

# *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* EM SEMENTES

## DE FEIJÃO. I. DETECÇÃO POR SEROLOGIA<sup>3</sup>

P.V. Valarini<sup>1</sup> e J.O.M. Menten<sup>2</sup>

1 Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA)/ EMBRAPA- C.P. 69- 13820 Jaguariúna/SP.

2 Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP. C.P. 9 , 13400- Piracicaba/SP, Bolsista do CNPq.

3 Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

Aceito para publicação em 30/10/1991.

### RESUMO

Foram comparados quatro técnicas de extração e dois métodos serológicos para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "Strain" *fuscans* (Xcphf) em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). As técnicas de extração incluíram sementes moídas e inteiras, com ou sem assepsia superficial, imersas em água destilada ou meio líquido (3g extrato de levedura/ L) esterilizados e incubação por 2 horas, à temperatura ambiente (sementes moídas) ou 18-24 hs, a 5-10°C (sementes inteiras). Para a identificação do patógeno, foram comparadas as técnicas serológicas de microprecipitina em placas e dupla difusão em gel-de-agar. A melhor técnica de extração foi a imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada, por 18-24 horas, a 5-10°C. O método da microprecipitina apresentou maior sensibilidade, mas menor especificidade que a dupla difusão em gel-de-agar. O antissoro do "strain" *fuscans* reagiu tanto com o antígeno homólogo (Xcphf) como com o heterólogo (Xcph). Sob o ponto de vista prático este antissoro pode ser usado para a detecção dos patógenos causadores do crestamento bacteriano do feijoeiro. A sensibilidade de do método da dupla difusão não foi suficiente para a detecção segura de baixas incidências do patógeno em amostras de sementes de feijão.

PALAVRAS CHAVES: feijão, semente, crestamento bacteriano, serologia.

### ABSTRACT

#### *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* IN COMMON

#### BEAN SEEDS. I. DETECTION BY SEROLOGY

Four extraction techniques and two serology methods were compared for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) and strain *fuscans* (Xcphf) in bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). The extraction techniques included ground or whole seeds, with or without superficial desinfection, soaked in sterilized distilled water or liquid medium (3g yeast extract/ L) and

incubation during 2 hours at room temperature (grinded seeds) or 18-24 hours at 5-10°C (whole seeds). Microprecipitin dishes and Ouchterlony double diffusion methods were compared for the pathogen identification. The best bacterium extraction technique was the whole seed immersion in distilled and sterilized water for 18-24 hours at 5-10°C. Microprecipitin method presented higher sensibility but lower specificity than the double diffusion. The strain *fuscans* anti-serum reacted with both the homologous (Xcphf) and the heterologous (Xcph) antigens. Therefore, under the practical point of view, this anti-serum can be used for detection of both causal agents of the bean bacterial blight. The sensibility of the double diffusion method was not enough for a reliable detection of small amount of the pathogen in bean seed samples.

KEY WORDS: bean, seed, bacterial blight, serology.

## INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, 1978 (DYE *et al.*, 3) e pelo "strain" *fuscans*, é uma doença que afeta a produção do feijoeiro em diferentes partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais (ZAUMEYER e THOMAS, 25; WALLEN e SUTTON, 24). No Brasil, a doença assume importância econômica, principalmente, no cultivo "das águas"; é de ampla distribuição e de difícil controle, agravadas pelo sistema de cultivo em mais de uma época no mesmo ano e pelo fato de seu agente causal ter a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação (COSTA, 2; KIMATI, 7; VIEIRA e SARTORATO, 23; MENEZES, 12 e BULISANI *et al.*, 1).

Uma das medidas de controle que tem trazido resultados satisfatórios consiste na utilização de sementes com elevado padrão de sanidade, o qual assegura uma cultura inicialmente livre da doença (BULISANI *et al.*, 1). Devido a possibilidade de ocorrência de epidemias em campo a partir de sementes mesmo com baixa incidência da bactéria (WALLEN e SUTTON, 24; KIMATI, 7), torna-se importante contar com métodos eficientes e rápidos para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão.

