

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. PHASEOLI: MÉTODO PARA DETECÇÃO EM SEMENTE DE FEIJÃO*

P.J. VALARINI¹ & J.O.M. MENTEN²

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

²Dept^o de Fitopatologia, ESALQ/USP. C. Postal 09, 13400 - Piracicaba/SP, Bolsistas do CNPq.

(Aceito para publicação em 13/07/92)

VALARINI, P.J. e MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: métodos para detecção em sementes de feijão. Fitopatol. bras. 17:373- 383.1992.

RESUMO

Visando detectar *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foram comparados quatro técnicas de extração e três métodos de identificação a partir de amostras de sementes sabidamente portadoras do patógeno.

As técnicas de extração da bactéria incluíram sementes moídas e inteiras, com e sem assepsia superficial com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), imersas em água destilada e em meio líquido (3g de extrato de levedura/l) esterilizados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente (sementes moídas) e 18-24 horas à 5°C (sementes inteiras). Para a identificação do patógeno, os seguintes métodos foram comparados: inoculação em plantas indicadoras, isolamento direto em meios de cultura semi-seletivos e por serologia (microprecipitina e dupla difusão em gel de ágar).

Os resultados mostraram que a detecção desse patógeno, através da extração por meio de imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada à 5°C por

18-24 horas e a identificação através da inoculação do extrato bruto em folhas primárias de plântulas (cv. CNF 0010), por incisão com tesoura, foi o método mais adequado para detectar e quantificar o inóculo em amostras de sementes de feijão. Esse método mostrou reprodutibilidade, alta especificidade, baixo custo e fácil execução, com sensibilidade de 0,1%, permitindo analisar cerca de 10 amostras/técnico/dia, num prazo relativamente curto (8-10 dias), o que sugere a sua aplicação prática em laboratórios de análises de rotina e, possivelmente, em programas de certificação de sementes. Utilizando-se esta metodologia, verificou-se que a maioria dos 20 lotes de sementes certificadas produzidas no Estado de São Paulo em 1988 (cultivos da "seca" e de "inverno") e 1988/89 (cultivo "das águas"), foi portadora do patógeno em índices variando de 0,1 a 1,1%, inóculo suficiente para ocasionar epidemias em campo, sob condições climáticas favoráveis.

Palavras chave: feijão, crestamento bacteriano comum, detecção em semente.

ABSTRACT

Methodology for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seeds.

For detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) in bean seeds (*Phaseolus vulgaris*), four extraction techniques and three identification methods were compared by using seed samples known to carry the pathogen. The extraction techniques included ground or

whole seeds, with and without superficial desinfestation with sodium hypochloride (1% active chlorine), soaked in sterilized distilled water and liquid medium (3g yeast extract/l) and incubated during 2 hours, at room temperature (ground seeds) and 18-24 hours at 5°C (whole seeds). The following methods were compared for bacterium identification: inoculation on indicator plants, direct isolation on agar media and serology (microprecipitin and Ouchterlony double diffusion).

* Parte da tese apresentada pelo 1º autor ESALQ-Piracicaba/SP, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

Results showed that the most appropriated method for detection and quantifying *Xcph*, was the pathogen extraction by soaking whole seeds in sterilized distilled water for 18-24 h, at 5°C and identification by inoculating the primary leaves indicators plants of the cv. CNF 0010 through scissors incision. This method showed reproducibility, high especificity, low cost and easy execution, with a sensibility of 0,1%, allowing analisys of 10 examples/technician/day and obtaining results in 8-10

days. Its application in a routine seed health testing and in programmes of seed certification are therefore recommended. Most of the certified seed produced in the State of São Paulo from 1988 dry and winter seasons and 1988/89 rainy season carried the bacterium and the incidence levels varied from 0,1 to 1,1%. This amount of inoculum in seeds may be enough to develop epidemics under climatic conditions favorable to disease development.

INTRODUÇÃO

Entre as doenças que afetam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em diferentes partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, está o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* incluindo "strain" *fuscans* (Dye et al., 1980). No Brasil, é uma doença que assume importância econômica principalmente no cultivo "das águas". É de ampla distribuição e de controle problemático, devido à dificuldade em se obter resistência nas cultivares comerciais, baixa eficiência do controle químico e ao sistema de cultivo em mais de uma época no mesmo ano. Além disso, o seu agente causal tem a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação (Kimati, 1980; Vieira & Sartorato, 1984; Bulisani et al., 1987).

