

Agressividade de Linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em Lima Ácida ‘Galego’*

Letícia A. S. Nociti^{1**}, Margarete Camargo¹, Júlio Rodrigues Neto², Fabrício J. B. Francischini³ & José Belasque Júnior⁴

¹Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP; ²Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto Biológico, CEP 13094-430, Campinas, SP, ³Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP; ⁴Departamento Científico, Fundecitrus, Cx. Postal 391, CEP 14801-970, Araraquara, SP, e-mail: belasque@fundecitrus.com.br

(Aceito para publicação em 08/02/2006)

Autor para correspondência: José Belasque Júnior

NOCITI, L.A.S., CAMARGO M., RODRIGUES NETO, J., FRANCISCHINI, F.J.B. & BELASQUE JÚNIOR J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ácida ‘Galego’. Fitopatologia Brasileira 31:140-146. 2006.

RESUMO

O presente trabalho objetivou gerar informações referentes à agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C (Xaa-C), produtoras (PP) e não produtoras de pigmento (NP) escuro em meio de cultura, comparativamente a *X. axonopodis* pv. *citri* Tipo A (Xac). Os tratamentos foram formados por 14 linhagens, sendo sete de Xaa-C PP, cinco Xaa-C NP, e duas linhagens de Xac. As linhagens foram inoculadas através de ferimentos, em folhas de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* Swingle), com agulha previamente mergulhada em uma suspensão de células bacterianas (10^7 UFC/mL). Foram realizadas dez repetições para cada tratamento, representadas por uma planta cada. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o experimento. As linhagens diferiram entre si quanto ao período de incubação, diâmetro e populações bacterianas das lesões e, comparativamente, Xaa-C NP mostraram-se mais agressivas do que Xaa-C PP. Algumas linhagens induziram sintomas que diferiram quanto à presença e extensão de anasarca, halo amarelo e saliência do tecido necrosado.

Palavras-chave adicionais: cancro cítrico, patogenicidade, interação patógeno-hospedeiro.

ABSTRACT

Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Type C strains in ‘Mexican’ Lime

The purpose of this research was to provide the information about the aggressiveness of strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* – strains C (Xaa-C), producer (PP) or not of dark pigment (NP) in culture medium in comparison with *X. axonopodis* pv. *citri* – strains A (Xac). A total of 14 strains were inoculated by needle wounds in ‘Mexican’ Lime (*Citrus aurantifolia*) leaves, with bacterial cell suspension (10^7 CFU/mL): seven were Xaa-C PP, five were not producers and two were Xac strains. Ten replications of one plant each were used in each treatment. The plants were kept in greenhouse during the experiment. The strains differed on incubation period, lesion size and population growth. Xaa NP was more aggressive than PP. Symptoms induced by some strains varied in terms of water-soaked, chlorotic halos and necrosis.

Additional keywords: citrus canker, pathogenicity, host-pathogen interaction.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa-C) agente causal da cancriose da lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* Swingle) ou cancriose C, foi observada primeiramente em 1963 em algumas regiões do Estado de São Paulo por Namekata (1971), induzindo sintomas hiperplásticos, semelhantes aos de cancro cítrico Asiático causado por *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac), tais como lesões

salientes, corticosas, pardacentas, circundadas muitas vezes por halo amarelo na superfície de ramos, folhas e frutos (Civerolo, 1994; Stall & Civerolo, 1991). Xaa-C é considerada patogênica apenas à lima ácida ‘Galego’, induzindo reação de hipersensibilidade quando inoculada em folhas de outras espécies cítricas (Malavolta Júnior *et al.*, 1987). Atualmente, a ocorrência de Xaa-C está restrita a alguns municípios do Estado de São Paulo, não causando danos economicamente significativos.

Recentemente, Destéfano & Rodrigues Neto (2001) detectaram linhagens de Xaa-C produtoras de pigmento escuro (provavelmente melanina) em meio de cultura artificial. A produção de pigmento escuro tem sido observada

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal SP. 2005.

**Bolsista CNPq

em algumas espécies e patovares do gênero *Xanthomonas*, como por exemplo *X. axonopodis* pv. *bauhiniae*, pv. *ricini*, pv. *punicae* e pv. *phaseoli*, e *X. campestris* pv. *laureliae* (Swings *et al.* 1993). De acordo com Gilbertson *et al.* (1990), a produção de pigmento escuro em fitobactérias pode representar fatores diferenciais como sobrevivência em condições adversas, na resposta ou inibição de substâncias produzidas por microrganismos antagonistas ou ainda como proteção contra mecanismos de defesa das plantas.

Em relação à patogenicidade, Ekpo & Saettler (1976) avaliaram a agressividade de linhagens de *X. phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans* (produtoras de pigmento escuro) em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., concluindo que as linhagens produtoras de pigmento escuro foram mais agressivas. O mesmo comportamento foi observado por Schuster & Coyne (1981).

