

CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA FOLIAR E INFECÇÃO
DE SEMENTES EM VARIEDADES DE FEIJOEIRO INOCU-
LADAS COM *XANTHOMONAS PHASEOLI* (E. F. SM.) DOWS. 1939

ABRAHAM RUPERTO OLEAS ARIAS

Orientador: Prof. ARMANDO BERGAMIN F^º

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março, 1982

A meus pais,

a meus irmãos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO, pela valiosa colabo
ração como Orientador e pela revisão dos originais;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, pe
las importantes sugestões e estímulo;

À Fundação Alemã para o Desenvolvimento Internacional, pela bolsa concedida;

Ao Programa Nacional de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganaderia del ECUADOR pela autorização concedida para a realização do curso.

Ao Professor Dr. HIROSHI KIMATI, pelas valiosas sugestões, fornecimento de material bibliográfico e revisão dos originais;

Ao Eng^o Agr^o M.S. CRISTOBAL BARRA D. pelos trâmites para a obtenção da bolsa, sua amizade e estímulo;

Aos Eng^{os} Agr^{os} Dr. ALOISIO SARTORATO da EMBRAPA e Dr. ANTONIO MENTEN do CENA pelo fornecimento das culturas bacterianas e sementes;

Ao Eng^o Agr^o Dr. OSVALDO PARADELA FILHO, pelo fornecimento de culturas bacterianas;

Ao Eng^o Agr^o JÚLIO RODRIGUES NETO, pela amizade, fornecimento de culturas bacterianas e sugestões;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação de Fitopatologia, pela amizade e constante estímulo;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração na realização dos trabalhos de laboratório e casa de vege
tação;

Ao Professor Dr. ZILMAR ZILLER MARCOS, pela versão do resumo em Inglês;

Ao Sr. Antonio Vitti, por seu magnífico trabalho datilográfico desta Tese;

Aos Eng^os Agr^os JAIME DE LATORRE, ROSA M. VALDEBENITO, ROBERTO AREVALO, LILIAN AREVALO, JESÚS ACOSTA e NEWTON DE CASTRO FEGIES, pela valiosa amizade e colaboração;

As pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Antecedentes e Sobrevivência	3
2.2. Processos de Disseminação, Infecção e Sintomatologia.	6
2.3. Métodos de Inoculação e Avaliação	8
2.4. Resistência Varietal e Patogenicidade de Isolados	11
2.5. Recuperação de <i>X. phaseoli</i> de Sementes	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Local de Pesquisa	17
3.2. Origem das Variedades de Feijoeiro	17
3.3. Isolados.	18
3.3.1. Meios de cultura	19
3.3.2. Conservação dos isolados	19
3.3.3. Caracterização dos isolados e testes de patogenicidade	20
3.4. Resistência Varietal e Transmissão de <i>X. phaseoli</i> pela Semente	20
3.4.1. Condições de casa de vegetação	20
3.4.2. Preparo de inóculo	20
3.4.3. Métodos de inoculação	22
3.4.4. Isolamento de <i>X. phaseoli</i> de sementes	22
3.4.5. Cinética do crescimento de <i>X. phaseoli</i> no tecido foliar de feijoeiro.	23
3.4.6. Verificação dos isolados das sementes através de método serológico	24
3.4.7. Provas de patogenicidade dos isolados de sementes	24
3.4.8. Planejamento dos ensaios e análise estatística	25

