicos realizados com bactéria intacta e extraída mediante tratamento térmico. A prova mais evidente deste fato foi demonstrada com testes de absorção cruzada. No entanto, foram notadas diferenças no tocante a: a) retardamento da reação inicial nos testes de precipitação em tubos, atribuindo-se este fato a formação de pequenas partículas de componentes antigênicos devido à extração; b) abaixamento do título em testes com outras bactérias que possuem alguns componentes antigênicos comuns; c) aceleração do aparecimento da reação nos casos de testes de dupla difusão em ágar, e com a formação de linhas de precipitação bem mais nítidas, que pode ser explicada pela maior difusibilidade do antígeno. O tratamento térmico, provavelmente interfere mais sobre os

componentes antigênicos comuns, evidenciando mais ainda, os componentes antigênicos específicos. Pela evidência de maior especificidade e outras vantagens mencionadas acima, a utilização do extrato de bactéria com antígeno deve ser recomendada na técnica para diferenciação e identificação - de bactérias através de reações serológicas. Esses dados concordam com aquêles obtidos por LUCAS e GROGAN (1969-a,b) que estudaram o efeito do tratamento térmico e químico sôbre os componentes antigênicos de Pseudomonas lacrymans (Smith e Br.) Carsner, provando a estabilidade dêsses componentes antigênicos específicos.

Os estudos realizados por diversos pesquisadores, investigando diferentes aspectos sôbre a sistemática do gênero Xanthomonas, demonstraram que a classificação e identificação de espécies parece ser bastante difícil e complexa. ELROD e BRAUM (1947-a,b,c) baseadas em técnicas serológicas, dividiram o gênero Xanthomonas em 5 serotipos, no entanto - os resultados obtidos pelos referidos autores sugerem que as quantidades de antígenos e antissôros não foram ajustadas convenientemente. FANG e col. (1950) usando técnica de absorção, demonstraram a possibilidade de se separar serologicamente, dentro do grupo X. translucens, a maioria de suas formas especiais determinadas em base de patogenicidade em hospedeiros diferenciais. Os mesmos autores, quando empregaram técnicas bioquímicas, apenas conseguiram separação ao nível do gênero. Portanto, os dados obtidos no presente trabalho concordam plenamente com os dados obtidos - por Fang e col.

Nos estudos realizados com bacteriófagos por diversos pesquisadores os resultados obtidos também são variáveis. Para XC, OKABE (1961) provou a especificidade de um bacteriófago isolado desta bactéria. Por outro lado, SUT-

TON e col. (1958), STOLP e STARR (1964) e GOTO (1970), trabalhando com diferentes espécies de Xanthomonas demonstraram a existência de fagos polivalente para grande número de espécies desse gênero. Considerando-se os 2 bacteriófagos, Cp-1 e Cp-2, como específicos para XC, uma vez que até o momento não há qualquer prova em contrário, o resultado obtido no presente trabalho parece ter um valor significativo, quando levado em consideração, juntamente, com outras características obtidas.

Os testes de patogenicidade realizados demonstraram diferenças bem evidentes entre XC, BLG e agente da Cancrose B. WERNHAN (1948) defendeu o ponto de vista da "adoção" da patogenicidade como principal determinadora da espécie para bactérias fitopatogênicas. DYE (1958) refutando o trabalho de Wernhan demonstrou que diferentes espécies do gênero Xanthomonas, quando inoculadas sucessivamente em feijoeiro - (Phaseolus vulgaris L.) reproduziram sintomas muito semelhantes aos causados por X. phaseoli sojense. Por esta razão, o autor citado afirmou que a especificidade patogênica para o hospedeiro como meio de separação da espécie em bactérias fitopatogênicas não pode ser levada em consideração. Entretanto, KLEMENT e col. (1964) trabalhando com bactéria do gênero Pseudomonas, espécies patogênicas à plantas e saprófitas, demonstraram que as espécies fitopatogênicas reproduziram sintomas em plantas de fumo e exceto para o hospedeiro congênial, os sintomas produzidos pelas demais bactérias no hospedeiro não congênial foram provocados por reação de hipersensibilidade da planta. Razão pela qual os autores criticaram as conclusões apresentadas por Dye. Levando-se em consideração a prova da hipersensibilidade das plantas e refutação apresentada por KLEMENT e col. (1964) ao trabalho de Dye, a adoção da tese apresentada por Wernhan como um dos fatores na diferenciação das bactérias em questão parece ser bastan-

te razoável. A concordância dos resultados obtidos neste trabalho com aquêles obtidos por FANG e col. (1950) na separação serológica de formas especiais baseadas na patogenidade em hospedeiro reforça ainda mais êste ponto de vista.