Uma das medidas que tem trazido resultados eficientes do controle desta bacteriose é a utilização de sementes sadias produzidas em regiões de clima seco, onde as condições são desfavoráveis ao desenvolvimento da doença (Bulisani et al., 1987; Schaad, 1988a). Considerando a possibilidade de ocorrência de epidemias em campo a partir de sementes com baixo nível de incidência do patógeno (Wallen & Sutton, 1965; Kimati, 1980), torna-se importante, além das inspeções visuais de campo, contar com um método eficiente, sensível e rápido para a detecção do patógeno em lotes de sementes de feijão.

Existem diversas metodologias desenvolvidas em laboratório para a detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes de culturas de importância econômica, tais como, testes de crescimento, uso de bacteriófagos, inoculações em plantas indicadoras, uso de meios seletivos e semi-seletivos, técnicas serológicas e plaqueamento direto (Schaad, 1987; Rat, 1988a; Rodrigues Neto, 1988). Essas técnicas variam quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade em relação a semente/bactéria testadas e poucas são quantitativas. Geralmente, três etapas são importantes para obtenção de um método de detecção: a extração do patógeno, a identificação da espécie e a determinação da sensibilidade do método (Schaad, 1982, 1988b). Sendo a escolha do método de detecção função do conhecimento do patógeno e do propósito de uso do teste e levando-se em consideração características como rapidez, sensibilidade, reproducibilidade, especificidade e aplicação prática, a presente pesquisa tem por objetivos avaliar a detecção do patógeno através da comparação de quatro técnicas de extração e três métodos de identificação e

quantificar a sua incidência em amostras de sementes certificadas produzidas no Estado de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada nos laboratórios e casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba/SP, no período de 1986 a 1989.

AMOSTRAS DE SEMENTES E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Para avaliar a metodologia de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*), foram utilizadas 3 amostras de sementes de feijão, procedentes de plantios que apresentaram plantas com sintomas característicos de bacteriose: duas coletadas em campos experimentais do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina/PR (cvs. Rio Vermelho, Carnaval) e uma coletada em lavoura de Goiânia/GO (cv. EMGOPA 201-Ouro). Foram comparadas quatro técnicas de extração de *Xcph* a partir de sub-amostras de 1000, 500, 100 e 10 sementes. As técnicas de extração da bactéria consistiram de: a) imersão em água destilada esterilizada de sementes moídas (Taylor, 1970); b) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras, desinfestadas superficialmente em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo); c) imersão em água destilada esterilizada de sementes inteiras (Rat, 1987)¹ modificada pelo maior período de incubação e d) imersão de sementes inteiras em meio de cultura líquido (3g de extrato de levedura/l de água destilada esterilizada) (Velasquez & Trujillo, 1984). As quantidades de água destilada ou meio líquido variaram em função do número de sementes e das condições em que as mesmas foram submetidas: sementes moídas - 20-50 sementes/100 ml e sementes inteiras - 200-300 sementes/100 ml. Os extratos obtidos de sementes moídas foram submetidos a incubação por 2 horas sob condições de laboratório enquanto que aqueles de sementes inteiras foram incubados sem agitação em geladeira por 18-24 horas à 5°C para evitar a proliferação de bactérias saprofíticas. Posteriormente, a partir das suspensões obtidas, procedeu-se a identificação do patógeno.

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

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Serologia

Dois métodos serológicos foram comparados para a identificação da bactéria: a microprecipitina em placas (Romeiro & Fukuda, 1983) e a dupla difusão em gel-de-agar (Ouchterlony, 1958).

Para determinar a especificidade dos métodos serológicos, antissoros de *Xcph* e do "strain" *fuscans* (*Xcphf*), obtidos em laboratório pela técnica descrita por Kimati (1975) e que apresentaram títulos de 1:1024 e 1:512, respectivamente, foram testados contra diversos isolados de bactérias patogênicas ou saprofíticas à cultura do feijoeiro.

Para avaliar a sensibilidade dos métodos serológicos, procedeu-se a reação serológica, utilizando antissoros e antígenos homólogos submetidos a diferentes concentrações.

2. Isolamento em meios de cultura

Dois meios foram comparados para isolamento de *Xcph*: nutriente glucose agar (NGA): extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; glucose 2,5 g e agar 15,0 g/l (Schaad, 1988a) e EPGA - Extrato de levedura 3,0 g; peptona 7,0 g; glucose 15,0 g; amido (fécula de batata) 15,0 g e agar 15,0 g/l (Rat, 1987). Após a autoclavagem, foram adicionados aos meios NGA e EPGA, cefalexina (Keflex) e clorotalonil (Daconil), em concentrações de 40 µg e 50 µg/ml de ingredientes ativos, respectivamente, de modo a torná-los semi-seletivos.