Outros estudos têm demonstrado que linhagens de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* produtoras e não produtoras de pigmento podem formar grupos distintos com variabilidade sorológica (Marangoni *et al.*, 1994; Oleas-Arias, 1982) e variações nos perfis gerados por PCR (Halfeld-Vieira *et al.*, 2001) e RAPD (Birch *et al.*, 1997). Com relação às linhagens de Xaa-C produtoras e não produtoras de pigmento, os estudos iniciais realizados com 20 linhagens (Destéfano & Rodrigues Neto, 2001) revelaram uniformidade entre as linhagens por meio de caracterização molecular baseada no polimorfismo da região espaçadora 16S-23S, e, aparentemente, não mostraram diferenças em patogenicidade à lima ácida 'Galego'.

Considerando a inexistência de informações a respeito da agressividade de linhagens de Xaa-C produtoras e não produtoras de pigmento escuro em meio de cultura, o presente trabalho teve como objetivo comparar a agressividade entre estas linhagens.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas bacterianas e preparo do inóculo

Sete linhagens de Xaa-C produtoras de pigmento (PP), cinco não produtoras de pigmento (NP) obtidas junto à coleção IBSBF¹ e incorporadas ao acervo da Coleção de Culturas do Fundo de Defesa da Citricultura [Fundecitrus] (Tabela1) foram reativadas em meio de cultura nutriente-água [NA] (extrato de carne, 3g; peptona, 5g; cloreto de sódio, 5g; ágar 15 g/L de água; pH 7,0) e incubadas a 28 °C durante 48 h.

Em seguida, foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada e a concentração ajustada para 3,4 x 10⁸ UFC/mL (51% de transmitância a 480 nm em espectrofotômetro), sendo efetuadas diluições seriadas para obtenção da concentração final de 10⁷ UFC/mL. Duas linhagens de Xac (FDC 738 e 075) foram incluídas nos testes a título de comparação.

TABELA 1 - Relação das linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Tipo C) e pv. *citri* (Xac-A)

Código de Acesso		Origem	Ano do Isolamento
IBSBF	FDC		
417	867	Votuporanga -SP	1982
1479	535*	José Bonifácio -SP	2000
1473	536*	Santa Rita D'Oeste -SP	1999
1481	537*	José Bonifácio -SP	2000
1683	578	Promissão -SP	2001
1472	725*	Santa Rita D'Oeste -SP	1999
1496	751*	Mesópolis -SP	2000
434	752	Ibirá-SP	1982
382	763	Américo de Campos -SP	1981
1497	766*	Mesópolis -SP	2000
1495	791*	Mesópolis -SP	2000
1350	828	Ubarana -SP	1997
1382	738 Xac -A	Barbosa -SP	1997
1421	075 Xac -A	Casa Branca -SP	1998

* Produtoras de pigmento escuro em meio de cultura artificial (PP). IBSBF= Coleção de Culturas de Fitobactérias, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto Biológico, Campinas, SP.

FDC = Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP.

Avaliação da agressividade

As linhagens foram inoculadas em plantas de lima ácida 'Galego' mantidas em vasos e em casa de vegetação perfurando-se o limbo foliar com uma agulha de 0,56 mm de diâmetro mergulhada na suspensão bacteriana. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 14 tratamentos (linhagens) e 10 repetições representadas por uma planta cada. Foram inoculadas 12 folhas medianas/planta com seis ferimentos cada. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 h após a inoculação, sendo observadas diariamente quanto ao aparecimento de necrose no sítio de inoculação. Para determinação do período de incubação foi considerada como planta doente aquela com mais de 50% das folhas inoculadas com pelo menos um dos sítios de inoculação apresentando sintomas, sendo que o período de incubação para cada tratamento correspondeu a média do número de dias decorridos da inoculação até o aparecimento de sintomas em cada planta.

O diâmetro médio das lesões foi avaliado aos 22, 36, 51, 64, 83 e 94 dias após a inoculação (DAI). Em cada data de avaliação mensurou-se os diâmetros de seis lesões/folha, tendo sido avaliada uma folha por planta, com utilização de micrômetro. Mensurou-se sempre a mesma folha para avaliar a evolução do diâmetro da lesão. A presença de halo amarelo ao redor da necrose foi desconsiderada nas avaliações de diâmetro.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada com os dados de diâmetro médio pela integração trapezoidal:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

¹IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto Biológico, Campinas, SP.

sendo X o diâmetro da lesão, em milímetros, t o tempo, em dias, e n o número de dados existentes.

Avaliação da população bacteriana nas lesões

De cada planta foi selecionada uma folha e retirado um pedaço de tecido com lesão com auxílio de um cortador com 5,35 mm de diâmetro aos 22, 36, 51, 64, 83 e 94 dias após a inoculação. Imediatamente após o corte, os tecidos contendo as lesões foram colocados em 1,0 mL de água destilada esterilizada e deixados em repouso durante 18 h a 4 °C. A suspensão resultante foi diluída em série e semeada em NA, sendo realizadas três repetições para cada diluição, e as placas mantidas a 28 °C. Após 48 h procedeu-se a contagem do número de colônias típicas de *Xanthomonas*.