Existem diversas metodologias desenvolvidas em laboratório para a detecção de bactérias de sementes. Geralmente, três etapas importantes devem ser consideradas para a obtenção de um método de detecção: a extração do patógeno, a identificação da espécie e a determinação da sensibilidade do método (SCHAAD, 18; RODRIGUES NETO, 16). Considerável ênfase tem sido dada para o desenvolvimento de técnicas que permitam obter resultados mais rápidos e com maior sensibilidade para a detecção de patógenos (IRWIN, 5). Os métodos serológicos, tais como aglutinação e dupla difusão, têm sido indicados para a detecção de bactérias patogênicas de sementes (NEERGAARD, 13). Para o caso específico de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, poucos procedimentos serológicos têm sido utilizados para esse fim (TRUJILLO e

SAETTLER, 21; OLEAS ARIAS, 14; MALIN *et al.*, 11; VELASQUEZ e TRUJILLO, 22).

Sendo assim, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a detecção desse patógeno em sementes de feijão, envolvendo a comparação de técnicas de extração e métodos serológicos para a identificação do patógeno.

## MATERIAL E MÉTODO

O trabalho de pesquisa foi realizado nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, em Piracicaba/SP.

### - Técnicas de extração

Para avaliar a metodologia de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*), foram utilizadas 6 amostras de sementes de feijão, procedentes de plantios com sintomas característicos de bacteriose: 5 coletadas em campos experimentais do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina/PR (cvs. Rosinha, Rio Vermelho, Carnaval, Catu e Rio Ivaí) e 1 coletada em lavoura de Goiânia/GO (cv. EMGOPA 201-ouro). Foram comparadas quatro técnicas de extração de *Xcph* a partir de sub-amostras de sementes de vários tamanhos e dois métodos serológicos para a identificação do patógeno.

As técnicas de extração da bactéria consistiram em: a) imersão em água destilada esterilizada de sementes moídas (TAYLOR, 20, modificada); b) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo); c) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras e d) imersão de sementes inteiras em meio líquido (3g extrato de levedura/L, esterilizado (VELASQUEZ e TRUJILLO, 21). As quantidades de água ou meio líquido variaram em função do número de sementes e das condições em que as mesmas foram submetidas (sementes moídas ou inteiras), conforme os QUADROS 1 e 2.

QUADRO 1 - Volume de água para extração de *Xcph* de amostras de sementes moídas de diferentes tamanhos.

Nº de Sementes	Volume de água (ml)	Tamanho do frasco (L)
1000	2000	3
500	1000	2
100	250	0,5
10	50	0,125

Para as sementes moídas, as suspensões foram incubadas por 2 horas sob condições de laboratório; para sementes inteiras, as suspensões foram incubadas em geladeira a 5-10°C por 18-24 horas. Posteriormente, a partir da suspensão obtida, procedeu-se a identificação do patógeno através dos métodos serológicos.

QUADRO 2- Volume de água ou meio de cultura líquido para extração de *Xcph* de amostras de sementes inteiras de diferentes tamanhos.

Nº de Sementes	Volume de água ou meio líquido (ml)	Tamanho do frasco(L)
1000	350-450	1,0
500	180-240	0,5
100	35- 50	0,25
10	5- 10	0,125

-Técnica de identificação

-Preparo dos antígenos

Isolados puros de *Xcph* e do "strain" *fuscans* (*Xcph*<sub>f</sub>) foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura NGA (extraído de carne -3,0g, peptona -5g, glicose -2,5g, agar, 15,0g em 1000 ml de água destilada) a 28°C, durante 48 horas. Após esse período, as colônias foram transferidas para frascos de vidro, contendo solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. Tendo-se homogeneizado a suspensão, as células bacterianas foram lavadas por duas vezes em solução salina por meio de centrifugação a 5900 g, durante 15 minutos. As bactérias decantadas foram ressuspenas em solução salina e ajustadas no espectrofotômetro para densidade ótica igual a 0,3 a 640nm; assim foram obtidas as concentrações de  $3,2 \times 10^8$  e  $4,6 \times 10^7$  ufc/ml de *Xcph* e de *Xcph*<sub>f</sub>, respectivamente. Essas suspensões foram utilizadas como antígenos para as imunizações e para as reações serológicas.