A seletividade à *Xcph* dos meios de cultura, com ou sem a adição do antibiótico e do fungicida, foi testada incluindo outros microorganismos patogênicos e não-patogênicos associados ao feijoeiro.

3. Inoculação em planta indicadora

Para identificar *Xcph* em sementes de feijão através da inoculação em plantas indicadoras, foram comparadas três cultivares, CNF 0010, Rosinha G-2 e Cornell 49-242 e duas técnicas de inoculação: agulhas múltiplas (Pompeu & Crowder, 1973) e incisão de folhas primárias com tesoura (Rava, 1984).

Em folhas primárias de plântulas das três cultivares, com 8 dias de idade, foram feitas inoculações dos extratos obtidos através das técnicas de incisão com tesoura e agulhas múltiplas. Após a inoculação, as plântulas foram colocadas sob condições de câmara úmida por 48 horas, mantendo-se à temperatura de 28-30°C. Após a incubação, as plântulas foram mantidas em casa-de-vegetação até completar o período de 7-10 dias. A avaliação constou em detectar a presença de sintomas de bacteriose, caracterizados por clorose e murcha dos bordos das folhas na região de inoculação.

Como controle, utilizou-se plântulas inoculadas com água destilada ou meio líquido esterilizados e, também plântulas inoculadas com *Xcph* e *Xcphf* na concentração de 10^8 ufc/ml.

Para avaliar a especificidade, diversos isolados de bactérias e fungos associados às sementes e folhas, patogênicos ou não ao feijoeiro, foram inoculados em plântulas de feijoeiro nas concentrações de 10^8 ufc/ml (bactérias) e 10^4 - 10^5 conídios/ml (fungos). A avaliação dos sintomas produzidos foi feita 7 a 10 dias após a inoculação.

A sensibilidade do método foi determinada através da incubação de diferentes sub-amostras de sementes em água destilada esterilizada por 18-24 horas à 5°C e a suspensão obtida inoculadas em plântulas conforme metodologia descrita anteriormente.

Para estimar quantitativamente o transporte de *Xcph* pela semente, amostras de sementes da cultivar IAC-Carioca, coletadas em plantas de campos de produção de sementes do Estado de São Paulo, cultivos da "seca" e de "inverno", 1988 e cultivo "das águas" em 1988/89, foram analisadas pelo método do Número Mais Provável (Cochran, 1950), conforme Tabela 1. De cada amostra foram tomadas sub-amostras de 500, 100 e 10 sementes e colocadas em frascos de Erlenmeyer com água destilada esterilizada e submetidas a incubação por 18-24 horas em geladeira a 5°C e, em seguida, a suspensão foi inoculada em plântulas conforme metodologia descrita anteriormente.

4. Teste de aferição do método selecionado

Após a determinação inicial da incidência da bacteriose (padrão), uma mesma amostra de sementes da cv. EMGOPA 201-Ouro, naturalmente portadora de *Xcph*, foi encaminhada para sete Laboratórios de Análise de Sanidade de Sementes de Instituições de Pesquisa para executar a aferição do método de detecção selecionado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Serologia

Na determinação da especificidade dos métodos serológicos, os resultados mostraram que, pela microprecipitina em placas, os antissoros de *Xcph* e *Xcphf* reagiram com os isolados bacterianos de diversas espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, indicando reação cruzada.

Pelo método da dupla difusão, o antissoro de *Xcph* reagiu apenas com seu homólogo e o antissoro *Xcphf* reagiu tanto com seu homólogo como o heterólogo indicando menor especificidade de ação deste antissoro na caracterização de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Nenhum dos 10 isolados "contaminantes" bacterianos testados por ambos os métodos, reagiu com os antissoros de *Xcph* e *Xcphf*. Esse mesmo padrão de comportamento foi constatado por Link & Sharp (1927), Trujillo & Saettler (1981) e Oleas Arias (1982).

Com relação a sensibilidade, constatou-se que os antissoros de *Xcph* e *Xcphf* foram eficientes na detecção da presença dos antígenos homólogos até as concentrações de $3,2 \times 10^6$ e $4,6 \times 10^6$ ufc/ml, respectivamente, não

TABELA 1. 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 a 500 sementes	5 a 100 sementes	5 a 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

Fonte: SWAROOP (1951).

verificando diferenças na utilização dos antissoros concentrados ou diluídos.