Análise Estatística

Os resultados de período de incubação, diâmetro médio das lesões em cada data de avaliação e AACPD foram analisados pelo programa ESTAT- Sistema para Análises Estatísticas (Pólo Computacional/ Depto. de Ciências Exatas, Unesp- FCAV- Campus de Jaboticabal) e submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizando-se os dados de diâmetro médio de cada linhagem, foram ajustadas retas por regressão linear e estas comparadas entre si, duas a duas, quanto a coincidência de retas (teste F) e ao coeficiente angular (b) (teste t). Todas as linhagens foram comparadas entre si por contrastes, estabelecidos com os dados do período de incubação, diâmetro das lesões e AACPD.

Sintomatologia

As linhagens foram comparadas com relação a indução de sintomas em plantas de lima ácida 'Galego', sendo as diferenças observadas visualmente aos 94 dias após a inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as linhagens de Xaa-C e Xac induziram sintomas típicos de cancriose. O período médio de incubação foi diferente entre as linhagens com os sintomas tornando-se visíveis entre 9,1 e 17,3 DAI (Figura 1). As duas linhagens de Xac (FDC-738 e 075) induziram sintomas típicos aos 9,1 dias após a inoculação diferindo estatisticamente de todas as demais linhagens de Xaa-C, que induziram sintomas entre 15 e 17,3 dias. Estes resultados diferem dos obtidos por Malavolta Júnior *et al.* (1987) que observaram período de incubação de seis a nove dias para Xaa-C e de quatro a cinco dias para Xac. Essas diferenças podem ser atribuídas ao método de inoculação (infiltração), condições ambientais e concentrações bacterianas utilizadas nos testes. Foram observadas diferenças entre as linhagens de Xaa-C, sendo que as linhagens FDC 751 e 536 PP induziram sintomas aos 15,2 DAI, com o menor período entre as linhagens de Xaa-C e diferindo estatisticamente das linhagens FDC 578, 791, 766 e 537. A linhagem FDC 766 PP induziu sintomas

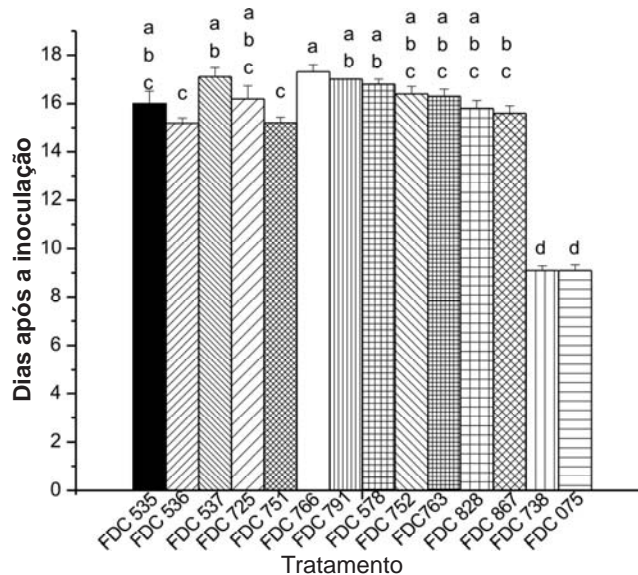


FIG. 1 - Número de dias entre a inoculação de plantas de lima ácida 'Galego' com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (FDC 535, 536, 537, 725, 751, 766, 791, 578, 752, 763, 828 e 867) e pv. *citri* (FDC 738 e 075) e o aparecimento de lesões. Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

aos 17,3 DAI, apresentando o maior período incubação e diferindo da linhagem FDC 867 NP que induziu sintomas aos 15,6 DAI. As demais linhagens de Xaa-C apresentaram período de incubação intermediário entre 15,8 e 16,4 DAI, não diferindo significativamente entre si e dos tratamentos com menores e maiores períodos de incubação.

Durante o período de avaliação do experimento (94 dias), as lesões evoluíram continuamente (Figura 2). Os diâmetros médios das lesões variaram de 1,28 a 5,15 mm, entretanto, as lesões induzidas pelas duas linhagens de Xac foram superiores aos observados nos demais tratamentos. Os diâmetros das lesões causadas pelas linhagens de Xaa-C PP foram inferiores aos observados para as linhagens NP. Os diâmetros médios das lesões diferiram significativamente pelo teste de comparação de médias (Tukey, 5%) aos 22, 36, 51, 64, 83 e 94 DAI. As duas linhagens de Xac (FDC 075 e 738) diferiram das demais linhagens de Xaa-C, entretanto aos 22 DAI a linhagem FDC 738 não diferiu das linhagens de Xaa-C FDC 536 PP, 763 NP, 828 NP e 867 NP. Entre as linhagens de Xaa-C foram observadas diferenças nos diâmetros em todas as avaliações, sendo que a linhagem 537 PP foi a que apresentou menor diâmetro médio aos 22, 36, 51, 64, 83 e 94 DAI (Tabela 2).

