Techniques d'identification des pathotypes de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes.

C. VERNIERE, O. PRUVOST, J. LUISETTI, M. DEVAUX et A. COUTEAU*

CHARACTERIZATION PROCEDURES OF THE PATHOTYPES OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CITRI, THE CAUSAL AGENT OF THE CITRUS BACTERIAL CANKER DISEASE.

C. VERNIERE, O. PRUVOST, J. LUISETTI, M. DEVAUX and A. COUTEAU.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p.169-173.

ABSTRACT - Xanthomonas campestris pv. citri, the causal agent of Citrus bacterial canker disease (CBCD) is identified under various pathotypes of recognized specific virulence and host range.

pathotypes of recognized specific virulence and host range. Different strains of X. c. pv. citri can be characterized by clinical tests such as 1) biochemical assays 2) the sensitivity to three different citriphages 3) serological tests developed with polyclonal or monoclonal antisera: immunodiffusion, immunofluorescence, ELISA, and 4) restriction fragments length polymorphism (RFLP) analyses on total DNA or plasmid DNA.

The constraints and possible advantages of these various techniques are discussed in a comparative evaluation.

TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES PATHOTYPES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CITRI, AGENT DU CHANCRE BACTERIEN DES AGRUMES.

C. VERNIERE, O. PRUVOST, J. LUISETTI, M. DEVAUX et A. COUTEAU.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 169-173.

RESUME - Différents pathotypes ont été décrits chez X. c. pv. citri. Les isolats de chaque pathotype différent par leur agressivité et par leur gamme d'hôtes.

Les souches peuvent être caractérisées par 1) des tests biochimiques, 2) par leur sensibilité à trois citriphages, 3) par des tests sérologiques (immunodiffusion, immunofluorescence, ELISA) utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, et 4) par des techniques de biologie moléculaire (analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) sur ADN total, étude du contenu plasmidique).

Les caractéristiques (avantages, limites) de ces différentes techniques d'identification sont évaluées et comparées.

INTRODUCTION

Xanthomonas campestris pv. citri (Hasse 1915) Dye 1978 est la bactérie responsable du chancre bactérien des agrumes (CBA) ou chancre citrique (appelé Citrus bacterial canker disease par les Anglo-saxons) (DYE et al., 1980). Le terme de pathovar est défini comme une subdivision intraspécifique réunissant un ensemble de souches sur la base de leur pouvoir pathogène vis-à-vis d'une ou de plusieurs plantes hôtes.

La majorité des espèces d'agrumes ainsi que les genres proches de la famille des Rutacées sont sensibles à ce genre. Xanthomonas campestris pv. citri est présent à l'état endémique en Asie et existe dans la plupart des pays de la zone agrumicole tropicale (CIVEROLO, 1984; KOIZUMI,

 VERNIERE, PRUVOST et COUTEAU - IRFA-CIRAD - Laboratoire de Phytopathologie - B.P. 180 - 97455 SAINT-PIERRE CEDEX -Ile de la Réunion.

LUISETTI et DEVAUX - Station de Pathologie végétale, rue G. Morel 49070 BEAUCOUZE.

1985). Il peut entraîner des dégâts importants comme récemment dans l'archipel des Maldives où il constitue un facteur limitant de la production locale (ROISTACHER et CIVEROLO, 1989).

Différentes formes de CBA ont été décrites en fonction de leur origine géographique et de l'expression du pouvoir pathogène de Xanthomonas campestris pv. citri sur différents hôtes. Ces formes doivent être considérées comme des variants de l'agent causal. Elles constituent une subdivision intra-pathovar, et sont appelées pathotypes (DYE et al., 1980):

• le pathotype A, correspondant au chancre asiatique, possède le spectre d'hôtes le plus large et se retrouve dans la majeure partie des pays concernés par la maladie. Il a été observé pour la première fois au Japon à la fin du 19e siècle (CIVEROLO, 1984), bien que la maladie semble originaire du subcontinent indien (FAWCETT et JENKINS, 1933);