-Preparo dos antissoros

Antígenos dos isolados 509/85 557/85 foram injetados em coelhos da raça Nova Zelândia, de aproximadamente 3,0Kg, para obtenção dos antissoros. Um e meio ml de cada antígeno, conservado em congelador, foi transferido para frascos de antibiótico e homogeneizado 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 7 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 20ml de sangue para a obtenção do soro normal que serviu de controle. Dez sangrias semanais de 20ml 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 5900g 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 antissoros foram mantidos em congelador até o momento de uso.

### - Técnicas serológicas

Duas técnicas serológicas foram comparadas: a microprecipitina em placas (ROMEIRO e FUKUDA, 17), modificada e a dupla difusão em gel-de-agar de Ouchterlony (KIMATI, 6).

A técnica da microprecipitina em placas consistiu em de-  
senhar um modelo quadriculado em placas de Petri, sendo que cada  
quadriculo mediu cerca de 1 cm<sup>2</sup>. Em seguida, colocou-se óleo de  
silicone no fundo de cada placa para evitar que as gotas se  
espalhassem. Os antissoros preparados da mistura de coletas (5ª, 6ª  
e 7ª), foram diluídos em solução salina tamponada (NaCl 0,85%,  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M em água destilada) pH 7,2 por fatores de 2<sup>-n</sup>,  
com n variando de 0 a 11 (SOUZA, 19). Com micropipetas de Pas-  
teur, as diluições de antissoros foram depositadas nos quadricula-  
dos e a seguir, sobre cada diluição de antissoro, colocou-se uma  
gota de antígeno. As placas de Petri foram tampadas e deixadas à  
temperatura ambiente. Duas avaliações foram feitas: aos 60 e 120  
minutos. A formação de um precipitado, visualizado ao microscópi-  
co estereoscópico, no aumento de 5x, sob luz indireta, indicou  
reação positiva; cada reação teve 3 repetições e como controle, u-  
tilizou-se soro normal.

A técnica da dupla difusão em gel-de-agar consistiu em  
verter 4 ml de meio fundente esterilizado (1% de agar Difco, NaCl  
0,85%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M, pH 7,2 e 0,01% de merthiolate) em lâ-  
minas de vidro e deixados solidificar no interior de placas de  
Petri. Posteriormente, foram feitos orifícios de 0,25 cm de diâ-  
metro com aparelho "Furagar" (LEITE e OLIVEIRA, 9), de distribui-  
ção hexagonal e, com auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios  
foram abertos e preenchidos duas vezes com diluições de antís-  
soros e antígenos. As lâminas permaneceram no interior das pla-  
cas com pequenos chumaços de algodão embebidos em água à tempe-  
ratura ambiente. A avaliação foi feita 24 e 48 horas após a ins-  
talação do ensaio, observando-se as bandas de precipitação forma-  
das. Cada reação teve 3 repetições e como controle, utilizou-se  
soro normal.

As seguintes avaliações serológicas foram realizadas:

- Reações serológicas entre os antissoros obtidos nas coletas e  
seus antígenos homólogos (*Xcph* e *Xcph*);
- Titulação dos antissoros: para determinar o título dos antís-  
sos de *Xcph* e do *Xcph*, utilizou-se as misturas das 5ª, 6ª e 7ª  
coletas de antissoros contra os antígenos homólogos;
- Especificidade: para determinar a especificidade das técnicas  
serológicas (microprecipitina em placas e dupla difusão), utili-  
zou-se antissoros de *Xcph* e de *Xcph* (mistura de coletas: 5ª, 6ª  
e 7ª) contra diversos isolados de bactérias patogênicas ou sapro-  
fíticas;
- Sensibilidade da técnica da dupla difusão em gel-de-agar: o e-  
feito da concentração dos antissoros de *Xcph* e de *Xcph* contra  
diferentes concentrações dos antígenos homólogos foi determinado  
pela dupla difusão em gel-de-agar onde os antissoros foram diluí-  
dos segundo a fórmula 2<sup>-n</sup>, sendo n variando de 0 a 11 e os antí-  
genos diluídos de acordo com os Quadros 6 e 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das reações serológicas realizadas pelas técnicas de microprecipitina e da dupla difusão em gel-de-agar em tre as diversas coletas dos antissoros de *Xcph* e de *Xcphf* com os antígenos homólogos, encontram-se no Quadro 3. Todas as coletas de antissoros produziram reação de precipitação através da técnica da microprecipitina enquanto que, pela dupla difusão, essa reação só foi visível a partir das 4ª e 5ª coletas dos antissoros para *Xcph* e para *Xcphf*, respectivamente; por ambas as técnicas, a reação foi mais nítida quando se utilizou o antígeno *Xcph*. Esses resultados indicaram maior sensibilidade da microprecipitina em placas. Pela mesma técnica, OLEAS ARIAS (14) testou 18 coletas de antissoros para *Xcph*, sendo que todas produziram reação evidenciável, confirmando a sensibilidade da técnica da microprecipitina em placas.