Com relação a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) observou-se que as linhagens de Xac apresentaram os maiores valores diferindo significativamente das linhagens de Xaa-C (Figura 3). Entre as linhagens de Xaa-C maiores valores foram observados para as linhagens não produtoras de pigmento FDC 763, 828 e 867. O menor valor observado de AACPD foi para as linhagens produtoras

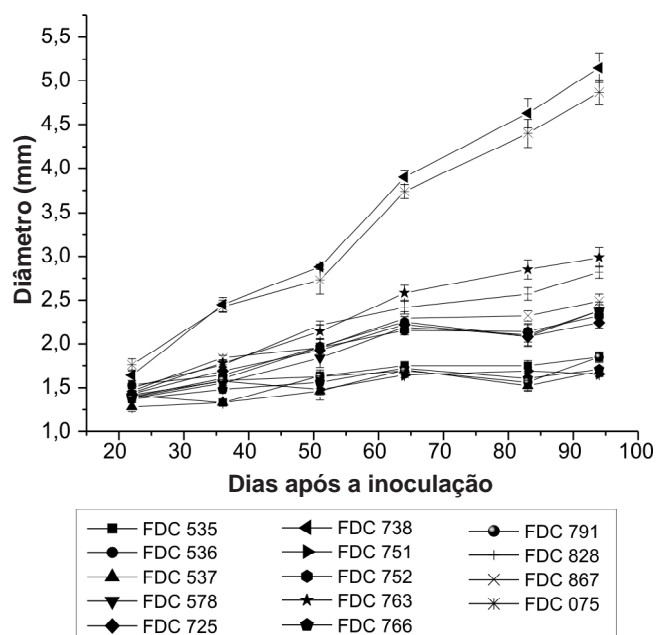


FIG. 2 - Diâmetro médio das lesões (mm) em folhas de plantas de lima ácida 'Galego' inoculadas com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (FDC 535, 536, 537, 725, 751, 766, 791, 578, 752, 763, 828 e 867) e pv. *citri* (FDC 738 e 075).

de pigmento FDC 535, 537, 751, 766 e 791 que diferiram significativamente das demais linhagens. As linhagens FDC 536 PP, 725 PP, 578 NP e 752 NP apresentaram valores intermediários e não diferiram entre si, porém, diferiram significativamente da linhagem FDC 763 NP e das linhagens com menores valores de AACPD.

Com os dados de diâmetro médio de cada linhagem foram ajustadas retas por regressão linear, uma para cada tratamento, e estas foram comparadas entre si quanto a coincidência das retas e o coeficiente angular (b). Dentre os tratamentos, apenas para a linhagem FDC 791 não foi possível o ajuste de uma equação linear (F não significativo a 5%). Os menores valores de coeficientes angulares (b) foram observados nas linhagens FDC 535, 537, 751, 766 e 791, enquanto que os maiores ocorreram para FDC 536, 725, 578, 752, 763, 828, 867, 738 e 075 (Tabela 3).

No teste de coincidência das retas verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4), sendo possível observar quais linhagens apresentaram desenvolvimentos diferentes de lesões (em diâmetro) ao longo do tempo considerando-se os parâmetros a e b . As linhagens que mais diferiram nas comparações foram FDC 738 e 075 (Xac), as quais apresentaram os menores valores de a (0,5974 e 0,7769, respectivamente) e maiores de b (0,0488 e 0,0437, respectivamente) e as FDC 763 e 828 que apresentaram valores intermediários para a (1,0053 e 1,1705, respectivamente) e b (0,0179 e 0,0221, respectivamente).

Pelos valores do teste t verificou-se que as linhagens diferiram entre si quanto a taxa de incremento da doença durante todo o período de avaliação (Tabela 5). As linhagens FDC 763, 738 e 075 foram as que apresentaram o maior número de diferenças significativas (12) em relação as demais linhagens. Estas linhagens possuem os maiores valores de b (0,0221, 0,0488 e 0,0437, respectivamente) entre todos os tratamentos (Tabela 3). A linhagem FDC 725 apresentou o menor número de diferenças significativas (cinco) em relação as demais linhagens.