- le pathotype B, agent du chancre sud américain, est connu depuis 1923. Il est présent en Argentine, en Uruguay, et probablement au Paraguay (ROSSETTI, 1977). Il est apparu sur Citrus limon et affecte essentiellement les citronniers et les limettiers ;
- le pathotype C, agent du chancre de la lime mexicaine (Citrus aurantifolia), a été découvert en 1963 au Brésil. Il semble limité à ce pays et restreint à la lime mexicaine (NAMEKATA et OLIVEIRA, 1972; ROSSETTI, 1977). Après inoculation artificielle, cette forme est faiblement agressive sur limettiers de Perse et de Tahiti et sur citronnier 'Eureka' et citronnier de Sicile (NAMEKATA et BALMER, 1977):
- le pathotype D a été observé en 1981 sur lime mexicaine au Mexique. Il ne semble pas induire de symptômes sur fruits (SANCHEZ et LOAIZA, 1983; SANCHEZ-ANGUIA-NO et FELIX-CASTRO, 1984). Devant la difficulté à isoler des germes de type Xanthomonas et à reproduire artificiellement les symptômes de cette maladie, baptisée «Citrus Leaf Spot», un autre agent causal a été recherché. Un champignon, Alternaria sp., a été constamment isolé et le postulat de Koch a pu être confirmé. La plupart des souches de Xanthomonas isolées au Mexique sont probablement des épiphytes opportunistes (BECERRA et al., 1988). Une seule souche de X.c. pv. citri, dont le pouvoir pathogène a été confirmé, a été isolée au Mexique (XC 90 de E.L. Civerolo). Cette souche n'a jamais pu être distinguée nettement des souches du pathotype B, et ce quelles que soient les techniques utilisées ;
- le pathotype E, agent du chancre des pépinières ou «Citrus Bacterial Spot Disease» (CBSD). Il est apparu en 1984 en Floride sur Citrumelo cv. Swingle (Poncirus trifoliata x Citrus paradisi) qui semble être son hôte de loin le plus commun, bien que la maladie ait été parfois observée sur pomelo (Citrus paradisi). La symptomatologie de cette maladie a été décrite de façon détaillée par SCHOULTIES et al. (1985). Elle se distingue par l'absence de pustules chancreuses sur les organes. La dénomination CBS sera utilisée pour ces souches dans la suite de cette note.

En se basant sur des données génétiques et sur l'expression du pouvoir pathogène, GABRIEL et al. (1989) ont proposé de reclasser les souches du type A au sein de l'espèce Xanthomonas citri (ex. Hasse) et d'installer les souches des types B, C, D et celles du type CBS dans deux nouveaux pathovars appelés respectivement X. campestris pv. aurantifolii pv. Nov. et X. campestris pv. citrumelo pv. Nov. Cette proposition a été contestée par différents auteurs (VAUTERIN et al., 1990; YOUNG et al., 1991; VAUTERIN et al., 1991). De nombreux auteurs américains s'accordent cependant à exclure du pathovar citri les souches induisant le «Citrus Bacterial Spot Disease». Ces souches sont momentanément dénommées X. campestris / CBS tant que leur position taxonomique ne sera pas clairement établie.

L'identification correcte et rapide d'un pathogène est indispensable et nécessaire au préalable d'une lutte efficace contre toute maladie. Quand elle est réalisable, la caractérisation de différents types de pathogènes chez l'agent responsable peut être déterminante par rapport à la lutte à mener. Dans le cas étudié, la spécificité d'hôte observée chez Xanthomonas campestris pv. citri et l'existence d'une

variabilité dans l'expression du pouvoir pathogène chez les différents pathotypes (NAMEKATA et BALMER. 1977; STALL et al. 1982; GRAHAM et GOTTWALD. 1990) rendent primordiale une identification précise des souches.

Le but de cette note est de présenter certaines des techniques d'identification utilisées actuellement et de discuter de leurs avantages et de leurs limites.

LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION

La caractérisation biochimique.

L'emploi de tests biochimiques et physiologiques chez les *Xanthomonas* ne peut permettre une identification des pathovars (DYE, 1962). Elle ne permet qu'une identification du genre.

Cependant, les réponses vis-à-vis de certains tests biochimiques et physiologiques montrent clairement l'existence d'une variabilité entre les pathotypes du pathovar *citri* (VERNIERE *et al.*, 1991). Trois profils biochimiques différents permettent de distinguer facilement certains pathotypes entre eux:

- le premier groupe comprend les souches du pathotype A et celles de type CBS. Elles hydrolysent la gélatine et la caséine et poussent en présence de NaCl à 2 p. 100 ;
- le second groupe est constitué des souches qui n'hydrolysent ni la gélatine, ni la caséine et dont la croissance est inhibée par une concentration de 1 p. 100 de NaCl. Il comprend les souches du pathotype B et la souche de type D:
- le troisième groupe renferme les souches de type C qui hydrolysent la caséine mais pas la gélatine. Ces souches peuvent pousser en présence de 1 p. 100 de NaCl mais leur croissance est fortement ralentie par une concentration de 2 p. 100 de NaCl.