Considerando que o antissoro *Xcphf* apresentou maior capacidade de ação na caracterização de *Xcph* e *Xcphf*, o mesmo foi selecionado para avaliações posteriores.

2. Isolamento em meios semi-seletivos

Com relação ao método de isolamento em meios de cultura (NGA e EPGA), os resultados obtidos mostraram que os isolados do gênero *Xanthomonas* (*Xcph*, *Xcphf*, *X*.

campestris pv. *cùtri*, *X. campestris* pv. *malvacearum*) cresceram normalmente em ambos os meios, com e sem antibiótico/fungicida, enquanto que os isolados de *Pseudomonas* spp., *Bacillus*, *Erwinia* spp., *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e 10 "contaminantes" frequentemente isolados de sementes de feijão, foram completamente inibidos pela cefalexina e pelo clorotalonil.

Apesar de ambos os meios apresentarem comportamentos semelhantes em relação a *Xcph* e *Xcphf* e aos demais isolados de microorganismos testados, NGA foi selecionado para avaliar as técnicas de extração, considerando a maior facilidade para caracterizar as colônias de *Xcph* e *Xcphf* em termos de coloração e forma devido a sua transparência.

3. Inoculação em planta indicadora

Tanto a técnica de inoculação por incisão com tesoura como a de agulhas múltiplas foram eficientes na expressão dos sintomas do crestamento bacteriano. Entretanto, a primeira foi a técnica de inoculação adotada para os ensaios posteriores, por ter sido mais prática e de maior rendimento, além de proporcionar maior nitidez na manifestação de sintomas. As cultivares testadas como planta indicadora, CNF 0010 e Rosinha G-2, não diferiram entre si e foram superiores a Cornell 49-242, quanto a expressão de sintomas do crestamento. Segundo a literatura, essas cultivares têm se mostrado de alta suscetibilidade à *Xcph* e, por isso, vêm sendo utilizadas como controle nos trabalhos de melhora genética (Pompeu, 1987; Rava *et al.*, 1900).

Na comparação das técnicas de extração e métodos de identificação de *Xcph*, a partir de sub-amostras de sementes de diferentes tamanhos, nas três cultivares de feijoeiro, a técnica de extração da bactéria através da imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada proporcionou severidade média de sintomas do crestamento, estatisticamente superior às obtidas pelas técnicas de extração a partir de sementes moídas e inteiras desinfestadas, não diferindo significativamente em relação à técnica de extração de sementes inteiras imersas em meio líquido (Tabela 2). Considerando o efeito do tamanho de sub-amostras, observou-se que mesmo as sub-amostras de 10 sementes possibilitaram consistência na detecção do patógeno.

Os melhores resultados de identificação do patógeno por meio de isolamento em meio de cultura foram alcançados a partir das técnicas de extração de sementes moídas e inteiras, imersas em água destilada esterilizada. Quanto a sensibilidade do método, embora os dados não sejam consistentes, houve uma tendência em se observar colônias típicas de *Xcph* a partir de sub-amostras maiores (1000 e 500 sementes). Considerando-se o efeito do tamanho de sub-amostras, este método proporcionou resultados consistentes até as sub-amostras de 500 sementes (Tabela 2).

Com relação ao método serológico, o melhor resultado de identificação de *Xcph* através de dupla difusão foi alcançado pela extração da bactéria a partir de sementes inteiras imersas em água destilada esterilizada. Também,

por este método, verificou-se que as amostras de sementes testadas foram portadoras do patógeno; através da técnica de extração mais eficiente, as reações serológicas positivas foram consistentemente observadas para sub-amostras de até 500 sementes contra o antissoro de *Xcphf* (Tabela 2).

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 de hipoclorito de sódio 2,5% e imersas em água destilada esterilizada, seguida de identificação por inoculação em planta indicadora. Já Ednie & Needham (1973) utilizaram três etapas para a detecção dessa bactéria: extração a partir de sementes moídas pré-desinfestadas com NaOCl 1%, isolamento em YDC e identificação por fago específico e/ou inoculação em planta indicadora. Esses procedimentos apresentam discordâncias em relação aos obtidos na presente pesquisa, uma vez que a extração da bactéria de sementes inteiras desinfestadas superficialmente, assim como testes preliminares de inoculação por injeção, foram superados em eficiência por outras variações. Considerando que esse patógeno pode se estabelecer tanto externa como internamente à semente (Weller & Saettler, 1980; Velasquez & Trujillo, 1984), a desinfestação pode ter propiciado a eliminação do inóculo externo. Segundo Rat (1988b), a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio ou cálcio foi eficiente na eliminação de microorganismos localizados sobre a superfície da semente.

