

Método para detecção de ...
1990 TS-PP-1990.00282



CNPMA-1124-1

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv.
phaseoli EM SEMENTES DE FEIJÃO

PEDRO JOSÉ VALARINI

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
1990



MÉTODO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJÃO

PEDRO JOSÉ VALARINI
Engenheiro-Agrônomo

ORIENTADOR: PROF. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro-1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

V137m Valarini, Pedro José
Método para detecção de Xanthomonas campestris
PV. phaseoli em sementes de feijão. Piracicaba,
1990.
167p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Feijão - Crestamento bacteriano comum
2. Feijão - Semente - Doença I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

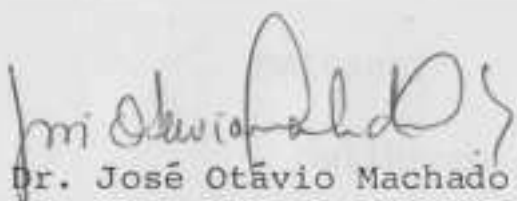
MÉTODO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJÃO

PEDRO JOSÉ VALARINI

Aprovado em 22/03/1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. Clélio Lima Salgado	ESALQ/USP
Prof. Dr. Charles Frederick Robbs	CNPDA/EMBRAPA
Prof. Dr. Chukichi Kurozawa	FCA/UNESP


Prof. Dr. José Otávio Machado Menten
- Orientador -

Aos meus pais

Horácio ("in memoriam") e

Antonia

MINHA GRATIDÃO

À minha esposa Ivete

e aos meus filhos

Matheus,

Guilherme e

Lucas,

com carinho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor externa os agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e em especial:

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), através do Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA), pelo auxílio e pela oportunidade concedida de realização do Curso de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa concedida.

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros (ESALQ) e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten, pela amizade, orientação, sugestões e colaboração no aprimoramento científico.

À esposa Ivete Regina Amstalden Valarini, pela paciência, apoio, dedicação e datilografia dos originais.

À Pesquisadora Científica Célia de Campos Lasca, Chefe da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, pela amizade, incentivo, revisão dos originais e auxílio no "Summary".

À Pesquisadora Científica Dra. Maria José Valarini, pela colaboração na correção dos originais e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pelos esclarecimentos, sugestões, apoio e colaboração na montagem das fotografias.

À Engenheira Agrônoma, MS, Lillian Maria Arruda Bacchi, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

À Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), através da Engenheira Agrônoma Maria Inês de Arruda Mariano, pela amizade, apoio e fornecimento de sementes.

Aos pesquisadores do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Anésio Bianchini e Marco A. Lollato, pela amizade e valiosa colaboração no fornecimento de sementes e na avaliação do experimento de campo.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela amizade, apoio e, sobretudo, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela amizade, apoio e sugestões apresentadas.

À Bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e colaboração nos testes de laboratório e casa de vegetação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xvi
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro.....	5
2.2. Patogenicidade, sobrevivência e disseminação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	9
2.3. Controle do crestamento bacteriano comum do fei joeiro.....	14
2.4. Métodos de detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>pha</i> - <i>seoli</i> em sementes de feijão.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Local e época de realização de pesquisa.....	38
3.2. Meios de cultura.....	38
3.2.1. NGA.....	38
3.2.2. EPGA.....	39
3.2.3. YDC.....	39
3.3. Origem, obtenção e preservação dos isolados....	40
3.3.1. Isolamento a partir de folhas e vagens..	40
3.3.2. Isolamento a partir de sementes.....	41
3.3.3. Preservação e identificação dos isolados obtidos.....	42
3.4. Outras culturas puras de diversas espécies de bactérias e fungos.....	44
3.5. Preparo e padronização do inóculo.....	45
3.6. Origem das amostras de sementes de feijão porta doras de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	46
3.7. Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em se - mentes de feijão.....	49

3.7.1. Técnicas de extração de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	49
3.7.1.1. Técnica de imersão de sementes moídas em água (TAYLOR, 1970 <u>mo</u> <u>dificada</u>).....	49
3.7.1.2. Técnica de imersão em água de sementes inteiras com desinfestação superficial.....	50
3.7.1.3. Técnica de imersão de sementes inteiras em água descrita por RAT ¹ ..., ligeiramente modificada.....	51
3.7.1.4. Técnica de imersão de sementes inteiras em meio líquido VELASQUEZ & TRUJILLO (1984), ligeiramente modificada.....	52
3.7.2. Técnicas de identificação de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de extratos obtidos de sementes.....	52
3.7.2.1. Serologia.....	52
3.7.2.1.1. Preparo dos antígenos imunizantes.....	52
3.7.2.1.2. Preparo dos antissoros.....	53
3.7.2.1.3. Técnicas serológicas utilizadas.....	54
3.7.2.1.4. Avaliação das técnicas através de reações serológicas.....	56
3.7.2.2. Isolamento direto em meios de cultura.....	57
3.7.2.3. Inoculação em plantas indicadoras.....	58

- 3.7.2.3.1. Origem das cultivares de feijoeiro.... 58
- 3.7.2.3.2. Obtenção das plantas para inoculação..... 59
- 3.7.2.3.3. Métodos de inoculação..... 60
- 3.7.2.3.4. Avaliação da incidência/severidade de infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli*... 61
- 3.7.2.3.5. Especificidade dos sintomas causados por *X. campestris* pv. *phaseoli*..... 63
- 3.7.5. Avaliação da sensibilidade das técnicas de extração através da inoculação por imersão com tesoura do extrato em diferentes diluições..... 63
- 3.8. Determinação da sensibilidade de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sub-amostras de sementes de feijão através do método da planta indicadora..... 64
 - 3.8.1. Inoculação artificial das sementes através do método de contato com a bactéria. 64
 - 3.8.2. Localização do patógeno na semente e seu efeito sobre a germinação..... 65
 - 3.8.3. Detecção de uma única semente portadora de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sub-amostras de sementes..... 66
- 3.9. Determinação quantitativa de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão produzidas no Estado de São Paulo..... 67

3.10. Correlação entre incidência do crestamento bacteriano comum em campo e porcentagem de sementes portadoras do patógeno, germinação e peso de 100 sementes.....	69
3.11. Delineamentos experimentais.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1. Serologia.....	73
4.1.1. Reação dos antissoros de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e do "strain" <i>fuscans</i> com antígenos homólogos.....	73
4.1.2. Títulos dos antissoros de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> do "strain" <i>fuscans</i>	74
4.1.3. Determinação da especificidade dos antissoros de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e do "strain" contra diversos isolados de bactérias.....	77
4.1.4. Avaliação da sensibilidade da técnica de dupla difusão em gel-de-agar através da reação dos antissoros de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e do "strain" <i>fuscans</i> com os antígenos homólogos em diluição.....	80
4.2. Isolamento direto em meios de cultura.....	85
4.3. Inoculação em plantas indicadoras.....	85
4.3.1. Avaliação das técnicas de extração, cultivares testadas e métodos de inoculação de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	85
4.3.2. Avaliação da sensibilidade das técnicas de extração através da inoculação de plantas indicadoras por incisão com tesoura do extrato em diferentes diluições.....	91
4.3.3. Especificidade dos sintomas causados por <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	94

4.4. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão de diferentes tamanhos.....	97
4.5. Determinação da localização de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e sensibilidade na detecção do patógeno em sub-amostras de sementes de feijão pelo método de planta indicadora.....	113
4.5.1. Localização do patógeno em sementes inoculadas artificialmente e seu efeito sobre a germinação.....	113
4.5.2. Detecção de uma única semente portadora de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sub-amostras de diferentes tamanhos, através de inoculação em plantas indicadoras.....	115
4.6. Determinação quantitativa de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão produzidas no Estado de São Paulo.....	118
4.7. Correlação entre a incidência do crestamento bacteriano comum em campos de produção e porcentagem de sementes portadoras de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e o efeito sobre a germinação e peso de 100 sementes	126
5. CONCLUSÕES.....	133
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
APÊNDICES.....	157

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Valores de densidade ótica à 640 nm para diferentes suspensões de células de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> com concentrações expressas em unidades formadoras de colônias (ufc)/ml.....	47
FIGURA 2. Valores de densidade ótica à 640 nm para diferentes suspensões de células de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> com concentrações expressas em unidades formadoras de colônias (ufc)/ml.....	48
FIGURA 3. Método de inoculação, por incisão com tesoura, de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em plantas indicadoras (CNF 0010) de feijoeiro. A) Mergulho de tesoura no inóculo; B) Inoculação das folhas primárias; C) Sintomas do crestamento bacteriano comum	112

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Caracterização dos isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) e dos "strains" <i>fuscans</i> (Xcphf) de feijão.....	43
TABELA 2. Relação dos isolados de diversas espécies de bactérias e fungos patogênicos e não patogênicos ao feijoeiro.....	44
TABELA 3. Amostras de sementes de diversas cultivares de feijoeiro portadoras de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	46
TABELA 4. Extração de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> de farinha de amostras de tamanhos variáveis de sementes de feijão.....	50
TABELA 5. Extração de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de amostras de sementes inteiras de feijão de tamanhos variáveis, imersas em água ou meio líquido.....	51
TABELA 6. Cultivares de feijoeiro suscetíveis a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e suas respectivas procedências.....	59
TABELA 7. Interpretação de resultados para quantificar a presença de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em amostras de sementes de feijão.....	70

TABELA 8.	Reação de diversas coletas dos antissoros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) e do "strain" <i>fuscans</i> (Xcphf) com os antígenos homólogos pelas técnicas serológicas da microprecipitina e dupla difusão em gel-de-agar.....	74
TABELA 9.	Títulos dos antissoros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) e do "strain" <i>fuscans</i> (Xcphf) contra antígenos homólogos pelas técnicas da microprecipitina em placas e dupla difusão em gel-de-agar (DDGA).....	76
TABELA 10.	Determinação da especificidade dos antissoros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) e do "strain" <i>fuscans</i> (Xcphf) por duas técnicas serológicas contra isolados de bactérias.....	78
TABELA 11.	Análise do antissoro de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em diluição contra diferentes concentrações do antígeno homólogo através da técnica da dupla difusão em gel-de-agar.....	81
TABELA 12.	Análise do antissoro de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> em diluição contra diferentes concentrações do antígeno homólogo através da técnica da dupla difusão em gel-de-agar.....	82

TABELA 13. Eficiência da cefalexina e do clorotalonil em dois meios de cultura para inibição de crescimento de diversas espécies de bactérias e fungos.....	84
TABELA 14. Efeito de técnicas de extração do patógeno de sementes de feijão (cv. EMGOPA 201-ouro), cultivares de feijoeiro e métodos de inoculação na reação de severidade de sintomas exibida por <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph).....	87
TABELA 15. Comparação da eficiência de técnicas de extração de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) de duas amostras de sementes de feijão através da inoculação do extrato diluído por incisão com tesoura em plantas de feijoeiro da cultivar CNF 0010.....	92
TABELA 16. Patogenicidade de diversos isolados de bactérias e fungos inoculados em plântulas de feijoeiro (cv. CNF 0010 e Rosinha G-2) por incisão com tesoura.....	95
TABELA 17. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Rio Vermelho) de diferentes tamanhos.....	98

TABELA 18. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Rosinha) de diferentes tamanhos.....	99
TABELA 19. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. EMGOPA 201-ouro) de diferentes tamanhos.....	100
TABELA 20. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão (cv. Carnaval) a partir de sub-amostras de diferentes tamanhos.....	101
TABELA 21. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Catu) de diferentes tamanhos.	102
TABELA 22. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Rio Ivai) de diferentes tamanhos.....	103

TABELA 23. Avaliação da localização de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes inoculadas artificialmente através do método da planta indicadora (cv. CNF 0010) e o efeito sobre a germinação.....	114
TABELA 24. Detecção de sementes individuais infectadas por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) em sub-amostras de sementes sadias de feijão de diferentes tamanhos, através do método de inoculação por incisão com tesoura em planta indicadora (cv. CNF 0010)..	117
TABELA 25. Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) em amostras de sementes certificadas de feijão (cultivo da "seca" - 1988) coletadas no Estado de São Paulo.....	120
TABELA 26. Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) em amostras de sementes certificadas de feijão (cultivo de "inverno" - 1988) coletadas no Estado de São Paulo.....	121
TABELA 27. Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph) em amostras de sementes certificadas de feijão (cultivo das "águas" - 1988/89) no Estado de São Paulo.....	122

TABELA 28. Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em campo e em amostras de lotes de sementes de feijão (cv. Rio Tibagi) coletadas nos campos experimentais do IAPAR (Londrina/PR) e seu efeito sobre a germinação e peso de 100 sementes.....	127
---	-----

MÉTODO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJÃO

Autor: PEDRO JOSÉ VALARINI

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

No Brasil, o crestamento bacteriano comum causado por *X. campestris* pv. *phaseoli* tem sido incluído entre as principais doenças do feijoeiro devido à sua ampla distribuição, a redução na produção e dificuldades de controle agravadas pelo fato de seu agente causal ter a semente como seu principal meio de disseminação e sobrevivência. Considerando que não se dispõem de métodos recomendados para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, no Brasil, e que o controle se baseia, principalmente, nas inspeções de campos, o presente trabalho teve como principal objetivo, desenvolver uma metodologia eficiente para detecção desse patógeno, avaliar a sua incidência em amostras de sementes certificadas de feijão produzidas no Estado de São Paulo, estabelecer correlação entre a ocorrência do crestamento bacteriano comum em campo com o transporte do patógeno pelas sementes e determinar o seu efeito sobre a germinação e o peso de 100 sementes. Para tal, quatro técnicas de ex-

tração e três métodos de identificação do patógeno foram comparados a partir de amostras de sementes sabidamente portadoras do patógeno.

As técnicas de extração da bactéria implicaram na imersão em água destilada ou meio líquido esterilizado, de sementes moídas ou inteiras, com desinfestação superficial ou não, em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), que foram incubadas por períodos variáveis de 2 horas, em temperatura ambiente (sementes moídas) a 18-24 horas, à temperatura de 5-10°C (sementes inteiras). Os métodos de identificação comparados foram: inoculação em placas indicadoras, isolamento direto em meios de cultura e técnicas serológicas. Para a inoculação em folhas primárias de plantas com 8 dias de idade, foram comparados três cultivares de feijoeiro (CNP 0010, Rosinha G-2 e Cornell 49-142) e três técnicas de inoculação (agulhas múltiplas, incisão com tesoura e injeção no n.º da folha primária). Os meios nutriente-glucose-agar (NGA) e extrato de levedura, peptona, glucose, amido solúvel e agar (EPGA), acrescidas do antibiótico cefalexina e do fungicida clorotalomil, nas concentrações de 40 e 67 µg/ml dos produtos comerciais, respectivamente, foram incluídos nos testes de isolamento direto. Com relação à serologia, compararam-se as técnicas da microprecipitina em placas de petri e da dupla difusão em gel-de-agar.

Os resultados mostraram que a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli*, incluindo a extração através da imer

mersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras a 5 - 10°C por 18-24 horas e identificação do patógeno através de inoculação em plantas indicadoras (cv. CNF 0010), por incisão com tesoura, foi o método mais adequado para detectar e quantificar o patógeno em sementes de feijão. Esse método apresentou-se eficiente para detecção da bactéria em um prazo relativamente curto (8-10 dias), de fácil execução, baixo custo, com sensibilidade 0,1% e de alta especificidade, permitindo a análise de cerca de 10 amostras/técnico/dia, o que se sugere a sua aplicação prática em análises de rotina e, possivelmente, em programas de certificação de sementes de feijão. A germinação e o peso de 100 sementes foram reduzidos significativamente devido a presença do patógeno na semente. Não se verificou uma correlação consistente entre incidência do patógeno em campo e na semente. A maioria das sementes certificadas produzidas no Estado de São Paulo, durante os cultivos da "seca" e de "inverno", em 1988, e das "águas" em 1988/89, foram portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em índices variando de 0,1 a 1,1%, inóculo na semente que pode originar epidemias em campo, sob condições climáticas favoráveis à doença, justificando mais uma vez, a conveniência da aplicação desse método para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.

METHOD FOR DETECTION OF *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
IN COMMON BEANS

Author: PEDRO JOSÉ VALARINI

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

In Brazil, common blight of bean caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* has been included among the major bean diseases because of its large distribution, yield reduction and difficulties of control. The importance of this disease is increased by the bacterial survival and dissemination mainly through the seeds. Considering that there is no recommended method for routine detection of this bacterium in bean seeds and that, in Brazil, the control is based mainly on seed field inspection, the present work had as main purpose to develop efficient methodology for routine detection of *X. campestris* pv. *phaseoli* in bean seeds. It also intended to evaluate the incidence of *X. campestris* pv. *phaseoli* in certified seeds of common bean produced in the the State of São Paulo, to investigate the correlation between field common blight occurrence and the pathogen incidence on seeds and to determine its effect on germination and 100 seeds weight.

Four bacterium extration techniques and three identification methods were compared by using bean seeds samples that were known to carry the pathogen. The techniques for bacterium extration constituted of immersion of whole on ground seeds in distilled water or sterilized liquid medium with ou without previous seed superficial desinfestation with sodium hypochloride solution (1% active chlorine). For ground seeds, the incubation was at room temperature during two hours and for whole seeds at 5-10°C during 18-24 hours. The following methods were compared for bacterium identification: inoculation on indicator plants, direct isolation on agar media and serology techniques.

For selecting the best cultivars and inoculation techniques to be used, experiments were performed with 8 days old seedlings of CNF 0010, Rosinha G-2 and Cornell 49-242 cultivars by using multiple needles, scissor incision and injection at the primary leaf node. Glucose-nutrient-agar (GNA) and yeast extract-peptone-glucose + soluble potato starch and agar (LPGA) with the antilbiotic cephalixin and the fungicide chlorothalonil were used im direct isolation essays. Concerning serology, the microprecipitin in Petri dishes and the agar-gel double-diffusion techniques were compared.

A survey on the incidence of *X. campestris* pv. *phaseoli* on bean seeds was carried out using samples which were harvested from inspected fields of several locations of the State of São Paulo.

Results showed that the recommended method for detecting and quantifying *X. campestris* pv. *phaseoli* in bean seeds was extraction by immersion of whole seeds in distilled and sterilized water, incubation at 5-10°C for 18-24 hours and pathogen identification by inoculating indicator plants of cv. CNF 0010 by scissor incision. This method was efficient for detecting the bacterium in relatively short time (8-10 days). It is of easy execution, cheap, with sensitivity of 0,1% and of high specificity; it allowed to analyse about 10 samples/technician/day. Therefore, its application can be suggested for routine bean seed health tests in certification programmes. Germination and 100 seeds weight were significantly reduced by the bacterium in the seeds. Correlation between common blight incidence at field and the pathogen incidence on seed was not clear. Most of the certified seed produced in the State of São Paulo from 1986 dry and winter seasons and 1988/89 rainy season carried the bacterium, the incidence levels varied from 0,1 to 1,1%. This amount of inoculum in seeds may be enough to develop epidemics what justify once more the convenience of applying the method developed in this work for detection of *X. campestris* pv. *phaseoli* in bean seeds in order to reject lots carrying the bacterium.

1. INTRODUÇÃO

O feijão constitui um alimento básico para a população brasileira, devido ao conteúdo proteico encontrado nas sementes (15 a 33%) e ao alto valor energético (341 cal/100g). Apesar do Brasil ser considerado o maior produtor e consumidor mundial de feijão, a produtividade média é baixa, não ultrapassando os 600 kg/ha, quando comparada aos rendimentos obtidos nos Estados Unidos, acima de 1600 kg/ha (POMPEU, 1987). A previsão de produção para 1989 de 2,5 a 2,7 milhões de toneladas (PROGNÓSTICO AGRÍCOLA, 1988) será insuficiente para o consumo interno, havendo necessidade de importação do produto.

Além da cultura do feijoeiro ser considerada de alto risco, pode-se atribuir a responsabilidade dessa baixa produtividade a diversos fatores, desde a falta de incentivo ao agricultor tanto financeiro como tecnológico, principalmente, na utilização de sementes certificadas e fiscalizadas, até a inobservância dos princípios mais elementares de práticas culturais. A ocorrência de moléstias destaca-se como o mais importante fator, sendo que, em certos casos, torna-se limitante à cultura (CAFATI, 1971; KIMATI, 1980).

Entre as moléstias, o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F. Smith) Dye, 1978 (DYE et alii, 1980) afeta a produção de feijoeiro em diferentes partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais. Em pesquisas de campo no Canadá, durante dois anos, foram registradas perdas na produção de grãos, devidas a bacteriose, calculadas em 38% (WALLEN & JACKSON, 1975). Na Colômbia, foram calculadas diminuições da produção de 22 e 45% em culturas do feijão infectadas natural e artificialmente com o agente causal do crestamento comum, respectivamente (YOSHII et alii, 1976).

No Brasil, o crestamento bacteriano comum é uma doença de importância econômica, de ampla distribuição, que vem causando grandes perdas em regiões úmidas, com temperaturas moderadas a altas (COSTA, 1972; KIMATI, 1980; RAVA, 1984; VIEIRA & SARTORATO, 1984; ATHAYDE & PACOVA, 1985; MENEZES, 1987; BULISANI et alii, 1987).

A semente é o meio mais eficiente de disseminação e sobrevivência do patógeno, constituindo-se como fonte de inóculo primário e em condições de gerar novos focos de infecção; populações mínimas de $10^3 - 10^4$ células bacterianas/semente podem produzir plantas infectadas em condições de campo (WELLER & SAETTLER, 1980). Também, prevalecendo condições climáticas favoráveis de umidade e temperatura, o agente causal do crestamento pode desenvolver-se tão rapidamente que

bastaria 0,5% de sementes infectadas para iniciar uma severa epidemia na lavoura (WALLEN & SUTTON, 1965; KIMATI, 1980).

Sendo a doença considerada de controle problemático, pela dificuldade em se obter resistência ou tolerância nas cultivares de valor comercial, pela baixa eficiência do controle com produtos químicos e pelo sistema de cultivo em mais de uma época no mesmo ano (ZAPATA et alii, 1985), uma das medidas de controle que tem trazido resultados satisfatórios, consiste na utilização de sementes com elevado padrão de sanidade (BULISANI et alii, 1987). Aliado a possibilidade de ocorrência de epidemias em campo a partir de sementes com baixos níveis de infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli*, torna-se importante contar com métodos eficientes, seguros e rápidos para a detecção do patógeno em lotes de sementes destinados a novas culturas. Nesse sentido, os vários métodos que têm sido empregados para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão apresentam variações quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade e poucos são quantitativos.

Levando-se em consideração a importância do cretamento bacteriano comum no feijoeiro para as condições tropicais e não tendo sido recomendados métodos para a detecção do patógeno em lotes de semente de feijão, a presente pesquisa teve os seguintes objetivos:

a) Desenvolver um método de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão que seja eficiente

te, rápido, específico, de baixo custo, de fácil execução, quantitativo, de alta sensibilidade e reproduzível. Para tal, há necessidade de uma técnica de extração e um método de identificação da bactéria da semente.

b) Avaliar a incidência do patógeno em amostras de sementes coletadas nos principais municípios produtores do Estado de São Paulo, cultivos de 1988 e 1988/1989, com base no método desenvolvido.

c) Estabelecer a correlação entre incidência da bacteriose em campo com a presença do patógeno nas sementes.

d) Determinar a influência da presença da bactéria sobre a germinação e o peso de 100 sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro

Das bacterioses de maior importância que ocorrem no feijoeiro, o "crestamento comum", causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, permanece como uma das mais sérias e prevalentes doenças da cultura, em diferentes partes do mundo (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; HARRISON et alii, 1964; COSTA, 1972; CRISPIN & CAMPOS, 1976; RAVA, 1984; ZAPATA et alii, 1985 e VENETTE et alii, 1987).

Segundo ZAUMEYER & THOMAS (1957), o "crestamento bacteriano comum" foi reconhecido, primeiramente, em 1892 nos Estados Unidos por BEACH (1892). Em 1897, SMITH (1901) descreveu a doença e denominou o agente causal de *Bacillus phaseoli* (E.F.Sm). Em 1901, o mesmo autor deu as características culturais do organismo e o transferiu para o gênero *Pseudomonas* e, em 1905, para o gênero *Bacterium*, denominando-o de *Bacterium phaseoli*. Em 1925, outro sistema de classificação foi proposto, definindo o patógeno como *Phytomonas phaseoli* (E.F.Sm.), (BERGEY et alii, 1925). Mais tarde, em 1939, esse gênero foi reclassificado quando, en-

tão, passou a se chamar *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows., 1939, pelo fato de produzir um pigmento amarelo, a xantomonadina mais recentemente, YOUNG et alii (1978) propuseram que diversas espécies de *Xanthomonas* fossem classificadas como patógenos de *Xanthomonas campestris*, uma vez que as espécies e sub-espécies deste gênero são geralmente indistinguíveis em provas morfológicas e bioquímicas, salvo por uma série de hospedeiros. Assim, no momento, os pesquisadores já se utilizam da nova nomenclatura, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (SMITH, 1897) Dye, 1978 (DYE et alii, 1980).

No Brasil, o crestamento comum foi assinalado pela primeira vez em 1953, no Rio de Janeiro (ROBBS, 1953). A partir desta data, tem sido registrado em todas as regiões produtoras de feijão do país. O seu agente causal foi descrito por ROBBS (1953) como *Xanthomonas phaseoli*, em materiais provenientes do Estado do Rio de Janeiro, sendo posteriormente, em 1965, determinada a presença do "strain" *fuscans*, no Estado de São Paulo, que diferia das demais, por produzir uma pigmentação parda em meio de cultura de extrato de carne (NAKAMURA & KIMATI, 1967; PARADELA FILHO & CARVALHO, 1967).

A similaridade de sintomatologia em campo, do "crestamento comum" causado por *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "crestamento fosco" causado por *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (E.F.Sm.) Dowson (BURKHOLDER, 1930; SUTTON & WALLEN, 1970) indica que a diferenciação entre as duas

doenças só poderia ser feita através de isolamento e estudos do agente causal (WALLEN & SUTTON, 1965; KIMATI, 1980). Em nutriente-agar, a maioria das espécies de *Xanthomonas* tem apresentado como característica um pigmento amarelo (xantomoadina), não difusível, enquanto que o "strain" *fuscans* difere pela produção de um pigmento pardo difusível em determinados meios (BURKHOLDER, 1930; ROBBS, 1953; COETZEE et alii, 1960; WALLEN & SUTTON, 1965; NAKAMURA & KIMATI, 1967; DYE, 1980; KIMATI, 1980).

Apesar de ser possível a diferenciação de ambas as doenças, sob determinadas condições, a maioria dos trabalhos mais recentes faz referência somente ao crestamento comum causado por *X. campestris*pv. *phaseoli* (RAVA, 1984; VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984; VENETTE et alii, 1987 e SCHAAD, 1988b) enquanto que poucos mencionam as duas doenças separadamente (ZAPATA et alii, 1985 e BULISANI et alii, 1987). Por outro lado, CLAFLIN et alii, (1987) e SCHUSTER et alii (1987) referem-se ao "crestamento comum" causado por *X. campestris* pv. *phaseoli* incluindo o "strain" *fuscans*.

Os sintomas da doença aparecem na parte aérea da planta, sendo que, nas folhas, iniciam-se como pequenas manchas úmidas ou encharcadas, oleosas, verde escuro e translúcidas sobre a face inferior da folha. As lesões crescem de forma irregular, coalescem e a área necrosada torna-se marrom, apresentando aspecto de queimadura ou crestamento. Ge-

ralmente, na confluência com a parte sadia da folha, pode-se notar um estreito halo amarelado difuso e evanescente. Com ataques severos pode ocorrer o desfolhamento da planta. No caule, o sintoma pode ser observado na forma de estrias ou manchas encharcadas que evoluem adquirindo coloração avermelhada. Pode ocorrer quebra da planta na região necrosada devido a formação de cancrios no primeiro nó, e que origina uma fase da doença conhecida como podridão nodal. Segundo BURKHOLDER (1921), o sintoma de murcha que pode ocorrer em plântulas, causado por *X. o. pv. phaseoli*, é uma das evidências da natureza sistêmica da doença. Um exame microscópico de plantas raquíticas, embora sem lesões externas sobre folhas e vagens, revelou que os sistemas vasculares do caule foram invadidos pela bactéria e as sementes apresentaram-se com manchas amareladas sobre o hilo, indicando que o patógeno penetrou na vagem através do sistema vascular. As vagens podem infectar-se por via sistêmica ou pelos estômatos; neste caso, aparecem pequenas manchas, inicialmente encharcadas e translúcidas que, posteriormente, tornam-se avermelhadas e ligeiramente deprimidas; frequentemente as lesões coalescem e se estendem ao longo do sistema vascular (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; MOHAN et alii, 1983. As sementes afetadas perdem sua coloração típica, se enrugam, tomando um brilho de aspecto envernizado ou podem não apresentar qualquer sintoma (LANDAETA, 1968; KIMATI, 1980). Em casos mais graves, as sementes apodrecem completamente dentro das vagens ou ficam re

duzidas a tegumentos vazios e encarquilhados (ATHAYDE & PACOVA, 1985). Quando as sementes infectadas são postas a germinar, o meristema apical das plântulas pode ser destruído acarretando - lhes a morte ou dando origem a plântulas doentes que produzem poucas vagens (VIEIRA & SARTORATO, 1984).

Embora os sintomas da doença sejam usualmente característicos, eles podem ser confundidos aos de outras moléstias foliares e de vagens do feijoeiro como o caso do crestamento de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*); os sintomas podem também ser parecidos com outros distúrbios que ocorrem na planta, como danos provocados por produtos químicos, empardecimento fisiológico, deficiência de zinco, injúrias devido aos agentes oxidantes do ar e diversos estresses (SAETTLER & ANDERSEN,¹ citado por TRUJILLO & SAETTLER, 1980 ; CLAFLIN et alii, 1987).

2.2. Patogenicidade, sobrevivência, e disseminação de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

A patogenicidade de *X. campestris* pv. *phaseoli* foi demonstrada em 1897 (ZAUMEYER & THOMAS, 1957). Num estudo sobre a variabilidade do patógeno, WATSON (1970) não encon-

1 SAETTLER, A.W. & ANDERSEN, A.L. Bean diseases and their control. In: ROBERTSON, L.S. & FRASIER, R.D., ed. Dry bean production, principles and practices. East Lansing, Michigan State University, 1978.p.172- 9 (Extension bulletin E.1251).

trou diferenças consistentes em patogenicidade entre isolados com e sem habilidade para produzir pigmento. As primeiras evidências de variação patogênica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes de diferentes regiões geográficas, foram obtidas por SCHUSTER & COYNE (1971) e SCHUSTER et alii (1973). Em investigações posteriores, EKPO & SAETTLER (1976) verificaram que os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* foram significativamente mais patogênicas do que os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*. OLEAS ARIAS (1982), trabalhando com cinco isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* procedentes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, verificou que os mesmos manifestaram variação patogênica, denominando-os de isolados altamente patogênicos, de patogenicidade intermediária e de fraca patogenicidade. RAVA (1984), em trabalho conduzido com isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provenientes de diferentes procedências, demonstrou, através da avaliação de sintomas, que os isolados do Brasil foram altamente patogênicos quando comparados com os da Colômbia, Estados Unidos, Uganda e Porto Rico.