A população bacteriana nas lesões de Xac apresentou-

TABELA 2 - Diâmetro médio de lesões (mm) causadas por linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pvs. *aurantifolii* e *citri* (FDC 738 e 075) em folha de lima ácida 'Galego'

Linhagem m	Dias após a Inoculação					
	22	36	51	64	83	94
FDC 535 (PP)	1,41 cd	1,33 e	1,63 cdef	1,75 d	1,75 ef	1,85 ef
FDC 536 (PP)	1,53 bc	1,64 bcd	1,97 bc	2,25 c	2,08 de	2,38 d
FDC 537 (PP)	1,28 d	1,33 e	1,46 f	1,70 d	1,52 f	1,68 f
FDC 578 (NP)	1,38 cd	1,55 cde	1,84 bcdef	2,19 c	2,10 de	2,38 d
FDC 725 (PP)	1,43 cd	1,69 bcd	1,93 bcd	2,22 c	2,08 de	2,24 de
FDC 738 (Xac)	1,64 ab	2,45 a	2,88 a	3,90 a	4,63 a	5,15 a
FDC 751 (PP)	1,42 cd	1,57 cde	1,48 ef	1,64 d	1,69 ef	1,65 f
FDC 752 (NP)	1,40 cd	1,60 bcd	1,96 bc	2,15 c	2,14 cde	2,32 d
FDC 763 (NP)	1,44 bed	1,78 bc	2,14 b	2,58 b	2,85 b	2,99 b
FDC 766 (PP)	1,37 cd	1,48 de	1,56 def	1,72 d	1,60 f	1,71 f
FDC 791 (PP)	1,39 cd	1,58 cd	1,62 cdef	1,69 d	1,56 f	1,85 ef
FDC 828 (NP)	1,50 bc	1,76 bc	2,21 b	2,42 bc	2,57 bc	2,82 bc
FDC 867 (NP)	1,46 bcd	1,84 b	1,96 bcd	2,29 bc	2,32 cd	2,49 cd
FDC 075 (Xac)	1,76 a	2,43 a	2,73 a	3,74 a	4,40 a	4,87 a
F	8,35**	42,80**	26,52**	117,70**	102,88**	161,89**
C.V. (%)	9,12	9,59	13,48	8,98	12,86	10,50

PP - Produtora de pigmento em meio de cultura artificial; NP - Não Produtora de pigmento.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F.

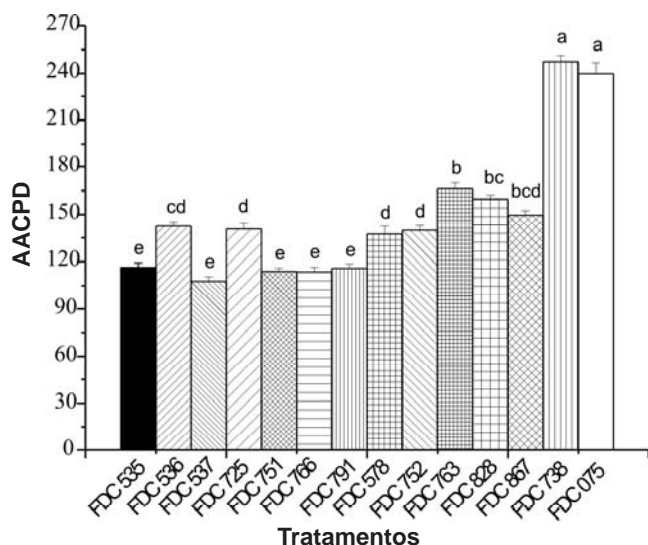


FIG. 3 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) calculada a partir dos diâmetros médios das lesões em folhas de plantas de lima ácida 'Galego' inoculadas com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (FDC 535, 536, 537, 725, 751, 766, 791, 578, 752, 763, 828 e 867) e *citri* (FDC 738 e 075).

Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

se crescente até aproximadamente 80 DAI, enquanto que nas lesões de Xaa-C a população bacteriana decresceu aos 30 DAI (Figura 4). Em todas as avaliações as populações de Xac foram superiores as de Xaa-C. Shiotani et al. (2000), comparando linhagens de Xac e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (patotipo B), observaram que as populações bacterianas nas lesões de Xaa-B nas espécies *Citrus grandis* Osbeck (pomelo 'Otachibana') e *Citrus sinensis* Osbeck (navel orange) decresceram a partir do terceiro DAI e a de Xac permaneceu em contínuo crescimento.

Quanto às diferenças na sintomatologia, as duas linhagens de Xac (FDC 075 e 738) induziram lesões com

TABELA 3 - Estimativas dos parâmetros (*a* e *b*) e coeficientes de correlação (R^2) das equações de regressão ajustadas aos valores médios de diâmetros de lesões em folhas de plantas de lima ácida 'Galego' inoculadas com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (FDC 535, 536, 537, 725, 751, 766, 791, 578, 752, 763, 828 e 867) e *citri* (FDC 738 e 075)

Linhagens	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2
FDC 535 (PP)	1,2166	0,0069	0,92*
FDC 536 (PP)	1,3207	0,0112	0,92*
FDC 537 (PP)	1,1848	0,0053	0,84*
FDC 725 (PP)	1,3164	0,0105	0,91*
FDC 751 (PP)	1,3851	0,0033	0,84*
FDC 766 (PP)	1,3278	0,0042	0,86*
FDC 791 (PP)	1,3627	0,0043	0,78 ^{ns}
FDC 578 (NP)	1,1231	0,0134	0,95**
FDC 752 (NP)	1,2059	0,0124	0,96**
FDC 763 (NP)	1,0053	0,0221	0,99**
FDC 828 (NP)	1,1705	0,0179	0,98*
FDC 867 (NP)	1,2818	0,0133	0,97**
FDC 738 (Xac)	0,5974	0,0488	0,99**
FDC 075 (Xac)	0,7769	0,0437	0,99**

ns indica não significativo, *significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F.