Testes bioquímicos, efeito da temperatura, características culturais e morfológicas têm relativamente pequeno valor na separação das espécies ou formas especiais como - foi demonstrado no presente trabalho, assim como foram discutidos por STARR (1959) e STOLP e col. (1965) e demonstrados por HAGBORG (1942), FANG e col. (1950), COLWEL e LISTON (1961), GOTO (1962) e DYE (1962). Êstes dados, no entanto são importantes para a determinação do gênero. A grande - concordância na maioria das características estudadas no presente trabalho indica ser razoável considerar as bactérias XC e BLG como pertencentes a uma mesma espécie. A diferença entre os dois patógenos em questão é evidente, quando se leva em consideração a patogenidade, componentes antigênicos específicos e suscetibilidade ou não para bacteriófagos tidos como específicos. Assim sendo, é óbvia, a necessidade de se classificá-los distintamente. A classificação das espécies do gênero Xanthomonas é bastante discutida por diversos taxonomistas e a tendência atual é reduzir ao máximo o número de espécies, uma vez que as pesquisas demonstrem a sua homogeneidade. Sendo assim, provavelmente, dentro de um curto período de tempo, o sistema de classificação do gênero Xanthomonas, como também para outros gêneros de bactérias fitopatogênicas poderá sofrer uma mudança radical.

STOLP e col. (1965) sugeriram a designação de "patotipo" em lugar de "formas especiais", quando se verifica a variação dentro de uma espécie bacteriana fitopatogênica. Entretanto, essa denominação ainda não está sendo adotada -

por especialistas, e por esta razão, parece mais recomendável empregar o termo "forma specialis", pelo menos, até que se estabeleça uma sistemática moderna. No presente trabalho, uma vez demonstrada a evidência de diferença entre XC, agente causal do Cancro Cítrico e BLG, agente causal da CLG ao nível intra-específico, acredita-se que esta última merece uma nova denominação para diferenciá-la de XC, agente causal da Cancrose A. Em pomares, BLG tem mostrado sintomas somente em limoeiro Galego, e, nas inoculações em estufas tem reproduzidos sintomas típicos nesta variedade e não típicos em outras variedades de Citrus aurantifolia e também em C. limon. Levando-se em consideração a espécie do limoeiro Galego, que se mostra muito mais suscetível, propõe-se a denominação Xanthomonas citri (Hasse) Dow. n. f. sp. aurantifolia para BLG.

oooo000oooo

6. CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho permitiram tirar as seguintes conclusões:

1. Quando XC, agente causal do Cancro Cítrico ou Cancrose A, foi inoculada através de ferimentos, as diferentes espécies e variedades cítricas não mostraram diferenças marcantes quanto à suscetibilidade.

2. A BLG, quando inoculada por ferimentos produz sintomas severos em limoeiro Galego e sintomas bastante brandos em lima da Pérsia, limão Tahiti, limão Eureka e limão Siciliano.

3. Quando BLG é inoculada sem ferimentos, a reprodução de sintomas em limoeiro Galego é bastante demorada, além do número de lesões ser bastante reduzido.

4. Os testes serológicos de dupla difusão em ágar, com reações cruzadas, evidenciaram componentes antigênicos específicos para XC e BLG.

5. Os testes serológicos de dupla difusão em ágar com absorção, assim como precipitação em tubos com absorção, revelaram componentes antigênicos específicos para XC e BLG.

6. X. carotae e X. manihotis possuem alguns componentes antigênicos comuns a XC e BLG.

7. A BLG pertence à mesma espécie que XC, porém difere da mesma ao nível intra-específico, portanto, é sugerida a denominação Xanthomonas citri (Hasse) Dow. n. f. sp. aurantifolia.

7. RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade o estudo comparativo entre o agente causal do Cancro Cítrico, Xanthomonas citri (Hasse) Dow. e o agente causal de uma cancrose que ocorre somente em limoeiro Galego em pomares, muitas vezes, constituídos de diferentes variedades ou espécies cítricas.

Em condições naturais, a sintomatologia apresentada pelas duas bactérias em limoeiro Galego é muito semelhante, conseqüentemente, ela não serve como base para separação segura das bactérias em questão. Por essa razão, no que se refere ao método de controle, as medidas pertinentes ao plano de erradicação do Cancro Cítrico eram discriminadamente aplicadas a qualquer caso de ocorrência de cancroses em citros. Este fato trouxe uma série de problemas e tornou indispensável o esclarecimento da natureza do agente causal da Cancrose do limoeiro Galego (CLG).

Os estudos comparativos visando a identificação da bactéria da Cancrose do limoeiro Galego (BLG), foram feitos através de exames morfológicos, testes em meios diferenciais, testes com bacteriófagos tidos como específicos para XC, testes de patogenicidade e testes serológicos. Nos testes serológicos foram incluídos os isolamentos de agente da Cancrose B, X. carotae, X. manihotis, X. phaseoli f, fuscans, X. vesicatoria e P. solanacearum, a fim de se obter informações sobre a relação antigênica existente entre as bactérias testadas.

Os testes diferenciais em meios de cultura, juntamente com os exames morfológicos demonstraram que BLG pertence ao gênero Xanthomonas. Estudos realizados com os bac

teriófagos Cp-1 e Cp-2 indicaram que a maioria dos isolamentos de XC testados são lisados por Cp-2, apenas um por Cp-1 e outros poucos imunes a ambos, enquanto que para os isolamentos de BLG, assim como agente da Cancrose B não foi observada formação de placas de lise.

Os testes de patogenicidade realizados demonstraram que XC e a suposta agente causal da Cancrose B produzem sintomas em tôdas as 15 variedades cítricas testadas, embora o isolamento causador da Cancrose B, apresentasse um comportamento diferente em certas variedades. Por outro lado, BLG teve um comportamento diferente, sendo bastante patogênica para limão Galego e pouco patogênico para lima da Pérsia, limão Tahiti, limão Euraka e limão Siciliano, em inoculações com ferimentos, como também não produziu sintomas em outras variedades cítricas testadas, apesar de inoculações sucessivas. Portanto, do ponto de vista da patogenicidade, a BLG é diferente tanto de XC como também do agente causal da Cancrose B. Quanto ao agente da Cancrose B, há necessidade de outros estudos para melhor conhecimento desse patógeno.

Os antissôros para XC e BLG obtidos mediante a inoculação em coelhos foram testados com as duas bactérias em questão, como também com os isolamentos de X. carotae, X. manihotis, X. phaseoli f: fuscans, X. vesicatoria e P. solanacearum. Foram obtidas reações positivas para ambos os antissôros quando testados com XC, BLG, X. carotae e X. manihotis. Nos testes homólogos, os títulos dos antissôros foram sempre bem mais elevados que nos testes heterólogos, porém este dado, independentemente, foi considerado insuficiente para separar bactérias que apresentam componentes antigênicos comuns. Os testes serológicos de dupla difusão em ágar cruzados, com absorção e de imunoeletroforese permitiram a demonstrar que a BLG é bem diferente de XC.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que BLG, em muitas características pouco difere de XC e levando-se em consideração a tendência geral dos taxonomistas modernos, isto é, de reduzir ao máximo o número de espécies quando possível, acredita-se que não há razão para considerar bactéria em questão como uma espécie nova. Porém, os diferentes testes demonstraram haver diferença patente ao nível intra-específico. Assim sendo, sugere-se que seja considerada como uma forma especial de XC com a designação de Xanthomonas citri (Hasse) Dow. n. f. sp. aurantifolia para BLG.

oooo00oooo

8. SUMMARY

This work presents comparative studies between Xanthomonas citri (Hasse) Dow., causal agent of citrus canker and a bacterium (BLG) causing canker only on Mexican lime in field conditions.

Studies through morphology, pathology and serology were performed. Lysogenicity for bacteriophages Cp-1 and Cp-2 specific to X. citri, was also studied and in serological investigation isolates of causal agent of canker B of citrus, X. carotae, X. manihotis, X. phaseoli f. fuscans, X. vesicatoria and P. solanacearum were included in order to obtain data on antigenic specificity.