As bactérias fitopatogênicas, em sua maioria, são aeróbicas e não formam endosporos como ocorrem com vários outros organismos. Sob condições adversas do ambiente, as células bacterianas entram em estado dormente ou hipobiótico, podem viver por longos períodos sem exigir nutrientes e tem maior aptidão para sobreviver em condições físicas e químicas adversas do que quando em plena atividade metabólica (LEBEN,

1974; SCHUSTER & COYNE, 1974). As fitobactérias do feijoeiro sobrevivem, de um ano para o outro, em restos de cultura, no solo, em plantas hospedeiras e, principalmente, nas sementes (interna e externamente). O êxito da sobrevivência depende, em parte, da quantidade de inóculo produzida e da continuidade das culturas hospedeiras. (SCHUSTER & COYNE, 1977)

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* pode sobreviver por muitos anos em resíduos de plantas doentes. Segundo SCHUSTER (1967) e KIMATI (1980), palha infectada com *X. campestris* pv. *phaseoli*, mantida na superfície do solo, foi mais eficiente na sobrevivência da bactéria do que aquela incorporada a uma profundidade de 10-20 cm. ZAUMEYER & THOMAS (1957) constataram que esse patógeno permaneceu em campos onde se utilizaram sementes sadias, sugerindo a possibilidade de sobrevivência da bactéria no solo ou a existência de outra fonte de inóculo (WELLER & SAETTLER, 1980). Por outro lado, SUTTON & WALLEN (1970) não conseguiram isolar *X. campestris* pv. *phaseoli* incluindo o "strain" *fuscans* de amostras de solo onde cresceram plantas infectadas de feijoeiro. Segundo VIEIRA & SARTORATO (1984) e ATHAYDE & PACOVA (1985), uma vez que o patógeno seja introduzido numa área, pode sobreviver no solo e nos restos de cultura possivelmente por dois anos.

Na sobrevivência de *X. campestris* pv. *phaseoli* é importante considerar outros hospedeiros além de *Phaseolus vulgaris*. Segundo SCHUSTER (1967), folhas infectadas de

Amaranthus retroflexus e *Chenopodium album* apresentaram "strains" patogênicos da bactéria, depois de permanecerem dez meses no campo. De acordo com KIMATI (1980), a sobrevivência dessa bactéria nos hospedeiros *A. retroflexus* e *Phaseolus arthropurpureus* deve apresentar um papel importante nas condições brasileiras, onde não há planejamento de rotações e o cultivo do feijoeiro é feito durante o ano todo na mesma área. Além desses, foram descritos como hospedeiros *Phaseolus coccineus* (NAKAMURA & KIMATI, 1967), *Phaseolus mungo*, *P. acutifolius*, *P. angularis*, *P. lunatus*, *P. multiflorus*, *Vigna sinensis*, *Glycine max* (ZAUMEYER & THOMAS, 1957) e *Vigna odiosa*, *V. mungo* e *Macroptilium lathyroides* (MOFFETT & CROFT, 1983).

Sem dúvida, um dos meios mais eficientes de sobrevivência de *X. campestris* pv. *phaseoli* está na semente (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; SAETTLER & PERRY, 1972; SCHUSTER & COYNE, 1974). A sobrevivência na semente é tão longa quanto a sua própria viabilidade, e poucas sementes infectadas podem resultar em desastrosas epidemias (KIMATI, 1980). Diversos autores detectaram bactérias em sementes armazenadas de feijão. BURKHOLDER (1921) detectou a presença de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em sementes de feijão "Red Kidney" de dois anos de idade e que, sementes armazenadas por três anos produziram plantas com crestamento comum. Por outro lado, ZAUMEYER & THOMAS (1957) isolaram a bactéria de sementes de feijão ar

mazenadas durante dez anos. De igual forma, BASU & WALLEN (1966) estabeleceram que a bactéria permaneceu viável na semente de feijão por três anos, à temperatura variando de 20° a 35°C, enquanto que SCHUSTER & SAYRE (1967) isolaram a bactéria de sementes armazenadas por quinze anos a 10°C (SCHUSTER & COYNE, 1974). O inóculo de *X. campestris* pv. *phaseoli* pode localizar-se tanto externa como internamente no tegumento ou ainda, algumas vezes no embrião da semente, após a penetração no sistema vascular (SCHUSTER e COYNE, 1974; NEERGAARD, 1979; ALVAREZ et alii, 1979; WELLER & SAETTLER, 1980; VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984; MENTEN & BUENO, 1987; RAT, 1988c). Segundo CUNFER(1988), a localização de patógenos bacterianos sobre ou dentro da semente é resultado de vários fatores, entre os quais, o local através do qual o hospedeiro é infectado, o tempo de infecção em relação ao desenvolvimento da semente e as condições climáticas predominantes. Assim, é possível que a variação de período de sobrevivência do patógeno na semente pode estar relacionado com as condições de armazenamento da semente e a localização do patógeno.

Além da importância na sobrevivência, as sementes constituem o meio mais eficiente de transporte ou disseminação do patógeno tanto interno como externamente, principalmente a longas distâncias, e em importante fonte primária de inóculo no campo (SCHUSTER et alii, 1973; NEERGAARD, 1979). Assim, se as sementes portadoras do patógeno determinarem fo

cos de infecção na mesma área, na vizinhança ou em áreas distintas, diz-se que ocorreu transmissão do patógeno, podendo neste caso, resultar em epidemia, se as condições climáticas forem favoráveis e a cultivar for suscetível. Além disso, a transmissão de patógenos por sementes é reconhecida como um excelente método pelo qual os fitopatógenos são introduzidos em novas áreas, sobrevivem na "ausência" de hospedeiros e, são selecionados e disseminados como raças específicas a determinados hospedeiros (MENTEN & BUENO, 1987).

Para avaliar a eficiência da semente como veículo de disseminação e transmissão de patógeno, estudos realizados no Canadá, mostraram que 0,5% de semente com *X. campestris* pv. *phaseoli*, ou 0,01% de sementes portadoras do patógeno por hectare, no caso de crestamento de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), foram suficientes para iniciar uma epidemia na lavoura de feijoeiro, quando prevaleceram condições climáticas favoráveis de umidade e temperatura (WALLEN & SUTTON, 1965; KIMATI, 1980). WALKER & PATEL (1964) e GUTHRIE et alii (1965) determinaram que 0,02% e 0,006% de sementes portadoras de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, respectivamente, foram capazes de iniciar pesadas infecções de campo e severas perdas sob condições climáticas apropriadas.

2.3. Controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro

Dentre as diversas estratégias de controle do

crestamento comum, incluem-se práticas de rotação de culturas, eliminação de restos de cultura, aração profunda do solo, irrigação no sulco de plantio, utilização de sementes saudias, tratamento de sementes ou aplicação foliar de bactericidas e, a longo prazo, o emprego de cultivares tolerantes e ou resistentes (KIMATI, 1980; VIEIRA & SARTORATO, 1984; KULIK & STANWOOD, 1984; ATHAYDE & PACOVA, 1985). Práticas culturais de controle, incluindo rotação de culturas e uso de sementes livres do patógeno, não são usadas em regiões onde a cultura de subexistência é prevalente (WEBSTER et alii, 1980). Qualquer controle mediante o uso de práticas culturais não elimina o patógeno, mas auxilia na diminuição do inóculo (ATHAYDE & PACOVA, 1985).

Os produtos químicos, sejam aplicados em tratamento de sementes ou em pulverizações, tem controlado algumas doenças fúngicas, mas apresentam limitado sucesso com doenças bacterianas (SCHAAD, 1982 e 1983), incluindo o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (SAETTLER & POTTER, 1967; WELLER & SAETTLER, 1976; RALPH, 1977; WEBSTER et alii, 1980):

O tratamento de sementes para o controle de patógenos bacterianos têm sido ineficientes por causa da necessidade de se reduzir a infecção a níveis muito baixos, visto que, sob condições favoráveis, ocorre a disseminação secundária (CROSSE, 1971) e as medidas de controle

tornam-se inadequadas (RALPH, 1977).

Embora o emprego da resistência genética, por ser o método mais prático e econômico de controle do cresta - mento comum, tenha grande potencial (RAWA et alii, 1990), a mo - léstia pode ser considerada de controle problemático, pe - la dificuldade em se obter resistência ou tolerância nas cul - tivares de valor comercial, porque há um amplo espectro de plantas hospedeiras do patógeno, pela baixa eficiência de con - trole por meio de pesticidas e, também, pelo siste - ma de cultivo em mais de uma época no mesmo ano, possibilitan - do a sobrevivência e mesmo a multiplicação da bactéria (BULI - SANI et alii, 1987). Embora a resistência genética tenha si - do útil no controle, nem sempre está disponível (SCHAAD, 1988a). Segundo ZAPATA et alii (1985), o controle do crestamento co - mum é difícil devido ao patógeno ser transmitido por sementes e ter alta capacidade de sobrevivência.

Tradicionalmente, o controle das fitobactérias transmitidas por sementes, nos países produtores, se realiza com base em programas de certificação de sementes, os quais asseguram materiais livres do patógeno (SAETTLER & PERRY, 1972; EDNIE & NEEDHAM, 1973; COPELAND et alii, 1975; RALPH, 1977; WELLER & SAETTLER, 1980; WEBSTER et alii, 1983). Esta tem sido a melhor estratégia de controle das doenças bacte - rianas transmitidas por sementes (RAT, 1988b).

RALPH (1977) sugeriu que devido a baixa efetivi

dade do tratamento químico das sementes, o controle dos patógenos bacterianos do feijoeiro deveria ser centralizado sob medidas de exclusão do inóculo primário, através de esquemas de certificação de sementes combinado com o uso de bactericidas em tratamento de sementes.

BULISANI et alii (1987) consideraram que a medida de controle do crestamento comum que tem trazido resultados satisfatórios é a utilização de sementes com elevado padrão de sanidade, isto é, aquelas produzidas em regiões de clima seco onde as condições são desfavoráveis ao desenvolvimento de *X. campestris* pv. *phaseoli*, associada a rotação de culturas. Controle cultural como rotação, aplicação foliar de fungicidas, tratamento de sementes ou o uso de sementes produzidas em climas semi-áridos, tem sido usados com limitado sucesso (SCHAAD, 1988a).

No passado, as inspeções visuais de campo foram requeridas para vários programas de certificação de sementes, tendo auxiliado na eliminação de muitos lotes de sementes altamente infectados, mas certamente não aqueles com baixos níveis de infecção. De fato, em Michigan, 25% dos lotes de sementes certificadas de feijão continham sementes infectadas por *X. campestris* pv. *phaseoli* (COPELAND et alii, 1975). Na Califórnia, os programas de certificação de sementes não foram suficientes para garantir lotes de sementes livres de *P. syringae* pv. *phaseolicola* uma vez que severas

epidemias de crestamento de halo tem ocorrido, mesmo em culturas originárias do uso de sementes certificadas de feijão (GROGAN & KIMBLE, 1967).

Não há dúvida que as inspeções de campo são de valor em esquemas de certificação de sementes, mas alguns cuidados devem ser tomados. CAFATI & SAETTLER (1980) citaram que cultivares de feijoeiro resistentes a *X. campestris* pv. *phaseoli* podem não mostrar sintomas de crestamento comum no campo, porém, o patógeno pode estar presente na semente e ser transmitido. SAETTLER et alii (1981) sugeriram que as inspeções de campo para controle de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em feijão foram parcialmente úteis na eliminação de infecção de sementes, visto que, epidemias do crestamento de halo ocorreram ocasionalmente em campos plantados com sementes de cultivares tolerantes e consideradas livres do patógeno. Outro fator que pode reduzir o sucesso das inspeções de campo, é o fato de que sintomas de doenças fitobacterianas cujo patógeno é transmitido por sementes podem ser mascarados por outras doenças (SCHAAD, 1982), como no caso de alguns fungos em feijão, que podem provocar sintomas parecidos com os ocasionados por bacterioses (LANDAETA, 1968).

Apesar do crestamento bacteriano ser considerado uma doença de importância para o Brasil, principalmente, no cultivo de feijão das "águas" e, que pode causar danos severos nas regiões de altas umidade e temperatura (VIEIRA &

SARTORATO, 1984; BULISANI et alii, 1987), praticamente não existe nenhum estudo de avaliação do inóculo presente na semente, o quanto é transmitido e passa a se constituir em fonte de inóculo no campo (planta doente); podendo iniciar uma epidemia.

Segundo NEERGAARD (1979), mais de 45 bactérias fitopatogênicas são transmitidas por sementes. Portanto, são de grande importância econômica e poucas são as doenças bacterianas que podem ser controladas no campo. Com o aumento do uso de sementes melhoradas e ampla distribuição e intercâmbio de sementes por via aérea, tem sido necessário intensificar o controle das bactérias de sementes, principalmente, tratando-se de patógenos de disseminação rápida que provocam enfermidade de "caráter explosivo". Correntemente, onze patógenos bacterianos de sementes são controlados por diversos países da Europa, entre os quais está incluído *X. campestris* pv. *phaseoli*. A Organização de Proteção de Plantas da Europa e Mediterrâneo (EPPO) definiu dois tipos de organismos para quarentena: A-1, que incluem patógenos não presentes na região e A-2, que incluem aqueles presentes mas sujeitos as medidas fitossanitárias internacionais para prevenir a disseminação do patógeno (SCHAA), 1988a). No Brasil, segundo SOAVE & MORAES (1987), o certificado fitossanitário ROMA, específico para quarentena, é emitido pelo Serviço de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura. Este certi-

ficado diz claramente que o lote de sementes se encontra praticamente livre de doenças e pragas nocivas e que está de acordo com a legislação fitossanitária do país importador. É evidente que o valor deste documento depende dos testes de sanidade utilizados para análise das sementes.

2.4. Métodos de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão

Além das inspeções de campo que são feitas para observação de sintomas de plantas, é necessário conhecer a condição de sanidade das sementes, submetendo-as a análise fitopatológica em laboratório. Esta análise é o procedimento mais seguro de determinar se as sementes estão transportando bactérias (LANDAETA, 1968). Um importante fator nos programas para fornecer sementes livres de patógeno, é a disponibilidade de um método seguro para detectar sementes portadoras. Os testes de sementes podem ser fundamentais para o controle de bactérias das mesmas, fornecendo informações para a expedição de certificados de sanidade e sobre a necessidade de um tratamento para erradicar um patógeno específico bem como a necessidade de quarentena. Além disso, devem ser reproduzíveis, econômicos, rápidos (SCHAAD, 1988) e de alta sensibilidade (RAT, 1988c).

Diversos métodos tem sido desenvolvidos para

teste de sanidade de sementes visando a detecção de bactérias fitopatogênicas, os quais, com leves modificações, podem ser adaptados para detectar a presença de diferentes bactérias de sementes (GUTHRIE et alii, 1965; PARASHAR & LEBEN, 1972; SHEKHAWAT & CHAKRAVARTI, 1979; SCHAAD, 1982). Para o caso de sementes de feijão, visando detectar *X.campestris* pv. *phaseoli*, vários métodos tem sido empregados, tais como:

1. Inspeção de sementes para sintomas visíveis

É um teste conduzido juntamente com a análise de pureza. As sementes classificadas como puras devem ser examinadas, visando encontrar sinais ou sintomas indicativos da presença de microorganismos. Considerando que as sementes podem apresentar sintomas de diferentes intensidades, a amostra deve ser examinada com auxílio do microscópio estereoscópico com poder de ampliação de até 60 x (LUCCA FILHO, 1987). Para detectar *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, ANDERSON et alii (1970) usaram a inspeção visual de sementes de feijão seguido de inoculação por injeção em plantas hospedeiras com líquido extraído de sementes imersas em água por 24 horas. Segundo NEERGAARD (1979), algumas vezes, esse patógeno do crestamento pode ser detectado em sementes de feijão pela presença de massas de células na área do hilo da semente. De acordo com LUCCA FILHO (1987), embora esse método permita obter uma rápida informação sobre o estado sanitário das sementes, não requerendo equipamentos sofisticados, mostra somente os

patógenos causadores de sintomas visíveis externamente. Além disso, não oferece informação sobre a viabilidade do patógeno.

2. Uso de bacteriófagos

A contagem de fagos em placas ou método de KATZNELSON (1950), consiste em se determinar a concentração inicial de partículas do fago em uma preparação, e adicioná-las a macerados de sementes ou sementes íntegras em meios líquidos. Após um período de incubação de 24 horas, o meio líquido é filtrado e espalhado em placas com camadas de agar previamente inoculadas com bactéria indicadora. Um aumento na contagem de fagos (placas de lise), acima de 100 vezes, indica a presença do patógeno na amostra. Esta técnica tem sido utilizada por KATZNELSON (1950); KATZNELSON et alii (1954); WALLEN & SUTTON (1965); TAYLOR (1970); EDNIE & NEEDHAM, (1973) e TRUJILLO & SAETTLER (1979), para detecção de bactérias em sementes de feijão. É um método simples e rápido, de grande sensibilidade e eficiência, que pode ser aplicado em testes de rotina, utilizando grande número de amostras (TEMPE, 1970; KIRALY et alii, 1974); não envolve equipamentos sofisticados e onerosos, além de ser facilmente avaliado. Embora os ensaios com bacteriófagos sejam altamente sensíveis, detectando infecções em sementes de feijão de 0,01%, consomem tempo, levando de 10 a 14 dias para se obter os resultados (MALIN et alii, 1983). Além disso, oferecem algumas outras desvantagens co-

mo a sensibilidade decrescida em presença de grande número de bactérias saprofíticas (EDNIE & NEEDHAM, 1973; LUCA FILHO, 1987), e a falta de bacteriófagos ativos e específicos para as bactérias que necessitem ser detectadas (SCHAAD, 1982). De acordo com DESCHODT & STRIJDOM (1979), o método tem sido frequentemente empregado para identificar os patógenos envolvidos após isolamento. Por outro lado, SCHAAD (1987) relata que por este método, o patógeno pode ser identificado diretamente no líquido contendo a semente.

3. Teste de crescimento ("growing-on test")

Este teste se baseia no crescimento de plântulas, inicialmente em substrato estéril, e observação do desenvolvimento de sintomas nas plantas que, frequentemente, são cultivadas até a maturação. Esta técnica tem sido empregada para a detecção de patógenos de feijão (GROGAN & KIMBLE, 1967; SCHAAD, 1982; WEBSTER et alii, 1983) e oferece a possibilidade de se determinar a transmissão da bactéria via semente. Entretanto, não é adequado para avaliar grande número de amostras de sementes, pois requer grande espaço físico em casas de vegetação, além da necessidade de período prolongado de tempo para obter a resposta. Problemas com expressão de sintomas devido a outros patógenos e falhas na germinação podem ocorrer, dificultando a avaliação (SCHAAD, 1987; RODRIGUES NETO, 1988). Devido às limitações, o teste de crescimento tem sido pouco usado em rotina. Todavia, par-

ticularmente para as inspeções quarentenárias de planta, o método é indispensável para detecção de importantes doenças cujos patógenos são transmitidos por sementes e podem se disseminar rapidamente em novas áreas, como é o caso de *X. campestris* pv. *phaseoli* em feijão. (NEERGAARD, 1979).

4. Técnica de isolamento direto

Consiste na moagem de quantidades variáveis de sementes a seco e incubação por duas horas em água. Em seguida, aplicando a técnica de diluição e transferência da suspensão obtida para placas, com meio B de King (KB), obtêm-se as colônias, que são identificadas como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* através de bacteriófagos específicos (TAYLOR, 1970). É um método que não requer equipamentos sofisticados e caros, e nem conhecimentos especializados para identificação dos isolados, além de possibilitar o teste de amostras de sementes de grandes tamanhos. Também, o método é de fácil execução, acurado, rápido (quatro dias) e quantitativo, porque estima a porcentagem de sementes portadoras de patógeno. Porém, a técnica é de limitado sucesso uma vez que sendo o meio KB não seletivo, dificulta a detecção de patógeno em amostras de sementes com baixos níveis de infecção (TAYLOR et alii, 1979). Segundo TAYLOR (1970), esta técnica de isolamento direto, pode ser usada para detectar outros patógenos bacterianos de feijão. Nesse sentido, EDNIE & NEEDHAN (1973) utilizaram a mesma técnica, modificada, para a detecção de *X.*

campestris pv. *phaseoli*, usando para a identificação, além do bacteriófago, a inoculação em plantas indicadoras. Essa técnica detectou níveis baixos de infecção tais como 1 semente portadora do patógeno em 10.000 sementes sadias. Uma variação desta técnica, foi descrita por SAETTLER & PERRY (1972) tendo como princípio, a incubação de sementes inteiras em água destilada esterilizada, durante 12-36 horas, fazendo-se posteriormente, diluições sucessivas, e cultivo sobre placas com meio YDC (Extrato de levedura - 10 g, dextrose - 10 g, CaCO_3 - 2,5 g, agar - 15 g/l de água). As colônias produzidas foram identificadas mediante provas bioquímicas e de patogenicidade.

5. Inoculação de plantas indicadoras

Nesta técnica de inoculação em planta indicadora ou teste de patogenicidade, geralmente utilizam-se como inóculo, culturas isoladas em meios artificiais ou suspensão obtida por inersão de sementes com ou sem assepsia em água destilada esterilizada ou meios líquidos, sob condições variadas; observa-se, posteriormente, a sintomatologia produzida. A inoculação pode ser realizada de várias maneiras: por meio de injeção, infiltração a vácuo, atomização, agulhas múltiplas, etc. A técnica tem se mostrado útil na detecção de fitobactérias em sementes de feijão, especialmente *X. campestris* pv. *phaseoli* (SAETTLER, 1971; SCHUSTER et alii, 1979; SCHWARTZ & LEGARD, 1982; WEBSTER et alii, 1983). A técnica pode apresentar as seguintes limitações: tempo (10-14 dias),

sensibilidade, espaço e infra-estrutura (SCHAAD, 1982 e 1987). Também, por ocasião da inoculação, deve ser levado em consideração a possibilidade do aparecimento de sintomas atípicos e o fato de algumas fitobactérias, como do gênero *Pseudomonas* elicitar reações em muitas plantas não hospedeiras, quando as mesmas forem cultivadas sob condições não favoráveis ou as dosagens de inóculo forem altas (SANDS et alii, 1980). Além disso, sintomas produzidos por outros agentes de sementes, como fungos, devem ser prevenidos (RODRIGUES NETO, 1988). A sensibilidade é baixa, sendo necessárias populações mínimas de 10^3 ou 10^4 células bacterianas/ml para produção de sintomas em plantas em condições de campo (RAT, 1988b).

Segundo WALLEEN & SUTTON (1965), o emprego de testes de inoculação em plantas indicadoras, em programas de rotina, é essencial para situações onde novos "strains" do patógeno, podem aparecer como o ocorrido em 1961, em Ontario, com *X. campestris* pv. *phaseoli* em feijoeiro.

Para examinar a especificidade das reações ao crestamento comum, SAETTLER (1971) inoculou plântulas com um grande número de bactérias do feijoeiro, patogênicas ou não. Somente plantas inoculadas com líquido extraído de sementes de *X. campestris* pv. *phaseoli* desenvolveram sintomas da doença. Particularmente interessante foi que nenhum dos 74 isolados de bactérias "contaminantes" de sementes produziu sintomas. Tais bactérias são representativas dos contaminan

tes encontrados em ensaios de programas de feijão que poderiam interferir com o diagnóstico cultural e serológico dos organismos causadores de crestamento. De acordo com SCHAAD (1982), a grande vantagem do método de inoculação em plantas é que o desenvolvimento de sintomas característicos fornece evidências diretas do patógeno (RAT, 1988b; SCHAAD, 1987).

A detecção de bactérias de sementes por reação de hipersensibilidade em folhas de fumo foi descrita por KLEMENT (1983). Por essa técnica, o tempo de investigação para identificar o patógeno pode ser reduzido de uma semana para várias horas (*Pseudomonas* fitopatogênicas, de 6 a 10 horas e *Xanthomonas*, de 10 a 24 horas), com a segurança de que bactérias saprofíticas não são capazes de induzir essa reação.

A técnica de enriquecimento por infiltração à vácuo da infusão obtida a partir de sementes ("Dome test"), empregada em ensaios para detectar patógenos bacterianos de sementes de feijão foi essencial quando a infecção foi baixa nas sementes (DHINGRA & SINCLAIR, 1985). Embora LAHMAN & SCHAAD (1985) tenham criticado esse teste, segundo o qual lotes de sementes de feijão livres do patógeno foram declarados portadores do mesmo, VENETTE et alii (1987) concluíram que o teste representa uma estimativa do inóculo inicial e a alta correlação entre os resultados obtidos pelo "Dome test" e pelos testes serológicos, indica que o teste pode ser útil como procedimento presuntivo para detectar patógenos bacteria-

nos de feijão.

6. Técnicas serológicas

Diversas técnicas serológicas tem sido utilizadas para a detecção de bactérias em sementes desde as mais simples como aglutinação em lâminas ou placas (microprecipitina) e imunodifusão em gel, até as mais sofisticadas como imunofluorescência e ELISA.

Microprecipitina em placas

Na aglutinação, quantidades definidas de uma suspensão bacteriana e de antissoro são colocadas em contato, na superfície de uma placa ou lâmina. Após um período relativamente curto, de algumas horas, observa-se a formação ou não de um precipitado (ROMEIRO & FUKUDA, 1983 ; RODRIGUES NETO, 1988).

Imunodifusão em gel-de-agar

Na imunodifusão em gel de agar de Ouchterlony , tanto a suspensão bacteriana como o antissoro são colocados em orifícios próximos feitos no agar. As substâncias migram através do ágar e ao se encontrarem, formam ou não as linhas de precipitação que poderão ser de identidade, identidade parcial ou não identidade (KIMATI, 1975; NEERGAARD, 1979; RODRIGUES NETO, 1988).

Imunofluorescência (IF)

Baseia-se na marcação (direta ou indireta) dos anticorpos com uma substância fluorescente como, por exemplo, isotiocianato de fluoresceína. Quando o anticorpo conjugado é combinado com a bactéria, sua presença é visualizada ao microscópio (com fonte de luz UV) com um halo fluorescente envolvendo a célula. Na IF direta, a substância fluorescente é conjugada diretamente com os anticorpos produzidos contra a bactéria, enquanto que na IF indireta, a bactéria é "revestida" pelos anticorpos obtidos pela imunização de coelhos. Anticorpos produzidos em ovelhas contra as imunoglobulinas de coelhos são então conjugadas com fluorescência e visualizados quando se ligam a qualquer anticorpo aglutinado à célula bacteriana (RODRIGUES NETO, 1988).

Teste de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay")

O procedimento deste teste é comparável à IF, porém, o marcador é uma enzima que pode ser a fosfatase alcalina. Portanto, as gama-globulinas do antissoro são conjugadas a essa enzima e, na formação do complexo antígeno-anticorpo (uma reação específica), a quantidade de enzima mais anticorpo fixada é evidenciada pela mudança de cor na placa de poliestireno que contém as proteínas. A intensidade de coloração é uma medida da quantidade de anticorpos fixados (RODRIGUES

NETO, 1988).

As técnicas serológicas mais simples, como aglutinação e imunodifusão em gel, tem sido usadas para identificar *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em culturas enriquecidas de sementes de feijão (GUTHRIE et alii, 1965; TAYLOR, 1970; NEERGAARD, 1979). Essas técnicas mostraram ser rápidas, específicas e empregadas frequentemente para identificar os patógenos de sementes após o isolamento (DESCHODT & STRIJDOM, 1979; RAT, 1988a). Segundo SCHAAD (1982) e MALIN et alii (1983), a técnica da imunodifusão apresenta limitações como baixa sensibilidade e maior consumo de tempo para obter os resultados (mais de 40 horas), especialmente quando numerosas amostras são testadas simultaneamente; a IF é mais sensível e necessita menos antissoró, permitindo visualizar rapidamente as reações de aglutinação (28 horas), porém, requer um antissoro mais específico que nas técnicas mais simples. Os testes serológicos de isolados de sementes, através da dupla difusão em gel de agar, permitiram identificar *X. campestris* pv. *phaseoli* com alta especificidade, sugerindo possível aplicação prática em trabalhos de certificação de sementes de feijão (OLEAS ARIAS, 1982).

Melhorias adicionais na sensibilidade das técnicas serológicas tem sido obtidas através do uso da IF direta ou indireta (SCHAAD, 1978; MALIN et alii, 1983) com a vantagem do uso da técnica indireta pelo fato de que o conjugado

pode ser utilizado para todos os antissoros produzidos em coglhos. Portanto não há necessidade se se conjugar cada antissoro obtido, como no método direto (RODRIGUES NETO, 1988). MALIN et alii (1983), usando a IF indireta, relataram a detecção de *X.campestrispv.phaseoli* em sementes de feijão a níveis de infecção tão baixos quanto 0,01%. O teste leva 28 horas, que é um período curto, comparado com 14 a 21 dias requerido para o teste de patogenicidade, não sendo necessário câmaras de crescimento ou espaços físicos em casa de vegetação. Segundo os autores, houve indicação de que a IF indireta combinada com uma ou mais inspecções de campo para detecção de sintomas do crestamento comum, em um programa de certificação de sementes, auxiliaram na eliminação de lotes de sementes portadoras de *X. campestris pv. phaseoli*.

De acordo com KULIK (1984), técnicas serológicas como ELISA e IF, para detecção de bactérias em sementes, exigem um nível maior de conhecimento para interpretação dos resultados, reagentes especializados e, algumas vezes, utilizam instrumentos caros. Outra desvantagem é que o antígeno e não o patógeno, que está sendo detectado.

Segundo VAN-VUURDE (1987), a IF tem demonstrado seu valor potencial para detecção de patógenos bacterianos de semente de feijão, entre os quais *X. campestris pv.phaseoli* e *P. syringae pv. phaseolicola*. As vantagens para aplicação em rotina consistem em obter resulta-

dos dentro de 5 dias, baixo custo e técnicas com limitado treinamento. O principal risco é a ocorrência de reações cruzadas entre antissoros e microrganismos saprofíticos. Embora SCHAAD (1982) e RAT (1988b) considerem que muitas técnicas serológicas podem ser usadas para a detecção de patógenos, IF e ELISA são mais apropriadas pela rapidez na resposta e relativa simplicidade das técnicas. Entretanto, essas técnicas não asseguram viabilidade da bactéria, podendo ocorrer reações cruzadas com bactérias saprofíticas ou células mortas do patógeno, o que indica que a segurança não é absoluta. Ainda segundo RAT (1988b) a sensibilidade dessas técnicas é baixa, necessitando 10^3 e 10^5 bactérias/ml para se detectar através do IF e ELISA, respectivamente. A técnica de ELISA, que pode ser indireta ou de "duplo-sanduiche", tem a vantagem de propiciar análise de grande número de amostras, utiliza menores quantidades de antissoro, além de ser um método quantitativo (RODRIGUES NETO, 1988). Porém, segundo SCHAAD (1987), há necessidade de confirmação de identidade pelo teste de patogenicidade.