Segundo Oleas Arias (1982), o método serológico por difusão em agar apresentou alta especificidade, porém, baixa sensibilidade na identificação do patógeno a partir da suspensão obtida por imersão das sementes inteiras em meio líquido ou água em relação à planta indicadora. Kiraly *et al.* (1984) estabeleceram que o antígeno, para ser usado em teste de dupla difusão, deveria conter 10^{10} células/ml. Trujillo & Saettler (1981) obtiveram excelentes resultados com preparações antígenos de células mortas e vivas contendo entre 6×10^6 e 1×10^7 células/ml. Segundo Rat (1988a), a técnica serológica permite a identificação da bactéria com uma boa segurança. Dos vários tipos, a microprecipitina em placas e a imuno-difusão em agar podem ser empregadas sobre culturas puras porque exigem grande quantidade de células bacterianas, isto é, sua sensibilidade é muito baixa e somente podem ser usadas para a confirmação da identificação.

Com relação ao isolamento direto em meios de cultura, Schaad (1982), prefere usar um meio menos rico como nutriente agar (NA), que reduz o crescimento de bactérias saprofitas; entretanto, a desvantagem do NA em relação a outros meios é que as colônias de *X. campestris* são difíceis de serem distinguidas de outras bactérias produtoras de pigmentos a marelos. Além disso, a detecção de pequeno número de bactérias fitopatogênicas em sementes tem sido difícil por causa do número relativamente grande de bactérias saprofitas taxonomicamente relacionadas aos patógenos, que os acompanham e interferem com seu crescimento sobre meios seletivos (Schaad & White, 1974). Ainda segundo Schaad (1982) e Mohan & Schaad (1987), enquanto que meios semi-seletivos melhoram a chance de sucesso no

TABELA 2. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) em sementes de três cultivares de feijoeiro, comparando-se médias de quatro técnicas de extração e três métodos de identificação do patógeno.¹

Técnicas de extração tamanho de sub-amostras de sementes	Cv. Rio Vermelho			Cv. Carnaval			Cv. Emgopa 201-ouro		
	Inoculação em plântulas ⁽²⁾	Serologia (DDGA) <i>Xcphf</i>	Isolamento em meio cultura (NGA)	Inoculação em plântulas	Serologia (DDGA) <i>Xcphf</i>	Isolamento em meio cultura (NGA)	Inoculação em plântulas	Serologia (DDGA) <i>Xcphf</i>	Isolamento em meio cultura (NGA)
Sementes moídas e suspensão em água por 2 horas, à temperatura ambiente									
1000	3,75 a	-	+	3,50 a	-	+	3,95 a	-	+
500	4,00 a	-	+	2,65 b	-	+	3,55 ab	-	-
100	3,00 b	-	+	2,50 bc	-	-	3,50 b	-	+
10	2,65 c	-	-	2,10 c	-	-	2,90 c	-	-
Média	3,25 BC			2,68 c			3,47 c		
Sementes inteiras com desinfestação superficial e suspensão em água, por 18-24h, à 5°C									
1000	3,55 a	+	+	3,15 ab	+	-	4,25 a	+	+
500	3,55 a	+	+	3,75 a	-	+	4,10 ab	+	+
100	2,80 b	-	-	2,19 bc	-	-	4,05 b	-	-
10	2,65 c	-	-	2,35 c	-	-	3,00 c	-	-
Média	3,03 c			2,86 B			3,85 B		
Sementes inteiras, suspensão em água por 18-24h, à 5°C									
1000	4,40 a	+	-	4,10 a	+	+	5,00 a	+	+
500	3,90 a	+	+	4,25 a	+	+	4,65 ab	+	-
100	3,85 b	+	+	3,90 b	+	-	4,35 b	+	+
10	3,50 c	-	-	3,05 b	-	-	3,75 c	-	-
Média	3,61 A			3,82 A			4,43 A		
Sementes inteiras, suspensão em meio líquido por 18-24h, à 5°C									
1000	4,20 a	+	+	3,65 a	-	+	4,65 a	+	+
500	3,70 a	+	+	3,55 a	+	+	4,50 ab	+	+
100	3,65 b	+	-	3,50 a	+	-	4,30 b	-	-
10	3,20 c	-	-	3,00 a	-	-	3,25 c	-	-
Média	3,68 AB			3,42 A			4,17 AB		
Controles:									
<i>Xcph</i> (10 ⁸ ufc/ml)	5,30	+	+	5,00	+	+	5,50	+	+
<i>Xcphf</i> (10 ⁸ ufc/ml)	5,00	+	+	5,30	+	+	5,40	+	+
Água ou meio líquido esterilizados	1,00	-	-	1,00	-	-	1,00	-	-