Results of morphological and physiological tests demonstrated that BLG also belongs to the genus Xanthomonas. Most isolates of X. citri were lysed by Cp-2, only one by Cp-1 and few other proved to be immune to both phages. Isolates of BLG and bacterium causal agent of canker B (from Argentina), never were lysed by these bacteriophages.

Pathogenic tests, using fifteen varieties of citrus plants, showed that X. citri and bacterium causal agent of canker B produce symptoms of all varieties tested, but the latter comported differently in pathogenicity on some citrus varieties. Pathogenicity of BLG was completely different, it showed itself highly pathogenic on Mexican lime with the production of typical symptoms of canker. It was slightly pathogenic on Persia lime, Tahiti lime, Eureka and Sicilian lemon in inoculating wounded leaves. It never produced symptoms on other citrus varieties tested. So, from

its pathogenicity, it is possible to distinguish BLG from X. citri and pathogen of cancrosi B. Antisera obtained from X. citri and BLG were tested against listed bacteria and positive reaction were varified also to X. carotae and X. manihotis (heterologous reaction). Cross reactions in agglutination, gel diffusion, absorption and immunoelectrophoresis tests permitted to determine specific antigenicity of X. citri and BLG. Therefore it was concluded that BLG is different from X. citri at special form level.

In considering general trend of modern taxonomists in reducing the number of species as much as possible, in the present case BLG can be considered a special form of X. citri and the name Xanthomonas citri (Hasse) Dow. n. f. sp. aurantifolia, is suggested.

oooo000oooo

9. LITERATURA CITADA

- BALL, E.M. - 1961 - Serological tests of the identification of plant viruses. Committee on Plant Virology. American Phytopath. Soc.
- BITANCOURT, A.A. - 1957 - O cancro cítrico. O Biológico, 23: 101-111.
- BREED, S.R., E.G.D. MURRAY e A. RITCHES - 1957 - Bergys Manual of determinative bacteriology. Baltimore. The Williams & Wilkins Co. 1529 pp., pg. 156.
- COLWEL, R.R. e J. LISTON - 1961 - Taxonomic analysis with the electronic computer of some Xanthomonas and Pseudomonas species. Can. J. Microbiol., 4:493-497.
- DU CHARME, E.P. - 1950 - La causa de la cancrrosis del limon. Informativo de investigaciones Agrícolas (IDIA) Argentina, 3(33-34):27-28.
- - - - 1951 - Cancrosis B of lemons. Citrus magazine, 13:18-20.
- DYE, D.W. - 1958 - Host specificity in Xanthomonas. Nature, 182: 1813-1814.
- - - - 1962 - The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of Xanthomonas spp. N. Z. J. Sci., 5:399-416.
- EISENSTARK, A. e L.B. BERNSTEIN - 1955 - Specificity of bacteriophages on Xanthomonas pruni. Phytopathology, 45:

596-598.

ELROD, R.P. e A.C. BRAUN - 1947-a - Serological studies of the Xanthomonas. I-Cross-agglutination relationships. J. Bact., 53:509-518.

-----, ---. - ---.----- - 1947-b - Serological studies of the Xanthomonas. II- X. translucens group. J. Bact., 53:519-524.

-----, ---. - ---.----- - 1947-c - Serological studies of the genus Xanthomonas. III- X. vascularum and X. phaseoli groups the intermediate position of X. campestris. J. Bact., 54:349-357.

FANG, C.T., O.N. ALLEN, A. RIKER e J.G. DIKSON - 1950 - The pathogenic, physiological and serological reactions of the four species of Xanthomonas translucens. - Phytopathology, 40:44-64.

FAWCETT, H.S. - 1936 - Citrus diseases and their control. Mc Graw-Hill Book Co. New York & London, 656 pp. pg. 245 (False canker).

-----, ---. e A.A. BITANCOURT - 1940 - Observações sôbre as doenças dos citrus no Paraguai. O Biológico, 6: 289-296.

FOGUET, J.L. - 1967 - Cancrosis del limonero. Est. Exp. Agr. de Tucuman, Boletin N°106: 6 pp.