A serologia também tem sido utilizada, combinada com outra técnica no estudo de bactérias fitopatogênicas. TRUJILLO & SAETLER (1979) desenvolveram técnicas combinadas de meio semi-seletivo e serologia (dupla difusão em gel-de-agar) para detectar *X. campestris* pv. *phaseoli* localizada internamente na semente do feijão. Também VELASQUEZ & TRUJILLO (1984) concluíram que essa combinação de técnicas

foi um procedimento altamente seguro para detecção dessa bactéria.

7. Meios seletivos e semi-seletivos

Na década de 70, foram numerosas as tentativas de encontrar um meio seletivo para rápido isolamento e identificação de bactérias patogênicas de planta. Entretanto, nenhum meio foi aceitável para *X. campestris* pv. *phaseoli*, por causa da baixa eficiência e só a partir de 1980, um meio líquido, semi-seletivo para esse patógeno, foi desenvolvido por TRUJILLO & SAETTLER (1980). A detecção de pequenos números de células bacterianas patogênicas, dentro ou sobre a semente, tem sido difícil por causa do número relativamente grande de bactérias saprofíticas, taxonomicamente relacionadas aos patógenos, que interferem com o crescimento dos mesmos em meios seletivos. Para WELLER & SAETTLER (1980), a detecção de infecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão sem sintomas, seria quase impossível pelos métodos correntemente usados (testes de crescimento, uso de bacteriófagos, inoculação em hospedeiros suscetíveis, técnicas serológicas, testes culturais ou uso de meios seletivos) por causa da baixa frequência dos organismos nos lotes de sementes e seu baixo nível populacional dentro de sementes individuais (menos que 10^5 células/semente). A técnica combinada de meio seletivo e serologia, desenvolvida por

TRUJILLO & SAETTLER (1979), permitiu detectar maiores Índices de infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão do que a técnica de injeção em plantas. Ainda segundo esses autores, o decréscimo de contaminantes bacterianos internos à semente mostrou-se vantajoso em relação a outros testes.

SHARON et alii (1982) relataram um método de enriquecimento em folhas destacadas para detecção de baixos níveis ($10^1 - 10^2$ células/semente) de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate e pimenta (*Capsicum annum* L.), respectivamente; através do plaqueamento das sementes em meios seletivos, detectaram os patógenos somente quando concentrações de inóculo maiores que 10^4 células/ml estavam presentes em 1 g de sementes inoculadas. SCHAAD (1982) considerou que se a técnica de enriquecimento fosse preferível, haveria necessidade de adicionar antibiótico ao meio líquido para aumentar seletivamente o crescimento do patógeno. A simplicidade e a alta sensibilidade dos métodos de enriquecimento estimulam o seu uso para detecção de baixas populações dos patógenos de sementes (IRWIN, 1987).

Nesse contexto, um meio seletivo (MXP) foi de desenvolvido por CLAFLIN et alii (1987) para detectar *X. campestris* pv. *phaseoli* e o "strain" *fuscans* de sementes de feijão. Estas foram incubadas por 6 horas, a 28°C, em um

diluyente de 12,5mM de PO_4 + 10 mM de $MgSO_4$ acrescido de 0,01% de tween 20 e o líquido obtido foi plaqueado em meio MXP. Uma limitação desse meio foi que, embora todos os "strains" do patógeno hidrolisassem amido, verificou-se que alguns deles cresceram lentamente ou não cresceram sobre MXP. MOHAN & SCHAAD (1987) desenvolveram meios semi-seletivos para detecção de *P. syringae* pv. *syringae* (KBC) e *P. syringae* pv. *phaseolicola* (MSP) em sementes de feijão. Suspensão de $2,1 \times 10^4$ células de *P. syringae* pv. *syringae* adicionada a 1 kg de sementes foi detectada sobre o meio KBC, enquanto que a concentração de 10^2 - 10^5 células de *P. syringae* pv. *phaseolicola* /semente foi detectada em amostras de sementes naturalmente portadoras do patógeno através do meio MSP.

Segundo SCHAAD (1982), enquanto que o uso dos meios semi-seletivos aumenta as chances de sucesso no isolamento do patógeno, há necessidade de confirmação da identidade pelo teste de patogenicidade, o que consome tempo, tornando-se limitante para os programas de certificação de sementes, uma vez que os resultados devem ser disponíveis rapidamente. Além disso, embora esses meios sejam extremamente práticos, é igualmente difícil desenvolver um meio que restrinja o crescimento de todos os contaminantes das diversas microfloras encontradas em sementes. O meio preferível seria aquele que exigisse ingredientes disponíveis, fosse de fácil preparo, baixo custo e permanecesse efetivo após pro-

longada armazenagem(CLAFLIN et alii, 1987).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a detecção de bactérias em sementes. Elas apresentam grandes variações quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade, de acordo com o tipo de semente e a bactéria testada. Poucas são quantitativas e algumas muito específicas para determinadas bactérias. A importância de quantificar o inóculo na semente, foi descrita por TAYLOR (1970), segundo o qual um teste sobre única amostra de semente, pode indicar presença ou ausência do patógeno, mas não fornece informação sobre o nível de contaminação ou infecção. Quando uma série de sub-amostras, de tamanhos decrescentes foi testada, a menor sub-amostra em que a presença do patógeno foi detectada fornece uma grosseira indicação do nível de sementes portadoras do patógeno no lote. Para tornar mais precisas as determinações, o número e o tamanho das sub-amostras podem ser escolhidos e ajustados a um procedimento estatístico, conhecido como o método do Número Mais Provável (NMP). Este método estatístico, largamente usado para estimar densidades bacterianas em líquidos (COCHRAN, 1950), foi adaptado e aplicado por TAYLOR (1970) e TAYLOR et alii (1979), para estimar a porcentagem de sementes de feijão portadoras de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em um lote, usando as tabelas de interpretação de resultados segundo SWAROOP (1951). Portanto, não existe uma metodologia padrão que atenda as várias necessidades. Ge

ralmente, para o desenvolvimento de metodologias para testes de sementes, em laboratório, três etapas importantes devem ser consideradas, ou seja: a) extração da bactéria, b) identificação de espécie e c) determinar a sensibilidade do teste e níveis de tolerância (SCHAAD, 1982; RODRIGUES NETO, 1988).

A escolha de um método de extração é muito importante e deve ser feita levando-se em consideração a espécie de planta, o tipo de patógeno e a utilização de sementes de várias procedências, uma vez que o patógeno pode se localizar externa ou internamente à semente (SCHAAD, 1982; VAN-VUURDE, 1987). Melhorias das técnicas de extração do patógeno das sementes, associadas com métodos rápidos e específicos de identificação da bactéria isolada (VAN - VUURDE et alii, 1983; SCHAAD et alii, 1986), são necessárias para a maior eficiência e segurança nos testes de sementes (MOHAN & SCHAAD, 1987). Segundo SCHAAD (1987), a maior limitação da maioria dos métodos de detecção é a própria identificação do patógeno, sugerindo que o melhor método disponível seja a combinação de isolamento em meio semi-seletivo com a identificação através de técnicas ou exame do DNA.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Local e época de realização da pesquisa

Os experimentos componentes da presente pesquisa foram realizados nos laboratórios e casas-de-vegetação dos Departamentos de Fitopatologia e Tecnologia de Sementes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba (SP), no período compreendido entre fevereiro de 1987 a outubro de 1989.

3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para isolamento do patógeno (sementes e folhas), repicagem, preservação e preparo de inóculo foram os seguintes:

3.2.1. Nutriente-glucose-agar - NGA (SCHAAD, 1988b)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Glucose	2,5 g

Agar	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

3.2.2. EPGA (RAT¹...)

Extrato de levedura.....	3,0 g
Peptona.....	7,0 g
Glucose.....	15,0 g
Amido(fécula de batata).....	15,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

Após a autoclavagem, à temperatura de 45-50° C, foram adicionados aos meios NGA e EPGA, o antibiótico cefalexina (Keflex) e o fungicida clorotalonil (Daconil BR, 75 PM), nas concentrações de 40 mg e 67 mg dos produtos comerciais, respectivamente, ajustando-se o pH para 7,2.

3.2.3. YDC (SAETTLER, 1971)

Extrato de levedura.....	10,0 g
Dextrose.....	10,0 g

¹RAT, B. (INRA - Station the Pathologie Vegetable - Angers - France) - Comunicação pessoal, 1987.

Carbonato de cálcio.....	2,5 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

3.3. Origem, obtenção e preservação dos isolados

Na presente pesquisa, foi usada a denominação de *X. campestris*pv. *phaseoli* como agente causal do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, salvo, para os testes serológicos onde incluirá *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* ("strain" *fuscans*).

3.3.1. Isolamento a partir de folhas e vagens

A partir de materiais vegetais frescos e/ou herborizados e armazenados em congelador, com sintomas típicos de crestamento bacteriano comum do feijoeiro, coletados em plantas mantidas em casa de vegetação e, em campos de cultivo de feijoeiro, procedeu-se o isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* incluindo o "strain" *fuscans*. Inicialmente, folhas e vagens foram lavadas em água corrente. Em seguida, esses materiais foram imersos em álcool 70% durante 15 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante 1 minuto. Posteriormente, foram lavados por duas a três vezes em água destilada esterilizada e colocados para secar em placas esterilizadas e mantidas em condições de laboratório. Desses materiais, seções de folhas e vagens de

2 a 3 cm de comprimento foram recortadas entre as regiões de tecidos necrosados e sadios e, utilizando a técnica descrita por MASUDA & TOKESHI (1978), procedeu-se o isolamento da bactéria. Uma seção do material foi então colocada em lâmina de vidro esterilizada com uma gota de água. A lâmina foi examinada ao microscópio estereoscópico no aumento de 10 vezes, com iluminação de luz indireta, para observar a exudação da bactéria. Posteriormente, com uma micropipeta esterilizada, transferiu-se a suspensão bacteriana para o meio de agar e as placas foram incubadas em câmaras de crescimento à temperatura controlada de 28°C durante 48-72 horas. Após o crescimento das colônias, as placas foram levadas ao microscópio estereoscópico e as colônias observadas individualmente. Colônias pequenas, de crescimento lento, de coloração amarelada, de aspecto brilhante e bordo liso, viscosa, convexa, que não utilizavam asparagina como fonte de C e N, foram reisoladas para o meio de cultura NGA. Para o caso do "strain" *fuscans*, uma característica importante a ser observada foi a produção de pigmento pardo difusível no meio de cultura. As colônias puras foram transferidas para tubos de ensaio com meio de cultura YDC inclinado e identificadas por métodos serológicos ou testes de patogenicidade, conforme a técnica de inoculação e avaliação descrita por RAVA (1984).

3.3.2. Isolamento a partir de sementes

O método de extração da bactéria a partir de

sementes de feijão consistiu em tomar uma amostra de 1000 sementes, desinfestá-las superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante três minutos e proceder a lavagem por duas vezes em água destilada esterilizada, eliminando-se em seguida o excesso de água com papel de filtro esterilizado. A seguir, as sementes foram colocadas em 400 ml de água destilada esterilizada e incubadas por uma noite em geladeira 5 - 10°C. Uma segunda técnica de extração consistiu na moagem das 1000 sementes a seco e incubação por 2 horas em dois litros de água destilada esterilizada à temperatura ambiente. Em seguida, através de diluições do extrato obtido (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e semeadura em placas de Petri com meio de cultura NGA, procedeu-se o isolamento e identificação do patógeno, conforme procedimento utilizado no item 3.3.1.

3.3.3. Preservação dos isolados obtidos

Os isolados puros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e dos "strains" *fuscaans* foram preservados em tubos inclinados com meio de cultura YDC, adicionando-se 2 ml de óleo mineral estéril e conservados em geladeira a 5°C ou sob liofilização.

Uma outra técnica utilizada para preservação da viabilidade da bactéria *X. campestris* pv. *phaseoli* foi a do uso do inóculo mantido em folhas infectadas secas (GILBERTSON

et alii, 1988), ligeiramente modificada. Tal procedimento consistiu em coletar folhas primárias com sintomas de doença, 15 dias após a inoculação em casa de vegetação e proceder a secagem das mesmas entre folhas de papel à temperatura ambiente de laboratório por 24-48 horas; em seguida, mantê-las em desidratador com sílica-gel por 24 horas e posteriormente, colocá-las em sacos plásticos ou placas de Petri para serem armazenadas em congelador a -20°C .

Os isolados de *Xanthomonas* pv. *campestris* (Xcph) e dos "strains" *fuscans* (Xcphf), usados na presente pesquisa, estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e dos "strains" *fuscans* (Xcphf) de feijão

Isolados*	Patógeno	Origem	Procedências
253/80 ⁺	Xcphf	Campinas (SP)	SBF/IB
557/85 ⁺	Xcphf	Campinas (SP)	SBF/IB
7775/86 ⁺	Xcphf	Londrina (PR)	IAPAR
EMG/86 ⁺	Xcphf	Goiânia (GO)	EMGOPA
705/88 ⁺	Xcphf	Campinas (SP)	SBF/IB
353/81 ⁺	Xcph	Campinas (SP)	SBF/IB
509/85 ⁺	Xcph	Campinas (SP)	SBF/IB
7604/86 ⁺⁺	Xcph	Londrina (PR)	IAPAR
RoG-2/86 ⁺	Xcph	Piracicaba (SP)	DF/ESALQ
Ca-80/87 ⁺⁺	Xcph	Planalto (SP)	LRA/IB
704/88 ⁺	Xcph	Campinas (SP)	SBF/IB
15/89 ⁺	Xcph	Goiânia (GO)	CNPAF/EMBRAPA
28/89 ⁺	Xcph	Goiânia (GO)	CNPAF/EMBRAPA

(*) número de identificação e ano de coleta dos isolados (+ folhas; ++ sementes); IB = Instituto Biológico - Seção de Bacteriologia Fitopatológica - Campinas (SP); IAPAR = Instituto Agronômico do Paraná - Londrina (PR); EMGOPA = Empresa Goiânia de Pesquisa Agropecuária - Goiás (GO); LRA/IB = Laboratório Regional de Araçatuba (SP), Instituto Biológico de São Paulo (SP); DF/ESALQ = Departamento de Fitopatologia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Piracicaba (SP); CNPAF/EMBRAPA = Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Goiânia (GO).

3.4. Outras culturas puras de diversas espécies de bactérias e fungos

Diversos isolados puros de bactérias e fungos patogênicos e não patogênicos à cultura do feijoeiro também usados na presente pesquisa, estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação dos isolados de diversas espécies de bactérias e fungos patogênicos e não patogênicos ao feijoeiro.

Isolado	Culturas	Origem	Procedência
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ⁺	Brassica	Campinas(SP)	SBF/IB
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ⁺	Brassica	Itajai(SC)	EMPASC
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> ⁺	Algodão	Londrina(PR)	IAPAR
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> ⁺	Citrus	São Paulo(SP)	IB
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> ⁺	Citrus	Piracicaba(SP)	CENA
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> ⁺⁺	Batata	Campinas(SP)	SBF/IB
<i>Erwinia herbicola</i> ⁺⁺		Campinas(SP)	SBF/IB
<i>Bacillus subtilis</i> ⁺		São Paulo(SP)	IB
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ⁺⁺	Feijão	Campinas(SP)	SBF/IB
<i>Pseudomonas solanacearum</i> ⁺	Tomate	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ
<i>Coletotrichum lindemuthianum</i> ⁺	Feijão	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ
<i>Fusarium</i> spp ⁺	Feijão	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ
<i>Isariopsis griseola</i> ⁺	Feijão	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ
<i>Trichoderma</i> spp ⁺	Feijão	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ
"contaminantes" bacterianos de sementes e folhas infectadas por Xcph ⁺	Feijão	Piracicaba(SP)	DF/ESALQ

(+) preservado em meio de cultura; (++) liofilizado; CENA = Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP/Piracicaba(SP); EMPASC = Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina; DF/ESALQ = Departamento de Fito patologia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Piracicaba (SP).

3.5. Preparo e padronização do inóculo

A partir de culturas puras de *X. campestris* pv. *phaseoli* e dos "strains" *fuscans* com 48 horas de crescimento, inóculos foram preparados mediante a transferência de 0,1 ml da suspensão bacteriana em meio nutritivo líquido para placas contendo NGA, sendo em seguida espalhada com alça de "Drigalski" e incubados a 28°C por 48 a 72 horas. Posteriormente, a partir das culturas, foi preparada a suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Após a homogeneização da suspensão, as bactérias foram lavadas por duas vezes na mesma solução por meio de centrifugação a 5900 g (centrífuga Sorval SS-34) durante 15 minutos, cada vez. As células bacterianas decantadas foram ressuspensas em solução salina e ajustadas para densidade ótica (DO) igual a 1,0 a 640 nm (espectrofotômetro Baush & Lomb Spectronic 20), correspondendo às concentrações iniciais ao redor de $11,5 \times 10^8$ e $1,8 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (ufc)/ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*, respectivamente. A partir dessas concentrações de inóculo, efetuou-se, pelo método de diluições em série (KIRALY et alii, 1974), o plaqueamento das suspensões bacterianas em meio NGA (0,1 ml/placa) com 4 repetições. Após 72 a 96 horas, fez-se a contagem do número de colônias desenvolvidas em placas com meio de cultura. Concomitantemente, realizou-se a leitura das diversas diluições em

espectrofotômetro. A partir dos valores da densidade ótica e dos correspondentes números médios de colônias bacterianas (ufc/ml) nas diversas diluições, determinou-se a densidade ótica igual a 0,3 ou 50% de transmitância, que corresponderam as concentrações de $3,2 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*, respectivamente, padronizadas para serem usadas nos experimentos, conforme as Figuras 1 e 2.

3.6. Origem das amostras de sementes de feijão portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Para os ensaios de extração e identificação do patógeno do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, foram utilizadas amostras de sementes portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli* das cultivares descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Amostras de sementes de diversas cultivares de feijoeiro portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Cultivares	Procedência
Emgopa 201 - ouro	Empresa Goiânia de Pesquisa Agropecuária - Goiânia (GO)
Carnaval, Rosinha, Rio Vermelho Rio Tibaji, Rio Ivai, Goiãno - Precoce, Carioca 80, Rio Iguaçu, Catu	Instituto Agronômico do Paraná - Londrina (PR)
Carioca -80	Laboratório Regional de Araçatuba (SP) - Instituto Biológico de São Paulo - São Paulo (SP)

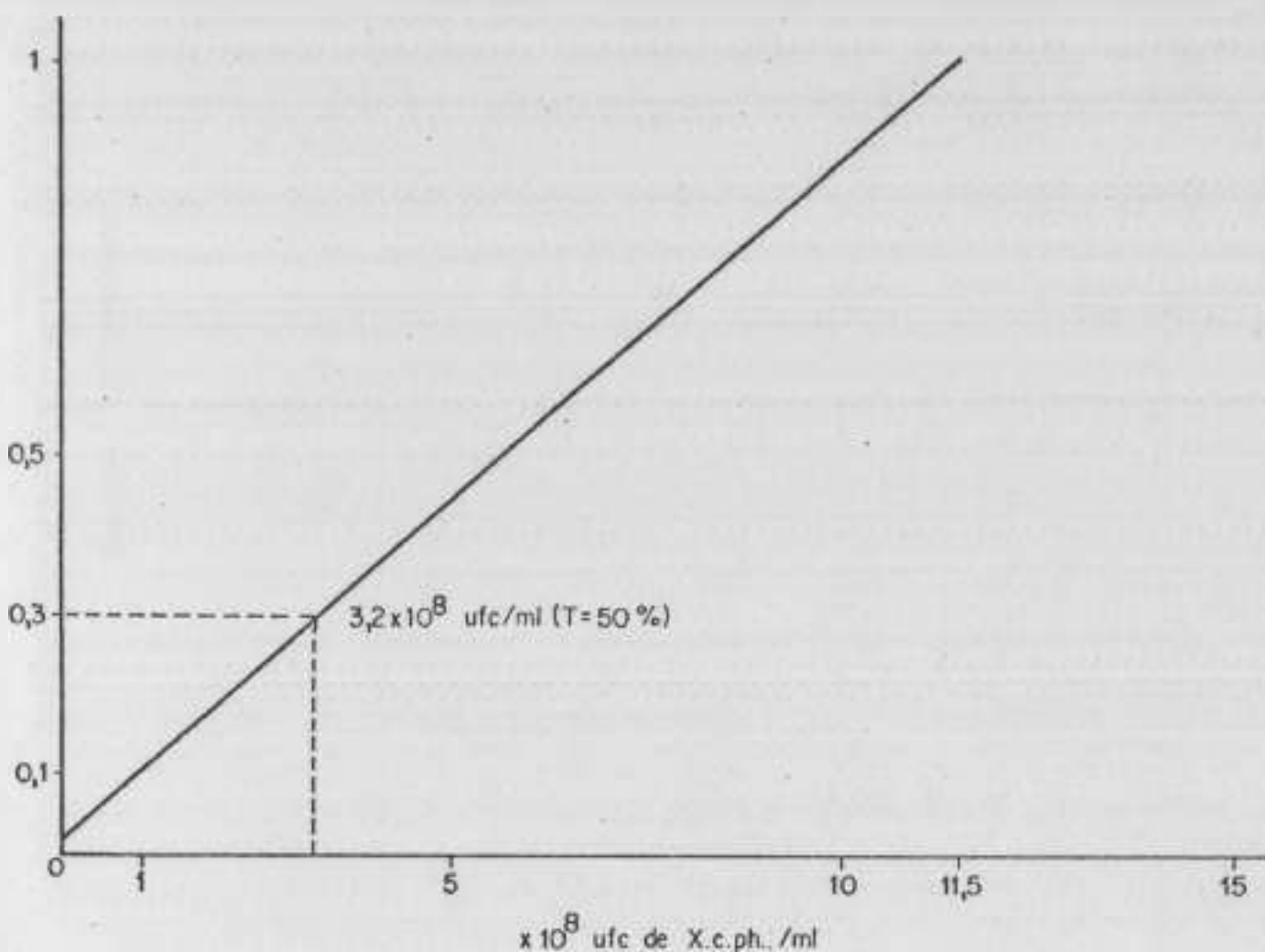


Figura 1. Valores de densidade ótica à 640 nm para diferentes suspensões de células de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (X.c.ph.) com concentrações expressas em unidades formadoras de colônias (ufc) / ml.

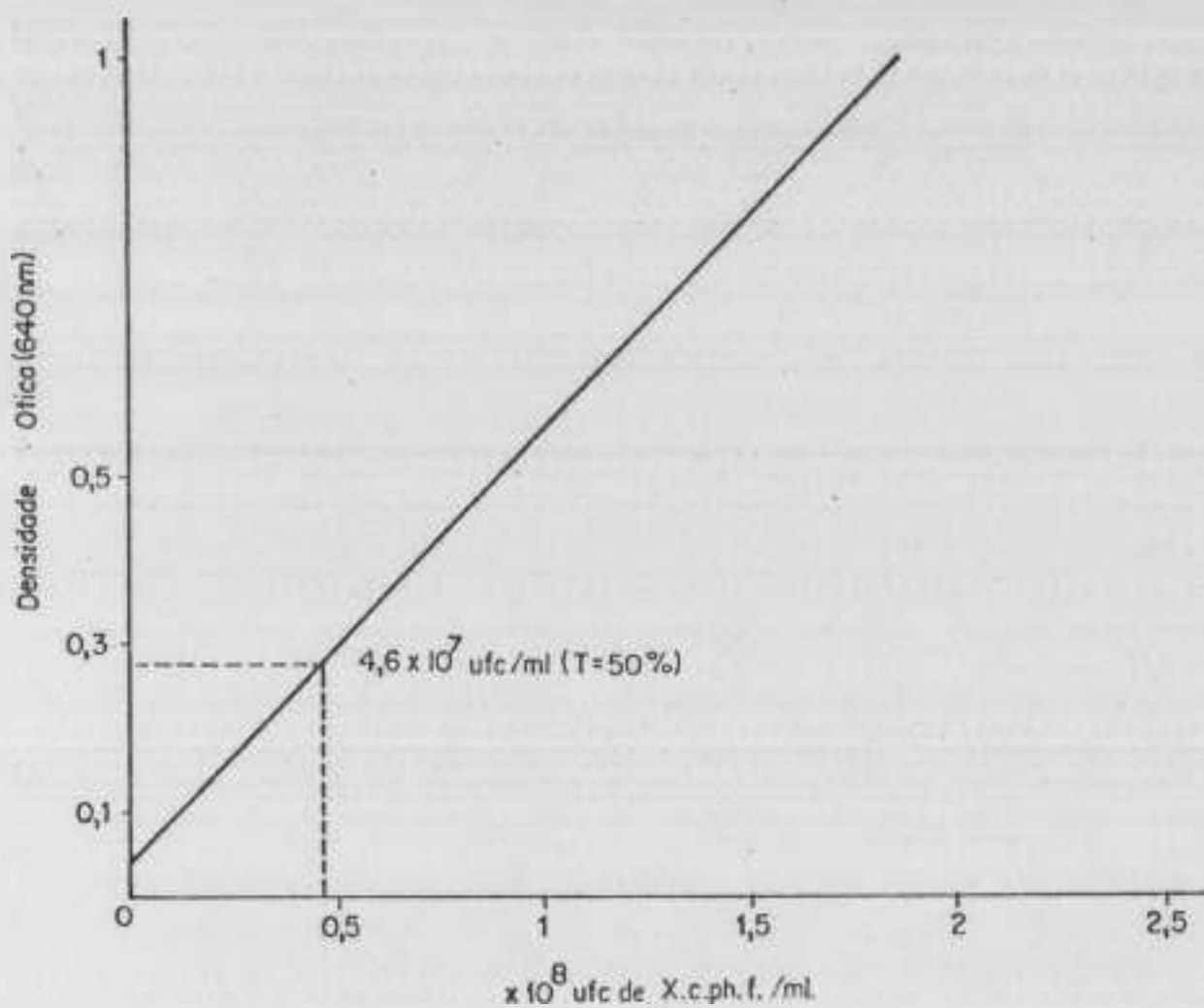


Figura 2. Valores de densidade ótica à 640nm para diferentes suspensões de células de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (X.c.ph.f.) com concentrações expressas em unidades formadoras de colônias (ufc)/ml.

3.7. Detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.

3.7.1. Técnicas de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes

Para extrair o patógeno das sementes, quatro técnicas foram comparadas pelo método de inoculação da planta indicadora devido aos resultados preliminares serem mais promissores. Posteriormente, os extratos foram utilizados para a detecção e identificação do patógeno através da serologia, isolamento direto, inoculação em planta indicadora, conforme descrito nos itens 3.7.2.1, 3.7.2.2., 3.7.2.3, respectivamente.

3.7.1.1. Técnica da imersão de sementes moídas em água (TAYLOR, 1970, modificada)

É uma modificação da técnica descrita por TAYLOR (1970) para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão. Consistiu na moagem de sementes de feijão através de um moinho de café "Mimoso". A farinha obtida foi colocada em frascos de vidro com quantidades variáveis de água destilada esterilizada em função do tamanho das amostras de sementes, conforme Tabela 4. Em seguida, o líquido pastoso formado foi agitado e mantido em incubação à temperatura ambiente de laboratório por duas horas. Posterior

mente, a partir da suspensão obtida, procedeu-se a detecção e identificação do patógeno. O isolamento direto do patógeno consistiu em tomar alíquotas de 0,1 ml do líquido sobrenadante e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , para a semeadura sobre a superfície de placas com meios de cultura (NGA e EPGA). A seguir, o líquido foi espalhado com alça de "Drigalski" e as placas foram incubadas em câmaras de crescimento à temperatura de 28°C. Entre 28-96 horas procedeu-se a avaliação por meio de observações das características das colônias formadas sob microscópio estereoscópico e reisolamento das colônias suspeitas para purificação e testes serológicos.

Tabela 4 - Extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* de farinha de amostras de tamanhos variáveis de sementes de feijão (1)

Número de sementes	peso aproximado de sementes (g)	volume líquido em suspensão(ml)	tamanho do frasco (l)
3000 -4000	1000	4000	5
2000	500	3000	5
1000	250	2000	3
500	125	1000	2
100	25	250	0,5
10	2,5	50	0,125

Fonte:¹ TAYLOR (1970)

3.7.1.2. Técnicas de imersão em água de sementes inteiras com desinfestação superficial

Esta técnica baseou-se na extração da bactéria de amostras de sementes desinfestadas superficialmente em so

lução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por três minutos, secagem em papel de filtro por algumas horas à temperatura ambiente, imersão em quantidades variáveis de água destilada esterilizada, em função do número e do tamanho das sementes (Tabela 5), e posterior incubação, por um período de 18-24 horas em geladeira a 5-10°C. Após esse período, procedeu-se a detecção e identificação do patógeno extraído.

Tabela 5: Extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* a partir de amostras de sementes inteiras de feijão de tamanhos variáveis, imersas em água ou meio líquido.

Número de sementes	Peso aproximado das sementes (g)	Volume de líquido em suspensão (ml)	Tamanho do frasco (l)
1000	150 - 250	350 - 450	1,0
500	75 - 125	180 - 240	0,50
100	15 - 25	35 - 50	0,25
10	1,5 - 2,5	5 - 10	0,125

3.7.1.3. Técnica da imersão de sementes inteiras em água descrita por RAT...¹, modificada.

O referido procedimento consistiu na imersão de amostras de sementes inteiras em quantidades variáveis de água destilada esterilizada (Tabela 5) e, posterior incubação em

¹RAT, B. (INRA - Station the Pathologie Vegetable - Angers - France), Comunicação pessoal, 1987.

geladeira a 5-10°C por um período de 18-24 horas. Em seguida, procedeu-se a detecção e identificação do patógeno extraído.

3.7.1.4. Técnica da imersão de sementes inteiras em meio líquido (VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984 , modificada)

A técnica consistiu na extração da bactéria a partir da imersão de amostras de sementes inteiras, em quantidades variáveis de meio líquido esterilizado (Tabela 5) contendo 3 g de extrato de levedura/l. A seguir, fez-se a incubação das sementes por 18-24 horas em geladeira a 5- 10°C e posterior detecção e identificação do patógeno extraído.

3.7.2. Técnicas de identificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* a partir de extratos obtidos de sementes.