maior diâmetro, maior saliência, necrosadas e circundadas por halo amarelo em comparação a linhagem de Xaa-C [FDC 725] (Figura 5A). Neste aspecto, Gabriel (1988) menciona que linhagens de diferentes patovares geralmente induzem diferentes sintomas no mesmo hospedeiro. Entre as linhagens de Xaa-C, observou-se que a linhagem FDC 763 (NP) induziu necrose e anasarca pronunciadas com halo amarelo, enquanto que para a linhagem 828 NP foram observadas lesões sem saliência (lisa em ambas as faces), ausência de halo amarelo com anasarca bem pronunciada (Figura 5B), assemelhando-se aos sintomas induzidos por *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Schouties et al., 1987). Por outro lado, a linhagem FDC 536 PP induziu lesões com anasarca sem halo amarelo (Figura 5C).

Com base nos resultados obtidos pôde-se claramente

TABELA 4 - Valores do Teste F para coincidência entre as retas ajustadas aos valores médios de diâmetros de lesões causadas por linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pvs. *aurantifolii* e *citri* (FDC 738 e 075) em folha de lima ácida 'Galego'

	535 (PP)	536 (PP)	537 (PP)	725 (PP)	751 (PP)	766 (PP)	791 (PP)	578 (NP)	752 (NP)	763 (NP)	828 (NP)	867 (NP)	738 (Xac)
535 (PP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
536 (PP)	13,50**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
537 (PP)	2,64 ^{ns}	22,82**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
725 (PP)	10,28**	0,14 ^{ns}	18,67**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
751 (PP)	2,52 ^{ns}	23,04**	1,80 ^{ns}	18,34**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
766 (PP)	1,41 ^{ns}	20,56**	1,21 ^{ns}	16,30**	0,17 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-
791 (PP)	0,65 ^{ns}	14,35**	2,02 ^{ns}	11,16**	0,46 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-
578 (NP)	12,86**	0,59 ^{ns}	22,56**	0,45 ^{ns}	25,11**	21,54**	14,63**	-	-	-	-	-	-
752 (NP)	15,32**	0,24 ^{ns}	26,31**	0,18 ^{ns}	29,69**	25,34**	16,65**	0,12 ^{ns}	-	-	-	-	-
763 (NP)	101,46**	17,33**	120,15**	20,65**	167,07**	141,48**	96,74**	22,79**	24,83**	-	-	-	-
828 (NP)	67,18**	7,94*	84,91**	10,32**	111,19**	95,11**	65,03**	11,60**	12,04**	2,76 ^{ns}	-	-	-
867 (NP)	31,37**	0,91 ^{ns}	45,65**	1,84 ^{ns}	54,33**	46,84**	31,48**	2,40 ^{ns}	1,97 ^{ns}	14,36**	4,73*	-	-
738 (Xac)	441,38**	210,63**	456,83**	218,93**	561,60**	515,51**	418,89**	244,87**	262,44**	170,38**	196,62**	237,58**	-
075 (Xac)	304,27**	148,27**	323,13**	155,19**	376,84**	351,31**	293,85**	170,50**	180,13**	106,57**	126,57**	159,05**	1,82 ^{ns}

ns - não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste de F

TABELA 5 - Valores do Teste t para paralelismo entre as retas ajustadas aos valores médios de diâmetros de lesões causadas por linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pvs *aurantifolii* e *citri* (FDC 738 e 075) em folha de lima ácida 'Galego'