FULTON, R.W. - 1950 - Bacteriophages attacking Pseudomonas tabaci and P. angulatum. Phytopathology, 40:936-949.

- GOLDSWORTHY, M.C. - 1928 - The production of agglutinins by phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 18:277-288.
- GOTO, M. - 1962 - Studies on citrus canker. *Bull. of Faculty of Agr. of Shizuoka University*, N° 12:72pp.
- , -- - 1970 - Variation of Xanthomonas, pathogenicity and relation of susceptibility for phages. *Annals of Phytopath. Soc. of Japan*, 36:171.
- GOTUZZO, E.A. e L.A.ROSSI - 1967 - Cancrosis de los citros. *Rev. Invests Agrops, INTA. Patologia Vegetal*, 6: 69-81.
- HAGBORG, W.A.F. - 1942 - Classification revision in Xanthomonas translucens (J.J. & R.) Dows. *Can. J. Research(C)*, 20:312-326.
- HASSE, C.H. - 1915 - Pseudomonas citri, the cause of citrus canker. *Jour. Agr. Res.*, 4:97-100.
- KATZNELSON, H. e M.D.SUTTON - 1951 - Rapid phage plaque count method for the detection of bacteria applied to the demonstration of internally borne infection of seed. *J. Bact*, 61:689-701.
- , --, ----- - 1953 - Bacteriophage in relation to Xanthomonas translucens. *Can. J. Bot.*, 31: 725-729.
- , --, ----- e S.T.BAYLEY - 1954 - The use of bacteriophage of Xanthomonas phaseoli in detecting

infection in beans, with observations on its growth and morphology. Can. J. Microbiol., 1:22-29.

KLEMENT, Z., G.L.FARKAS e L.LOVREKOVICH - 1964 - Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54:474-477.

-----, --, e R.N.COODMAN - 1967 - The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Ann.Rev. Phytopathology, 5:17-44.

KOIZUMI, M. - 1966 - Method for inoculation of Xanthomonas citri. Annals of Phytopath. Soc. of Japan, 32: 299-300.

-----, --, S.YAMAMOTO e S.YAMADA - 1966-a - Ecological studies on citrus canker cause by Xanthomonas citri. I. Some ecological studies on bacteriophages of caused Bacterium in lesions of various citrus leaves. Bull. Hort. Res. Sta., Japan, Ser. -B, Nº 5: 105-117.

-----, --, --, ----- - ----- - 1966-b - Studies on citrus canker. Ann. Rep. Res. of Okitsu Branch Hort. Res. Sta. Bull. Nº 2:21-23.

-----, --, e S.YAMADA - 1969 - Studies on citrus canker. Ann. Rep. Res. of Okitsu Branch Hort. Res. Sta., Bull., Nº 5:24-34.

LINK, G.K.K. e C.G.SHARP - 1927 - Correlation of host and serological specificity Bacterium campestre, B. flacuncifaciens, B. phaseoli and B. phaseoli sojense.

Bot. Gaz., 83:145-160.

LINK, G.K.K. e A. De S. LINK - 1928 - Further agglutination tests with bacterial plant pathogens. Bot. Gaz., 85: 178-197.

-----, ----, A.E. EDGECOMBE e J. GODKIN - 1929 - Further agglutination tests with phytopathogenic bacteria. Bot. Gaz., 87:531-547.

LOUCKS, K.W. - 1930 - Some physiological studies of Phytomonas citri. Jour. Agr. Res., 41:247-258.

LUCAS, L.T. e R.G. GROGAN - 1969-a - Serological variation and identification of Pseudomonas lacrymans and other phytopathogenic Pseudomonas nomenspecies. Phytopathology, 59:1908-1912.

-----, ---- - ---- - 1969-b - Some properties of specific antigens of Pseudomonas lacrymans and other Pseudomonas nomenspecies. Phytopathology, 59:1913-1917.

Mc LEAN, F.T. - 1921 - A study of the structure of the stomata of two species of citrus in relation to citrus canker. Bull. Torr. Bot. Club., 48:101-106.

MATSUMOTO, T. e N. OKABE - 1937 - Preliminary note on the bacteriophage for Bacterium citri (Hesse) Doidge. Agric. Hort. (Japan), 12:2055-2059 (in RAM-17:25).