(¹) Média de 4 repetições. Valores seguidos pela mesma letra minúscula (vertical), não diferem entre si, na comparação dentro de cada técnica de extração. Valores médios seguidos pela mesma letra maiúscula (vertical) indicam que as técnicas de extração não diferem entre si (Teste de Tukey a 5%). (+) presença ou (-) ausência de reação serológica ou colônias de *Xcph*

(²) Severidade de sintomas. Escala de 1 - ausência de sintomas a 6 - máxima quantidade de doença.

isolamento de patógenos, há necessidade de confirmar a sua identidade por testes de patogenicidade. Outros pontos que parecem ser limitantes são: o alto custo dos agentes inibidores de crescimento de saprófitas, a possibilidade de reduzir o crescimento do próprio patógeno, a necessidade de pessoal qualificado para obtenção dos meios e principalmente, a falta de segurança nos resultados obtidos.

Parâmetros avaliados em relação ao método de inoculação da planta indicadora

Os resultados de avaliação da especificidade do método da planta indicadora (Tabela 3) mostraram sintomas característicos de clorose dos cortes e murcha dos bordos das folhas primárias apenas nas plântulas da cv. CNF 0010 inoculadas com isolados de *Xcph* e *Xcphf* entre 7 a 10 dias após a inoculação. É interessante mencionar que nenhum dos 10 isolados bacterianos "contaminantes" de sementes e folhas de feijoeiro produziu sintoma em plântulas de feijoeiro, concordando com os resultados obtidos por Saettler (1971).

Na determinação da sensibilidade do método de inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010) (Tabela 4), observou-se que até a diluição de 1 semente infectada ou contaminada por *Xcph* em 1000, o método apresentou 100% de eficiência na detecção, a partir do qual a eficiência decresceu, atingindo 60% na diluição de 1:4000. Esses resultados mostraram que o método de inoculação em planta indicadora apresentou sensibilidade de 1:1000, ou seja, eficiência de 0,1%. Malin *et al.* (1983) obtiveram sucesso na detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão. Por meio da técnica da

imunofluorescência indireta foi possível detectar níveis de infecção de 1:10000. Segundo Geng *et al.* (1983), a sensibilidade caracteriza a confiabilidade do método e deve ser determinada antes da sua utilização em programas de certificação de sementes.

A Tabela 5 mostra os resultados de aferição do método de detecção de *Xcph* através da extração pela imersão de sementes inteiras em água destilada esterilizada e identificação por inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010) por incisão com tesoura.

Os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios indicaram uma incidência de *Xcph* nas sementes, variando de 1,1 a 3,5% que comparados com o padrão (2,4%) e, de acordo com a Tabela 1, de interpretação de resultados, estão dentro dos limites inferiores e superiores permitidos de 0,8 a 7,5%, respectivamente, mostrando que o método de detecção apresentou reproducibilidade.

Quantificação da incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) em amostras de sementes

Das oito amostras coletadas em nove municípios do Estado de São Paulo, correspondentes ao cultivo da "seca" de 1988, observou-se que a incidência de *Xcph* em sementes de cinco amostras variaram de 0,2 a 1,1% (Tabela 6). Dos correspondentes campos de produção, somente em dois deles se constatou a bacteriose, em níveis insignificantes, sendo que o método de detecção não acusou a presença de *Xcph* em sementes originárias dos mesmos (067 e 069). Com relação ao cultivo de "inverno" das oito amostras coletadas de oito campos de produção, a incidência de *Xcph* variou de 0,1 a 0,7%. Dos

TABELA 3. Sintomas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) em plantas indicadoras inoculadas através da técnica de incisão com tesoura⁽¹⁾.

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

(1) Médias de 4 repetições (vasos) com 4 plantas/vaso;

(2) Concentração de inóculo: 10⁸ ufc/ml (bactérias) e 10⁴-10⁵ conídios/ml (fungos);

(3) Escala de notas de 1 (ausência de sintomas) a 6 (máxima quantidade de doença).

TABELA 4. Sensibilidade do método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) em planta indicadora (cv. CNF 0010).