Les bactériophages et la lysotypic.

Les souches de Xanthomonas campostris pv. citri peuvent être différenciées par l'action lytique de trois bactériophages de référence appeiés citriphages CP1. CP2 et CP3 (WAKIMOTO, 1967, GOTO et al., 1986). La technique utilisé permettant de comparer la sensibilité des souches bactériennes à chacun des phages est la lysotypie (ADAMS, 1959). Trois lysogroupes peuvent être séparés:

- le lysogroupe 1 est défini par l'asbence de lyse en présence de trois phages CP1, CP2 et CP3. Il comprend les souches du type C, celles de type CBS et certaines souches du type A;
- le lysogroupe 2 regroupe les souches sensibles à l'un ou l'autre des phages CP1 et CP2 ou à ces deux phages. Seules des souches de type A appartiennent à ce groupe;
- le lysogroupe 3 distingue les souches sensibles au seul phage CP3. Il est constitué par les souches du type B et la souche de type D.

Les techniques sérologiques.

■Utilisation d'anticorps polyclonaux.

A partir de cellules bactériennes entières vivantes ou tuées, des sérums polyclonaux peuvent être obtenus. Parmi les techniques sérologiques disponibles, la technique de l'immunofluorescence indirecte (FAURE et al., 1977) et la technique de l'immunodiffusion (OUCHTERLONY, 1948; HAMPTON et al., 1990) ont été utilisées. Chacun des antisérums dirigé contre un pathotype a développé une spécificité importante vis-à-vis des souches de ce pathotype;

- les souches du pathotype A ne réagissent qu'avec les sérums anti-A et ne donnent qu'un très léger précipité non caractéristique ou une fluorescence à faible dilution en présence des antisérums B, C ou E;
- les souches des pathotypes B, C et D donnent une réponse identique vis-à-vis de l'ensemble des antisérums développés contre des souches bactériennes appartenant aux types B et C, et ce quelle que soit la technique utilisée. Au sein de ce groupe, l'antisérum anti-CFBP 2901, souche du pathotype B, fait apparaître nettement deux sous-groupes par immunodiffusion (coalescence ou présence d'un éperon). Une faible affinité vis-à-vis de l'antisérum E a été observée par immunofluorescence. Ces souches ne développent qu'une très faible affinité avec les antisérums A utilisés:
- les souches de type CBS testées ont un profil propre. Elles ne réagissent pas avec les antisérums A et faiblement avec les antisérums B et C par immunofluorescence.

L'emploi d'anticorps polyclonaux permet donc de séparer rapidement et avec une grande spécificité les souches du pathotype A développant un pouvoir pathogène important. Parmi les autres pathovars testés, des réactions croisées ont été observées avec les pathovars manihotis et oryzae (antisérum A) et mangiferaeindicae et phaseoli (antisérum B).

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. Il apparaît que l'immunodiffusion soit la technique la mieux adaptée à la différenciation des souches au sein d'un même organisme (SCHAAD, 1979). Son inconvénient majeur tient dans la quantité d'antisérum nécessaire à l'obtention d'une réaction antigène/anticorps franche. De plus, les techniques sérologiques, de part la réaction antigène/anticorps hautement spécifique mise en jeu, nécessitent une grande standardisation.

■Utilisation d'anticorps monoclonaux.

L'utilisation des anticorps polyclonaux est limitée par certains facteurs. La réponse des animaux immunisés, par exemple, ne peut être contrôlée, d'où le développement de l'emploi des anticorps monoclonaux qui offrent une grande stabilité au niveau des anticorps produits.