	535 (PP)	536 (PP)	537 (PP)	725 (PP)	751 (PP)	766 (PP)	791 (PP)	578 (NP)	752 (NP)	763 (NP)	828 (NP)	867 (NP)	738 (Xac)
535 (PP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
536 (PP)	1,51**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
537 (PP)	0,70 ^{ns}	1,99 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
725 (PP)	1,27 ^{ns}	0,19 ^{ns}	1,76 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
751 (PP)	2,02 ^{ns}	3,04*	1,03 ^{ns}	2,77*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
766 (PP)	1,38 ^{ns}	2,57*	0,52 ^{ns}	2,32 ^{ns}	0,59 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-
791 (PP)	1,14 ^{ns}	2,32 ^{ns}	0,41 ^{ns}	2,09 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-
578 (NP)	2,51*	0,70 ^{ns}	2,98*	0,90 ^{ns}	4,33**	3,75**	3,34*	-	-	-	-	-	-
752 (NP)	2,25 ^{ns}	0,40 ^{ns}	2,75*	0,60 ^{ns}	4,19**	3,56**	3,13*	0,36 ^{ns}	-	-	-	-	-
763 (NP)	7,01**	3,81**	7,23**	4,01**	10,04**	8,89**	7,63**	3,30**	3,91**	-	-	-	-
828 (NP)	4,88**	2,29 ^{ns}	5,24**	2,49*	7,44**	6,52**	5,64**	1,65 ^{ns}	2,14 ^{ns}	1,85 ^{ns}	-	-	-
867 (NP)	2,73*	0,71 ^{ns}	3,21*	0,92 ^{ns}	4,83**	4,13**	3,60**	0,03 ^{ns}	0,35 ^{ns}	3,66**	1,83 ^{ns}	-	-
738 (Xac)	14,85**	11,10**	14,78**	11,22**	17,50**	16,50**	15,09**	11,08**	11,84**	9,31**	10,59**	11,80**	-
075 (Xac)	11,75**	8,90**	11,85**	9,04**	13,78**	13,06**	12,14**	8,72**	9,31**	6,80**	8,02**	9,21**	1,40 ^{ns}

ns - não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste de F.

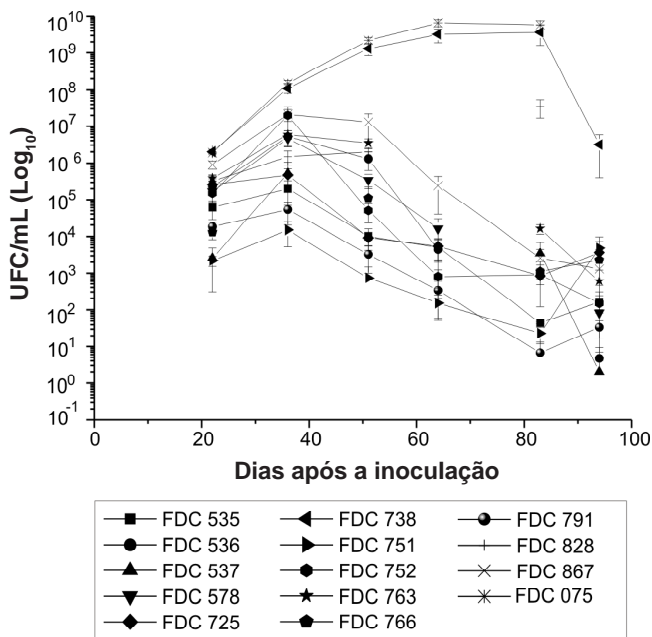


FIG. 4 - Avaliação populacional em lesões de folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (FDC 535, 536, 537, 725, 751, 766, 791, 578, 752, 763, 828 e 867) e *citri* (FDC 738 e 075).

caracterizar dois grupos distintos em termos de agressividade entre as linhagens de Xaa-C, o que correlacionou-se com a capacidade de produção de pigmento escuro em meio de cultura. As linhagens PP foram menos agressivas que as linhagens NP, e ambos os grupos apresentaram reduzida agressividade em comparação com Xac. A comparação por contrastes ortogonais permite facilmente a separação de Xac e Xaa-C (PP e NP) em três grupos distintos de agressividade (Tabela 6). As linhagens de Xaa-C NP não diferiram de PP quanto ao período de incubação e diâmetro das lesões aos 22 e 36 DAI, mas diferenças ocorreram nas demais

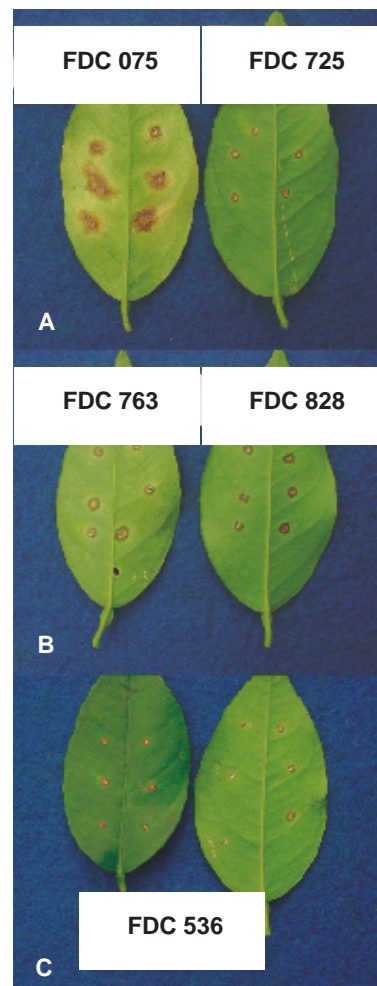


FIG. 5 - Sintomas induzidos por diferentes linhagens de *Xanthomonas axonopodis*. **A.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* FDC 075 e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* – FDC 725; **B.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* não produtora de pigmento; **C.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* produtora de pigmento.