3.7.2.1. Serologia

3.7.2.1.1. Preparo dos antígenos imunizantes

Os isolados puros de *X. campestris* pv. *phaseoli* (509/85) e do "strain" *fuscans* (557/85) foram cultivados em placas de Petri com meio de NGA, a 28°C, durante 48 horas. Após esse período, as colônias foram transferidas, por meio de alça de platina, para frascos de vidro, contendo solução salina 0,85% esterilizada. Tendo-se homogeneizado a suspensão, as bacté-

rias foram lavadas por duas vezes em solução salina esterilizada por meio de centrifugação a 5900g, durante 15 minutos. As bactérias decantadas foram suspensas em solução salina ajustada no espectrofotômetro para densidade ótica igual a 0,3 a 640 nm; assim foram obtidas as concentrações de $3,2 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*, respectivamente. Alíquotas de 5 ml foram colocadas em frascos de antibiótico que, uma vez selados, foram conservados em congelador.

3.7.2.1.2. Preparo dos antissoros

Antígenos dos isolados 509/85 e 557/85 foram injetados em coelhos da raça Nova Zelândia, de aproximadamente 2,83 kg e 3,0 kg, respectivamente, para obtenção dos antissoros. Um e meio ml de cada antígeno, conservado em congelador, foi transferido para frascos de antibiótico e homogeneizados através da adição de 15 a 20 gotas de adjuvante completo de Freund (Difco), sob agitação constante por meio de uma seringa com agulha grossa até a obtenção de uma emulsão. Um ml dessa emulsão foi injetado, por via intramuscular, na coxa do animal, duas vezes a cada sete dias, durante as cinco primeiras semanas e, a partir daí, uma injeção espaçada de sete dias, num total de 15 aplicações. Antes da primeira injeção de cada antígeno, foi feita uma sangria de 20 ml de sangue para a obtenção do soro normal que serviu de controle. Sangrias

semanais de 20 ml foram feitas da sexta injeção em diante, através de secções das veias da orelha. O soro foi obtido a partir do sangue coagulado, que permaneceu por duas horas à temperatura ambiente e, após a separação do coágulo aderido às paredes do tubo que o contém, sob refrigeração a 5°C por uma noite. O plasma sanguíneo foi centrifugado a 5900 g por 10 minutos e acondicionados em frascos de vidro esterilizados e protegidos com papel aluminizado com prévia adição de duas gotas de merthiolate a 0,01%. Após a identificação, os antis soros foram mantidos em congelador até o momento do uso.

3.7.2.1.3. Técnicas serológicas utilizadas

Duas técnicas serológicas foram comparadas: a técnica de microprecipitina em placas (ROMEIRO & FUKUTA, 1983), com ligeiras modificações e a de dupla difusão em gel-de-agar de Ouchterlony (KIMATI, 1975).

A técnica da microprecipitina em placas consiste em fazer desenhos de um modelo quadriculado com caneta hidrográfica em placas de Petri esterilizadas, sendo que cada quadrículo mediu ao redor de 1 cm^2 . Em seguida, foi espalhado óleo de silicone no fundo de cada placa para evitar que as gotas se espalhassem. Os antissoros foram diluídos em solução salina tamponada, pH = 7,2 (NaCl 0,85%, K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,01 M e água destilada 1000 ml), por fatores de 2^{-n} , com n variando de 0 a 11 (SOUZA, 1980), enquanto que os antígenos preparados de acordo com o item 3.5., foram diluídos em solução salina

0,85% de forma a obter diluições de 1:10. Com micropipetas de Pasteur, as diluições de antissoros foram depositadas nos quadriculados e a seguir, sobre cada diluição de antissoro, colocou-se uma gota de antígeno diluído. As placas de Petri foram tampadas e deixadas à temperatura ambiente. Foram feitas duas avaliações: aos 60 e 120 minutos. A formação de um precipitado, visualizado ao microscópio estereoscópico, no menor aumento, sob luz indireta, indicou reação positiva; cada diluição teve três repetições e, como controle, utilizou-se soro normal contra antígenos diluídos.

A técnica da dupla difusão consistiu em verter 4 ml de meio gel-agar esterilizado (1% agar Difco, NaCl 0,85%, K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,01M, pH = 7,2 e 0,01% de merthiolate) ainda líquido, em lâminas de vidro limpas e deixados solidificar no interior de placas de Petri. Posteriormente, foram feitos orifícios de 0,25 cm de diâmetro com aparelho "Furagar" (LEITE & OLIVEIRA, 1975), de distribuição hexagonal e, com auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios foram abertos e preenchidos duas vezes com diluições de antissoros e antígenos. As lâminas permaneceram no interior das placas de Petri com pequenos chumaços de algodão embebidos em água e foram mantidas à temperatura ambiente. A avaliação foi feita 24 a 48 horas após a instalação do ensaio, observando-se as bandas de precipitação formadas. Cada diluição teve três repetições e, em todos os testes, como controle, utilizou-se soro normal contra antígenos diluídos.

3.7.2.1.4. Avaliação das técnicas através de reações serológicas

- a) Reações de diversas coletas de antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra antígenos homólogos.

Os isolados 509/85 e 557/85, padronizados nas concentrações $3,2 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente, conforme item 3.5, foram usados como antígenos em reações serológicas contra 10 coletas de antissoros.

- b) Titulação dos antissoros

Para determinar o título dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* utilizou-se a mistura das 5a., 6a. e 7a. coletas de antissoros contra os antígenos homólogos nas concentrações de $3,2 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente.

- c) Análise dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra diferentes concentrações dos antígenos homólogos.

O efeito da concentração dos antissoros de *X.*

campestris pv.*phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra diferentes concentrações dos antígenos homólogos foi determinado pela técnica da dupla difusão em gel-de-agar por meio de diluição dos antissoros segundo a fórmula 2^{-n} , sendo n variando de 0 a 11. A partir das concentrações de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* padronizadas para $3,2 \times 10^8$ e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente, procederam-se as diluições dos antígenos homólogos.

d) Determinação da especificidade das técnicas serológicas

A especificidade das técnicas serológicas de microprecipitina em placas e dupla difusão em gel-de-agar foi determinada usando antissoros de *X. campestris* pv.*phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra diversos isolados de bactérias patogênicas ou saprofíticas ao feijoeiro.

3.7.2.2. Isolamento direto em meios de cultura

Inicialmente, a eficiência do antibiótico cefalexina (40 mg produto comercial/l) e do fungicida clorotalonil (67 mg p.c/l) incluídos nos meios NGA e EPGA e utilizados na técnica do isolamento direto, foi testada contra o crescimento de alguns isolados puros de bactérias, tais como, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. solanacearum*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *phaseoli* e dos "strains" *fuscans*.

O isolamento direto de *X. campestris* pv. *phaseoli* consistiu em tomar alíquotas de 0,1 ml do líquido sobrenadante e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , para o caso da técnica descrita no ítem 3.7.1.1, e transferir para a superfície de placas com meios de cultura NGA e EPGA. A seguir, o líquido foi uniformemente distribuído com alça de Drigalsky e as placas foram incubadas em câmaras de crescimento à temperatura de 28°C. A partir de 36 a 96 horas, procedeu-se a avaliação de 4 placas/tratamento/diluição, por meio de observações periódicas das características das colônias formadas sob microscópio estereoscópico e o reisolamento das colônias individuais suspeitas de ser *X. campestris* pv. *phaseoli* para purificação e, posterior comprovação por meio de testes serológicos e de patogenicidade.

3.7.2.3. Inoculação em plantas indicadoras

3.7.2.3.1. Origem das cultivares de feijoeiro

Foram comparadas três cultivares de feijoeiro suscetíveis a *X. campestris* pv. *phaseoli* cujas sementes sadias foram originárias de diversos locais especificados na Tabela 6.

Tabela 6: Cultivares de feijoeiro suscetíveis a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e suas respectivas procedências.

Cultivares	Procedências
CNF 0010	Centro Nacional de Pesquisa de Arroz, Feijão - EMBRAPA - Goiânia (GO) e Centro de Energia Nuclear na Agricultura/CENA-USP-Piracicaba (SP).
Rosinha G-2	Instituto Agronômico de Campinas-Campinas (SP) e CENA - Piracicaba (SP).
Cornell 49-242	Instituto Agronômico de Campinas (SP)

3.7.2.3.2. Obtenção das plantas para inoculação

As sementes foram submetidas a pré-germinação durante 24 e 48 horas por imersão em água de torneira ou através de semeadura em bandejas, sobre camadas de algodão e folhas de papel toalha umidecidas em água e mantidas à temperatura ambiente de laboratório. A seguir, foram transferidas para vasos de alumínio (7 sementes/vaso), com capacidade de 1,8 a 2,0 litros, possuindo substrato esterilizado, constituído de uma mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso, na proporção e 1,5:1,0:2,5. Os vasos foram mantidos sobre bancadas de madeira, em casas de vegetação, sob condições de temperaturas variáveis, mínimas de 15-22°C e máximas de 28-36°C e na ausência de pragas e/ou outras doenças. O bicho mineiro (*Liriomyza* spp), praga frequentemente observada nas plantas de feijoeiro sob condições de casa de vegetação, foi preventivamente controlado com o inseticida de contato, folitol 600 (parathion methyl), na dosagem de 100 ml do produto comercial por 100 l de água. Quando as plantas atingiram de

6 a 8 dias de idade, foram raleadas, deixando-se de 4 a 5 plantas por vaso. Foram inoculadas as duas folhas primárias de 8 a 10 plantas por tratamento/repetição, num total de quatro repetições. A inoculação foi feita nas folhas primárias das plantas, que, posteriormente, foram mantidas em câmara úmida durante 48 horas, sob bancadas de madeira com temperatura controlada entre 25-30°C e cobertas com plástico transparente. No piso da casa de vegetação, colocou-se serragem de madeira que foi umedecida periodicamente para proporcionar uma alta umidade relativa. Durante os meses de frio, temperaturas diurnas e noturnas dentro da casa de vegetação, foram mantidas acima de 25°C, utilizando um aquecedor elétrico automático. Após a incubação das sementes a 5 - 10°C e antes da inoculação, os frascos foram mantidos por 2 horas a temperatura ambiente para que o líquido restabelecesse o equilíbrio de temperatura. Também, para evitar contaminação, entre a inoculação de uma amostra de sementes e outra, a tesoura e as agulhas entomológicas foram flambadas em álcool 96°GL e lavadas em água para o resfriamento e eliminação do excesso de resíduo.

3.7.2.3.3. Métodos de inoculação

Três métodos de inoculação foram comparados:

Incisão com tesoura (WEBSTER et alii, 1980), agulhas múltiplas (ANDRUS, 1948) e injeção na inserção do nó da folha primária (SAETTLER, 1971).

No caso do método de inoculação por incisão com tesoura, as folhas primárias foram inoculadas através de cor

tes com uma tesoura previamente mergulhada no inóculo. O primeiro corte de 1,5 cm foi feito, aproximadamente, na área compreendida entre o bordo do limbo foliar até a primeira nervura lateral, e o segundo, paralelo ao primeiro e de igual tamanho, feito a uma distância de aproximadamente 2 cm. No método por agulhas múltiplas, uma esponja previamente mergulhada na suspensão bacteriana, foi colocada na superfície inferior da folha primária, em seguida, com auxílio das agulhas entomológicas, montadas em uma estrutura de parafina foram feitas as perfurações, pressionando-se o inoculador sobre a folha para permitir o íntimo contato do patógeno com seus tecidos. Finalmente, a técnica por injeção, consistiu em introduzir o inóculo no nódulo de inserção da folha primária com auxílio de uma seringa descartável de insulina de 1 ml com agulha disposta obliquamente no caule da planta.

Como controle, foram utilizadas plantas inoculadas com água destilada e/ou meio de cultura líquido esterilizados (testemunhas em branco) e com suspensões bacterianas de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidas a partir de cultura pura (3.2×10^8 ufc/ml) e/ou folhas infectadas pelo patógeno, desidratadas e imersas em água destilada esterilizada (controle positivo).

3.7.2.3.4. Avaliações da incidência/severidade

da infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli*

As avaliações de sintomas foram realizadas a partir de 5 até 10 dias após a inoculação.

Para a técnica de "incisão com tesoura", utilizou-se a escala descrita por RAVA (1984) e modificada:

1. ausência de sintomas;
2. clorose nos cortes;
3. clorose nos cortes e murcha do bordo da folha compreendida entre os cortes;
4. clorose e murcha que ultrapassou a nervura lateral;
5. clorose e murcha até o nível interno dos cortes;
6. clorose avançada em torno de 1 cm no interior da folha e murcha da área cortada.

Para a técnica de inoculação de "agulhas múltiplas", utilizou-se a escala proposta por POMPEU & CROWDER (1973):

1. ausência de sintomas na área inoculada;
2. amarelecimento da área inoculada;
3. murcha ou necrose até 25% da área inoculada;
4. murcha ou necrose até 50% da área inoculada;
5. murcha ou necrose até 75% da área inoculada;
6. murcha ou necrose até 100% da área inoculada.

Para a avaliação da técnica de injeção em plantas de feijoeiro, considerou-se a formação de lesões alongadas de coloração marrom escuro, no ponto de inoculação, avaliando-se a % de plantas com sintomas.

3.7.4.3.5. Especificidade dos sintomas causados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

Para examinar a patogenicidade e sintomatologia de diversos isolados de bactérias, fungos e organismos associados a sementes e folhas, patogênicos ou não ao feijoeiro, plantas das cultivares CNF 0010 e Rosinha G-2 foram inoculadas pelo método da incisão com tesoura nas concentrações ao redor de 10^8 células/ml para bactérias e 10^4 - 10^5 conídios/ml para fungos. A avaliação de severidade de infecção foi feita aos 7 a 10 dias, após a inoculação, seguindo a escala de notas descritas no ítem 3.7.2.3.4.

3.7.5. Avaliação da sensibilidade das técnicas de extração através da inoculação por incisão com tesoura do extrato em diferentes diluições.

Para avaliar a sensibilidade das técnicas de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli*, amostras de 1000 sementes de duas cultivares de feijoeiro (cvs. EMGOPA 201-ouro e Rio Vermelho), foram submetidas a extração conforme técnicas

descritas no item 3.7.1. Após a incubação, procedeu-se a diluição das mesmas em água destilada esterilizada para 1:2, 1:4, 1:10, 1:16 e 1:100 e a inoculação em folhas primárias de plantas de feijoeiro da cv. CNF 0010 com 8 dias de idade, pelo método de incisão com tesoura. A avaliação foi feita 7 dias após a inoculação, baseada na escala descrita no item 3.7.2.3.4. A parcela experimental consistiu de 2 vasos com 5 plantas/repetição, num total de 4 repetições.

Também as técnicas de extração como os métodos de detecção e identificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram avaliados em função do tamanho de sub-amostra (1000, 500, 100 e 10 sementes).

Deve ser mencionado que inicialmente as técnicas de extração somente foram comparadas pelo método de inoculação em plantas indicadoras devido aos resultados obtidos serem mais promissores.

3.8. Determinação da sensibilidade de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sub-amostras de sementes de feijão através do método da planta indicadora

3.8.1. Inoculação artificial das sementes através de método de contato com a bactéria

Cerca de 10 kg de sementes das cultivares Vagem Roxa, IPA 74-19 e HF 465-63-1, procedentes do Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA) - Recife (PE), comprovadamente livres do patógeno, foram tomadas para o ensaio. Culturas pu-

ras de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram cultivadas em placas de Petri, com meio de cultura NGA, e incubadas a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, colocou-se 50 sementes por placa e manteve-se sob agitação por alguns minutos para que o inóculo envolvesse as sementes. Como testemunhas, foram colocadas sementes em placas com meio de cultura sem a bactéria. As sementes foram mantidas por 0, 12, 24, 36 e 48 horas em contato com as colônias bacterianas à temperatura ambiente de laboratório (20-28°C). Em seguida, procedeu-se a secagem das sementes em placas com discos de papel de filtro esterilizado por 48 horas e, posteriormente, a desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante dois minutos de metade das sementes de cada período de incubação (300 sementes). Novamente as sementes foram colocadas em placas com papel de filtro esterilizado por mais 48 horas para secagem, embaladas em sacos de papel e armazenadas sob condições de câmara fria (temperatura de 10±2°C e umidade relativa de 90%).

3.8.2. Localização do patógeno na semente e seu efeito sobre a germinação

Para determinar a localização e o índice de incidência do patógeno, sementes individuais, com e sem desinfestação superficial, dos diversos períodos de inoculação (0, 12, 24, 36 e 48 horas) foram colocadas em frascos de vidro de antibiótico contendo 1 ml de água destilada esterili-

lizada e incubadas por 18-24 horas em geladeira a 5-10°C. Em seguida, a suspensão obtida foi inoculada em plantas de feijoeiro (cultivar CNF 0010) com oito dias de idade (5 plantas/vaso) através da técnica de inoculação por "incisão com tesoura", num total de 25 plantas por tratamento. A avaliação da incidência do patógeno foi feita por meio da contagem do número de plantas com sintomas.

O teste de germinação de sementes de feijão seguiu as normas contidas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, M.A., 1976). Em síntese, a técnica consistiu em distribuir equidistantemente 50 sementes de cada período de incubação (200 sementes/tratamento) em folhas de papel de filtro ("Germ test") umidecidas, medindo 38 x 28 cm e posterior cobertura com uma folha do mesmo tamanho. Em seguida, as folhas contendo as sementes foram enroladas e os rolos de papel colocados na vertical, com a margem dobrada para baixo e incubadas em câmaras com umidade relativa de 100% e temperatura constante de 30°C, durante nove dias. A avaliação da germinação realizou-se aos cinco e nove dias após a instalação do ensaio.

3.8.3. Detecção de uma única semente infectada por *X. campestris* pv. *phaseoli* em sub-amostras de sementes

Sementes infectadas pela bactéria foram colocadas em frascos (1 semente/frasco) contendo sub-amostras de

100,250, 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 sementes sadias, acrescentando-se 40, 100, 200, 350, 700, 1000 e 1500 ml de água destilada esterilizada, respectivamente, e mantidas sob incubação por 18-24 horas em geladeira à 5-10°C. A suspensão obtida foi inoculada em plântulas de feijoeiro (CNF 0010), de oito dias de idade, pelo método de "incisão com tesoura" (25 plantas/tratamento). A avaliação de incidência foi feita aos sete dias após a inoculação, através da contagem do número de plantas com sintomas. Como controle, foram utilizadas para inoculação de um total de 10 plantas/repetição, sementes sadias imersas em água destilada esterilizada (controle em branco) e folhas de plantas de feijoeiro infectadas por *X.campestris* pv.*phaseoli*, desidratadas e imersas em água destilada esterilizada (controle positivo).

3.9. Determinação quantitativa de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão produzidas no Estado de São Paulo

Para estimar quantitativamente o transporte de *X. campestris* pv.*phaseoli*, amostras de sementes de 1 kg foram coletadas em campos de produção de sementes certificadas dos cultivos da "seca" (janeiro-fevereiro/1988), de "inverno" (maio-junho/1988) e das "águas" (setembro - outubro/1988-89), procedentes dos principais municípios produtores de feijão do Estado de São Paulo. Após a coleta e até o momento de execução dos testes, as amostras de sementes foram mantidas em

câmara seca (UR = 45% e temperatura = 10[±]2°C).

De acordo com o método do Número Mais Provável (MNP) (COCHRAN, 1950; TAYLOR, 1970), de cada amostra de sementes foram tomadas, ao acaso, uma sub-amostra de 500 sementes, cinco sub-amostras de 100 e cinco sub-amostras de 10, e colocadas em frascos de vidro com quantidades variáveis de água destilada esterilizada conforme consta na Tabela 5. Após a incubação por 18-24 h, em geladeira a 5-10°C, os frascos contendo as sementes mais água, foram mantidos por duas horas à temperatura ambiente de laboratório para que o líquido reestabelecesse o equilíbrio de temperatura, tendo-se em seguida, procedido a inoculação da suspensão obtida em plantas de feijoeiro. Para cada sub-amostra, utilizou-se um vaso com 5 plantas, sendo inoculadas as duas folhas primárias de cada planta. Onze vasos foram inoculados por amostra (um para cada sub-amostra) e mais dois vasos para o controle, sendo um testemunha com água e o outro inoculação da bactéria *X. campestris* pv. *phaseoli*. A avaliação da incidência da doença consistiu em detectar a presença ou ausência de sintomas nas plantas, 7 - 10 dias após a inoculação, sendo que uma planta com sintoma de crestamento foi suficiente para indicar resultado positivo.

Os resultados expressos como número de sub-amostras positiva ou negativa para cada amostra testada, foram interpretados pelo método de NMP (COCHRAN, 1950), seguindo a tabela descrita por TAYLOR (1970) para detecção de *P.*

syringae pv. *phaseolicola*, derivada de SWAROOP (1951). O percentual de sementes portadoras do patógeno foi estimada na faixa de 0,1 a 16,1%, com limites inferior e superior variando entre $< 0,05 - 0,4\%$ a $3,9 - > 45\%$, respectivamente, conforme Tabela 7.

3.10. Correlação entre incidência do crestamento bacteriano em campo e porcentagem de sementes portadoras do patógeno, germinação e peso de 100 sementes

Foi feita a quantificação da doença em campos experimentais de feijoeiro do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) - Londrina (PR), contando-se o número de plantas com sintomas e calculando-se a porcentagem de incidências. Considerou-se como planta infectada aquela que apresentou pelo menos uma lesão típica do crestamento comum em quaisquer de suas partes, podendo ou não ser nas vagens.

A incidência do patógeno em amostras de sementes de feijão de seis lotes da cultivar Rio Tibagi coletadas nesses campos e, submetidas a diferentes processos de secagem e armazenamento, foi determinada através da técnica de extração de RAT(1987), modificada e do método de inoculação por incisão com tesoura em plantas indicadoras, cultivar CNF 0010. A porcentagem de sementes com *X.campestris* pv.*phaseoli* foi estimada quantitativamente, usando-se o método do número mais provável (NMP) conforme item 3.9. O peso de 100 sementes (em gramas) e a germinação das sementes dos seis lotes fo

Tabela 7. Interpretação de resultados para quantificar a presença de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em amostras de sementes de feijão.

Número de sub-amostras com resultados positivos			Número mais provável (NMP) de sementes portadoras do patógeno (%)	Limites do NMP/100 sementes	
1 de 500 sementes	5 de 100 sementes	5 de 10 sementes		Inferior	Superior
0	0	1	0,1	<0,05	0,4
0	0	2	0,2	0,05	0,6
0	1	0	0,1	0,05	0,4
0	1	1	0,2	0,05	0,6
0	1	2	0,3	0,05	0,8
0	2	0	0,2	0,05	0,6
0	2	1	0,3	0,05	0,8
0	2	2	0,4	0,05	1,1
0	3	0	0,3	0,05	0,8
0	3	1	0,5	0,05	1,3
0	4	0	0,5	0,05	1,3
1	0	0	0,1	0,05	0,4
1	0	1	0,3	0,05	0,8
1	0	2	0,4	0,05	1,1
1	0	3	0,6	0,05	1,5
1	1	0	0,3	0,05	0,8
1	1	1	0,5	0,05	1,3
1	1	2	0,7	0,1	1,7
1	1	3	0,9	0,2	2,1
1	2	0	0,5	0,05	1,3
1	2	1	0,7	0,1	1,7
1	2	2	1,0	0,3	2,3
1	2	3	1,2	0,3	2,8
1	3	0	0,8	0,2	1,9
1	3	1	1,1	0,3	2,6
1	3	2	1,4	0,4	3,4
1	3	3	1,8	0,5	5,3
1	3	4	2,1	0,6	6,6
1	4	0	1,3	0,4	3,1
1	4	1	1,7	0,5	4,7
1	4	2	2,2	0,7	6,9
1	4	3	2,8	0,9	8,5
1	4	4	3,5	1,2	10,1
1	4	5	4,3	1,5	11,7
1	5	0	2,4	0,8	7,5
1	5	1	3,5	1,2	10,1
1	5	2	5,4	1,8	13,8
1	5	3	9,2	9,2	21,7
1	5	4	16,1	3,9	>45,0

(<) = menor de que; (>) maior do que.

Fonte: SWAROOP (1951)

ram determinados e comparados com os resultados obtidos de incidência do crestamento avaliado a nível de campo.

3.11. Delineamentos experimentais

3.11.1. Comparação entre técnicas de extração, cultivares e métodos de inoculação

As técnicas de extração, as cultivares e os métodos de inoculação foram comparados através da análise da variância, pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial $4 \times 3 \times 2$. Os dados foram transformados segundo expressão \sqrt{x} , onde x representa notas de severidade de sintomas de 1 a 6 (Apêndice 1).

3.11.2. Comparação entre técnicas de extração e diluição de uma única amostra de sementes.

As técnicas de extração e as diluições de uma única amostra de sementes em água destilada esterilizada de duas cultivares de feijoeiro (EMGOPA 201-ouro e Rio Vermelho) foram comparadas através da análise da variância, pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 6×4 . Os dados foram transformados segundo a expressão \sqrt{x} , onde x representa notas da severidade de sintomas de 1 a 6 (Apêndice 2).

3.11.3. Comparação entre técnicas de extração e tamanhos de sub-amostras de sementes.

A análise estatística foi feita apenas para os dados de planta indicadora. As técnicas de extração e os diferentes tamanhos de sub-amostras (1000, 500, 100 e 10 sementes) foram comparados através da análise da variância, pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 4 x 4. Também, os dados foram transformados segundo a expressão \sqrt{x} , onde x representa notas de severidade de sintomas de 1 a 6 (Apêndice 3).

3.11.4. Germinação de sementes inoculadas artificialmente.

Os dados de germinação foram analisados estatisticamente através da análise da variância, pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com fatorial 6 x 2. Os dados apresentados em %, foram transformados para arc sen $\sqrt{x/100}$ (Apêndice 4).

3.11.5. Germinação e peso de 100 sementes naturalmente portadoras do patógeno

Os dados de germinação e peso de 100 sementes foram avaliados estatisticamente através da análise da variância, pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo que os dados de germinação foram transformados para arc sen $\sqrt{x/100}$ (Apêndice 5).

Para comparação das médias dos parâmetros analisados foi utilizado o teste de Tukey à 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Serologia

4.1.1. Reação dos antissoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* com antígenos homólogos

Os resultados dos testes serológicos realizados pelas técnicas de microprecipitina e dupla difusão em gel-de-agar entre as diversas coletas dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* com os antígenos homólogos encontram-se na Tabela 8. Os resultados mostraram que todas as coletas de antissoros produziram uma reação de precipitação através da técnica de microprecipitina em placas enquanto que pela dupla difusão em gel-de-agar essa reação só foi visível a partir das 4a. e 6a. coletas dos antissoros para *X. campestris* pv. *phaseoli* e "strain" *fuscans* respectivamente, sendo que por ambas as técnicas, a reação foi mais nítida quando se utilizou o isolado *X. campestris* pv. *phaseoli*. Esses resultados indicaram maior sensibilidade da técnica da microprecipitina em placas. Através da mesma técnica, OLEAS ARIAS (1982) testou

18 coletas de antíssoros para essa bactéria, sendo que todas produziram reação evidenciável, confirmando a sensibilidade da técnica da microprecipitina em placas.

Tabela 8 -Reação de diversas coletas dos antíssoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* (Xcphf) com os antígenos homólogos pelas técnicas serológicas da microprecipitina e dupla difusão em gel-de-agar.

Técnicas Serológicas	Isolados ⁽¹⁾ bacterianos	coleta de antíssoros											
		SN	1 ⁽²⁾	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Microprecipitina em placas	Xcph	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
	Xcphf	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dupla difusão gel-de-agar	Xcph	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++
	Xcphf	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

(1) Concentração: $3,2 \times 10^8$ ufc/ml (Xcph) e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml (Xcphf); (+) reação positiva; (++) reação mais nítida; (-) reação negativa; (2) 1a. sangria feita 21 dias após a 1a. imunização. Cada coleta, 3 repetições; SN= soro normal.

4.1.2. Títulos dos antíssoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*

Na tabela 9, encontram-se os resultados das reações serológicas dos antíssoros da mistura de coletas (5a. 6a. e 7a.) de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* com os antígenos homólogos realizadas pelas técnicas da microprecipitina em placas e da dupla difusão em gel-de-agar.

Pela técnica da microprecipitina em placas, os antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra os antígenos homólogos nas concentrações de $3,2 \times 10^8$ ufc/ml (Xpch) e $4,6 \times 10^7$ ufc/ml (Xcphf) apresentaram títulos mais elevados (1:1024) e (1:512) do que pela técnica da dupla difusão em gel-de-agar (1:256) e (1:64), respectivamente, sendo que os títulos dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram superiores aos da *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, independentemente da técnica serológica utilizada, conforme Tabela 9. Provavelmente, isto tenha ocorrido devido à menor concentração do antígeno imunizante do "strain" *fuscans* empregado na reação (Tabelas 11 e 12). TRUJILLO & SAETTLER (1981) obtiveram títulos de antissoros mais elevados para *X. campestris* pv. *phaseoli* e para o "strain" *fuscans*, de 1:2000 e 1:5000, respectivamente, pela técnica da microaglutinação em tubos, usando como antígenos homólogos, células mortas em formalina à 40%, na concentração de 10^9 células/ml. OLEAS ARIAS (1982) obteve resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, tendo alcançado o título do antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* de 1:1024 contra o antígeno homólogo na concentração de $2,5 \times 10^8$ ufc/ml, usando a técnica da microprecipitina em placas de Petri. Ainda segundo o autor, nas 18 coletas de antissoro, ocorreu um aumento paulatino do título em cada antissoro, a medida que se aumentou o número de imunizações.

Tabela 9. Títulos dos antissoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* (Xcphf) contra antígenos homólogos pelas técnicas da microprecipitina em placas e dupla difusão em gel-de-agar (DDGA)

Antissoros-	(1)	Técnicas Serológicas			
		Microprecipitina		DDGA	
		Antígenos		Antígenos	
		Xcph ⁽²⁾	Xcphf ⁽³⁾	Xcph ⁽²⁾	Xcphf ⁽³⁾
Soro normal	-	-	-	-	
1 : 1	+	+	+	+	
1 : 2	+	+	+	+	
1 : 4	+	+	+	+	
1 : 8	+	+	+	+	
1 : 16	+	+	+	+	
1 : 32	+	+	+	+	
1 : 64	+	+	+	+	
1 : 128	+	+	+	-	
1 : 256	+	+	+	-	
1 : 512	+	+	-	-	
1 : 1024	+	-	-	-	
1 : 2048	-	-	-	-	

(1) 5ª, 6ª e 7ª coletas; (2) $3,2 \times 10^8$ ufc/ml; (3) $4,6 \times 10^7$ ufc/ml; (+) reação positiva; (-) reação negativa. Cada diluição: 3 repetições.