Sept anticorps monoclonaux ont été produits contre différentes souches de X. c. pv. citri (ALVAREZ et al., 1987; ALVAREZ et BENEDICT, 1990, ALVAREZ et al., 1991). Ces anticorps peuvent être utilisés avec un grand nombre de techniques. Cependant, c'est la technique ELISA qui est préférentiellement utilisée à des fins d'identification de souches. Aucun de ces anticorps n'est capable de réagir,

soit avec l'ensemble du pathovar citri, soit avec l'ensemble des souches composant un des pathotypes décrits :

- l'anticorps Al réagit avec un fort pourcentage de souches appartenant au pathotype A. Cependant, des souches récemment isolées d'Inde, d'Oman, et d'Arabie Saoudite ne réagissent pas avec cet anticorps, alors que d'autres techniques semblent montrer que ces souches appartiennent au pathotype A. L'appartenance de ces souches à ce pathotype reste néanmoins à confirmer avec d'autres techniques (RFLP, analyse du contenu plasmidique);
- l'anticorps A2 ne réagit qu'avec environ 15 p. 100 des souches étudiées. Cet anticorps ne reconnaît que des souches de pathotype A sensibles au bactériophage CP1;
- l'anticorps B1 ne réagit qu'avec une seule souche du pathotype B (CFBP 2901);
- l'anticorps B2 réagit avec la majorité des souches de type B isolées en Argentine et en Uruguay. Il ne reconnaît cependant pas les souches CFBP 2868 et 2901. Il réagit également avec les trois souches de type C disponibles et avec la souche de type D;
- l'anticorps B3 réagit avec les souches CFBP 2868 et 2901. non reconnues par l'anticorps B2;
- l'anticorps C1 reconnaît la souche CFBP 2866, mais ne réagit pas avec les deux autres souches de type C disponibles (CFBP 2905 et 2906);
- l'anticorps CBS1 reconnaît toutes les souches de type CBS-A (HARTUNG et CIVEROLO, 1991). Ces souches sont les seules induisant des symptômes de type «Citrus Bacterial Spot Disease» et présentant une activité pathogène indiscutable sur citrumelo en Floride.

L'emploi des anticorps monoclonaux a permis d'éliminer certaines des réactions croisées mises en évidence lors de l'utilisation des anticorps polyclonaux, mais ne permet pas de les supprimer totalement.

Les études génétiques (RFLP sur ADN total).

Ce système (HARTUNG et CIVEROLO, 1989) est basé sur les profils d'hybridation en «Southern blot» de 7 fragments génomiques d'environ 20 kb (et n'hybridant pas entre eux) avec l'ADN total de souches digéré par EcoRI. Par cette technique, les souches de X.c. pv. citri sont clairement différenciables des souches de type CBS. Dans le premier sous-groupe, constitué des souches de X. c. pv. citri, il est possible de différencier nettement les souches appartenant au pathotype A des souches appartenant aux pathotypes B, C et D. Ces trois derniers pathotypes présentent des profils d'hybridation relativement similaires. Dans le second sous-groupe, composé des souches de type CBS, il est possible de différencier les souches dénommées CBS - A (au pouvoir pathogène indiscutable) des souches CBS - B (très faiblement agressives, et qui sont désormais considérées , plus comme des opportunistes que comme de réels pathogènes).

DISCUSSION - CONCLUSION

Il existe donc différents groupes de techniques pour identifier les pathotypes de X. c. pv. citri. Les souches

peuvent être identifiées grâce à des tests biochimiques, sérologiques, lysotypiques, ou par la technique des RFLP sur ADN total. Les tests décrits présentent certaines limites. Elles sont exposées ci-après:

- l'emploi des tests biochimiques permet de distinguer les types A/CBS, les pathotypes B/D et le pathotype C. Ils ne permettent pas de séparer le type A du type CBS qui ont des conséquences économiques très différentes. Ces tests ont l'avantage d'être simples à mettre en oeuvre et peu coûteux. Ils peuvent donc être utilisés assez facilement par des laboratoires dans les pays en voie de développement. Ils sont basés sur une réaction d'hydrolyse de la gélatine, de la caséine, et sur la tolérance des souches au chlorure de sodium. Tous les autres Xanthomonas et d'autres genres bactériens peuvent donner les mêmes types de réponse que ceux obtenus avec les souches de X. c. pv. citri. Si ces tests présentent donc un intérêt pour l'identification des pathotypes, il est impératif que l'appartenance des souches au pathovar citri ait été préalablement démontrée par des tests de pouvoir pathogène (*). L'identification biochimique est peu rapide. Il faut, en effet, compter environ une semaine pour obtenir les résultats du test de pouvoir pathogène, et une semaine supplémentaire servant à l'incubation des tests biochimiques;
- la lysotypie présente également certaines limites. Si cette technique peu coûteuse peut s'avérer très spécifique pour reconnaître les souches du pathotype B (sensibilité au phage CP3), elle ne permet pas de distinguer nettement les souches de type A des souches de type C et CBS;
- e la sérologie permet une assez bonne identification des souches. Il est facilement possible de distinguer les souches de X. c. pv. citri des souches de type CBS par cette technique. Au sein du pathovar citri, les souches du pathotype A sont facilement différenciables de celles des autres pathotypes. En routine, l'anticorps monoclonal A1 est utilisé pour identifier les souches de type A (le seul ayant une forte incidence économique), et un mélange des anticorps B2 et B3 est utilisé pour identifier les souches des pathotypes B/C/D (induisant des formes bénignes de la maladie sur une gamme d'hôtes très limitée). Les pathotypes B, C et D montrent de grandes affinités sérologiques et des tests complémentaires (tests biochimiques ou lysotypiques) sont nécessaires à leur caractérisation propre. L'anticorps CBS1 permet, lui, de distinguer les souches fortement agressives de X. campestris induisant le «Citrus Bacterial Spot » (baptisées CBS - A) des souches très peu agressives (CBS - B).