TABELA 6 - Valores do teste F para contrastes ortogonais estabelecidos entre linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* para período de incubação, diâmetro de lesões e AACPD em plantas de lima ácida 'Galego'

Contrates	Incubação	Diâmetro de lesões (dias após a inoculação)						AACPD
		22	36	51	64	83	94	
<i>X. citri</i> vs. <i>X. aurantifolii</i>	689,57**	77,71**	449,39**	241,75**	1251,55**	1138,49**	1823,72**	1539,51**
<i>X. citri</i> vs. <i>X. aurantifolii</i> produtora (PP)	813,57**	76,79**	487,57**	289,63**	1401,49**	1272,55**	2020,77**	1719,10**
<i>X. citri</i> vs. <i>X. aurantifolii</i> não produtora (NP)	723,91**	57,11**	283,46**	126,74**	746,36**	681,19**	1108,44**	922,73**
<i>X. aurantifolii</i> (PP) vs. <i>X. aurantifolii</i> (NP)	0,45 ^{ns}	1,48 ^{ns}	38,55**	52,32**	150,59**	134,51**	197,10**	180,10**

ns - não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste de F.

avaliações de diâmetro e para AACPD, com superioridade para NP. Diferenças entre Xac e Xaa-C ocorreram em todos os parâmetros e datas de avaliação.

Em *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (sin. *X. phaseoli* var. *fuscans*), a produção de pigmento foi correlacionada com uma maior virulência (Basu & Wallen, 1967; Ekpo & Saettler, 1976). Em desacordo com essa observação, no presente estudo observou-se que as linhagens produtoras de pigmento foram menos agressivas que as não produtoras. Baseado nas diferenças em agressividade observadas é possível gerar informações úteis para melhor conhecimento da interação hospedeiro/patógeno, bem como contribuir para identificação dos mecanismos de patogenicidade desses patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASU, P.K. & WALLEN, V.R. Factor affecting virulence and pigment production of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. Canadian Journal of Botany 45:2367-2374. 1967.
- BIRCH, P.R., HYMAN, L.J., TAYLOR, R., OPIO, A.F., BRAGARD, C. & TOTH, I.K. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. European Journal of Plant Pathology 103:809-814. 1997.
- CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease in tropical regions. In: Lemattre, M., Freigoun, S., Rudolph, K. & Swings, J.G. (Eds.) Proceedings of the 8th International Conf Plant Path Bacteria. ORSTOM/INRA, Paris. 1994. pp. 45-50.
- DESTÉFANO, S.A.L. & RODRIGUES NETO, J. Caracterização de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Tipo C) produtora de pigmento escuro. Summa Phytopathologica 27:287-291. 2001.
- EKPO, E.J.A. & SAETTLER, A.W. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. Plant Disease Reporter 60:80-83. 1976.
- GABRIEL, D.W., HUNTER, J.E., KINGSLEY, M.T., MILLER, J.W. & LAZO, G.R. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:59-65. 1988.
- GILBERTSON, R.L., HAGERDORN, D.J. & RAND, R.E. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *Xanthomonas campestris* in bean debris. Plant Disease 74:322-327.1990.
- HALFELD-VIEIRA, B.A., SOUZA, R.M., FIGUEIRA, A.R. & BOARI, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. Fitopatologia Brasileira 26:737-740. 2001.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A., CARVALHO, M.L.V., RODRIGUES NETO, J., ROSSETTI, V., NOGUEIRA, E.M.C. & PALAZZO, D.A. Reaction of different *Citrus* and relatives to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. Proceedings Congress of the International Society of Citriculture 1:363-364. 1987.
- MARINGONI, A.C., KIMATI, H. & KUROSZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Summa Phytopathologica 20:164-167. 1994.
- NAMEKATA, T. Estudo comparativo entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F. SP. *aurantifolii*, agente causal da cancriose do limoeiro Galego. (Tese de Doutorado). Piracicaba SP. ESALQ-USP. 1971.
- OLEAS-ARIAS, A.R. Correlação entre resistência foliar e infecção de sementes em variedades de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Sm.) Dows. 1939. Piracicaba SP. ESALQ-USP. 1982.
- SCHOULTIES, C.L., CIVEROLO, E.L., MILLER, J.W., STALL, R.E., KRASS, C.J., POE, S.R. & DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. Plant Disease 71:388-395.1987.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Biology, epidemiology, genetics and breeding for resistance to bacterial pathogens of *Phaseolus vulgaris* L. Horticultural Review 3:28-58.1981.
- SHIOTANI, H., OZAKI, K. & TSUYUMU, S. Pathogenic interaction between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of Pummelo (*Citrus grandis*). Phytopathology 90:1383-1389.2000.
- SWINGS, J.G., VAUTERIN, L. & KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (Eds.) *Xanthomonas*. London. Chapman & Hall. 1993. p.128.
- STALL, R.E. & CIVEROLO, E.L. Research related to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Annual Review of Phytopathology 29:339-420. 1991.