4.1.3. Determinação da especificidade dos antissoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* contra diversos isolados de bactérias

Os resultados das reações de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas e de saprófitas contra antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* (Xcphf) através das técnicas da microprecipitina em placas e dupla difusão em gel-de-agar, estão contidos na Tabela 10. Pela técnica da microprecipitina, os isolados bacterianos dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* reagiram com os antissoros de *Xanthomonas*, enquanto que através da técnica da dupla difusão em gel-de-agar, o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* reagiu apenas com seu antígeno homólogo (Xcph) e o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* reagiu tanto com o seu antígeno homólogo como com o antígeno heterólogo (Xcph), indicando menor especificidade de ação desse antissoro, na caracterização dos isolados bacterianos patogênicos ao feijoeiro. Enquanto a técnica da microprecipitina em placas mostrou reações cruzadas do antissoro de *Xanthomonas* entre espécies de *Xanthomonas* assim como com espécies do gênero *Pseudomonas*, a técnica da dupla difusão em gel-de-agar mostrou ser altamente específica na caracterização dos isolados de *Xanthomonas* patogênicos ao feijoeiro. Esse mesmo padrão de comportamento foi

Tabela 10: Determinação da especificidade dos antissoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* (Xcphf) por duas técnicas serológicas contra isolados de bactérias

Isolados bacterianos (2)	Número de iso- lados	Técnicas serológicas (1)					
		Microprecip./ placas			D. Difusão em gel-agar		
		SN	AS Xcph	AS Xcphf	SN	AS Xcph	AS Xcphf
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	8	-	+	+	-	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	5	-	+	+	-	-	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	2	-	+	+	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	2	-	+	+	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	1	-	+	+	-	-	-
<i>Erwinia herbicola</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	2	-	-	-	-	-	-
"Contaminantes" bacterianos de sementes e fo- lhas de feijoeiro infectadas por Xcph	10	-	-	-	-	-	-
Controle água destilada		-	-	-	-	-	-

(+) reação positiva; (-) reação negativa; (1) média de quatro repetições; (2) concentração D.O. = 0,3 ;
SN = soro normal, AS = antissor.

constatado por LINK & SHARP (1927). Posteriormente, ELROD & BRAUN (1947) demonstraram a presença de grupos imunológicos, considerando que o grupo "phaseoli" consistia de *X. campestris* pv. *phaseoli* e o "strain" *fuscans*, *X. campestris* pv. *geranii*, *X. campestris* pv. *pelargonii* e *X. campestris* pv. *malvacearum*. Tal fato não foi determinado mediante reações cruzadas de aglutinação. Mais recentemente, no estudo de caracterização dos antissoros de *X. campestris phaseoli* e do "strain" *fuscans*, TRUJILLO & SAETTLER (1981) verificaram que a técnica da dupla difusão em gel-de-agar foi mais segura do que a microaglutinação em tubos; pela técnica da microaglutinação em tubos, antissoros de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* apresentaram reações cruzadas com células vivas de outras espécies de *Xanthomonas* e com bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Corynebacterium*, não se observando essas reações com células vivas de *Agrobacterium*, *Bacillus* e *Corynebacterium* sp. assim como células mortas pelo vapor (100°C, 1 hora) de 19 contaminantes bacterianos obtidos de sementes de feijão desinfestadas superficialmente. Também, pela técnica da dupla difusão em gel-de-agar, OLEAS ARIAS (1982) concluiu que o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentou especificidade para isolados homólogos e ausência de reação com os heterólogos "strain" *fuscans*, *Pseudomonas* sp e bactérias contaminantes, concordando os resultados obtidos no presente estudo.

4.1.4. Avaliação da sensibilidade da técnica de dupla difusão em gel-de-agar através da reação dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* com os antígenos homólogos em diluição

Embora apresentando maior título, a técnica serológica da microprecipitina não foi incluída neste experimento, uma vez que os testes preliminares indicaram dificuldades de avaliação nas maiores diluições.

Os resultados da análise dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* em diluição, contra diferentes concentrações dos antígenos homólogos, pela técnica da dupla difusão em gel-de-agar, encontram-se nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. De acordo com os resultados, foi possível detectar reação serológica nas diluições dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* em até 1:4 contra as concentrações dos antígenos homólogos de $3,2 \times 10^6$ e $4,6 \times 10^6$ ufc/ml, respectivamente. TRUJILLO & SAETTLER (1981), analisando o comportamento de antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*, com diferentes concentrações dos antígenos homólogos nas densidades óticas de 0,1 a 0,05, concluíram que as bandas se formarem até as concentrações de $3,8 \times 10^6$ células/ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* e $2,9 \times 10^6$

Tabela 11. Análise do antissoro de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em diluição contra diferentes concentrações do antígeno homólogo através da técnica da dupla difusão em gel-de-agar.

Antígenos	Antissoros												
	SS	SN	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
$3,2 \times 10^8$ ufc/ml	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
$3,2 \times 10^7$ ufc/ml	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^6$ ufc/ml	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^5$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^4$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^3$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^3$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$1,6 \times 10^3$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$0,8 \times 10^3$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$0,4 \times 10^3$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^2$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$3,2 \times 10^1$ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle (água)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Avaliação: 24 e 48 horas após instalação do ensaio; SS = solução salina 0,85%; SN = soro normal; (+) reação positiva; (-) reação negativa. Cada diluição - 3 repetições.

Tabela 12. Análise do antissoro de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* em diluição contra diferentes concentrações do antígeno homólogo através da técnica da dupla difusão em gel - de-agar.

Antígenos	Antissoros											
	SS	SN	1:1	1:2	1:4	1:8	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
4,6 x 10 ⁷ ufc/ml	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4,6 x 10 ⁶ ufc/ml	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 ⁵ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 ⁴ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 ³ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3 x 10 ³ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,1 x 10 ³ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,57x 10 ³ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 ² ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 ¹ ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 ufc/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle (água)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Avaliação: 24 e 48 horas após instalação do ensaio; SS = solução salina 0,85%; SN = soro normal; (+) reação positiva; (-) reação negativa. Cada diluição - 3 repetições.

células/ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (DO = 0,06), usando, como antígenos, células mortas a vapor (100°C, 1 hora).

Devido a alta especificidade, a técnica serológica da dupla difusão em gel-de-agar foi selecionada para ser comparada na identificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* a partir de extrato obtido de sementes de feijão.

4.2. Isolamento direto em meios de cultura

Os resultados do teste de eficiência do antibiótico cefalexina e do fungicida clorotalonil, acrescidos aos meios de cultura NGA e EPGA, para verificar a inibição de crescimento de bactérias e, fungos respectivamente, encontram-se na Tabela 13. Dos isolados de bactérias testados nos meios de cultura, os do gênero *Xanthomonas* cresceram em ambos os meios, com e sem antibiótico e fungicida, enquanto que aqueles dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Erwinia*, foram completamente inibidos pelo antibiótico na concentração de 40 µg do produto comercial/ml. O mesmo ocorreu com o fungicida na concentração de 67 µg do produto comercial/ml que inibiu o crescimento de colônias fúngicas nos meios de cultura. MARINGONI & KUROSZAWA (1984) estudaram o efeito de quatro fungicidas (captan, clorotalonil, cicloheximida e thiram) em diversas concentrações nos meios de cultura sobre cinco isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Tabela 13. Eficiência da cefalexina e do clorotalonil em dois meios de cultura para inibição de crescimento de diversas espécies de bactérias e fungos (1).

Isolações de bactérias e fungos *	Meios de cultura (2)					
	NGA			EPGA		
	c. antib. e fung. (3)	s. antib. e fung.		c. antib. e fung. (3)	s. antib. e fung.	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xcph)	+	+		+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	+	+		+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	+	+		+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	+	+		+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	+		-	+	+
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	-	+		-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+		-	+	+
<i>Erwinia herbicola</i>	-	+		-	+	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	-	+		-	+	+
<i>Fusarium</i> spp	-	+		-	+	+
<i>Trichoderma</i> spp	-	+		-	+	+
"Contaminantes" bacterianos de sementes de feijão infectadas por Xcph.	-	+		-	+	+

(+) crescimento; (-) ausência de crescimento; (1) média de quatro repetições (2) a composição dos meios se encontra no item 3.2.; (3) concentrações: antibiótico: 40 mg p.c./l e fungicida: 67 mg p.c./l. * conc. de inóculo: bactérias - 10^4 - 10^5 células/ml e fungos - 10^4 - 10^5 conídios/ml.

(Dowson) Dye e concluíram que o clorotalonil, nas concentrações de 12,5 µg/ml, inibiu o crescimento de *Botrytis cinerea*, acima de 12,5 µg/ml inibiu parcialmente *Penicillium* sp e *Neurospora* sp e a 50 µg/ml inibiu *Colletotrichum gloesporioides*; porém, não afetaram os isolados de *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* provenientes de tomateiro, podendo ser um produto alternativo à cicloheximida com vantagens de ser encontrado no Brasil. Também, devido a sérios problemas encontrados com contaminantes, CLAFLIN et alii (1987) desenvolveram um meio semi-seletivo MXP para isolar *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes e solo, em que incluíram cefalexina (20 µg/ml de meio) e clorotalonil (Daconil 40,4%) (15 µg/ml de meio) para inibir contaminantes bacterianos e fúngicos, respectivamente. Segundo os autores, a cefalexina, na dosagem de 20 µg/ml, foi requerida para inibir *Erwinia* sp., especialmente *Erwinia herbicola* enquanto que os "strains" de *X. campestris* pv. *phaseoli* cresceram até a concentração de 30 µg/ml. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a eficiência de inibição de contaminantes foi alcançada, utilizando concentrações duas vezes maiores dos produtos.

4.3. Inoculação em plantas indicadoras

4.3.1 Avaliação de técnicas de extração, cultivares testadas e métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

A avaliação dos resultados do método de inocula-

ção por injeção na inserção do nó das folhas primárias não foi considerada devido a ausência de sintomas característicos da doença e morte precoce de plantas o que impediu a distinção da eficiência dentre as técnicas de extração e entre cultivares testadas. Provavelmente, a morte das plantas seja explicada por ser, esse método, muito drástico.

Na Tabela 14 são apresentados os dados médios de graus de severidade de sintomas em cultivares de feijoeiro, exibidos por *X. campestris* pv. *phaseoli* através de 4 técnicas de extração da bactéria e 2 métodos de inoculação.

De acordo com a Tabela 14, a análise estatística dos resultados obtidos não mostrou diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, entre as cultivares, utilizando-se as técnicas de extração baseadas na suspensão em água de sementes moídas, na suspensão em meio líquido de sementes inteiras e na suspensão em água de sementes inteiras com desinfestação superficial. Por outro lado, pela técnica de extração do patógeno, que utiliza suspensão em água de sementes inteiras, embora as cultivares CNF 0010 e Rosinha G-2, não diferissem entre si, quanto aos graus de severidade de sintomas, a primeira foi mais sensível na expressão de sintomas do crestamento comum em relação a Cornell 49-242, independentemente do método de inoculação utilizado. Ainda na tabela 14, dentro de cultivar, a comparação entre as técnicas de extração mostrou que o grau de severidade de sintomas nas plan

Tabela 14. Efeito de técnicas de extração do patógeno de sementes de feijão (cv. EMGO-PA 201-ouro), cultivares de feijoeiro e métodos de inoculação na reação de severidade de sintomas exibida por *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) (1).

Técnicas de extração	Cultivares / Métodos de inoculação													
	CNF 0010						Rosinha G-2						Cornell 49-242	
	AM	IT	M̄	AM	IT	M̄	AM	IT	M̄	AM	IT	M̄		
Moagem de sementes e suspensão em água por 2 horas (*)	2,75 ⁽²⁾	2,62	2,68 b A	2,50	2,12	2,31 C A	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25 b A		
Sementes inteiras com desinfecção-suspensão em água por 18-24 horas (**)	2,87	3,12	2,99ab A	2,50	2,62	2,56 bc A	2,25	2,12	2,12	2,12	2,12	2,18 b A		
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas (**)	3,37	3,50	3,42ab A	3,37	3,50	3,43a A	3,12	3,00	3,00	3,00	3,00	3,06a A		
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas (**)	3,62	3,75	3,68a A	3,37	3,50	3,41ab AB	3,00	3,12	3,12	3,12	3,12	3,06a B		
Controles-Água destilada esterilizada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
-Meio líquido esterilizado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
-Xcph (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0	4,75	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,25		

(1) Médias de quatro repetições (2 vasos de 5 plantas-cada repetição); (2) Escalas de severidade de sintomas descritas no item 3.7.2.3.4.; AM = agulhas múltiplas; IT = incisão com tesoura. Incubação: (*) Temperatura ambiente de laboratório, (**) Em geladeira a temperatura de 5-10⁰C. Letras minúsculas na vertical, comparan médias entre técnicas de extração e letras maiúsculas na horizontal, comparan médias entre cultivares. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si (teste de Tukey a 5%).

tas da cv. CNF 0010 foi significativamente superior quando se inoculou suspensão em água de sementes inteiras, em relação a inoculação da suspensão em água de sementes moídas, porém, não diferiu da inoculação de suspensão em meio líquido de sementes inteiras e, também de sementes inteiras em água com de sin fest ação superficial. Com relação a cv. Rosinha G-2, embora os graus de severidade de sintomas nas plantas não diferissem significativamente entre si, quando se inocularam sus pen sões em água e em meio líquido de sementes inteiras, eles foram superiores aos graus de severidade obtidas pela inocula ção da suspensão em água de sementes moídas e sementes inteiras com desinfestação. Comportamento semelhante ao da cv. Ro sin ha G-2 ocorreu com a inoculação de plantas da cv. Cornell 49-242.

De acordo com os resultados apresentados no A pê ndice 6, a análise estatística dos dados obtidos não revelou diferenças significativas em severidade de sintomas nas cultivares hospedeiras, entre os métodos de inoculação.

Na literatura, diversos métodos tem sido aplicados para inoculação e avaliação da resistência do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli*. ANDRUS (1948) obteve ótimos resul tados utilizando o método de inoculação com agulhas múltiplas, num programa de melhoramento para resistência a *X. campestris* pv. *phaseoli* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* em feijoeiro, cujas vantagens foram ausência de escape e presença de áreas de

reação que permitem medir quantitativamente. POMPEU & CROWDER (1973) e POMPEU (1987) compararam vários métodos de inoculação, encontrando maior eficiência no método de "agulhas múltiplas", sendo que o método da "incisão com tesoura" não foi incluído neste estudo. Uma das técnicas de inoculação mais empregada para avaliar a resistência de cultivares ao crestamento comum é a incisão de folhas primárias com tesouras previamente mergulhadas no inóculo (SARTORATO & RAVA, 1979; WESBTER et alii, 1980; OLEAS ARIAS, 1982; RAVA, 1984; RAVA et alii, 1990) ou com lâminas de barbear (PASTOR-CORRALES, 1981).

Os resultados obtidos mostraram que, dos 3 métodos de inoculação comparados, agulhas múltiplas e incisão com tesoura foram eficientes na expressão de sintomas induzidos por *X. campestris* pv. *phaseoli*. Entretanto, o último adotado, no presente trabalho, visto ter sido mais prático e de maior rendimento, além de expressar os sintomas mais rapidamente.

A manifestação de sintomas em plantas inoculadas com suspensão em água ou meio líquido das sementes portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli* variou de 5 a 10 dias após a inoculação. Provavelmente, esta variação foi função da quantidade de inóculo do patógeno nas amostras de sementes e de condições ambientais na casa de vegetação. BURKHOLDER (1930) observou que o crestamento comum foi prevalente em estações quentes do que frias e que a infecção foi mais facilmente obtida em casa de vegetação a 26,7° do que a 18,3°C. Se

gundo GOSS (1940), em geral, o crestamento comum é considerado como doença de altas temperaturas. O sintoma da doença no feijoeiro foi obtida por inoculação com *X. campestris* pv. *phaseoli* à temperatura variando de 16 a 32°C. Na temperatura de 32°C, os sintomas apareceram com 7 dias, a 20°C com 23 dias, enquanto que, a 16°C, somente leves sintomas foram observados em poucas folhas ao final de 27 dias. Ainda segundo o autor, a umidade é usualmente considerada essencial para o agente causal do crestamento, durante o período de incubação de 24 horas, sendo que após esse período, baixas umidades aumentaram a severidade de sintomas sobre folhas infectadas com crestamento comum.

Das cultivares comparadas como plantas indicadoras, tanto CNF 0010 como Rosinha G-2 foram eficientes na expressão de sintomas e possibilitaram diferenciação entre as técnicas de extração da bactéria. Segundo a literatura, essas duas cultivares tem mostrado alta suscetibilidade à *X. campestris* pv. *phaseoli* e, por isso, vêm sendo utilizadas como controle nos trabalhos de melhoramento visando resistência ao patógeno (POMPEU, 1987; RAVA et alii, 1989). Embora ambas as cultivares tivessem sido muito semelhantes quanto a expressão de sintomas do crestamento, observou-se uma ligeira superioridade de CNF 0010 em relação a Rosinha G-2, por esta razão, a mesma foi adotada na presente pesquisa, como planta indicadora para as inoculações de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

4.3.2. Avaliação da sensibilidade das técnicas de extração através da inoculação em plantas indicadoras por incisão com tesoura do extrato em diferentes diluições.

Os resultados da comparação da eficiência de técnicas de extração da bactéria pela inoculação do extrato, em diferentes diluições, de duas amostras de sementes portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli* cvs. EMGOPA 201-ouro e Rio Vermelho, podem ser observados na Tabela 15. De acordo com os resultados, não se observou interação significativa entre os fatores avaliados, ou seja, técnicas de extração x diluição. Considerando a média das diluições, na cultivar EMGOPA 201-ouro, observaram diferenças significativas nos graus de severidade de sintomas obtidos a partir da inoculação da suspensão de sementes inteiras em água (RAT, 1987, modificada) e em meio líquido (VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984, modificada) e também, da suspensão de sementes inteiras em água com desinfestação superficial em relação a suspensão obtida a partir da imersão em água de sementes moídas (TAYLOR, 1970). No caso de extração de bactéria a partir de sementes da cv. Rio vermelho, observou-se que a técnica baseada em RAT (1987, modificada) proporcionou graus de severidade de sintomas significativamente superior as demais, seguido aos obtidos pelas técnicas baseadas em VELASQUEZ & TRUJILLO (1984) e TAYLOR (1970), modificadas, em relação à técnica baseada na imersão em água de sementes inteiras com desinfestação superficial. Provavelmente,

Tabela 15. Comparação da eficiência de técnicas de extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XcpH) de duas amostras de sementes de feijão através da inoculação do extrato diluído por incisão com tesoura em plantas de feijoeiro da cultivar CVF 0010(1).

Técnicas de extração	CV. EXOPA 201-ouro / Diluição extrato				CV. Rio Vermelho / Diluição extrato									
	1:1	1:2	1:4	1:10	1:16	1:100	M	1:1	1:2	1:4	1:10	1:16	1:100	M
Moagem das sementes e suspensão em água por 2 horas (*)	2,6	2,3	2,2	2,0	1,7	1,4	2,02 b	3,6	3,5	3,6	3,1	2,5	1,6	2,93 b
Sementes inteiras com desinfecção-suspensão em água por 18-24 horas (**)	3,5	3,2	2,8	2,6	2,4	2,0	2,71a	3,5	3,1	2,9	2,5	1,8	1,6	2,48 c
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas (**)	3,5	3,1	2,9	2,5	2,4	1,9	2,67a	3,5	3,5	3,4	2,9	2,8	1,9	2,93 b
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas (**)	3,7	3,4	3,1	2,9	2,8	2,3	3,01a	4,0	3,9	3,9	3,4	3,2	2,1	3,36a
Controles:														
- Água dest. esterilizada	0							0						
- Meio líquido esterilizado	0							0						
- XcpH (10 ⁸ ufc/ml)	4,9							5,3						

(1) médias de 4 repetições (2 vasos de 5 plantas cada/repetição); (2) escala de severidade de sintomas descrita no item 3.7.2.3.4.. Incubação: (*) Temperatura ambiente de laboratório; (**) Em geladeira à temperatura de 5-10°C. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

esses resultados possam ser explicados pela localização do inóculo nas sementes das duas cultivares, ou seja, na cv. EM-GOPA 201-ouro, o inóculo estaria mais interno a semente enquanto na cv. Rio Vermelho, o inóculo estaria tanto interna como externo (este último sendo eliminado durante a desinfestação com NaOCl, 1% de cloro ativo).

Considerando que *X. campestris* pv. *phaseoli* pode localizar-se tanto interna como externamente à semente, constituindo-se a mesma em importante fonte de inóculo primário (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; SAETTLER & PERRY, 1972; TRUJILLO & SAETTLER, 1979; WELLER & SAETTLER, 1980; VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984), a extração através das técnicas que utilizam sementes inteiras sem desinfestação superficial, imersa em água destilada (RAT, 1987, modificada) e em meio líquido (VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984, modificada) determinou maior grau de severidade de sintomas nas plantas, proporcionando melhor discriminação de reações entre as cultivares indicadoras, provavelmente, devido a maior extração da bactéria da semente.

Segundo SCHAAD (1982) e RODRIGUES NETO (1988), entre as etapas importantes que devem ser levadas em consideração para testes de sementes, está a extração da bactéria da mesma. Para seleção da técnica de extração deve-se conhecer o patógeno, principalmente a sua localização na semente e utilizar sementes de várias procedências (VAN-VUURDE, 1987), o que permitiria alcançar maior segurança na detecção da bactéria num determinado lote de sementes.

4.3.3. Especificidade dos sintomas causados por *X. campestris* pv. *phaseoli*

Os resultados de avaliação da patogenicidade dos diversos isolados de bactérias e fungos, patogênicos e não à cultura do feijoeiro, através da inoculação de plântulas das cultivares CNF 0010 e Rosinha G-2, por incisão com tesoura, encontram-se na tabela 16. As mesmas mostraram sintomas característicos de clorose dos cortes e murcha do bordo das folhas, entre 5 a 7 dias após a inoculação, apenas nas plantas de ambas as cultivares inoculadas com isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* incluindo o "strain" *fuscans*, (Fig. 3 C). Entre as *Pseudomonas*, apenas *P. syringae* pv. *syringae*, isolada do feijoeiro provocou o aparecimento de sintomas de murcha na região de inoculação, dentro de 48 horas, isto é, logo após a retirada das plantas da câmara úmida, totalmente distintos dos causados por *X. campestris* pv. *phaseoli*, que só foram observados dentro de 5 a 7 dias após a inoculação. Trabalhando nesse assunto, SAETTLER (1971) inoculou plantas de feijoeiro da cultivar "Manitou" com 10 dias de idade, através de injeção no nó das folhas primárias, com suspensão de um grande número de bactérias patogênicas e não patogênicas ao feijoeiro. Todos os patógenos de feijoeiro (*X. campestris* pv. *phaseoli* e o "strain" *fuscans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* e *P. syringae* pv. *syringae*) e apenas *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, não patogênica ao feijoeiro, produzi-

Tabela 16. Patogenicidade de diversos isolados de bactérias e fungos inoculados em plântulas de feijoeiro (cv. CNF 0010 e Rosinha G-2) por incisão com tesoura⁽¹⁾.

Bactérias e fungos ⁽²⁾	Número de isolados.	Cultivares de feijoeiro	Severidade de sintomas ⁽³⁾
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	4	Rosinha G-2	5,00
		CNF 0010	5,25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	4	Rosinha G-2	5,00
		CNF 0010	5,25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	2	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	2	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1	Rosinha G-2	+
		CNF 0010	+
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	1	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	1	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Erwinia herbicola</i>	1	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	2	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Fusarium</i> spp	5	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
<i>Trichoderma</i> spp	3	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
"Contaminantes" bacterianos de sementes e folhas infectadas de feijoeiro por <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	10	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0
Testemunha (água destilada esterilizada)	-	Rosinha G-2	0
		CNF 0010	0

(1) médias de 4 repetições \bar{x} 4 vasos com 4 plantas/vaso ; (2) concentração de inóculo (bactérias) - 10^8 células/ml e 10^4 - 10^5 conídios/ml (fungos) ; (3) escala de notas descrita no item 3.7.2.3.4.; (+) sintomas de murcha na região de inoculação após 48 horas.

ram sintomas em plantas, dentro de 5 a 7 dias após a inoculação. Provavelmente, a sensibilidade das cultivares testadas e a diferença entre os métodos de inoculação possam explicar o comportamento diverso do patógeno *P. syringae* pv. *syringae* em produzir sintomas em plantas dentro de um período variável desde 48 horas como foi obtido no presente estudo até 5 a 7 dias após a inoculação conforme SAETTLER (1971). Segundo SANDS et alii (1980), a expressão de sintomas provocados por *Pseudomonas* não necessariamente indica prova de patogenicidade. As *Pseudomonas* são amplamente distribuídas e muitas produzem sintomas atípicos sobre plantas não hospedeiras, quando estas são submetidas a condições adversas ou sob altas quantidades de inóculo.

Sintomas induzidos por bactérias saprofíticas (RAT, 1988b) ou outros agentes de sementes como fungos, devem ser prevenidos. É conveniente, para a confirmação do patógeno suspeito, inocular plantas com culturas virulentas da bactéria em estudo, como controle positivo para a comparação (RODRIGUES NETO, 1988). Nesse aspecto, deve ser mencionado, que na presente pesquisa, utilizou-se, com sucesso, folhas infectadas por *X. campestris* pv. *phaseoli*, desidratadas e imersas em água, para ativação e liberação das bactérias, como controle positivo. Além de manter o inóculo viável por longos períodos, constitui numa técnica efetiva, simples, rápida e de baixo custo para inoculação de plantas de feijoeiro com o pa-

tógeno, particularmente, onde as facilidades de laboratório são limitadas, conforme o trabalho desenvolvido por GILBERTSON et alii (1988).

4.4. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* a partir de sub-amostras de sementes de feijão de diferentes tamanhos

As Tabelas 17 a 22 apresentam os resultados referentes à comparação de quatro técnicas de extração e três métodos de identificação de *X. campestris* pv. *phaseoli*, a partir de sub-amostras de sementes de diferentes tamanho, de seis cultivares de feijoeiro portadoras do patógeno. Nos testes com sub-amostras de sementes das cultivares Rio Vermelho, EMGOPA 201-ouro, carnaval e catu (Tabelas 17, 19, 20 e 21), observa-se que a técnica de extração da bactéria através da suspensão de sementes inteiras em água (RAT, 1987, modificada), proporcionou graus de severidade de sintomas em plantas de feijoeiro (cv. CNF 0010), estatisticamente superiores aos obtidos a partir das técnicas de extração que utilizaram suspensão em água de sementes moídas (TAYLOR, 1970, modificada) ou de sementes inteiras com desinfestação superficial (NaOCl, 1% de cloro ativo), porém, semelhante àqueles obtidos a partir da suspensão de sementes inteiras em meio líquido (VELASQUEZ E TRUJILLO, 1984, modificada). Na tabela 18,

Tabela 17. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Kanthiomyces compactus* pv. *plumicola* a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Rio Vermelho) de diferentes tamanhos.

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras (em número de sementes)	Métodos de identificação											
	Planta indicadora (cv. CNP 0010)	Seroologia (MCA) (2)		Isolamento em meios de cultura (3)								
		Severidade de sintomas (Nota 1 a 6)	AS	XcpH	AS	XcpHif						
Moagem das sementes e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	2,75 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	3,00 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	2,00 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média	1,65 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C	1000	2,55 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	2,55 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	1,80 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	1,65 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média	2,13 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C	1000	1,40 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	2,90 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	2,85 ^b	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	2,10 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média	2,91 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C	1000	3,20 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	2,65 ^a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	2,70 ^b	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	2,20 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média	2,68 ^{AB}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controles	Isol. XcpH (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Isol. XcpHif (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Água destilada/meio líquido esterilizado	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) MCA = ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia característica do patógeno; (+) as diluições foram feitas sempre para técnica de moagem das sementes; AS = antissero.

Tabela 16. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseolicola* a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. Positiva) de diferentes tanques.

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras (em número de sementes)	Métodos de identificação				
	Planta indicadora (cv. CNP 0010)	Serologia (DCCA) (2)		Isolamento em meios de cultura (3)	
	Severidade de sintomas (Nota 1 a 6)	AS Xqph	AS Xqphf	MCA diluição*	EFVA diluição*
Módulo das sementes e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente					
1000		-	-	+	-
500	3,35 a	-	-	+	+
100	3,50 ab	-	-	-	+
10	3,50 b	-	-	-	-
Média	1,35 c	-	-	-	-
	2,92 AB				
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C					
1000		+	+	+	+
500	3,75 a	+	+	-	-
100	3,35 ab	-	-	-	-
10	3,10 b	-	-	-	-
Média	1,90 c	-	-	-	-
	2,68 B				
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C					
1000		+	+	+	+
500	4,50 a	+	+	+	+
100	4,00 ab	+	+	+	+
10	3,25 b	+	+	+	+
Média	1,80 c	-	-	-	-
	3,38 A				
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C					
1000		+	+	+	+
500	4,00 a	+	+	+	+
100	3,25 ab	-	-	-	-
10	3,50 b	-	-	-	-
Média	1,40 c	-	-	-	-
	3,03 AB				
Controles					
Isol. Xqph (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	+	+	+	+
Isol. Xqphf (10 ⁸ ufc/ml)	5,0	-	-	-	-
Água destilada/meio líquido esterilizado	0	-	-	-	-

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) DCCA = ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia e + presença de colônia característica do patógeno; (*) as diluições foram feitas somente para técnicas de inoculação das sementes; AS = antissoro.

Tabela 19. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli a partir de sub-amostras de sementes de feijão (cv. BIODPA 201 - ouro) de diferentes tamanhos.

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras (em número de sementes)	Métodos de identificação				
	Planta indicadora (cv. CIP 0010)	Serology (DOCA) (2)		Isolamento em meios de cultura (3)	
	Severidade de sintomas	AS Xqph	AS Xqphf	MHA diluição*	DOCA diluição*
	Nota 1 a 6)			10 ⁰ 10 ⁻¹ 10 ⁻²	10 ⁰ 10 ⁻¹ 10 ⁻²
Métodos de detecção					
Métodos de identificação					
Métodos de detecção e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente					
	(1)				
	2,95 a	-	-	-	+
	2,55 ab	-	-	-	+
	2,50 b	-	-	+	-
	1,98 c	-	-	-	-
	2,47 c	-	-	-	-
	Média				
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C					
	3,25 a	+	+	+	+
	3,10 ab	+	+	+	+
	3,05 b	-	-	-	-
	2,00 c	-	-	+	-
	2,85 b	-	-	-	-
	Média				
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C					
	4,00 a	+	+	+	+
	3,65 ab	+	+	-	-
	3,35 b	-	-	-	+
	2,75 c	-	-	-	-
	3,43 A	-	-	-	-
	Média				
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C					
	3,65 a	+	+	+	+
	3,50 ab	+	+	-	+
	3,30 b	-	-	-	-
	2,25 c	-	-	-	-
	3,17 AB	-	-	-	-
	Média				

Controles
 Isol. Xqph (10⁸ ufc/ml)
 Isol. Xqphf (10⁸ ufc/ml)
 Água destilada/meio líquido esterilizado

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) DOCA - ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia e + presença de colônia característica do patógeno; (*) as diluições foram feitas somente para técnicas da reação das sementes; AS = antissor.