Le problème des souches du subcontinent indien ne réagissant pas avec les anticorps disponibles est en cours de solutionnement. De nouveaux sérums contre ces souches ont été fabriqués (ALVAREZ, communication personnelle). De plus, une étude approfondie qui permettra de préciser la position de ces souches au sein des pathotypes de X. c. pv. citri est en phase d'initiation.

 - il n'existe pas de tests de pouvoir pathogène efficients pour la distinction des pathotypes de X. c. pv. citri. En ELISA, on obtient une réponse rapide (24 heures). Ce temps de réponse pourrait encore être raccourci par utilisation de la technique «dot-blot» sur membrane de nitrocellulose.

Néanmoins, l'utilisation des anticorps monoclonaux n'a pas permis d'éliminer totalement les réactions croisées, qui se limitent à quelques membres du genre Xanthomonas. Une affinité de souches saprophytes de Xanthomonas isolées d'agrumes en Argentine a été constatée avec l'anticorps B2. Le couplage de ce test avec celui du pouvoir pathogène est donc prudent, mais fait perdre -l'intérêt principal de la technique ELISA qui réside dans son temps de réponse très court;

• la technique des RFLP permet une distinction très nette des souches de X. c. pv. citri et des souches de X. campestris/CBS. Au sein du pathovar citri, les souches du pathotype A sont facilement différenciables de celles des autres pathotypes. Il n'est pas aisé de différencier les souches des pathotypes B, C et D par la technique des RFLP. En revanche, cette technique permet de distinguer facilement les souches fortement agressives induisant le «Citrus Bacterial Spot Disease» (CBS - A) des souches très peu agressives (CBS - B). Bien que des études complémentaires restent à réaliser, il semble qu'aucune autre bactérie testée ne présente des profils similaires à ceux obtenus à l'aide des souches de X. c. pv. citri. Un test de pouvoir pathogène, technique assez délicate à réaliser pour des non-spécialistes, ne semble pas indispensable à réaliser. Cette technique présente une très bonne spécificité, meilleure que celle offerte par les techniques sérologiques, mais est beaucoup plus longue à mettre en oeuvre. Le temps de réponse se situe aux alentours d'une semaine.

Il n'existe pour l'instant aucune technique parfaite (alliant très bonne spécificité et temps de réponse très court) pour identifier les pathotypes de X. c. pv. citri. De plus, étant donné le faible nombre de souches des pathotypes B (8), C (3), et D (1) disponibles au niveau international, il paraît dangereux de baser l'identification de souches de X. c. pv. citri sur un seul critère. Ceci est d'autant plus vrai que, malgré le faible nombre de souches de type B et de type C disponibles, l'existence d'une assez grande variabilité interne à ces pathotypes a été mise en évidence en utilisant les techniques sérologiques et les RFLP. Le choix des tests est fonction principalement du niveau d'équipement des laboratoires, associé au coût des réactifs nécessaires.

Des travaux récents sur l'ADN plasmidique de X. c. pv. citri (PRUVOST et al., sous presse) permettent de penser qu'une technique d'hybridation en «Southern blot» de l'ADN total avec une sonde d'origine plasmidique pourrait voir le jour. Elle permettrait d'allier des niveaux de spécificité comparables à celle du système RFLP de HARTUNG et CIVEROLO (1989) avec un temps de réponse plus court (48 heures environ au lieu d'une semaine).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS (M.H.). 1959. Bacteriophages. Interscience, New York, 592 p.