MORTON, D.J. - 1965 - Comparison of three serological procedure for identifying Xanthomonas vasicatoria in pepper leaves. Phytopathology, 55:421-424.

- MUSHIN,R., J.NAYLOR e N.NAHOVARY - 1959 - Studies on plant pathogenic bacteria, II, Serology. Aust. J. Biol. Sci., 12:233-246.
- OKABE,N. - 1932 - Bacterial diseases of plants occurring in Formosa I. Jour. Soc. Trop. Agric., 4:470-483.
- ,-. - 1961 - Papers in commemoration of Dr. Matsumoto for his thirty years of service as Prof. of plant pathology. National Taiwan Univ. pp.61-73.
- OLIVEIRA,A.R. - 1967 - Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel de pimentão. Tese de Doutorado. 40 pp.
- OUCHTERLONY,D. - 1949 - Antigen-antibody reaction in gels. Ark. Kemi. Min. Geol. 26-b, 14.
- ,-. - 1958 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In Progress in Allergy. S. Karger, Basel, New York., 5:1-78.
- ,-. - 1962 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In Progress in Allergy. S. Karger, Basel, New York 6:30-154.
- PELTIER,G.L. - 1920 - Influence of temperature and humidity on the growth of Pseudomonas citri and its host plants and on infection and development of the disease. Jour. Agr. Res., 20:447-506.
- PELTIER,L.P., C.E.GEORGI e L.F.LINDGREE - 1959 - Laboratory Manual for general bacteriology. N.Y., London, -

Sidney. John Wiley & Sons Inc., pp. 159-160.

PETTER, A. A. e M. L. HUNT - 1966 - Serological relationships between Agrobacterium tumefaciens, Echerichia coli - and E. mutabilis. *Phytopathology*, 56:145 (Abst.)

ROSSETTI, V., J. T. NAKADAIRA e R. CALZA - 1965 - Observações sobre as doenças dos citros no litoral da Argentina e Uruguai. *O Biológico*, 31:203-215.

SLOGTEREN, D. H. M. van - 1955 - Serological micro reactions - with plant viruses under parafin oil. *Proc. of Potato virus Diseases*. Lisse - Wageningen pp. 51-54.

SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS - 1957 - Manual of microbiological methods. N.Y. Mc Graw Hill Book Co. pp. 315.

STARR, M. P. - 1959 - Bacteria as plant pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.*, 13:211-238.

STEVENS, H. E. - 1915 - Citrus canker - III - Fla. Agr. Exp. Sta. Bull., 128:3-20.

STOLP, H. e M. P. STARR - 1964 - Bacteriophage reactions and speciation of phytopathogenic Xanthomonas. *Phytopathology Z.*, 51:442-478.

-----, M. P. STARR e N. L. BAIGENT - 1965 - Problems of phytopathogenic Pseudomonas and Xanthomonas. *Ann. Rev. Phytopathology*, 3:231-264.

SUTTON, M. D., H. KATZNELSON e C. QUADLING - 1958 - A bacteriophage that attacks numerous phytopathogenic Xantho

monas species. Can. J. Microbiol., 4:493-497.

UPPAL, B.N. - 1933 - Appendix 50, Summary of work done under the plant pathologists to Government, Bombay Presidency, Poora, for years 1930-32. (in RAM - 12:551).

WAKIMOTO, S. - 1961 - Bacteriophage of Xanthomonas citri. - Bull. National Res. Inst. Dept. of Plant Pathol., 14:49-51.

-----, S. - 1963 - Bacteriophage Cp-1, Cp-1a and Cp-2 of Xanthomonas citri. Bull. Japan Agric. Pathol., 28:74.

-----, S. - 1967 - Some characteristics of citrus canker bacteria, Xanthomonas citri (Hasse) Dow. and the related phages isolated from Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan., 33:301-310.

WERNHAN, C.C. - 1948 - The species value of pathogenicity in the genus Xanthomonas. Phytopathology, 38:283-291.

WOLF, F. - 1916 - Citrus canker. Jour. Agr. Res., 4:69-99.

ZEMAN, V. - 1934 - La producción citricola. Estudio sobre las enfermedades que afectan a los naranjales de la Provincia de Corrientes. El Liberal (Corrientes) - Junio de 1934 - 3 pp. datilografadas.