Tabela 20. Comparação de métodos de detecção e identificação (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão (cv. Carnaval) a partir de sub-amostras de diferentes tamanhos.

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras (em número de sementes)	Métodos de identificação					
	Planta indicadora (cv. CNF 0010) Severidade de sintomas (Nota 1 a 6)	Serologia (mgv) (2)		Inoculamento em meios de cultura (3)		
		AS Xqph	AS Xqphf	MCA diluição*	MCA diluição*	10 ⁰ 10 ⁻¹ 10 ⁻²
Moagem das sementes e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente						
1000	(1)	-	-	-	+	-
500	2,50 a	-	-	-	-	+
100	1,65 b	-	-	-	-	-
10	1,50 bc	-	-	-	-	-
Média	1,00 c	-	-	-	-	-
	1,66 . C					
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	2,15 ab	-	+	-	-	-
500	2,75 a	+	-	+	+	+
100	1,19 bc	-	-	+	-	-
10	1,35 c	-	-	-	-	-
Média	1,86 B					
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	3,10 a	+	+	+	+	+
500	3,25 a	+	+	+	+	+
100	2,90 b	-	-	-	-	-
10	2,05 b	-	-	-	-	-
Média	2,82 A					
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	2,85 a	+	-	-	-	+
500	2,55 a	-	+	+	+	+
100	2,50 a	+	+	+	+	-
10	2,00 a	-	-	-	-	-
Média	2,32 A					
Controles						
Isol. Xqph (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	+	+	+	+	+
Isol. Xqphf (10 ⁸ ufc/ml)	5,0	-	-	-	-	-
Água destilada/meio líquido esterilizado	0	-	-	-	-	-

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si; entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) DGA - ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia e + presença de colônia característica do patógeno; (*) as diluições foram feitas sempre para técnica de moagem das sementes, AS = antissoro.

Tabela 21. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. *plumicola* a partir de subamostras de sementes de feijão (cv. Catu) de diferentes tamanhos.

Técnicas de extração e tamanho de subamostras (em número de sementes)	Métodos de identificação					
	Planta indicadora (cv. CIF 0010)		Serologia (ODCA) (2)		Isolamento em meios de cultura (3)	
	Soberiedade de sementes	AS Xqph	AS Xqphf	10CA diluições*	10CA diluições*	EDCA diluições*
Nota 1 a 6)						
Moyen das sementes e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente						
1000	(1)	-	-	-	+	-
500	3,00 a	-	-	-	-	+
100	2,50 ab	-	-	-	-	+
10	2,15 b	-	-	-	-	-
Média	2,15 b	-	-	-	-	-
	2,45 B	-	-	-	-	-
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	2,45 a	+	+	+	+	+
500	2,50 a	-	-	-	-	-
100	2,05 ab	-	-	-	-	-
10	1,90 b	-	-	-	-	-
Média	2,22 C	-	-	-	-	-
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	3,50 a	+	+	+	+	+
500	3,10 a	-	-	-	-	-
100	3,05 a	+	+	+	+	+
10	2,05 b	-	-	-	-	-
Média	2,92 A	-	-	-	-	-
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	3,05 a	-	-	+	+	+
500	2,80 ab	+	+	-	-	-
100	2,35 b	-	-	-	-	-
10	2,35 b	-	-	-	-	-
Média	2,63 A	-	-	-	-	-
Controles						
Isol. Xqph (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	+	+	+	+	+
Isol. Xqphf (10 ⁸ ufc/ml)	4,0	-	-	-	-	-
Água destilada/meio líquido esterilizado	0	-	-	-	-	-

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) ODCA - ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia e + presença de colônia característica do patógeno; (*) as diluições foram feitas somente para técnica de moyen das sementes; AS = antissoro.

Tabela 22. Comparação de métodos de detecção (extração e identificação) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* a partir de subamostras de sementes de feijão (cv. Rio Ivaí) de diferentes tamanhos.

Técnicas de extração e tamanho de subamostras (em número de sementes)	Métodos de identificação					
	Planta indicadora (cv. CNF 0010)	Serologia (DGA) (2)		Isolamento em meios de cultura (3)		
	Severidade de sintomas (Nota 1 a 6)	AS Xoph	AS Xatpf	NCA diluição*	EPGA diluição*	
Moagem das sementes e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente						
1000	(1)	-	-	-	-	-
500	3,10 a	-	-	-	-	-
100	3,20 a	-	-	-	-	-
10	2,60 b	-	-	-	-	-
Média	3,02 A	-	-	-	-	-
Sementes inteiras com desinfestação-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	2,75 bc	+	+	-	-	-
500	3,25 a	+	+	+	+	+
100	3,05 ab	+	+	-	+	+
10	2,50 c	-	-	-	-	-
Média	2,88 A	+	+	-	-	-
Sementes inteiras-suspensão em água por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	3,25 a	+	+	-	-	+
500	3,05 ab	+	+	-	-	+
100	2,90 ab	-	+	+	+	+
10	2,80 b	-	-	-	-	-
Média	3,00 A	+	+	-	-	+
Sementes inteiras-suspensão em meio líquido por 18-24 horas, à 5-10°C						
1000	3,00 a	+	+	-	-	+
500	3,20 a	+	+	-	-	+
100	2,95 a	-	-	-	-	+
10	2,80 a	-	-	-	-	-
Média	2,98 A	+	+	+	+	-
Controles						
Isol. Xoph (10 ⁸ ufc/ml)	4,5	+	+	+	+	+
Isol. Xatpf (10 ⁶ ufc/ml)	4,5	-	-	-	-	-
Água destilada/meio líquido esterilizado	0	-	-	-	-	-

(1) Valores seguidos pela mesma letra minúscula, não diferem entre si entre tamanhos de sub-amostras para cada técnica de extração; valores seguidos pela mesma letra maiúscula, indicam que as técnicas de extração não diferem entre si; (2) DGA - ausência e + presença de reação; (3) - ausência de colônia e + presença de colônia característica do patógeno; (*) as diluições foram feitas somente para técnica da moagem das sementes; AS = antissoro.

os resultados com a cultivar Rosinha mostraram que apenas a técnica de extração baseada na suspensão de sementes inteiras com desinfestação superficial proporcionou graus de severidade de sintomas em plantas inferiores as demais técnicas. Na tabela 22, não se observaram diferenças significativas entre os graus médios de severidade de sintomas oriundos da inoculação de extratos de sementes da cv. Rio Ivai, obtidos pelas quatro técnicas de extração. Considerando o efeito do tamanho das sub-amostras obtidas a partir de amostras de sementes recebidas, observou-se que, mesmo as sub-amostras de 10 sementes possibilitaram a detecção do patógeno. Isto significa que a incidência foi no mínimo, 10% em todas as sub-amostras, pois pelo menos 1 semente era portadora do patógeno em 10 analisadas (Tabelas 17 a 22).

Para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em sementes de feijão, SAETTLER (1971) utilizou com sucesso, a metodologia de extração, a partir de sementes inteiras desinfestadas superficialmente com solução hipoclorito de sódio 2,5% e imersas em água destilada esterilizada, seguida de identificação do patógeno através da inoculação por injeção no nó das folhas primárias de plântulas de feijoeiro com 10 dias de idade. Por outro lado, EDNIE & NEEDHAM (1973) utilizaram três etapas para a detecção dessa bactéria a partir de sementes de feijão: extração a partir de sementes moídas pré-desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de

sódio (NaOCl, 1% cloro ativo) por 10 minutos, isolamento em meio de cultura YDC e identificação usando fago específico ou inoculação em plantas hospedeiras. O método apresentou alta sensibilidade para detectar 1 semente infectada pelo patógeno em 10.000. Esses resultados contrariam, em parte, os obtidos na presente pesquisa uma vez que tanto a extração da bactéria de sementes inteiras desinfestadas superficialmente como a inoculação por injeção não foram eficientes. Considerando que a bactéria pode estabelecer-se tanto interno como externamente à semente (WELLER & SAETTLER, 1980; VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984), a desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) pode ter propiciado a eliminação de inóculo externo, tornando a técnica de extração menos eficiente conforme os resultados obtidos na presente pesquisa. Segundo RAT (1988c), a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio ou cálcio é eficiente na eliminação dos microorganismos localizados sobre a superfície da semente.

A partir da suspensão obtida pela técnica de extração de semente moída baseada em TAYLOR (1970), os resultados de identificação da bactéria, através do método serológico por dupla difusão em gel-de-agar, foram negativos talvez devido à viscosidade do líquido que dificultou a difusão da bactéria através do agar para propiciar a reação com os antissoros (Tabelas 17 a 22). Uma possível solução seria a realização de uma filtragem de suspensão. Em contrapartida, os me

lhores resultados de identificação do patógeno através do método serológico foram alcançados a partir da extração da bactéria pelas técnicas descritas por RAT (1987) e VELASQUEZ & TRUJILLO (1984), modificadas. Entre os antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* utilizados, não ocorreram diferenças expressivas com relação a identificação do patógeno. O método serológico por dupla difusão em gel-de-agar apresentou alta especificidade, concordando com o resultados obtidos por OLEAS ARIAS (1982), porém, baixa sensibilidade na identificação do patógeno a partir da suspensão obtida por imersão das sementes em água ou meio líquido, em relação a planta indicadora. KIRALY et alii (1974) estabeleceram que o antígeno, para ser usado em teste de dupla difusão em gel-de-agar, deveria conter 10^{10} células/ml. TRUJILLO & SAETTLER (1979), utilizando esta técnica serológica combinada com meio semi-seletivo, não detectaram *X. campestris* pv. *phaseoli* nas amostras de sementes de feijão onde menos do que 10^9 ufc/ml do patógeno foi adicionada a 1,6 kg de sementes não infectadas, imersas em solução salina 0,01 M PO_4 , pH = 7,2. Em outro teste, usando lotes de sementes com níveis de infecção natural variando de 0,01 a 10%, esta técnica combinada não detectou a bactéria em lotes com níveis de infecção de sementes inferiores a 1%. Por sua vez, em estudos com antissoros preparados contra *X. campestris* pv. *phaseoli* e o "strain" *fuscans*, TRUJILLO & SAETTLER (1981) obtiveram excelentes resultados com preparações antigênicas de células mortas e vivas, contendo entre $6 \cdot 10^6$ e 1×10^7

células/ml. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos, nesta pesquisa, com células vivas nas concentrações de $3,2 \times 10^6$ e $4,6 \times 10^6$ ufc/ ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans*, respectivamente, pelo teste de dupla difusão em gel-de-agar.

Segundo RAT (1988a), a técnica serológica permite a identificação de bactérias com uma boa segurança. Dos vários tipos, a microprecipitina em placas ou tubos e a imuno difusão em agar podem ser empregadas sobre culturas puras porque exigem grande quantidade de bactérias, isto é, sua sensibilidade é muito baixa e somente podem ser usadas para a confirmação da identificação.

Por isso, apesar da técnica serológica através da dupla difusão em gel-de-agar mostrar alta especificidade para *X. campestris* pv. *phaseoli*, a sua sensibilidade foi baixa, devendo a sua utilização ser de importância como método de detecção indireta, isto é, quando usada em combinação com outras técnicas como, por exemplo, isolamento direto, para a identificação do patógeno.

Com relação ao isolamento direto em meios de cultura, os dados obtidos revelaram não haver consistência na detecção, mesmo nas menores diluições. Contudo, o isolamento no meio EPGA contendo o antibiótico cefalexina e o fungicida clorotalonil que impediram, em parte, a proliferação excessiva dos "contaminantes" bacterianos e fúngicos de semen-

tes, respectivamente, deu melhor resultado do que no meio NGA (Tabelas 17 a 22). Segundo SCHAAD (1982), a desvantagem do uso de um meio menos rico, como nutriente agar, consiste na dificuldade em se distinguir as colônias de *Xanthomonas campestris* das colônias de outras bactérias que produzem o pigmento amarelo xanthomonadina. Para o caso do isolamento direto, deve ser mencionado que foram utilizados os testes serológicos e de patogenicidade, para auxiliar na identificação das colônias suspeitas de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Uma característica auxiliar de identificação foi a observação do empardecimento do meio de cultura, especialmente NGA, devido a capacidade dos "strains" *fuscans* em produzir um pigmento marrom. SUTTON & WALLEN (1970) também verificaram que os "strains" *fuscans* foram identificados pela sua habilidade em produzir o pigmento marrom em nutriente agar com 24 a 48 horas de incubação a 27°C. Esses resultados indicam que algumas bactérias patogênicas de sementes podem ser identificadas apenas com base nas características das colônias em meio de agar como acontece para a maioria dos fungos (SCHAAD, 1982; IRWIN, 1987).

O uso de técnicas combinadas tem sido citado na literatura por diversos autores. TRUJILLO & SAETTLER (1979) utilizaram uma técnica combinada de meio semi-seletivo líquido (MSS = 1 mg de extrato de levedura, 25 mg cicloheximida, 2 mg nitrofurantoina, 1 mg ácido nalidixico, 0,05 mg

gentamicina em 1000 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH= 7,2) e teste serológico por dupla difusão em gel-de-agar, para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. O meio semi-seletivo permitiu o crescimento do patógeno a níveis populacionais altos na presença de contaminantes, enquanto o teste serológico mostrou-se altamente específico para a identificação da bactéria. Segundo esses autores, esta combinação de técnicas foi mais eficiente e mais rápida do que o método de inoculação, além de não exigir grandes espaços e equipamentos para a conclusão dos testes. VELASQUEZ & TRUJILLO (1984), comparando diferentes métodos para a detecção de sementes de feijão por esse patógeno, afirmaram que a combinação de meio semi-seletivo com imuno-difusão em gel-de-agar resultou em um procedimento altamente seguro para a detecção do patógeno, obtendo 23% a mais de detecção do que no método de injeção de plantas e 47% a mais do que no teste serológico, quando o meio semi-seletivo não foi usado. Um meio semi-seletivo MXP (0,8 g K_2HPO_4 ; 0,6 g KH_2PO_4 ; 0,7g extrato de levedura, 8 g de amido solúvel, 10 g brometo de potássio, 1 g glicose, 15 g agar; após autoclavagem adicionar: 15 mg de clorotalonil, 20 mg de cefalexina, 20 mg kasugamicina, 2 mg glutamicina, 20 ml metil violeta, 2B-solução a 1% em etanol 20%, 60 ml metil verde-solução aquosa a 1%), foi desenvolvido por CLAFIN et alii (1987) para isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* e do "strain" *fuscans* a partir de sementes de feijão e solo infestado. Todos os "strains" *fuscans* da *X.*

campestris pv. *phaseoli* e a maioria dos patovares de *X.* *campestris* testados cresceram sobre esse meio. Entretanto, alguns "strains" *fuscans* foram indistinguíveis da *X. campestris* pv. *phaseoli* típica e o pigmento marrom característico não foi produzido sobre esse meio. Os autores também admitiram que alguns "strains" cresceram muito lentamente sobre o meio MXP; além disso, os mesmos comentaram que, embora os meios semi-seletivos sejam práticos, torna-se difícil desenvolver um meio que restrinja o crescimento de todos os contaminantes sem afetar o crescimento do patógeno. Segundo SCHAAD (1982) e MOHAN & SCHAAD (1987), enquanto os meios semi-seletivos melhoram as chances de sucesso no isolamento do patógeno, há necessidade de confirmar a sua identificação através de testes de patogenicidade. Outros pontos que parecem ser limitantes são: o alto custo dos agentes inibidores de crescimento para saprófitas, a necessidade de treinamento pessoal para obtenção desses meios de cultura e principalmente, a falta de segurança nos resultados obtidos. Segundo KLEMENT (1983), por causa da semelhança existente nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de muitas bactérias fitopatogênicas e saprófitas, comuns sobre a superfície de sementes, o teste da reação de hipersensibilidade (RH) em folhas de plantas de fumo, através do método de infiltração por injeção, pode ser um meio útil de distinção de patógenos e não patógenos, com a vantagem de poder reduzir o tempo de investigação de uma semana para 6 a 10 horas, para o caso das *Pseudomonas* e de 10 a 24 horas para as

Xanthomonas extraídas de sementes.

Os testes de inoculação em plantas indicadoras podem ser considerados de baixa eficiência, sendo necessárias populações iguais ou maiores do que 10^3 a 10^4 células bacterianas/sementes de feijoeiro (WELLER & SAETTLER, 1980) ou 10^3 a 10^4 células/ml (RAT, 1988b) para a produção de sintomas. Entretanto, vários trabalhos têm relatados populações de *X. c. phaseoli* maiores do que 10^5 células/semente (EDNIE & NEEDHAM, 1973, TRUJILLO & SAETTLER, 1979, WELLER & SAETTLER, 1980). Também, TRUJILLO & SAETTLER (1979) verificaram que sementes com sintomas visuais desse patógeno, tinham em média, concentrações de inóculos de 10^7 - 10^9 células/semente. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que esse método apresentou alta especificidade e maior sensibilidade na detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* extraída de semente de feijão do que os métodos comparados de serologia (dupla difusão em gel-de-agar) e isolamento direto em meios de cultura; este procedimento (Fig. 3), possibilitou a clara distinção entre as técnicas de extração e permitiu a identificação segura e direta do patógeno. Portanto, através do método de detecção que inclui as etapas de extração através da suspensão em água de sementes inteiras e incubação a 5 - 10°C, por 18 - 24 horas (1 dia) (RAT, 1987, modificada) e identificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* por meio de inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010) (7 a 10 dias), pode-se obter resultados dentro do prazo de 8 - 10 dias, sendo possível avaliar um número considerável de a-

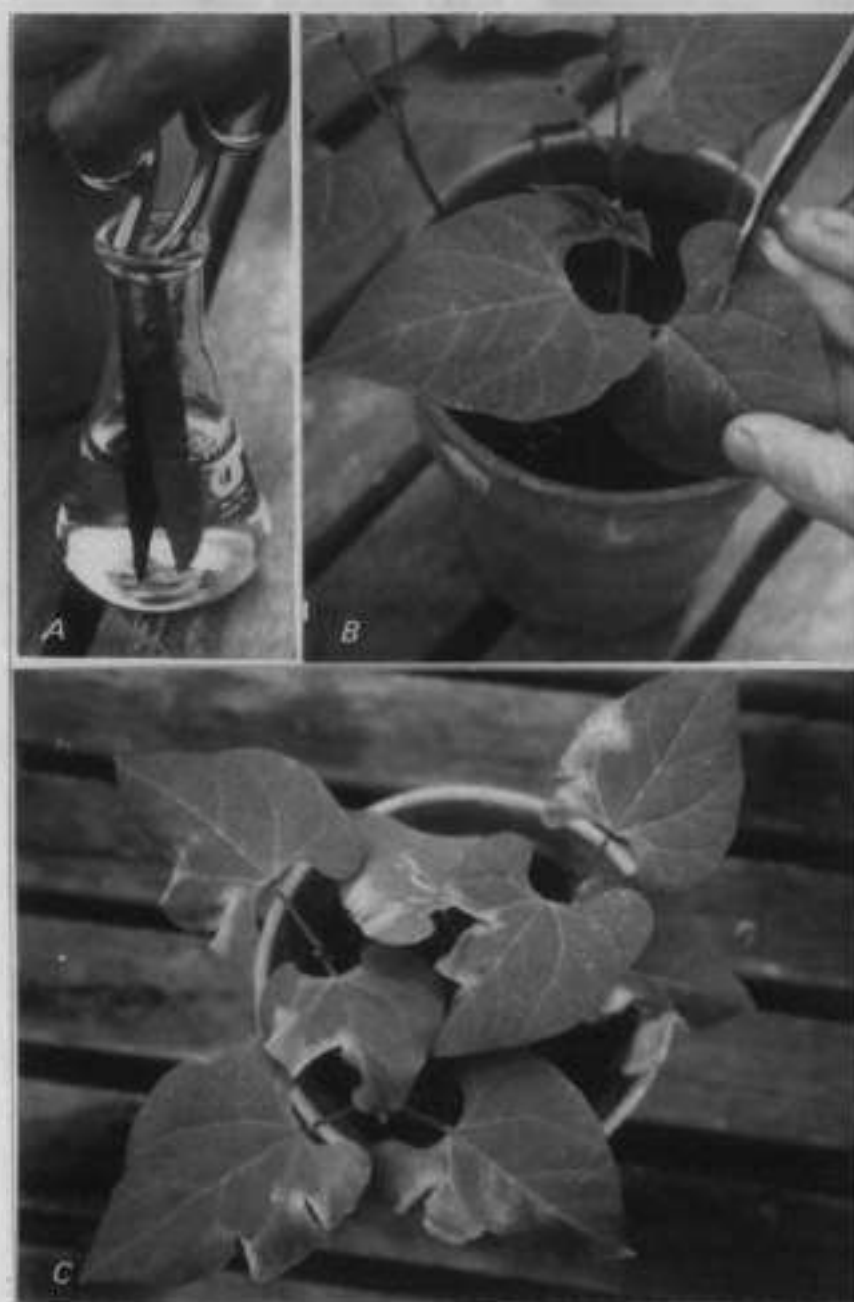
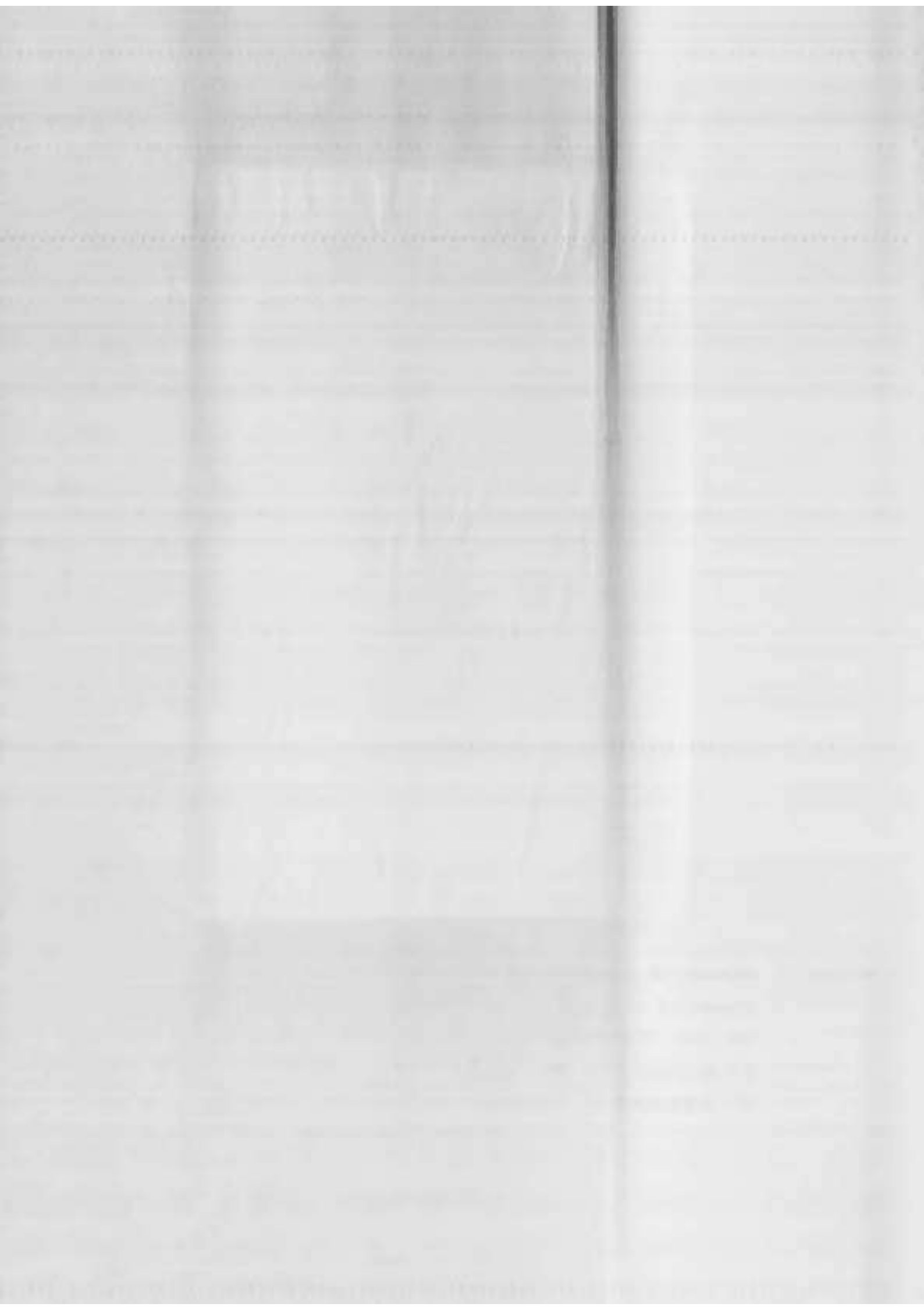


FIGURA 3. Método de inoculação, por incisão com tesoura, de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, em planta indicada (cv. CNF 0010) de feijoeiro. A) Mergulho da tesoura no inóculo; B) Inoculação em folhas primárias ; C) Sintomas do crestamento bacteriano comum.

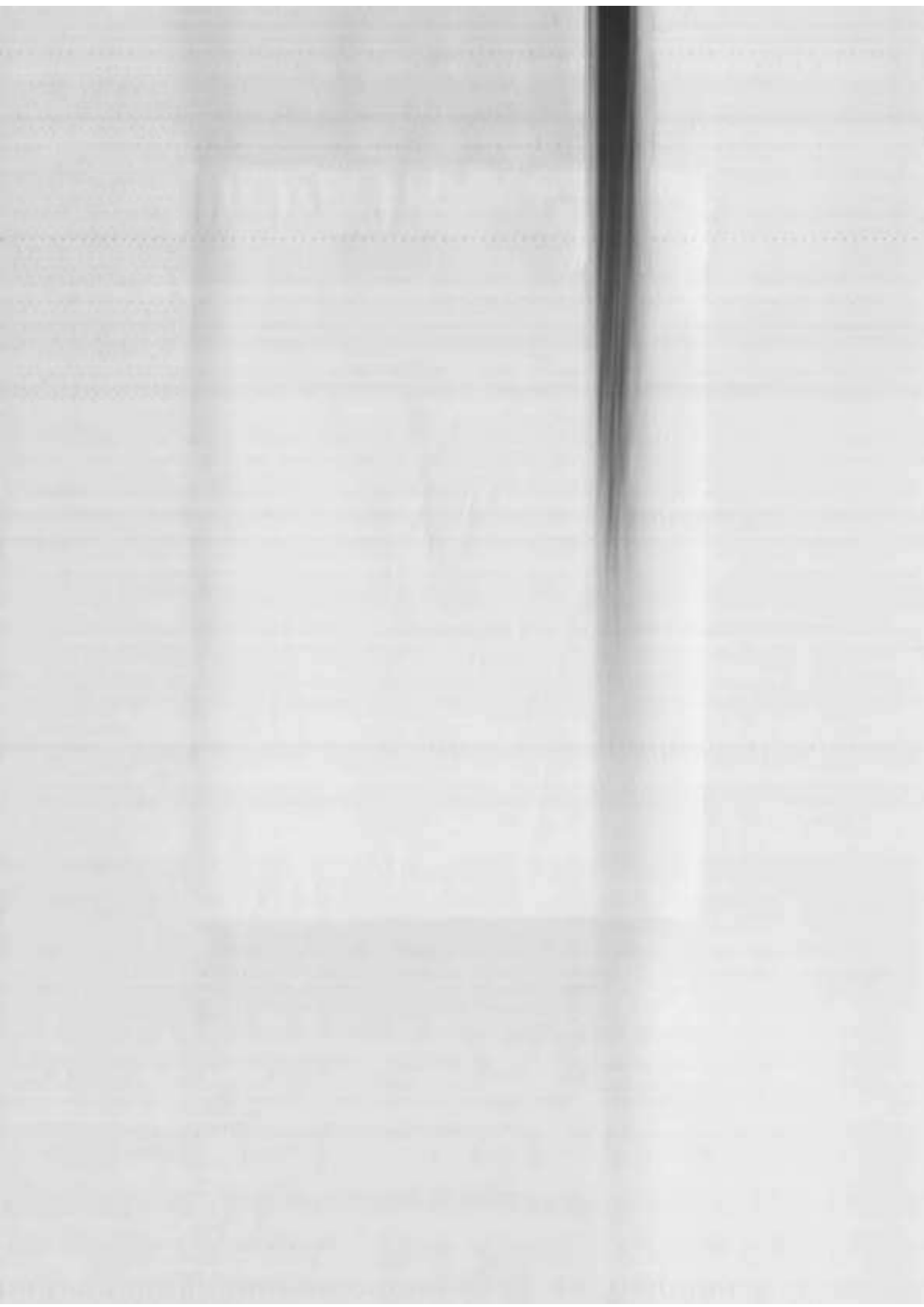


mostras de sementes (cerca de 10 amostras/dia/técnico) e devido as condições climáticas favoráveis, e disponibilidade de casa de vegetação, com temperatura em torno de 28-32°C, os testes podem ser realizados durante todo o ano.

4.5. Determinação da localização de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes e sensibilidade na detecção do patógeno em sub-amostras de sementes de feijão pelo método da planta indicadora.

4.5.1. Localização do patógeno em sementes inoculadas artificialmente e seu efeito sobre a germinação.

Os resultados da localização de *X. campestris* pv. *phaseoli*, inoculada artificialmente em sementes de feijão, obtidas através da inoculação em plantas indicadoras pelo método da incisão com tesoura e o efeito sobre a germinação estão contidos na Tabela 23. Dos diversos períodos de exposição das sementes ao inóculo do patógeno contido no meio de cultura NGA em placas, a contaminação externa das sementes foi total a partir de 0 hora e somente com 24 horas de contato, observou-se que o inóculo penetrou na semente, do que resultou 60% de sementes infectadas, sendo que 36 horas foram suficientes para se obter 100% de sementes com infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli*. A germinação foi afetada pela



mostras de sementes (ceia de 10 amostras/dia/técnico) e devido as condições climáticas favoráveis, e disponibilidade de casa de vegetação, com temperatura em torno de 28-32°C, os testes podem ser realizados durante todo o ano.

4.5. Determinação da localização de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes e sensibilidade na detecção do patógeno em sub-amostras de sementes de feijão pelo método da planta indicadora.