Proporção de sementes infectadas por sub-amostras	Volume de água (ml)	% plantas com sintomas de cretamento bacteriano comum ⁽¹⁾										% resultados positivos
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1/100	40	60	80	100	100	90	80	85	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												
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
<i>Xcph</i> (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.

TABELA 5. Reproducibilidade do método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em planta indicadora (CNF 0010), através da técnica de incisão com tesoura.

Laboratório de análises de sementes	nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos			Estimativa de incidência (%) de <i>Xcph</i> em sementes
	1 de 500	5 de 100	5 de 10	
1. Padrão	1	5	0	2,4
2. ESALQ/Piracicaba/SP	1	5	0	2,4
3. ESAL/Lavras/MG	1	4	1	1,7
4. IAPAR/Londrina/PR	1	4	1	1,7
5. UNESP/Botucatu/SP	1	3	1	1,1
6. IAC/Campinas/SP	1	5	1	3,5
7. CATI/Campinas/SP	1	4	2	2,2
8. IB/São Paulo/SP	1	2	3	1,2

correspondentes campos, somente em dois deles se constatou a bacteriose sendo que desses, apenas em um (040), o método de detecção acusou a presença de *Xcph* (0,4%). Ainda pela Tabela 6, apenas quatro amostras de dois municípios foram analisadas, correspondente ao cultivo "das águas" e os resultados da análise em laboratório indicaram a incidência da bacteriose de 0,3 a 1,1%. Os laudos de campo acusaram níveis insignificantes de incidência da bacteriose nos quatro campos de produção.

Os testes de sementes em laboratório que revelaram resultados negativos para a presença de *Xcph* não asseguram que as amostras de sementes analisadas estejam

livres da bactéria, conforme relata Taylor *et al.* (1979), mas indicam que as amostras devem conter menos que 0,1% de sementes portadoras do patógeno, ou ainda, podem estar livres do mesmo, uma vez que o método apresentou sensibilidade de até 0,1% com 100% de segurança.

O método da planta indicadora apresentou alta especificidade e maior sensibilidade na detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão do que os métodos comparados (serologia e isolamento direto em meio de cultura); esse procedimento possibilitou a clara distinção entre as técnicas de extração e permitiu a identificação segura e direta do patógeno. Portanto, a

TABELA 6. Incidência (%) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcph*) em amostras de sementes certificadas de feijão, cv. IAC-carioca, produzidas no Estado de São Paulo.

Amostras de sementes e safra de cultivo	Localidades de Produção	Nº de sub-amostras de sementes com resultados positivos ⁽¹⁾			Incidência (%) de <i>Xcph</i> nas sementes ⁽²⁾	Laudo de inspeção de campo ⁽³⁾
		1 de 500	5 de 100	5 de 10		
Cultivo da seca						
617	Itapeva	0	0	0	< 0,1	-
067	Itaí	0	0	0	< 0,1	+
069	Coronel Macedo	0	0	0	< 0,1	+
665	Itapetininga	0	1	1	0,2	-
682	Capão Bonito	1	2	1	0,7	-
584	Capão Bonito	1	1	3	0,9	-
680	Itapetininga	1	2	2	1,0	-
628	Itapeva	1	3	1	1,1	-
Cultivo de inverno						
046	Fernandópolis	0	0	0	< 0,1	+
042	Presidente Prudente	0	0	0	< 0,1	-
099	Ibitinga	0	0	0	< 0,1	-
937	Santo Anastácio	1	0	0	0,1	-
048	Jaboticabal	0	1	2	0,3	-
040	Ribeirão Preto	0	2	2	0,4	+
073	S.J. do Rio Preto	1	1	1	0,5	-
119	Araçatuba	1	2	1	0,7	-
Cultivo das águas						
38	Itapetininga	1	1	0	0,3	+
60	Itapetininga	1	2	0	0,5	+
05	Avaré	1	2	2	1,0	+
10	Avaré	1	3	1	1,1	+

(1) Método de detecção: extração por suspensão em água, de sementes inteiras, 18-24 horas a 5°C + inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010), por incisão por tesoura;

(2) Tabela de interpretação de resultados;

(3) Serviço de Produção de Sementes, Matrizes e Mudanças, CATI, Campinas/SP;

(+) Níveis insignificantes de ataque do crestamento em campo;

(-) Ausência de sintomas.

detecção de *Xcph* através da extração em sementes inteiras imersas em água destilada e esterilizada e incubação à 5°C, por 18-24 horas e identificação por meio de inoculação em planta indicadora (cv. CNF 0010), pode fornecer resultados dentro de 8-10 dias, sendo possível avaliar cerca de 10 amostras/dia/técnico. Além disso, apresentou as seguintes vantagens: fácil execução, baixo custo, com sensibilidade de 0,1%, reproduzível, permitindo estimar quantitativamente o transporte do inóculo pela semente, o que possibilita a sua utilização em laboratórios de análises de rotina e, possivelmente, em programas de certificação de sementes de feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics*. 6:105-116. 1950.