ALVAREZ (A.M.), BENEDICT (A.A.), MIZUMOTO (C.Y.) and CIVEROLO (E.L.). 1987.

Mexican Lime Bacteriosis examined with monoclonal antibodies. In Plant Pathogenic Bacteria Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. E. L. CIVEROLO, A. COLLMER, R.E. DAVIS and A.G. GILLESPIE Eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 847-852.

=

ALVAREZ (A.M.) and BENEDICT (A.A.). 1990.

Relationships among phytopathogenic bacteria distinguished with monoclonal antibodies.

Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Part B, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989, Z. KLEMENT Ed., Akademiai Kiado, Budapest, 859-863

ALVAREZ (A.M.), BENEDICT (A.A.), MIZUMOTO (C.Y.), POLLARD (L.W.) and CIVEROLO (E.L.). 1991.

Analysis of Xanthomonas campestris pv. citri and X. C. citrumelo with monoclonal antibodies. Phytopathology, 81 (8), 857-865.

BECERRA (S.), MEDINA (U.V.M.), GARZA (J.G.) and OROZCO

Citrus leaf spot, a new mexican lime disease: a review. Int. Citrus Congress, Middle East Int. Soc. Citriculture, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 33.

CIVEROLO (E.L.). 1984. Bacterial canker disease of Citrus.

J. Rio Grande Val. Hort. Soc., 37, 127-145.

DYE (D.W.). 1962. The inadequacy of the usual determinative test for the identification of Xanthomonas spp. N.Z.J. Sci., 5 (4), 393-416.

DYE (D.W.), BRADBURY (J.F.), GOTO (M.), HAYWARD (A.C.), LELLIOT (R.A.) and SCHROTH (M.N.). 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotypes strains. Rev. Plant Pathol., 59 (4), 153-168.

FAURE (M.), DUPOUEY (P.) et MORELEC (M.J.). 1977. Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immunoenzymatiques. Maloine S.A. Ed. Paris, 566 p.

FAWCETT (H.S.) and JENKINS (A.E.). 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus

Citrus in England and the United States. Phytopathology, 23 (10), 820-824.

GABRIEL (D.W.), KINGSLEY (M.T.), HUNTER (J.E.) and GOTTWALD (T.). 1989. Reinstatement of Xanthomonas citri (ex Hasse) and X. phaseoli (ex Smith) to species and reclassification of all X. campestris pv.

citri strain Int. J. Syst. Bacteriol., 39 (1), 14-22.

GOTO (M.), TAKAHASHI (T.) and MESSINA (M. A.). 1980. A comparative study of the strains of Xanthomonas campestris pv. citri isolated from Citrus Canker in Japan and Cancrosis B in Argentina. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 46, 329-338

GRAHAM (J.H.) and GOTTWALD (T.R.). 1990.

Variation in aggressiveness of Xanthomonas campestris pv. citrumelo associated with citrus bacterial spot in Florida Citrus nurse-

Phytopathology, 80 (2), 190-196.

HAMPTON (R.), BAIL (F.) and DE BOER (S.). 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS Press, St. Paul, Minn., 389 p.

HARTUNG (J.S.) and CIVEROLO (E.L.). 1989.

Restriction - fragment length polymorphism distinguish Xantho-monas campestris strains isolated from Florida citrus nurseries from X. c. pv. citri. Phytopathology, 79 (7), 793-799.

HARTUNG (J.S.) and CIVEROLO (E.L.). 1991. Variation among strains of Xanthomonas campestris causing citrus bacterial spot.

Plant Dis., 75 (6), 622-626.

KOIZUMI (M.). 1985.

Citrus canker: the world situation. 2-7. in Citrus canker: an international perspective, L.W. Timmer, Ed. IFAS, University of Florida, Lake Alfred, 28 p

NAMEKATA (T.) and OLIVEIRA (A.R. de). 1972. Comparative serological studies between Xanthomonas citri and a bacterium causing canker on mexican lime.

Proc. 3rd Int. Conf. Plant Path. Bact., Wageningen, Netherlands,

April 14-21, 1971, 151-152.

NAMEKATA (T.) and BALMER (E.). 1977. Comparative studies on pathogenicity among causal agents of the three citrus canker. Proc. 1st Int. Cong. Citriculture, Murcia, Spain, April 29 - May 10, 1973, II, 659-662.