4.5.1. Localização do patógeno em sementes inoculadas artificialmente e seu efeito sobre a germinação.

Os resultados da localização de *X. campestris* pv. *phaseoli*, inoculada artificialmente em sementes de feijão, obtidas através da inoculação em plantas indicadoras pelo método da incisão com tesoura e o efeito sobre a germinação estão contidos na Tabela 13. Dos diversos períodos de exposição das sementes ao inóculo do patógeno contido no meio de cultura NGA em placas, a contaminação externa das sementes foi total a partir de 0 hora e somente com 24 horas de contato, observou-se que o inóculo penetrou na semente, do que resultou 60% de sementes infectadas, sendo que 36 horas foram suficientes para se obter 100% de sementes com infecção por *X. campestris* pv. *phaseoli*. A germinação foi afetada pela

Tabela 23. Avaliação da localização de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes inoculadas artificialmente através do método da planta indicadora (cv. CNF 0010) e o efeito sobre a germinação.

Períodos de contato de sementes com a bactéria em meio de cultura - NGA (horas)	% de incidência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes		% germinação ⁽³⁾ de sementes com <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>
	(1)		
	Interna	Interna+Externa ⁽²⁾	
0	0	100	87,22a
12	0	100	84,48ab
24	60	100	80,34ab
36	100	100	78,21 b
48	100	100	78,35 b
Test. (s/bactéria após 48 horas)	0	0	88,21a

(1) com desinfestação superficial (solução de hipoclorito de sódio - 1% cloro ativo); (2) sem desinfestação superficial; (3) de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS), item 3.6.1... 200 sementes analisadas/tratamento.

presença do inóculo localizado interna e/ou externamente a semente, sendo que somente a partir de 36 horas de contato da semente com a bactéria observou-se redução significativa da germinação em relação à testemunha (sem bactéria). Segundo ALVAREZ et alii (1979), em grupos de sementes de feijão com diferentes níveis de infecção (0,25, 50, 75 e 100%), observaram-se uma tendência decrescente na percentagem de germinação, a medida que aumentava o nível de infecção nas sementes. WELLER & SAETTLER (1980) estudaram o efeito da infecção de sementes por *X.campestris* pv.*phaseoli* incluindo o "strain" *fuscans*, sobre o crescimento de plantas através de quatro tipos de infecção: 1 = sementes com manchas na região do hilo; 2 = sementes com menos de 10% de área manchada; 3 = sementes com 11 - 100% de mancha e não enrugamento; 4 = sementes completamente manchadas e parcialmente enrugadas e concluíram que sementes severamente infectadas (tipos 2 a 4) germinaram a uma baixa taxa e produziram plantas deformadas. Os autores determinaram que a bactéria pode localizar-se tanto externa como internamente às sementes, constituindo-se as mesmas em importantes fontes de inóculo.

4.5.2. Detecção de uma única semente portadora de *X. campestris* pv.*phaseoli* em sub-amostras de diferentes tamanhos através da inoculação em plantas indicadoras

Os resultados de determinação da sensibilidade

de detecção de *X.campestris* pv. *phaseoli*, em sub-amostras de sementes de diferentes tamanhos, através do método da planta indicadora (cv. CNF 0010) encontram-se na Tabela 24, onde observa-se que até a diluição de 1:1000, o método apresentou 100% de eficiência na detecção da bactéria, a partir do qual a eficiência foi decrescendo, atingindo 60% na diluição de 1:4000. Esses resultados mostraram que o método da planta indicadora apresenta sensibilidade de 0,1%, isto é, permite detectar 1 semente portadora da bactéria em 1000 sadias, com 100% de segurança. Segundo GENG et alii (1983), a sensibilidade na detecção do patógeno caracteriza a confiabilidade do método, devendo ser determinada antes da sua utilização em programas de controle de qualidade. TAYLOR (1970) investigou a sensibilidade para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* usando o método do Número Mais Provável (NMP) para estimar o nível de infecção em um lote de sementes pelo teste de uma série de amostra de tamanhos decrescentes. MALIN et alii (1983) obtiveram sucesso na detecção de *X.campestris* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão onde uma tolerância zero foi considerado necessário. Através da técnica da IF indireta foi possível detectar níveis de infecção de 0,01%.

Os resultados obtidos por TAYLOR et alii (1979) e MOHAN & SCHAAD (1987), segundo os quais o nível de infecção variou amplamente entre as sementes contaminadas e/ou infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, apontam para a necessidade de se considerar o potencial de inóculo do patógeno por

Tabela 24. Detecção de sementes individuais infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XcpH) em sub-amostras de sementes sadias de feijão de diferentes tamanhos, através do método de inoculação por incisão com tesoura em planta indicadora (cv. CNF 0010).

Proporção de sementes infectadas por sub-amostra	Volume de água (ml)	% plantas com sintomas de tratamento bacteriano comum (1)										% resultados positivos
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1/100	40	60	80	100	100	90	80	65	100	95	75	100
1/250	100	90	70	50	100	70	50	65	80	60	100	100
1/500	200	80	75	50	60	100	80	75	60	35	65	100
1/1000	350	70	40	80	85	90	100	40	25	60	35	100
1/2000	700	60	70	20	40	50	45	80	0	30	70	90
1/3000	1000	20	60	25	0	50	35	45	0	70	15	80
1/4000	1500	10	10	35	0	15	0	65	50	0	0	60
Controles (2)												
100 sementes sadias	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000 sementes sadias	350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000 sementes sadias	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XcpH (folhas infectadas e desidratadas, imersas em água)	100	10	8	10	9	10	8	9	10	10	10	100

(1) 10 repetições, sendo 25 plantas/tratamento/repetição; (2) 10 plantas/repetição.

semente infectada e não o número de sementes infectadas que devem ser adicionadas às sementes sadias para o estabelecimento da sensibilidade dos métodos de detecção de patógenos em sementes. Segundo RAT (1988c), é necessário desenvolver métodos de detecção, onde a sensibilidade é a qualidade mais importante uma vez que o maior problema reside na dificuldade de detecção, de baixos níveis de infecção.

4.6. Determinação quantitativa de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão produzidas no Estado de São Paulo

As tabelas 25 a 27 apresentam os resultados de avaliação quantitativa da incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* em amostras de sementes de feijão produzidas no Estado de São Paulo, durante os cultivos da "seca" e de "inverno" no ano de 1988 e das "águas" no ano de 1988/1989 através da técnica de extração de sementes inteiras em água destilada esterilizada e incubação à temperatura de 5-10°C (RAT, 1987, modificada) e identificação do patógeno por meio de inoculação, por incisão com tesoura, de plantas indicadoras (cv. CNF 0010). Pela Tabela 25, das 14 amostras coletadas em 9 municípios do Estado, correspondendo ao cultivo da "seca" de 1988, observou-se que esse método determinou, quantitativamente, a incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de 11 amostras, cujos índices variaram de 0,1 a

1,1%. Dos 14 campos de produção de sementes do cultivo da "seca", apenas se dispõem de 8 com laudos de inspeção de campo, sendo que desses, somente em 2 campos se constatou a presença do crestamento bacteriano comum embora em níveis insignificantes. O método de detecção não acusou resultados positivos para a presença do patógeno em sementes das correspondentes amostras de números 067 (Itaí) e 069 (Coronel Macedo) presumivelmente, portadora do patógeno.

Na tabela 26, os testes conduzidos em 16 amostras de sementes de 9 municípios, referentes ao cultivo de "inverno" de 1988, indicaram a incidência do patógeno em 11 amostras, variando entre 0,1 a 0,8% de sementes portadoras. Dos 16 campos de produção de sementes, somente 1 campo não apresentou laudo de inspeção. Nos demais, apenas em 3 campos foram constatadas a bacteriose em níveis insignificantes de ataque, sendo que, o método de detecção utilizado revelou incidência de 0,4 e 0,7% de sementes com o patógeno nas amostras de Ribeirão Preto de números 040 e 045, correspondentes a 2 destes campos.

Na Tabela 27, apenas quatro amostras de dois municípios foram analisadas, correspondendo ao cultivo das "águas", de 1988/89 e os resultados apresentados indicaram incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* nas sementes de todas as amostras, com índices variando de 0,3 a 1,1%. Os laudos de inspeção de campo acusaram níveis muito

Tabela 25. Incidência (%) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) em amostras de sementes certificadas de feijão (cultivo da "seca" - 1988) coletadas no Estado de São Paulo (1).

Localidade	Amostra (CATI) nº	Nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos				Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes (2)	Laudo de inspeção (3) de campo
		1 de 500	5 de 100	5 de 10	5 de 10		
Itapeva	617	0	0	0	0	< 0,1	-
Itaí	067	0	0	0	0	< 0,1	+
Coronel Macedo	069	0	0	0	0	< 0,1	+
Taguarituba(*)	068	0	1	0	0	0,1	-
Itapetininga	665	0	1	1	1	0,2	-
Pilar do Sul(*)	174	0	2	0	0	0,2	-
Parapanama(*)	056	1	1	0	0	0,3	-
Pilar do Sul(*)	177	0	2	1	1	0,3	-
Boituva(*)	163	1	2	0	0	0,5	-
Capão Bonito	682	1	2	1	1	0,7	-
Boituva(*)	169	1	3	0	0	0,8	-
Capão Bonito	584	1	1	3	3	0,9	-
Itapetininga	680	1	2	2	2	1,0	-
Itapeva	628	1	3	1	1	1,1	-

(1) Método de detecção: técnica de extração de RAT (1987) modificada + inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010); (2) Tabela 7 de interpretação de resultados - item 3.9.; (3) Serviço de Produção de Sementes, Matrizes e Mudas - CATI/Campinas/SP.; + níveis insignificantes de ataque da bacteriose; - ausência da doença; (*) ausência de laudo. Testemunha em branco: água destilada esterilizada; Controle positivo: folhas infectadas (xcp), desidratadas e imersas em água destilada esterilizada.

Tabela 26. Incidência (%) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XcpH) em amostras de sementes certificadas de feijão (cultivo de "inverno" - 1988) coletadas no Estado de São Paulo (1).

Localidade	Amostra (CATI) nº	Nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos			Incidência (%) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes (2)	Laudo de inspeção (3) de campo
		1 de 500	1 de 100	5 de 10		
Fernandópolis	046	0	0	0	< 0,1	+
Santo Anastácio	945	0	0	0	< 0,1	-
Presidente Prudente	042	0	0	0	< 0,1	-
S.J. do Rio Preto	067	0	0	0	< 0,1	-
Ibitinga	099	0	0	0	< 0,1	-
Santo Anastácio	937	1	0	0	0,1	-
Jaboticabal	048	0	1	2	0,3	-
Ibitinga	101	1	1	0	0,3	-
Ribeirão Preto	040	0	2	2	0,4	+
Jaboticabal	047	0	2	2	0,4	-
Aguaiá (*)	062	1	2	0	0,5	-
S.J. do Rio Preto	073	1	1	1	0,5	-
Ribeirão Preto	045	1	2	1	0,7	+
Araçatuba	119	1	2	1	0,7	-
Fernandópolis	042	1	3	0	0,8	-
Araçatuba	112	1	3	0	0,8	-

(1) Método de detecção: técnica de extração de PAT (1987) modificada + inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010); (2) Tabela 7 de interpretação de resultados - item 3.9.; (3) Serviço de Produção de Sementes, Matrizes e Mudas - CATI/Campinas/SP.; + níveis insignificantes de ataque da bacteriose; - ausência da doença. (*) Ausência de laudo. Testemunha em branco: água destilada esterilizada; Controle positivo: folhas infectadas (XcpH), desidratadas e imersas em água destilada esterilizada.

Tabela 27. Incidência (%) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XcpH) em amostras de sementes certifi-
ficadas de feijão (cultivo das "águas" - 1988/89) no Estado de São Paulo (1).

Localidade	Amostra (CATI) nº	Nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos				Incidência (%) de <i>Xantho- monas campestris</i> pv. <i>phi- seoli</i> em sementes (2)	Laudo de ins- peção de campo (3)
		1 de 500	5 de 100	5 de 10	5 de 10		
Itapetininga	38	1	1	0	0,3	+	
Itapetininga	60	1	2	0	0,5	+	
Avaré	05	1	2	2	1,0	+	
Avaré	10	1	3	1	1,1	+	

(1) Método de detecção: técnica de extração de RAT (1987) modificada + inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010); (2) Tabela 7 de interpretação de resultados - item 3.9.; (3) Serviço de Produção de Sementes, Matrizes e Mudanças - CATI/Campinas/SP.; + níveis insignificantes de ataque da bacteriose Testemunha em branco: água destilada esterilizada. Controle positivo: folhas infectadas (XcpH), desi-
dratadas e imersas em água destilada esterilizada.

baixos de incidência da bacteriose, em todos os campos.

Diversos fatores, entre os quais, falhas no diagnóstico de campo, ocorrência de infecção muito baixa ou latente e a sensibilidade do teste de detecção de 0,1%, podem explicar as disparidades obtidas entre a detecção em campo e a incidência do patógeno nas sementes.

Pelos resultados obtidos, as maiores incidências foram assinaladas nas amostras originárias dos cultivos das "águas" e da "seca". De acordo com a literatura, a doença ocorre com maior frequência e maior severidade quando as condições favoráveis de alta umidade (U.R. > 90%) e temperatura relativamente elevada ($T = 24^{\circ}$ a 32°C) são predominantes, o que normalmente ocorre no cultivo das "águas" (PARADELA FILHO & CARVALHO, 1967; KIMATI, 1980; VIEIRA & SARTORATO, 1984; ATHAIDE & PACOVA, 1985; BULISANI et alii, 1987 e MENEZES, 1987).

Os testes de sementes que revelaram resultados negativos para a presença do patógeno através do método que inclui extração por meio de imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras e incubação por 18-24 horas, à temperatura de $5-10^{\circ}\text{C}$ mais a identificação através de inoculação em planta indicadora, mostraram que, pela tabela 7 de interpretação dos resultados para quantificação da incidência da bactéria em sementes, as amostras devem conter menos do que 0,1% de sementes portadoras do patógeno, ou podem estar livres do

mesmo. Isto porque o método de detecção testado apresentou sensibilidade para determinar incidência a partir de 0,1% com 100% de segurança. TAYLOR et alii (1979) verificaram que um resultado negativo de um teste de uma amostra de 3000 sementes não implicou estar a amostra livre de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, mas indicou que a amostra, provavelmente, continha menos que 0,1% de incidência e poderia produzir não mais que 0,01% de infecção primária no campo. Como a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, é essencial para o controle efetivo da doença em Michigan (COPELAND et alii, 1975), Idaho (WEBSTER et alii, 1983) e nos países da Europa e Mediterrâneo, esse aspecto é rigorosamente controlado. Assim, uma tolerância zero para *X. campestris* pv. *phaseoli* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* em laboratório, e 0,005% de plantas doentes durante as inspeções de campo para o crestamento comum, são requeridas. Conforme SMITH (1984), 11 bactérias de sementes são controladas por diversos países da Europa e Mediterrâneo, entre as quais está *X. campestris* pv. *phaseoli* em feijoeiro. Segundo LASCA (1985), para o estabelecimento de padrões de sanidade em campo, o tipo de patógeno deve ser considerado; tratando-se de patógeno de disseminação rápida, que provoca enfermidade de "carater explosivo", como ocorre com a bacteriose do feijoeiro ocasionada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, os padrões devem ser altos com tolerância de infecção de plantas baixando a zero.

No Brasil, nenhum método para detecção de patógenos bacterianos em sementes é utilizado, e o controle das bactérias transmitidas por sementes, se baseia apenas nas inspeções de campo. Nesse sentido, existem tentativas de controle baseadas em padrões de campo, levando-se em consideração as observações de sintomas para diversas doenças, entre as quais está o crestamento comum. O nível de tolerância da bacteriose em campo, permitido para produção de sementes certificadas de feijão, nos Estados do Paraná e São Paulo, é de 20% de plantas infectadas (MEHTA, 1986; COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL, 1988). Isto significa que nenhum campo seria rejeitado pela fiscalização do Serviço de Produção de Sementes da CATI - Campinas (SP), uma vez que pelos laudos de inspeção de campo, na maioria dos campos de produção de sementes, não ocorreu a bacteriose (cultivos da "seca" e de "inverno") ou houve falha no diagnóstico de campo ou ainda, não houve manifestação de sintomas pois, as sementes acusaram a presença do patógeno. Quando acusou a presença da bacteriose, a incidência foi muito baixa ou insignificante como no caso do cultivo das "águas".

Como nem sempre as doenças mostram sintomas, as inspeções de campo não são suficientes para assegurar que um determinado lote de sementes, dele oriundo, esteja livre do patógeno. Sendo as sementes potencialmente portadoras de agentes patogênicos como as bactérias que, na maioria das ve-

zes, nelas se instalam sem provocar sintomas, ou se provocam podem ser confundidos com os outros agentes, para conhecer a sua condição, é necessário submetê-las a teste de sanidade em laboratório (LANDAETA, 1968). Análises de amostras de sementes de campo de produção, realizadas neste trabalho, acusaram níveis de incidência de 0,1 a 1,1%, que poderiam originar epidemias quando essas sementes fossem semeadas em campo sob condições climáticas favoráveis. No entanto, os laudos de inspeção de campo para essas mesmas sementes mostraram baixa incidência ou ausência de bacteriose. Nesse particular, WALLEN & SUTTON (1965) verificaram, no Canadá, que 0,5% de sementes infectadas com *X.campestris* pv. *phaseoli* foi o bastante para iniciar uma epidemia na lavoura sob condições climáticas favoráveis, tal como afirmado por KIMATI (1980).

4.7. Correlação entre a incidência do crestamento bacteriano comum em campos de produção e porcentagem de sementes de feijão portadoras de *X.campestris* pv. *phaseoli* e o efeito sobre a germinação e peso de 100 sementes

A incidência de *X.campestris* pv. *phaseoli* em campos experimentais e em amostras de lotes de sementes de feijão da cultivar Rio Tibagi, bem como o efeito sobre a germinação e o peso de 100 sementes, encontram-se na Tabela 28. Os lotes de sementes L₁, L₂ e L₄, que provêm do mesmo campo, a-

Tabela 28. Incidência (%) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em campo e em amostras de lotes de sementes de feijão (cv. Rio Tibagi) coletadas nos campos experimentais do IAPAR (Londrina/PR) e seu efeito sobre a germinação e peso de 100 sementes (1).

Lotes de sementes (amostras)	Incidência de cresta-mento em campo (%) (2)	Condições das sementes		Nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos		Incidência (%) de XcpH em sementes (3)	% germinação (4)	Peso de 100 sementes em g (4)				
		Colheita mecânica	Secagem ao sol (períodos/hor - ras)	Amarelagem câmara fria (anos) (UR= 50%, T=10°C)	1 de 500 sementes				5 de 100 sementes			
L ₁	60	REC-BAT	2/5	-	1	5	3	9,2	82,02	d	16,89	e
L ₂	60	REC-BAT	1/5	-	1	5	3	9,2	90,12	bc	16,70	e
L ₃	35	REC-BAT	1/5	-	1	5	2	5,4	96,12a		18,10ab	
L ₄	60	Autontriz	1/5	-	1	5	3	9,2	93,03ab		17,19	bc
L ₅	100	REC-BAT	1/6	4	1	0	0	0,1	87,15	cd	18,79a	
L ₆	100	REC-BAT	1/7	3	1	2	1	0,7	89,64	bc	18,90a	

REC-BAT - recolhedeira, bateadeira e trilhadeira; (1) Método de detecção: técnica de extração (BAT, 1987), modificada + inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010); (2) Planta infectada - pelo menos uma lesão típica de crestante; L₁, L₂ e L₄ = provém do neg no campo; (3) Tabela 7 de interpretação de resultados - item 3.9.; (4) 200 sementes - em 4 repetições de 50 sementes cada. Médias com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

presentando na fase de pré-colheita uma incidência geral média de 60% de plantas atacadas, mostraram através dos testes de sanidade em laboratório, 9,2% de incidência por *X. campestris* pv. *phaseoli*. Entre esses lotes, as diferenças se concentraram nas condições de colheita e secagem das sementes, sendo que para L₁, a colheita foi feita com máquina recolhedeira, bateadeira e trilhadeira (REC-BAT), seguido por dois períodos de secagem ao sol de 5 horas cada; o lote L₂ foi semelhante ao L₁ mas com um período de secagem ao sol de 5 horas e o L₄, colhido com automotriz, foi submetido ao mesmo período de secagem do L₂. Já a amostra do L₃, que apresentou 5,4% de sementes portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provém de outro campo, com incidência média de 35% de plantas atacadas na fase de pré-colheita sendo que as sementes foram colhidas com REC-BAT e submetidas a um período de secagem ao sol de 5 horas. Pelos resultados obtidos, verificou-se que uma menor incidência da bacteriose em campo, resultou em menor % de sementes portadoras do patógeno. Por outro lado, as amostras de sementes dos lotes L₅ e L₆, que apresentaram índices de presença do patógeno nas sementes bem mais baixos de 0,1 e 0,7%, provém de campos com 100% de incidência na fase de pré-colheita, ambas amostras foram colhidas com REC-BAT e submetidas a secagem por 6 e 7 horas ao sol, respectivamente. O lote L₆ foi armazenado em câmara seca e fria (50% UR e 10°C), por três anos, enquanto que o lote L₅ foi armazenado nas mesmas condições, por quatro anos, o que pode ter reduzido

os Índices de sementes com patógeno, justificando a relativa baixa incidência de 0,7 e 0,1%, respectivamente.

Ainda na Tabela 28, a análise estatística dos dados de germinação para as amostras dos seis lotes de sementes revelou que o índice de germinação da amostra do lote L_3 foi estatisticamente superior às amostras dos lotes L_1 e L_2 porém, não diferindo da amostra do lote L_4 , cujas sementes foram submetidas a tratamento semelhante apenas de secagem. O mesmo não ocorreu com as amostras dos lotes L_5 e L_6 que, apesar de apresentarem baixos níveis de incidências na semente, a germinação foi significativamente reduzida em relação a amostra do lote L_3 , provavelmente, devido ao armazenamento. Com relação ao peso de 100 sementes, a análise estatística dos dados mostrou redução significativa no peso de 100 sementes das amostras dos lotes L_1 , L_2 e L_4 que apresentaram as maiores incidências tanto em campo como na semente, em relação à amostra do lote L_3 . Os lotes L_5 e L_6 , com incidências do patógeno na semente muito baixas, foram produzidos em condições diferentes (outros anos agrícolas). Esses resultados indicaram que o patógeno pode afetar a semente, reduzindo significativamente a germinação e o peso e, por consequência, a qualidade fisiológica e comercial do produto. Nesse sentido, VIEIRA & SARTORATO (1984) verificaram que quando as sementes portadoras de *X. campestris* pv *phaseoli* são postas a germinar, o meristema apical das plântulas pode ser destruído, acarretando-lhes a

morte, ou podem dar origem a plantas doentes, que produzem poucas vagens. Também, WELLER & SAETTLER (1980) relataram que sementes severamente infectadas por *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentaram taxas reduzidas de germinação e produziram plântulas deformadas. SCHUSTER et alii (1987) observaram que a germinação de sementes de feijão manchadas pelo patógeno foi reduzida sob condições de campo.

Considerando apenas as amostras L_1 , L_2 , L_3 e L_4 , apesar da correlação estabelecida entre incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* no campo e em sementes, obtida por análise de regressão linear ($Y = 0,08 + 0,152 x$) ser extremamente elevada ($r = 1$), porque três, entre os quatro dados analisados mostraram valores idênticos, a análise de variância da regressão linear não mostrou significância ao nível de 5% de probabilidade segundo o teste F (GOMES, 1978). Por isso, apesar da alta correlação existente, a equação de regressão linear não explica a dependência entre as variáveis observadas, em parte, devido ao número reduzido de dados analisados. Resultados semelhantes foram verificados na análise de correlação entre incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* na semente x germinação ($Y = 26,35 - 0,20 x$) e incidência do patógeno na semente x peso de 100 sementes ($Y = 58,13 - 2,89 x$), cujos coeficientes de correlação $r = -0,63$ e $r = -0,94$, respectivamente. Portanto, a alta correlação obtida entre os parâmetros analisados precisa ser tomada com precauções, uma vez que ela mostra certa tendência de evolu-

ção dos dados, sem demonstrar a dependência entre as variáveis. Consequentemente, seu uso não deve ser extrapolado, sugerindo que se deve tomar um maior número de dados ou repetições para aumentar a confiabilidade.

Resultados de correlação de ensaios de laboratório com o desenvolvimento de doenças em campo foram considerados muito importantes (TAYLOR, 1970; SCHAAD et alii 1980; SCHAAD, 1983) pois, quando a taxa de transmissão do patógeno for alta e 1 única semente portadora do mesmo em 10.000 resultar em doença no campo, tais como ocorreu com o crestamento de halo do feijoeiro, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (TAYLOR, 1970) ou com a podridão negra das crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (SCHAAD et alii, 1980), o método escolhido deveria ser altamente sensível e específico. O mesmo pode ocorrer com o crestamento bacteriano comum, causado por *X. c.* pv. *phaseoli* em feijoeiro.

Finalmente, cumpre mencionar que métodos avançados para detecção de patógenos bacterianos de sementes são citados na literatura, os quais baseiam-se nas áreas de biotecnologia e patologia molecular, utilizando-se a tecnologia do DNA complementar por hibridização e métodos serológicos com anticorpos monoclonais. Futuramente, esses procedimentos podem apresentar significativo impacto na área de Fitopatologia para diagnose de doenças de plantas e, especialmente, na área de Patologia de Sementes. Tais procedimentos certamente visarão aperfeiçoar os tradicionais métodos serológicos existentes

tes (Imunofluorescência, ELISA, "Immunoblotes", etc.) para identificação segura das bactérias com o uso de antissoros mais específicos, de maior sensibilidade e rapidez, além de possibilitar a eliminação da ocorrência de reações cruzadas com outras bactérias (IRWIN, 1987; SCHAAD, 1987, RAT, 1988b). Entretanto, segundo SCHAAD (1987), nenhum desses novos procedimentos moleculares são suficientes quando usados para detecção direta de bactérias patogênicas de plantas em extratos de sementes. Apesar do exame do DNA, ser considerado uma técnica eficiente, rápida e de baixo custo para confirmar a identificação do patógeno, sua principal limitação é ainda o uso de material radioativo. Sendo assim, é interessante que os laboratórios de rotina continuem utilizando testes de patogenicidade para a identificação do patógeno. Segundo TAYLOR et alii (1989), na prática, a prioridade de se obter segurança na detecção em relação à rapidez, mostra que a identificação de um patógeno bacteriano por serologia deve ser confirmada através do teste de patogenicidade.

5. CONCLUSÕES

Os resultados nas condições em que foi realizada a presente pesquisa, permitiram concluir que:

1. A extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão, através da imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada e incubação em geladeira à temperatura de 5-10°C, por 18-24 horas, foi a mais eficiente e adequada.
2. A inoculação do extrato obtido de sementes portadoras de *X. campestris* pv. *phaseoli* em folhas primárias de plantas de feijoeiro (cultivar CNF 0010), por incisão com tesoura, foi um método eficiente para a identificação do patógeno e, mais seguro e prático do que os métodos serológicos e de isolamento direto em meios de cultura.
3. Para a detecção, em rotina, de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, recomenda-se a extração através da imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada e incubação em geladeira (5-10°C), por 18-24 horas e a identificação através da inoculação em plantas indicadoras (cv. CNF 0010), por incisão com tesoura; es-

te procedimento apresentou-se quantitativo, específico, com sensibilidade de 0,1%, de fácil execução, baixo custo, além de exigir tempo relativamente curto para sua realização (8-10 dias), permitindo analisar cerca de 10 amostras/técnico/dia, o que sugere a sua aplicação em laboratórios de análise de rotina e, possivelmente, em programas de certificação de sementes.

4. O teste serológico através da dupla difusão em gel-de-agar de Ouchterlony foi altamente específico, mas não suficientemente sensível para detectar baixas incidências do patógeno em amostras de sementes de feijão.
5. *X. campestris* pv. *phaseoli* pode localizar-se tanto interna como externamente à semente e a germinação assim como o peso de 100 sementes podem ser afetados pela incidência do patógeno na semente.
6. A maioria das sementes certificadas de feijão produzidas no Estado de São Paulo, durante os cultivos de 1988 (da "seca" e de "inverno") e 1988/89 (das "águas"), apresentou-se portadora de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em índices variando de 0,1 a 1,1%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, C.E.; VANEGAS, G.G.; VICTORIA, K., J.I. Transmission por semilla de bacterias fitopatogenicas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Colombia. *Acta Agronomica*, Palmira, 29(1/4):11-20, 1979.
- ANDERSON, A.L.; COPELAND, L.O.; SAETTLER, A.W. Grow blight free field beans. Michigan State University, Farmer Science, Series, 1970 (Ext. Bull, 620).
- ANDRUS, C.F. A method for testing beans for resistance to bacterial blights. *Phytopathology*, St. Paul, 38:757-9, 1948.
- ATHAYDE, A.O. & PACOVA, B.E.V. Doenças e técnicas de produção de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado do Espírito Santo. Vitória, Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária. 1985. 49p. (Circular Técnica, 10).
- BASU, P.K. & WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in vivo and in vitro. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 44:1239-45, 1966.

- BEACH, S.A. Some bean diseases. *Bulletin of the New York State Agricultural Experiment Station, Geneva (48):305-33, 1892.*
- BERGEY, D.H.; HARRISON, F.C.; BREED, R.S.; HAMMER, B.W.; HUNTOON, F.M. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 2.ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1925. 462p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. *Regras para análise de sementes.* Brasília, 1976. 188p.
- BULISANI, E.A.; ALMEIDA, L.D.; ROSTON, A.J. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. In: BULISANI, E.A. coord. *Feijão; fatores de produção e qualidade.* Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 2, p. 29-88.
- BURKHOLDER, W.H. The bacterial blight of the bean; a systemic disease. *Phytopathology, St. Paul, 11(2):60-9, 1921.*
- BURKHOLDER, W.H. *The bacterial disease of the bean: an comparative study.* Ithaca, Cornell Agric. Exper. Stat., 1930. 88p. (Mem., 127). *Apud Review of Applied Mycology, Wallingford, 9:695-6, 1930 (Resumo).*
- CAFATI, C.R. & SAETTLER, A.W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible phaseolus genotypes. *Phytopathology, St. Paul, 70:638-40, 1980.*

- CAFATI KOMPTZKI, C. Reação de variedades de feijoeiro a *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Sm.) Dows. e *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk. Piracicaba, 1971. 59p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MxP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*, St. Paul, 77(5):730-4, 1987.
- COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics*, New York, 6:105-16, 1950.
- COETZEE, J.N.; DEKLERK, H.C.; SACKS, T.G. Host-range of Lactobacillus bacteriophages. *Nature*, London, 187:348-9, 1960.
- COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. *Guia de inspeção de campo e padrões de certificação de sementes*, Campinas, 1988. n.p.
- COPELAND, L.O.; ADAMS, M.W.; BELL, D.C. An improved seed programme for maintaining disease - free seed of field beans (*Phaseolus vulgaris*). *Seed Science and Technology*, Zurich, 3:719-24, 1975.
- COSTA, A.S. Investigações sobre moléstias de feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1., Campinas, 1971. *Anais*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1972. v.2, p.305-84.