QUADRO 3- Reação de diversas coletas de antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) e do "strain" *fuscans* (*Xcphf*) com os antígenos homólogos.

Técnicas Serológicas	Antígenos (1)	Coletas de antissoros(2)										
		SN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Microprecipitina em placas	<i>Xcph</i>	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
	<i>Xcphf</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dupla difusão em gel-de-agar	<i>Xcph</i>	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++
	<i>Xcphf</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

(1) Conc.:  $3,2 \times 10^8$  ufc/ml(*Xcph*) e  $4,6 \times 10^7$  ufc/ml (*Xcphf*)

(2) 1ª sangria realizada 21 dias após a 1ª imunização; (+) reação positiva; (++) reação mais nítida; (-) negativa. Cada reação 3 repetições: SN= soro normal.

No Quadro 4 encontram-se os resultados das reações serológicas dos antissoros da mistura de coletas 5ª, 6ª e 7ª de *Xcph* e de *Xcphf* diluídos com os antígenos homólogos. Pela técnica da microprecipitina em placas, os antissoros de *Xcph* e de *Xcphf* contra os antígenos homólogos 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; os títulos dos antissoros de *Xcph* foram superiores aos de *Xcphf*, independentemente da técnica serológica utilizada, conforme Quadro 4. Provavelmente, isto tenha ocorrido devido a menor concentração do antígeno de *Xcphf*. TRUJILLO e SAETTLER (21) obtiveram títulos de antissoros mais elevados para *Xcph* e para *Xcphf*, 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 (14) obteve resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, tendo alcançado o título do antissoro de *Xcph* de 1:1024 contra o antígeno homólogo na con-

centração de  $2,5 \times 10^8$  ufc/ml, usando a técnica de microprecipitina em placas. Ainda segundo esse autor, nas 18 coletas de antissoro, ocorrem um aumento paulatino do título em cada antissoro, à medida que se aumentou o número de imunizações.

QUADRO 4- Títulos dos antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strains" *fuscans* (Xcphf) contra os antígenos homólogos pelas técnicas da microprecipitina em placas e dupla difusão em gel de agar.

Antissoros (1) (diluição)	Técnicas Serológicas (2)			
	Microprecipitina		Dupla difusão	
	Antígenos		Antígenos	
	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf
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) Mistura de coletas (5ª, 6ª e 7ª);

(2) + reação positiva; - reação negativa. Cada reação: 3 repetições.

Os resultados de reação de especificidade dos antissoros de Xcph e de Xcphf contra diversos isolados de bactérias fitopatogênicas e de saprófitas ao feijoeiro através das técnicas serológicas estão contidos no Quadro 5. Pela técnica da microprecipitina em placas, os isolados bacterianos dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* reagiram com os antissoros de Xcph e da Xcphf enquanto que pela dupla difusão em gel de agar, o antissoro de Xcph reagiu apenas com seu antígeno homólogo e o antissoro de Xcphf reagiu tanto com o homólogo como com o heterólogo, indicando menor especificidade de ação desse antissoro na caracterização de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Enquanto a técnica da microprecipitina mostrou reações cruzadas dos antissoros de Xcph e de Xcphf entre espécies de *Xanthomonas* assim como com espécies do gênero *Pseudomonas*, a técnica da dupla difusão mostrou ser altamente específica na caracterização de isolados de Xcph. Esse mesmo padrão de comportamento foi constatado por LINK e SHARP (10). Também, no estudo para caracterização dos antissoros de Xcphf, TRUJILLO e SAETTLER (21) verificaram que a técnica da dupla difusão

QUADRO 5- Determinação da especificidade dos antissoros *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcph) e do "strain" *fuscans* (Xcphf) por duas técnicas serológicas contra isolados de bacterias.