OUCHTERLONY (O.). 1948. In vitro method for testing the toxin - producing capacity of diphteria bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 25, 186-191.

PRUVOST (O.), HARTUNG (J.S.), CIVEROLO (E.L.), DUBOIS Cécile and PERRIER (X.). 1992.

Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of Xanthomonas campestris pv. citri, the causal agent of citrus bacterial canker disease. Phytopathology, 82, (In press).

ROISTACHER (C.N.) and CIVEROLO (E.L.). 1989. Citrus bacterial canker disease of lime trees in the Maldive Islands. Plant Dis., 73 (4), 363-367.

ROSSETTI (Victoria). 1977.

Citrus Canker in Latin America: a review. Proc. Int. Soc. Citriculture, 3, 918-924.

SANCHEZ (L.D.) y LOAIZA (R.R.), 1983. Bacteriosis del limonero mexicano (Citrus aurantifolia). FAO Plant Prot. Bull., 31 (3), 131-132.

SANCHEZ-ANGUIANO (H.M.) and FELIX-CASTRO (F.A.). 1984. An overview of Citrus canker (bacteriosis) on mexican lime at Tecoman, Colima, Mexico, Proc. Int. Soc. Citriculture, vol. 1, 323-324.

SCHAAD (N.W.). 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria.

Ann. Rev. Phytopathol., 17, 123-147.

SCHOULTIES (C.L.), MILLER (J.W.), CIVEROLO (E.L.) and SASSER (M.). 1985. A new outbreak of citrus canker in Florida. Plant Dis. 69 361.

STALL (R.E.), MILLER (J.W.), MARCO (G.M.) and CANTEROS (B.I.C.). 1982. Pathogenicity of the three strains of citrus canker organism on grapefruit. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. August 16-23, 1981, Cali,

Colombia, 334-340. VAUTERIN (L.), SWINGS (J.), GILLIS (M.), KESTERS (K.) MEW (T.W.), SCHROTH (M.N.), PALLERONI (N.J.), HILDE-BRAND (D.C.), STEAD (D.E.), CIVEROLO (E.L.), HAYWARD (A.C.), MARAITE (H.), STALL (R.E.), VIDAVER (A.K.) and BRADBURY (J.F.). 1990.

Towards an improved taxonomy of Xanthomonas. Int. J. Syst. Bacteriol., 40, 312-316.

VAUTERIN (L.), YANG (P.), HOSTE (B.), VANCANNEYT (M.), CIVEROLO (E.L.), SWINGS (J.) and KERSTERS (K.). 1991. Differentiation of Xanthomonas campestris pv. citri strains by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA - DNA hybridization.

Int. J. Syst. Bacteriol., 41 (4), 535-542.

VERNIERE (C.), DEVAUX (M.), PRUVOST (O.), COUTEAU (A.) et LUISETTI (J.). 1991. Etude de la variabilité biochimique et physiologique de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes. Fruits, 46 (2), 153-161.

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

YOUNG (J.M.), BRADBURY (J.F.), GARDAN (L.), GVOZDYAK (R.I.), STEAD (D.E.), TAKIKAWA (Y.) and VIDAVER (A.K.).

Comment on the reinstatement of Xanthomonas citri (ex Hass 1915) Gabriel et al., 1989 and X. phaseoli (ex Smith 1897) Gabriel et al., 1989: indication of the needs for minimal standards for the genus Xanthomonas. Int. J. Syst. Bacteriol., 41 (1), 172-177.

TECNICAS DE IDENTIFICACION DE LOS PATOTIPOS DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CITRI, AGENTE DEL CANCRO BACTERIANO DE LOS CITRICOS.

C. VERNIERE, O. PRUVOST, J. LUISETTI, M. DEVAUX y A. COUTEAU.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 169-173.

RESUMEN - Diferentes patotipos han sido descritos para X.2c. pv. > citri. Las cepas de cada patotipo varían segun su grado de agresividad y su gama de hóspederos.

y su gama de hospederos.

Las cepas pueden ser caracterizadas 1) por pruebas bioquímicas,
2) por su sensibilidad a tres citrifagos, 3) por pruebas serológicas
(inmunodifusíon, inmunofluorescencia, ELISA) utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, y 4) con técnicas de biología
molecular (análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) sobre ADN total, estudio del contenido plasmidico).

Las características (ventajas, límites) de estas diferentes técnicas de identificación son evaluadas y comparadas