- CRISPIN, A. & CAMPOS, J. Bean diseases of importance in Mexico in 1975. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 60:534-5, 1976.
- CROSSE, J.E. Prospects for the use of bactericides for the control of bacterial diseases. In: BRITISH INSECTICIDE AND FUNGICIDE CONFERENCE, 6. 1971. *Proceedings*. 1971. p. 694-705.
- CUNFER, B.M. Localization and survival of seedborne plant pathogens. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. *Proceedings*, edited by L.C. NASSER et alii. Brasília, ABRATES, 1988, p.51-62.
- DESCHODT, C.C. & STRIJDOM, B.W. Growing disease-free bean plants from seeds a sample contaminated with bacterial pathogens. *Phytophylactica, Pretoria*, 11:187-9, 1979.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, CRC Press, 1985. 355p.
- DYE, D.W. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W., ed. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, American Phytopathological Society, 1980. p.45-9.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOTT, R.A.; SCHROTH, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, Wallingford, 59(4):153-68, 1980.

- EDNIE, A.B. & NEEDHAM, S.M. Laboratory test for internally-borne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field bean (*Phaseolis vulgaris* L.) seed. *Proceedings Association of Official Seed Analysis*, Oklahoma City, 63:76-82, 1973.
- EKPO, E.J.A. & SAETTLER, A.W. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 60:80-3, 1976.
- ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the genus *Xanthomonas* I. Cross-agglutination relationships. *Journal of Bacteriology*, Washington, 53:509-18, 1947.
- GENG, S.; CAMPBELL, R.N.; CARTER, M.; HILLS, F.J. Quality control programs for seedborne. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 67(2):236-42, 1983.
- GILBERTSON, R.L.; RAND, R.E.; CARLSON, E.; HAGEDORN, D.J. The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of beans. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 72:385-9, 1988.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 8.ed., Piracicaba, Nobel, 1978. 430p.
- GOSS, R.W. The relation of temperature to common and halo blight of beans. *Phytopathology*, St. Paul, 30:258-64, 1940.

- GROGAN, R.G. & KIMBLE, K.A. The role of seed contamination in the transmission of *Pseudomonas phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, St. Paul, 57:28-31, 1967.
- GUTHRIE, J.W.; HUBER, D.M.; FENWICK, H.S. Serological detection of halo blight. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 49:297-9, 1965.
- HARRISON, D.E.; FREEMAN, H.; SMITH, P.R. Common and fuscans blight of french bean. *Journal of Agriculture*, Melbourne, 62(11):508-14, 1964.
- IRWIN, J.A. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. *Seed Science and Technology*, Zurich, 15:755-63, 1987.
- KATZNELSON, H. The detection of internally-borne bacterial pathogens of beans by a rapid phage-plaque court technique. *Science*, New York, 112:645-7, 1950.
- KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D.; BAYLEY, S.T. The use of bacteriology of *Xanthomonas phaseoli* in detecting infection in beans with observations on its growth and morphology. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 2:22-9, 1954.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Collectotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu arx., 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre-docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F., ed. *Manual de fitopatologia*. 2.ed. São Paulo, Ceres, 1980. v.2, cap. 19, p.297-318.
- KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; ; SOLYMOŠY, F.; VÖROS, J. *Methods in plant pathology*. Amsterdam, Elsevier Scientific, Publishing, 1974. 509p.
- KLEMENT, Z. Detection of seedborne bacteria by hypersensitive reaction. *Seed Science and Technology*, Zurich, 11:589-93, 1983.
- KULIK, M.M. New techniques for the detection of seed-borne pathogenic viruses, viroids, bacteria and fungi. *Seed Science and Technology*, Zurich, 12:831-40, 1984.
- KULIK, M.M. & STANWOOD, D.C. Horticultural seed pathology: an introduction. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, 9(1):1-19, 1984.
- LAHMAN, L.K. & SCHAAD, N.W. Evaluation of the "dome test" as a reliable assay for seedborne bacterial blight pathogens of beans. *Plant Disease*, St. Paul, 69:680-3, 1985.
- LANDAETA, R. Analisis y certificacion fitopatologica de semillas. *Revista de la Facultad de Agronomia - Universidad Central de Venezuela*, Maracay, 4(3):29-66, 1968.

- LASCA, C.C. Controle de qualidade - sanidade de sementes. In: SEMINÁRIO PAULISTA DE SEMENTES E MUDAS, 1., São Paulo, 1984. *Anais*. São Paulo, Comissão Estadual de Sementes e Mudanças do Estado de São Paulo, 1985. p.363-76.
- LEBEN, C. *Survival of plant pathogenic bacteria*. Wooster, Agricultural Research and Development Center, 1974. 21p. (Special circular, 100).
- LEITE, A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1:143-6, 1975.
- LINK, K.K. & SHARP, C.G. Serological differentiation of *Bacterium campestris* from *B. phaseoli*, *B. phaseoli sojense*, and *B. flaccumfaciens*. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 8., Philadelphia, 1926. Abstracts. *Phytopathology*, St. Paul, 17:53-4, 1927.
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.V.S., ed. *Patologia de sementes*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 10, p.276-98.
- MALIN, E.M.; ROTH, D.A.; BELDEN, E.E. Indirect immuno-fluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Disease*, St. Paul, 67(6):645-7, 1983.

- MARINGONI, A.C. & KUROSZAWA, C. Efeito de captan chlorotalonil, cicloheximida e thiram no isolamento de *Xanthomonas campestris* cv. *vesicatoria* (Dowson) Dye. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 7., Botucatu, 1984. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 10(1/2):64-6, 1984.
- MASUDA, Y. & TOKESHI, H. A useful method for diagnosis and isolation of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of leaf scald in sugarcane. *Sugarcane Pathologist's Newsletter*, Réduit, 20:22-3, 1978.
- MEHTA, Y.R. Estabelecimento de padrões de tolerância para sanidade, no campo e na semente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., Campinas, 1986. *Resumos*. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.41-7.
- MENEZES, J.R. Testes de sanidade de semente de feijão. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.V.S., ed. *Patologia de sementes*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 18, p.395-405.
- MENTEN, J.O.M. & BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.V.S., ed. *Patologia de sementes*. Campinas, Fundação Cargill, 1987, cap. 7, p.164-91.
- MOFFETT, M.L. & CROFT, B.J. *Xanthomonas*. In: FAHY, P.C. & PERSLEY, G.J., ed. *Plant bacterial diseases; a diagnostic guide*. London, Academic Press, 1983. p.189-228.

- MOHAN, S.K. & SCHAAD, N.W. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* and P.s. pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, St. Paul, 77:1390-5, 1987.
- MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, J.R. *Doenças do feijoeiro no Paraná; guia para identificação e controle*. Londrina, IAPAR, 1983. 51p.
- NAKAMURA, K. & KIMATI, H. Crestamento fosco do feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 1:40-8, 1967.
- NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London, MacMillan, 1979. v.1. 839p.
- 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, 1982. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PARADELA FILHO, O. & CARVALHO, A.M.B. Ocorrência de *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* Starr. & Burk. em feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 1:36, 1967.
- PARASHAR, R.D. & LEBEN, C. Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lots. *Phytopathology*, St. Paul, 62:1075-5, 1972.

- PASTOR-CORRALES, M.A.; BEEBE, S.E.; CORREA, F.J. Comparing 2 inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOLOGY BACTERIA, 5., Cali, 1981. *Proceedings*, p.493-503.
- POMPEU, A.S. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BULISANI, E.A., coord. *Feijão; fatores de produção e qualidade*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 1, p.1-28.
- POMPEU, A.S. & CROWDER, L.V. Methods of inoculation and bacterial concentrations of *Xanthomonas phaseoli* Dows. for the inheritance of disease reactions in *Phaseolus vulgaris* L. crosses (dry beans), under growth chamber conditions. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 25(11):1078-81, 1973.
- PROGNÓSTICO AGRÍCOLA 88/89, São Paulo, 1:5.40-5, 1988.
- RALPH, W. Problems in testing and control of seed-borne bacterial pathogens: a critical evaluation. *Seed Science and Technology*, Zurich, 5:735-52, 1977.
- RAT, B. Achievement and research approaches developed by the french laboratory on seed transmitted bacteria. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987, *Proceedings*, edited by L.C. NASSER et alii. Brasília, ABRATES, 1988a. p.295-9.

- RAT, B. Control of seed borne bacteria. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. *Proceedings*, Edited by L.C. NASSER et alii. Brasília, ABRATES, 1988b. p.258-63.
- RAT, B. How to avoid the dissemination of diseases in germ-plasm exchange: case of the bacteria. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. *Proceedings*, edited by L.C. NASSER et alii. Brasília, ABRATES, 1988c. p.72-4.
- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 19(4):445-8, 1984.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; ROMEIRO, R.S. Avaliação de cultivares de feijão quanto à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo e casa de vegetação. *Summa Phytopathologica*, Jaguariuna, 16, 1990. (No prelo).
- ROBBS, C.F. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. *Agronomia*, Rio de Janeiro, 12 (3/4):231-3, 1953.
- RODRIGUES NETO, J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SE-MENTES, 3., Lavras, 1988. *Anais*. Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.123-39.

- ROMEIRO, R.S. & FUKUDA, C. Método simples para determinação de título de aglutinação e/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 8(1): 93-5, 1983.
- SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid in identifying bean blight bacteria. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 55(8):703-6, 1971.
- SAETTLER, A.W. & PERRY, S.K. Seed-transmitted bacterial diseases in Michigan navy (Pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 56(5):378-81, 1972.
- SAETTLER, A.W. & POTTER, H.S. Chemical control of bacterial blights of dry field beans in Michigan by foliage sprays applied by ground and air equipment. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 51(8):622-5, 1967.
- SAETTLER, A.W.; STADT, J.J.; PONTIUS, L.T. Effects of inoculation time and cultivar on internal infection of bean seed by *Pseudomonas phaseolicola*. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, 6(3):23-30, 1981.
- SANDS, D.C.; SCHROTH, M.N.; HILDEBRAND, D.C. *Pseudomonas*. In: SCHAAD, N.W., ed. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, American Phytopathological Society, 1980. p.36-44.

- SARTORATO, A. & RAVA, C.A. *Detecção de novas fontes de tolerância ao crestamento bacteriano comum ao feijoeiro*. Goiânia, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz-Feijão, 1979, p.1-3.
- SCHAAD, N.W. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, 68:249-52, 1978.
- SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial pathogens. *Plant Disease*, St. Paul, 66:885-90, 1982.
- SCHAAD, N.W. Correlation of laboratory assays for seedborne bacteria with disease development. *Seed Science and Technology*, Zurich, 11:877:83, 1983.
- SCHAAD, N.W. Use and limitations of methods to detect seedborne bacteria. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. Brasília, ABRATES, 1987. p.324-32.
- SCHAAD, N.W. Bacteria. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 76., Ontario, 1984. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 78(6):872-5, 1988a.
- SCHAAD, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2.ed. St. Paul, American Phytopathological Society, 1988b. 158p.

- SCHAAD, N.W.; SITTERLY, W.R.; HUMAYDAN, H. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to black rot crucifers. *Plant Disease*, St. Paul, 64:91-2, 1980.
- SCHAAD, N.W.; AZAD, H.; PEET, R.C.; PANOPOULOS, N.J. Cloned phaseolotoxin gene as a hybridization probe for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. In: MEETING OF THE PACIFIC DIVISION OF THE AMERICAN PHITOPATHOLOGICAL SOCIETY. St. Paul, 1986. Abstracts. *Phytopathology*, St. Paul, 57: 846, 1986.
- SCHUSTER, M.L. Survival of bean bacterial pathogens in the field and greenhouse under different environmental conditions. *Phytopathology*, St. Paul, 57:830, 1967.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. New virulent strains of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 55:505-56, 1971.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 12:199-221, 1974.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 2(2):117-30, 1977.

- SCHUSTER, M.L. & SAYRE, R.M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae. *Phytopathology*, St. Paul, 57:1064-6, 1967.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.F.; HOFF, B. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 57:74-5, 1973.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P.; NULAND, D.S.; SMITH, C.C. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* and other bacterial species or varieties in seeds of tolerant bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 63:955-9, 1979.
- SCHUSTER, M.L.; ZIEGELBEIN, M.L.; SMITH, C.C.; SHOTKOSKI, E. New types of symptoms of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) light-colored seed incited by bacterial pathogens. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 12(4):307-10, 1987.
- SCHWARTZ, H.F. & LEGARD, D.E. An approach for laboratory testing of certified dry beans. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 74., Salt Lake City, 1982. Abstracts. *Phytopathology*, St. Paul, 72:943-4, 1982.

- SHARON, E.; OKON, Y.; BASHAN, Y.; HENIS, Y. Detached leaf enrichment: a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptomless leaves of tomato and pepper. *Journal Applied Bacteriology*, Osney Mead., 53: 371-7, 1982.
- SHEKHAWAT, P.S. & CHAKRAVARTI, B.P. Comparison of agarplate and cotyledone methods for detection of *Xanthomonas vesicatoria* in chilli seeds. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 94(1):80-3, 1979.
- SMITH, E.F. *The cultural characters of Pseudomonas hyacinthi, P. campestris, P. phaseoli and P. stewartii - four one - flagellate yellow bacteria parasitic on plants.* Washington, USDA, 1901. 153p. (Bulletin, 28.).
- SMITH, I.M. Activities of the European and Mediterranean Plant Protection Organization in relation to seed-borne pathogens. *Seed Science and Technology*, Zurich, 12:57-8, 1984.
- SOAVE, J. & MORAES, S.A. Medidas de controle de doenças transmitidas por sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.V.S., ed. *Patologia de sementes.* Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 8, p. 192-259.

- SOUZA, N.L. Reações de linhagens e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a *Pseudomonas albo-precipitans* Rosen. Piracicaba, 1980. 65p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SUTTON, M.D. & WALLEN, V.R. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in South-western. Ontario, 1961-1968. *Canadian Journal of Botany, Ottawa*, 48:1329-34, 1970.
- SWAROOP, S. The range of variation of the most probable number of organisms estimated by the dilution method. *Indian Journal Medical Research*, New Delhi, 39(1):107-34, 1951.
- TAYLOR, J.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burker) Dowson. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 66:29-36, 1970.
- TAYLOR, J.D.; DUDLEY, C.L.; PRESLY, L. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 93:267-77, 1979.
- TAYLOR, J.D.; ROBERTS, S.J.; LIONS, N.F.; WELLESBOURNE, I.H.R.; LYNE, A.; HIGGINS, P. Screening procedures for detecting seed-borne *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. In: MEETING OF THE TECHNIQUES FOR RAPID DETECTION AND DIAGNOSIS OF PLANT DISEASE, Norwich, 1989. *Programme and abstracts*. Norwich, British Society for Plant Pathology, 1989. p.8.

- TEMPE, J. Routine methods for determining the health condition of seeds in the seed testing station. *Proceedings International Seed Testing Association*, Copenhagen, 35:3-42, 1970.
- TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, 4(2):35-41, 1979.
- TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. A liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. East Lansing, Michigan State University/Agricultural Experimental Station, 1980. 7p. (Research report, 411).
- TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. Production and characterization of antisera to *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. East Lansing, Michigan State University/Agricultural Experiment Station, 1981, 8p. (Research report, 414).
- VAN-VUURDE, J.W.L.; BOVENKAMP, V.D.; BIRNBAUM, Y. Immuno-fluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris phaseoli* in bean seed. *Seed Science and Technology*, Zurich, 11:547-59, 1983.

- VAN-VUURDE, J.W.L. Detection of seedborne bacteria by immunofluorescence. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 6., Maryland, 1985. *Proceedings*. Maryland, Martinus Nijhoff, 1987. p.799-808.
- VELASQUEZ, N.C. & TRUJILLO, G. Comparación de metodologías para la detección de la infección de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Semith.) Dye. *Agronomía Tropical*, Maracay, 34(1/3):29-41, 1984.
- VENETTE, J.R.; LAMPPA, R.S.; ALBAUCH, D.A.; NAYES, J.B. Presumptive procedure (Dome Test) for detection of seedborne bacterial pathogens in dry beans. *Plant Disease*, St. Paul, 71(11):984-90, 1987.
- VIEIRA, R.F. & SARTORATO, A. *Recomendações técnicas para produção de sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.) de alta qualidade*. Goiânia, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, 1984. 46p. (Circular técnica, 10.).
- WALKER, J.C. & PATEL, P.N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo-blight of bean. *Phytopathology*, St. Paul, 54:140-1, 1964.
- WALLEN, V.R. & SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 43:437-46, 1965.

- WALLEN, V.R. & JACKSON, H.R. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. *Phytopathology*, St. Paul, 65:942-8, 1975.
- WATSON, D.R.W. Bean common blight and fuscans blight in New Zealand. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 54(12):1068-72, 1970.
- WEBSTER, D.M.; ATKIN, J.D.; CROSS, J.E. Bacterial blights of snap beans their control. *Plant Disease*, St. Paul, 67: 935-40, 1983.
- WEBSTER, D.M.; TEMPLE, S.R.; SCHWARTZ, H.F. Selection for resistance *Xanthomonas phaseoli* in dry beans. *Crop Science*, Madison, 20(4):519-22, 1980.
- WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Chemical control of common and fuscans bacterial blights in Michigan navy (Pea) beans. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 60(9):793-7, 1976.
- WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology*, St. Paul, 70:148-52, 1980.
- YOSHII, K.; GÁLVEZ, G.E.; ALVAREZ, G. Stimulation of yield losses in beans caused by common blight. *Proceedings of the American Phytopathological Society*, Miami, 3:198-299, 1976.

- YOUNG, J.M.; DYE, D.M.; BRADBURY, J.E.; PARAGOPOULOS, C.F.;
ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for
plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of
Agricultural Research*, Wellington, 21:153-77, 1978.
- ZAPATA, M.; FREYTAG, G.F.; WILKINSON, R.E. Evaluation for
bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology*,
St. Paul, 75:1032-9, 1985.
- ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R. *A monographic study of bean
diseases and methods for their control*. Washington, USDA.
1957, p.65-74 (Technical bulletin, 868).

APÉNDICES

APÊNDICE 1 - Análise da variância dos dados de comparação entre métodos de inoculação dentro da cultivar e entre técnicas da extração dentro da cultivar.

Quadro da análise de variância					
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Cultivar	2	0,1018581	0,0509291	1,1747*	0,33206
Métodos	1	0,0223259	0,0223259	0,5150*	0,51141
Cul. x met.	2	0,0227362	0,0113681	0,2622	0,77508
Resíduo	18	0,7803864	0,0433548		
Total	23	0,9273066			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 13,52%

Quadro da análise de variância					
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Cultivar	2	0,1188590	0,0594295	3,3054*	0,05869
Métodos	1	0,0008047	0,0008047	0,0448	0,82898
Cul. x met.	2	0,0050272	0,0025136	0,1398	0,87041
Resíduo	18	0,3226297	0,0179794		
Total	23	0,4483206			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 7,29%

Quadro da análise de variância

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.> F
Cultivar	2	0.0598353	0.0299177	1.7692*	0.19765
Métodos	1	0.0009222	0.0009222	0.0545	0.81256
Cul. x met.	2	0.0059783	0.0029891	0.1768	0.84016
Resíduo	18	0.3043803	0.0169100		
Total	23	0.3711161			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 7,16%

Quadro da análise de variância

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.> F
Cultivar	2	0.2462011	0.1231006	2.6768*	0.09461
Métodos	1	0.0018806	0.0018806	0.0409	0.83606
Cul. x met.	2	0.0146747	0.0073374	0.1596	0.85407
Resíduo	18	0.8277737	0.0459874		
Total	23	1.0905302			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 13,46%

Quadro da análise de variância (CNF 0010)

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	valor F	Prob.> F
Extrac.	3	0.3947742	0,1315914	4.7025*	0.01019
Métodos	1	0.0054180	0.0054180	0.1936	0.66744
Ext. x met.	3	0.0127337	0.0042446	0.1517	0.92699
Resíduo	24	0.6716020	0.0279834		
Total	31	1.0845279			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 9,39%

Quadro de análise de variância (Rosinha G-2)

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Extrac.	3	0.7591579	0.2530526	7.1809*	0.00162
Métodos	1	0.0062408	0.0062408	0.1771	0.68048
Ext x met.	3	0.0416721	0.0138907	0.3942	0.76124
Resíduo	24	0.8457501	0.0352396		
Total	31	1.6528209			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 11,05%

Quadro de análise de variância (Cornell 49-242)

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	valor F	Prob. > F
Extrac.	3	0.5712371	0.1904124	6.3575*	0.00282
Métodos	1	0.0012721	0.0012721	0.0425	0.83264
Ext. x met.	3	0.0070131	0.0023377	0.0781	0.97056
Resíduo	24	0.7188197	0.0299508		
Total	31	1.2983420			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 10,73%

APÊNDICE 2. Análise da variância dos dados de comparação entre técnicas de extração e diluição do extrato de duas amostras de sementes de feijão.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. Rio Vermelho)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. >F
Métodos	3	1.2802508	0.4267503	19.2055*	0.00001
Diluic.	5	2.1594905	0.4318981	10.4371*	0.00001
MetxDil.	15	0.0439576	0.0029305	0.1319	0.99985
Resíduo	72	1.5998587	0.0222203		
Total	95	5.0835576			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 9,25%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. EMGOPA 201-ouro)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. >F
Métodos	3	0.8027807	0.2675936	14.9415*	0.00001
Diluic.	5	3.9613512	0.7922702	44.2375*	0.00001
MetxDil.	15	0.2247753	0.0149850	0.8367*	0.63530
Resíduo	72	1.2894818	0.0179095		
Total	95	6.2783890			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 7,82%

APÊNDICE 3. Análise da variância dos dados de comparação entre técnicas de extração e tamanhos de sub-amostras de sementes.

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. Rio Vermelho)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	1.1169556	0.3723185	13.1920*	0.00001
Diluic.	3	1.8791683	0.6263894	22.1943*	0.00001
Cultivar	1	0.0139135	0.0139135	0.4930	0.50864
MetxDil.	9	0.4436074	0.0492897	1.7464*	0.08851
MetxCul.	3	0.0307465	0.0102488	0.3631	0.78271
DilxCul.	3	0.0346057	0.0115352	0.4087	0.75067
MetxDilxCul.	9	0.0845671	0.0093963	0.3329	0.96161
Resíduo	96	2.7094091	0.0282230		
Total	127	6.3129732			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 10,61%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. Rosinha)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	0.2490039	0.0830013	3.2935*	0.02341
Diluic.	3	11.1225375	3.7075125	147.1138*	0.00001
Cultivar	1	0.0022428	0.0022428	0.0890	0.76371
MetxDil.	9	0.2268929	0.0252103	1.0003*	0.44579
MetxCul.	3	0.0080688	0.0026896	0.1067	0.95513
DilxCul.	3	0.0113190	0.0037397	0.1484	0.92986
MetxDilxCul.	9	0.1290576	0.0143397	0.5690	0.82013
Resíduo	96	2.4193593	0.0252017		
Total	127	14.1683820			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 9,41%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. EMGOPA 201-ouro)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	1.4633547	0.4877849	19.8066*	0.00001
Diluic.	3	2.6036830	0.8678943	35.2409*	0.00001
Cultivar	1	0.0992615	0.0992615	4.0305*	0.04474
MetxDil.	9	0.1051275	0.0116808	0.4743	0.88878
MetxCul.	3	0.0050708	0.0016903	0.0686	0.97572
DilxCul.	3	0.0276039	0.0092013	0.3736	0.77533
MetxDilxCul.	9	0.0414880	0.0046098	0.1872	0.99425
Resíduo	96	2.3642352	0.0246274		
Total	127	6.7098245			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 9,16%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. Carnaval)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	2.8956715	0.9652238	26.1211*	0.00001
Diluic.	3	2.6714368	0.8904789	24.0984*	0.00001
Cultivar	1	0.0266491	0.0266491	0.7212*	0.59753
MetxDil.	9	0.7283188	0.0809243	2.1900*	0.02888
MetxCul.	3	0.0530116	0.0176705	0.4782	0.70237
DilxCul.	3	0.0179265	0.0059755	0.1617	0.92136
MetxDilxCul.	9	0.0424794	0.0047199	0.1277	0.99830
Resíduo	96	3.5473767	0.0369518		
Total	127	9.9828704			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 13,09%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. catu)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	0.8650347	0.2883449	15.3321*	0.00001
Diluic.	3	1.4290358	0.4763453	25.3287*	0.00001
Cultivar	1	0.0014954	0.0014954	0.0795	0.77540
MetxDil.	9	0.3446299	0.0382922	2.0361*	0.04288
MetxCul.	3	0.0323910	0.0107970	0.5741	0.63759
DilxCul.	3	0.0093340	0.0031113	0.1654	0.91896
MetxDilxCul.	9	0.0390268	0.0043363	0.2306	0.98852
Resíduo	96	1.8054306	0.0188066		
Total	127	4.5263782			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 8,62%

QUADRO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA (cv. Rio Ivaí)

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Métodos	3	0.0267381	0.0089094	0.9713*	0.58885
Diluic.	3	0.3722617	0.1240872	13.5277*	0.00001
Cultivar	1	0.0654315	0.0654315	7.1332*	0.00875
MetxDil.	9	0.1793418	0.0199269	2.1724*	0.03022
MetxCul.	3	0.0626794	0.0208931	2.2777*	0.08320
DilxCul.	3	0.0150696	0.0050232	0.5476	0.65520
MetxDilxCul.	9	0.0582124	0.0064680	0.7051*	0.70426
Resíduo	96	0.8805944	0.0091729		
Total	127	1.6603189			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 5,54%

Apêndice 4 - Análise da variância dos dados de germinação de sementes inoculadas artificialmente.

Quadro de análise de variância (Germinação)					
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Expos.	5	468.6176450	93.7235290	5.3908*	0.00110
Assps.	1	39.4644829	39.4644829	2.2699 *	0.13703
Exp x Ass.	5	23.8255411	4.7651082	0.2741	0.92353
Resíduo	36	625.8936609	17.3859350		
Total	47	1157.8013299			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade .

CV = 2,69%

Apêndice 5 - Análise da variância dos dados de germinação e peso de 100 sementes naturalmente portadoras do patógeno.

Quadro da análise de variância (Germinação)					
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Lote	5	443.8483037	88.7696607	16.2424*	0.00003
Resíduo	18	98.3752316	5.4652906		
Total	23	542.2235353			

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

CV = 3,26%

Quadro da análise de variância (Peso de 100 sementes)					
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Trat.	5	18.6933419	3.7386684	16.2551*	0.00003
Resíduo	18	4.1400003	0.2300000		
Total	23	22.83333422			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade .

CV = 6,35%

1) - *[Faint handwritten text]*
 2) - *[Faint handwritten text]*

1) 12 W 1) 11 L 1) 10 S 1) 9 N

1) 8 S 1) 7 L 1) 6 S 1) 5 N

1) 4 S 1) 3 L 1) 2 S 1) 1 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

1) 0 S 1) 0 L 1) 0 S 1) 0 N

Apêndice 6. Efeito de métodos de inoculação na reação de severidade de sintomas em cultivares de feijoeiro exibida por *X. campestris* pv. *phaseoli* extraída de sementes (cv. EMOGA 201-ouro)

Técnicas de extração	Cultivares / Métodos de inoculação					
	CNF 0010		Posinha G-2		Cornell 49-242	
	AM	IT	AM	IT	AM	IT
Moagem das sementes e suspensão em água/2 horas	2,75 ⁽¹⁾	2,62	2,50	2,12	2,25	2,25
Sementes inteiras com desinfestação-superficial e suspensão em água/18-24 horas	2,87	3,12	2,50	2,62	2,25	2,12
Sementes inteiras e suspensão em meio líquido/18-24 horas	3,37	3,50	3,37	3,50	3,12	3,00
Sementes inteiras e suspensão em água/18-24 horas	3,62	3,75	3,37	3,50	3,00	3,12
\bar{M}	3,15 A	3,24 A	2,96 A	2,90 A	2,53 A	2,62 A

(1) Médias de 4 repetições. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. AM = agulhas múltiplas; IT = incisão com tesoura.



1. Name of the candidate: _____

2. Roll Number: _____

Sl. No.	Name of the Candidate	Grade	Percentage	Remarks
1	_____	_____	_____	_____
2	_____	_____	_____	_____
3	_____	_____	_____	_____
4	_____	_____	_____	_____
5	_____	_____	_____	_____
6	_____	_____	_____	_____
7	_____	_____	_____	_____
8	_____	_____	_____	_____
9	_____	_____	_____	_____
10	_____	_____	_____	_____
11	_____	_____	_____	_____
12	_____	_____	_____	_____
13	_____	_____	_____	_____
14	_____	_____	_____	_____
15	_____	_____	_____	_____
16	_____	_____	_____	_____
17	_____	_____	_____	_____
18	_____	_____	_____	_____
19	_____	_____	_____	_____
20	_____	_____	_____	_____
21	_____	_____	_____	_____
22	_____	_____	_____	_____
23	_____	_____	_____	_____
24	_____	_____	_____	_____
25	_____	_____	_____	_____
26	_____	_____	_____	_____
27	_____	_____	_____	_____
28	_____	_____	_____	_____
29	_____	_____	_____	_____
30	_____	_____	_____	_____
31	_____	_____	_____	_____
32	_____	_____	_____	_____
33	_____	_____	_____	_____
34	_____	_____	_____	_____
35	_____	_____	_____	_____
36	_____	_____	_____	_____
37	_____	_____	_____	_____
38	_____	_____	_____	_____
39	_____	_____	_____	_____
40	_____	_____	_____	_____
41	_____	_____	_____	_____
42	_____	_____	_____	_____
43	_____	_____	_____	_____
44	_____	_____	_____	_____
45	_____	_____	_____	_____
46	_____	_____	_____	_____
47	_____	_____	_____	_____
48	_____	_____	_____	_____
49	_____	_____	_____	_____
50	_____	_____	_____	_____

Signature of the Candidate: _____

Signature of the Examiner: _____

Date: _____



EMBRAPA (Tese, Ph.D. - 282)

FICHA DO LIVRO

AUTOR

VALARINI, Pedro José

TÍTULO: Método para detecção de
Xanthomonas campestris pv. ...

DEVOLVER EM

NOME DO LEITOR

29/11/96

Era: José José

16/05/97

Família



EMBRAPA

— BIBLIOTECA —