Isolados bacterianos(1)	Número de isolados	Técnicas serológicas(2)							
		Microprecipitina em placas				Dupla Difusão em gel-de-agar			
		SN	AS	AS	Xcph	SN	AS	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>citrini</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 folhas de feijoeiro infectadas por Xcph.	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle (água destilada)		-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Concentração: densidade ótica (DO): 0,3 a 640nm; (2)SN= soro normal; AS= antissoro; (+) reação positiva; (-) reação negativa; (média de 4 repetições).



foi mais segura do que a microaglutinação em tubos. Por esta última, antíssoros de *Xcph* apresentaram reações cruzadas com células vivas de outras espécies de *Xanthomonas* e com bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Corynebacterium* não se observando estas reações com células mortas pelo vapor (100°C, 1 hora) de 19 contaminantes bacterianos obtidos de sementes de feijão desinfestadas superficialmente. Pela técnica da dupla difusão, OLEAS ARIAS (14) concluiu que o antíssoro de *Xcph* apresentou especificidade para isolados homólogos e ausência de reação com os heterólogos *Xcph*, *Pseudomonas* sp. e bactérias contaminantes, concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, sob o ponto de vista prático, seria mais interessante a utilização do antíssoro do "strain" *fuscans*, devido a sua capacidade de detectar tanto *Xcph* como *Xcph*, ambos causadores do cretamento bacteriano do feijoeiro.

Os resultados da análise dos antíssoros de *Xcph* e de *Xcph* em diluição, contra diferentes concentrações dos antígenos homólogos pela técnica da dupla difusão em gel de agar encontram-se nos Quadros 6 e 7, respectivamente. Constatou-se que o antíssoro de *Xcph* (nas diluições até 1:4), foi eficiente em detectar a presença de *Xcph* até a concentração de  $3,2 \times 10^6$  ufc/ml; o antíssoro de *Xcph* (nas diluições até 1:4) reagiu serologicamente com seu antígeno homólogo até na concentração de  $4,6 \times 10^6$  ufc/ml. Verificou-se que não houve vantagem em utilizar o antíssoro diluído, devendo os testes serológicos serem realizados com o antíssoro original (1:1). TRUJILLO e SAETTLER (21), analisando os antíssoros de *Xcph* e de *Xcph*, com diferentes concentrações dos antígenos homólogos, nas densidades óticas de 0,1 a 0,05, concluíram que as bandas se formaram até as concentrações de  $3,8 \times 10^6$  células/ml de *Xcph* e  $2,9 \times 10^6$  células/ml de *Xcph* 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 utilizada na identificação de *Xcph* a partir de extratos obtidos de sementes de feijão (Quadro 8).

O Quadro 8 apresenta os resultados referentes a comparação de quatro técnicas de extração para detecção de *Xcph* através do método de dupla difusão em gel-de-agar. A partir da suspensão obtida pela técnica de extração de sementes moídas baseada em TAYLOR (20), os resultados da reação para identificação da bactéria através da dupla difusão em gel-de-agar foram negativos talvez devido a viscosidade do líquido que dificultou a difusão da bactéria no agar para propiciar a reação com o antíssoro (Quadro 8). Uma possível solução seria a realização de uma filtragem da suspensão. Em contrapartida, o melhor resultado de identificação pelo método serológico foi alcançado pela extração da bactéria a partir de sementes inteiras imersas em água. Entre os antíssoros de *Xcph* e de *Xcph* utilizados, não ocorreram diferenças expressivas com relação a identificação do patógeno. Entretanto, o número de reações serológicas positivas foi geralmente maior quando se

QUADRO 6- Análises 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 (ufc/ml)	Antissoros(1)												
	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 x 10 <sup>8</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3,2 x 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>6</sup>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,6 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,8 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,4 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle (água)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) SS- solução salina 0,85%; SN- soro normal; (+) reação positiva; (-) reação negativa (cada reação: 3 re-  
petições).

QUADRO 7- Análise do antissoro de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* "strain" Juacans em diluição contra diferentes concentrações do antígeno homólogo através da técnica da dupla difusão em gel-de-agar.