- 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):153-168. 1980.
- EDNIE, A.B. & NEEDHAM, S.M. Laboratory test for internallyborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field bean (*Phaseolis vulgaris* L.) seed. *Proceedings Associations of Official Seed Analysis*, Oklahoma City, 63:76-82. 1973.
- GENG, S.; CAMPBELL, R.N.; CARTER, M.; HILLS, F.J. Quality control programs for seedborne pathogens. *Plant Dis. Repr.* 67(2):236-242. 1983.
- 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.
- KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSEY, F. & VÖROS, J. *Methods in plant pathology*. 50p. Elsevier Scientific. Publishing Amsterdam, 1974. 509p.
- LINK, K.K. & SHARP, C.G. Serological differentiation of *Bacterium campestris* from *B. phaseoli*, *B. phaseoli sojense* and *B. flaccumfaciens*. *Phytopathology* 17:53-54. 1927.
- MALIN, E.M.; ROTH, D.A.; BELDEN, E.E. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Dis.* 67(6):645-647. 1983.
- MOHAN, S.K. & SCHAAD, N.W. An improved agar plating assay for detection *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology* 77:1390-1395. 1987.
- 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, ESALQ-USP, 1982. 81p. (Tese Mestrado).
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy* 5:1-78. 1958.
- POMPEU, A.S. Melhoria de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BULISANI, E.A., coord. *Feijão: fatores de produção e qualidade*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap. 1, p. 1-28.
- RAT, B. Control of seed borne bacteria. In: *ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY*, Passo Fundo, 1987. *Proceedings*. Brasília, ABRATES, 1988a. p. 258-263.
- RAT, B. How to avoid the dissemination of diseases in germoplasm exchange: case of the bacteria. In: *ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY*, Passo Fundo, 1987. *Proceedings*. Brasília, ABRATES, 1988b. p. 72-74.
- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesq. Agrop. Bras.* 19(4):445-448. 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 Phytopathol.* 16(2):83-91. 1990.
- RODRIGUES NETO, J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: *SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES*, 3., Lavras, 1988. *Anais*. Campinas, Fundação Cargill, 1988, p. 123-139.
- ROMEIRO, R.S. & FUKUDA, C. Método simples para determinação de aglutinação e/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. *Fitopatol. bras.* 8:93-95, 1983.
- SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid in identifying bean blight bacteria. *Plant Dis. Repr.* 55(8):703-706. 1971.
- SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial pathogens. *Plant Dis.* 66:885-890. 1982.
- SCHAAD, N.W. Use and limitations of methods to detect seedborne bacteria. In: *ADVANCED INTERNATIONAL COURSE OF SEED PATHOLOGY*, Passo Fundo, 1987. Brasília, ABRATES, 1987. p. 324-332.
- SCHAAD, N.W. Bacteria. In: *ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY*, 76., ONTARIO, 1984. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Phytopathology.* 78(6):872-875. 1988a.
- SCHAAD, N.W. Use and limitations of methods to detect seedborne bacteria. In: *ADVANCED INTERNATIONAL COURSE OF SEED PATHOLOGY*. p. 324-332. ABRATES, Brasília, 1988b.
- SCHAAD, N.W. & WHITE, W.C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 64:876-880. 1974.
- 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): 107-134. 1951.
- TAYLOR, J.D.; DUDLEY, C.L.; PRESLEY, L. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Ann. of Appl. Biol.* 93: 267-277. 1979.
- VELASQUEZ, N.C. & TRUJILLO, G. 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. 1984.
- 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).
- WALLEN, V.R. & SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr. & Burkh. on field bean in Ontario. *Can. J. Bot.* 43: 437-446. 1965.

WEBSTER, D.M.; TEMPLE, S.R.; SCHWARTZ, H.F.
Selection for resistance *Xanthomonas phaseoli* in dry
beans. *Crop Science* 20(4): 519-522. 1980.

WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Evaluation of
seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli*
var. *fuscans* as primary inocula in bean blights.
Phytopathology 70: 148-152. 1980.