Antígenos (ufc/ml)	Antissoros(1)											
	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 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>6</sup>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,57x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle(água)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) SS- solução salina 0,85%; SN- soro normal; (+) reação positiva; (-) reação negativa (cada 3 repetições).

QUADRO 8 - Comparação de técnicas de extração de *X. campestris pv. phaseoli* (Xcph) em sub-amostras de sementes de 6 cultivares de feijão através do teste da dupla difusão em gel-de-agar (anti-soro de Xcph e Xcphf).

Técnicas de extração e tamanho de sub-amostras (nº de sementes)	Reações serológicas (1) apresentadas pelos extratos de sementes das cultivares																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	Carnaval		Rio Vermelho		Rosinha		Catu		Rio Ivaí		EMCOFA 201-suro																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf	Xcph	Xcphf																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Moagem das sementes e suspensão em água/ 2 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-													
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																										
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																							
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																				
Sementes inteiras com desinf. superf./suspensão em água 18-24 h a 5-10 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																	
1000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																														
500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																											
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																								
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																					
Sementes inteiras/suspensão em água 18-24h/5-10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																		
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																															
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																												
100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																									
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																						
Sementes inteiras/suspensão em meio liq. 18-24h/5-10 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																			
1000	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																
500	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																													
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																										
10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																							
Controles: Xcph(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																																				
Xcphf(10 <sup>9</sup> ufc/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Água dest. esteril.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																																																														

(1) + presença e - ausência de reação serológica e média de 3 repetições.

empregou o antissoro  $Xcph\delta$ ; isto, provavelmente, se deve a capacidade deste antissoro em detectar tanto o antígeno  $Xcph$  como  $Xcph\delta$ . Verificou-se que todas as amostras de sementes de feijão testadas foram portadoras de  $Xcph$ ; através da técnica de extração mais eficiente (imersão de sementes inteiras em água), reações serológicas positivas foram consistentemente observadas para sub-amostras de até 500 sementes contra antissoro de  $Xcph\delta$ .

KIRALY *et al.* (8) estabeleceram que o antígeno, para ser usado em teste de dupla difusão em gel-de-agar, deveria conter  $10^{10}$  células/ml. TRUJILLO e SAETTLER (21), utilizando esta técnica combinada com meio semi-seletivo, não detectaram  $Xcph$  nas amostras de sementes de feijão onde menos do que  $10^9$  ufc/ml do patógeno foi adicionado a 1,6 Kg de sementes não infectadas, imersas em solução salina NaCl 0,01M  $PO_4$ , pH = 7,2.

Segundo RAT (15), a técnica serológica permite a identificação de bactéria com uma boa segurança. Dos vários tipos, a microprecipitina em placas ou tubos e a imuno-difusão em agar podem ser empregadas para teste sobre culturas puras porque exigem grande quantidade de bactérias, isto é, a sensibilidade é muito baixa e somente podem ser usadas para a confirmação da identificação. Também, conforme FRANKEN e VAN-VUURDE (4), as técnicas serológicas como imunofluorescência, teste de Elisa ("enzime - linked immunosorbent assay"), dupla difusão de Ouchterlony e aglutinação são comumente indicadas para detectar bactérias de sementes. Entretanto, a falta de disponibilidade de antissoros de alta qualidade e de padronização na aplicação de testes de sementes são obstáculos à utilização das técnicas serológicas.

Conclui-se que apesar da técnica serológica através da dupla difusão em gel-de-agar mostrar alta especificidade para  $Xcph$ , não foi suficientemente sensível para detectar baixas incidências do patógeno em amostras de sementes de feijão, devendo a sua utilização ser de importância como método de detecção indireta, isto é, quando usada em combinação com outras técnicas como, por exemplo, isoladamente direto, para a identificação do patógeno.

## LITERATURA CITADA

- 1 BULISANI, E.A.; L.D. ALMEIDA e A.J. BOSTON, 1987. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. In: BULISANI, E.A. coord. *Feijão: fatores de produção e qualidade*. Campinas, Fundação Cargill, Cap. 2:29-88.
- 2 COSTA, A.S., 1972. Investigações sobre moléstias de feijoeiro no Brasil. In: 1º Simpósio Brasileiro de Feijão, Campinas, 1971. *Anais*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2:305-84.
- 3 DYE, D.W.; J.F. BRADBURY; M. GOTO; A.C. HAYWARD, R.A. LELLIOTT e M.N. SCHROTH, 1980. 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.

- 4 FRANKEN, A.A. e J.W. VAN VUURDE, 1988. Problems and new approaches in the use of serology for seedborne bacteria. In: 5ª International Congress of Plant Pathology, Kyoto. *Abstracts of papers*. Section XIII, Seed Pathology, Session 3, Technology for detection of seedborne pathogens, p.403.
- 5 IRWIN, J.A., 1987. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. *Seed Science and Technology*, Zurich, 15: 755-63.
- 6 KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu arx., 1957). Piracicaba, 103p. (Livre docência-ESALQ/USP).
- 7 KIMATI, H., 1980. Doenças do feijoeiro, In: GALLI, F., ed. *Manual de Fitopatologia*. 2.ed. São Paulo, Ceres, 2, cap.19 : 297-318.
- 8 KIRALY, Z.; Z. KLEMENT; F. SOLYMOSEY e J. YÜROS, 1974. *Methods in plant pathology*. Amsterdam, Elseviers Scientific, Publishing, 509p.
- 9 LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA, 1975. *Furagar. Summa Phytonathologica*, Piracicaba, 1:143-6.
- 10 LINK, K.K. e C.G. SHARP, 1927. Serological differentiation of *Bacterium campestris* from *B. phaseoli*, *B. phaseoli snyderi* and *B. flaccumfaciens*. In: 8ª Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Philadelphia, 1926. Abstracts. *Phytopathology*, St. Paul, 17:53-4.
- 11 MALIN, E.M.; D.A. ROTH e E.E. BENDEN, 1983. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Disease*, St. Paul, 67(6):645-7.
- 12 MENEZES, J.R., 1987. Testes de sanidade de semente de feijão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S., ed. *Patologia de sementes*. Campinas, Fundação Cargill, Cap. 18:395-405.
- 13 NEERGAARD, P., 1979. *Seed pathology*. London, MacMillan, 1, 839p.
- 14 OLEAS ARIAS, A.P., 1982. Correlação entre resistência foliar e infecção de sementes em variedades de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Sm.) Dows. 1939. Piracicaba, 81p. (Mestrado-ESALQ/USP).
- 15 RAT, B., 1988. Achievement and research approaches developed by the french laboratory on seed transmitted bacteria. In: Advanced International Course in Seed Pathology, Passo Fundo, 1987, Proceedings, edited by L.C. NASSER et al. Brasília, ABRATES, p.295-9.
- 16 RODRIGUES NETO, J., 1988. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: 3ª Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, Lavras, Anais, Campinas, Fundação Cargill, p. 123-39.
- 17 ROMEIRO, R.S. e C. FUKUDA, 1983. Método simples para determinação de título de aglutinação e/ou precipitação do antissororo ou do antígeno. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 8(1):93-5.

- 18 SCHAAD, N.W., 1982. Detection of seedborne bacterial pathogens. *Plant Disease*, St. Paul, 66:885-90.
- 19 SOUZA, N.L., 1980. Reações de linhagens e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a *Pseudomonas albo-precipitans* Rosen. Piracicaba, 65p. (Mestrado- ESALQ/USP).
- 20 TAYLOR, J.D., 1970. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burker) Dowson. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 66:29-36.
- 21 TRUJILLO, G.E. e A.W. SAETTLER, 1981. *Production and characterization of antisera to Xanthomonas phaseoli and X. phaseolicola* var. *fuscans*. East Lansing, Michigan State University/Agricultural Experiment Station, 8p. (Research report, 414).
- 22 VELASQUEZ, N.C. e TRUJILLO, 1984. Comparacion de metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith.) Dye. *Agronomia Tropical*, Maracay, 34 (1/3):29-41.
- 23 VIEIRA, R.F. e A. SARTORATO, 1984. *Recomendações técnicas para produção de sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.) de alta qualidade*. Goiânia, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, 46p. (Circular Técnica, 10).
- 24 WALLEN, V.R. e M.D. SUTTON, 1965. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 43:437-46.
- 25 ZAUMEYER, W.J. e H.R. THOMAS, 1957. *A monographic study of bean diseases and methods for their control*. Washington, USDA. p.65-74 (Technical bulletin, 868).