	<u>Páginas</u>
3.4.9. Avaliações	26
3.5. Serologia	29
3.5.1. Preparo do antígeno	29
3.5.2. Obtenção do anti-soro	30
3.5.3. Titulação do anti-soro	30
3.5.4. Reação serológica dos isolados de sementes . . .	31
3.5.5. Reação serológica de isolados de <i>X. phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.	31
4. RESULTADOS	32
4.1. ENSAIO I: Comportamento de Variedades de Feijoeiro Inoculadas por Atomização com o Isolado 82-Da de <i>X.</i> <i>phaseoli</i> , em Três Idades Diferentes	32
4.1.1. Reação das folhas à inoculação	32
4.1.2. Cinética do crescimento de <i>X. phaseoli</i> no tecido foliar das variedades Carioca, México-29 e Tepar- ry	34
4.1.3. Estudo de infecção de vagens	38
4.1.4. Infecção das sementes	38
4.1.5. Verificação serológica dos isolados de sementes.	39
4.1.6. Prova de patogenicidade com os isolados de semen- te	41
4.2. ENSAIO 2: Inoculação do Isolado 82-Da de <i>X. phaseoli</i> em Vagens de Variedades de Feijoeiro pelo Método de Riscas na Sutura Dorsal	42
4.2.1. Comportamento de vagens de variedades de feijão inoculadas com <i>X. phaseoli</i>	42
4.2.2. Avaliação visual de sementes com sintomas de in- fecção de <i>X. phaseoli</i>	43
4.2.3. Avaliação de sementes infectadas de variedades de feijoeiro analisadas no laboratório	44
4.2.4. Verificação serológica dos isolados de sementes.	45
4.2.5. Prova de patogenicidade dos isolados de semente.	49
4.3. ENSAIO 3: Comportamento de Cinco Variedades de Fei- joeiro Inoculadas com Cinco Isolados de <i>X. phaseoli</i> .	50

	<u>Páginas</u>
4.4. Serologia	52
4.4.1. Reação serológica dos isolados	52
4.4.2. Titulação de anti-soros	53
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Reação de Variedades de Feijoeiro Inoculadas com <i>X. phaseoli</i> em Diferentes Idades	55
5.2. Cinética do Crescimento Bacteriano no Tecido Foliar	57
5.3. Infecção de Vagens	59
5.4. Infecção de Sementes	60
5.5. Verificação serológica dos isolados de sementes	63
5.6. Provas de Patogenicidade	64
5.7. Reação de Variedades de Feijoeiro à Inoculação com Isolados de <i>Xanthomonas phaseoli</i>	66
6. CONCLUSÕES	69
7. RESUMO	71
8. SUMMARY	72
9. LITERATURA CITADA	73
APÊNDICE	I

1. INTRODUÇÃO

O feijão, por seu conteúdo protéico e alto valor energético, constitui-se no alimento básico para a população do país. O Brasil, no ano de 1980, teve uma área colhida de 4.637.714 ha e uma produção de 1.968.894 de toneladas de feijão; não obstante ser um dos maiores produtores e consumidores do mundo, a produção por unidade de área é baixa, sendo esta de 424 kg/ha (DOSSA, 1981).

A produção baixa deve-se a diversos fatores, estando entre os mais importantes as doenças (KIMATI, 1980). Dentre estas mencionam-se o "Crestamento Comum", causado por *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows. e o "Crestamento Fosco", causado por *X. phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr. & Burk. Estas bacterioses constituem problemas endêmicos praticamente em todas as regiões onde se cultiva o feijoeiro (ZALMEYER e THOMAS, 1957; COYNE et alii, 1965). Pesquisas de campo em Ontário, Canadá, durante dois anos, permitiram a WALLEN e JACKSON (1975) calcular em 38% da produção as perdas devidas a essas doenças. Na Colômbia, foi calculada uma diminuição da produção de 22 e 45%, em culturas de feijão infectadas natural e artificialmente com os crestamentos, respectivamente (YOSHII et alii, 1976).

Os fatos anteriormente mencionados mostram a importância destas doenças. Além disso, o problema se acentua considerando-se a capacidade dos patógenos que as causam de serem transmitidos pela semente (SCHUSTER e COYNE, 1974). A semente infectada é o principal meio de disseminação e sobrevivência da bactéria. Esta fonte de inóculo primário está em condi

ções de dar origem a novos focos de infecção, pois considera-se que populações mínimas de 10^3 - 10^4 bactérias por semente podem produzir plantas infectadas em condições de campo (WELLER e SAETTLER, 1980). Por outro lado, bastaria 0.5% de sementes infectadas para ocasionar sérias epidemias (WALLEN e SUTTON, 1965). Isto determina a importância de se contar com métodos seguros e rápidos para a verificação de sementes infectadas com estas bactérias em lotes destinados a novas culturas; neste sentido, pesquisadores brasileiros têm feito a determinação da ocorrência destas bacterioses na semente de feijão, mas não se conhecem dados quantitativos sobre este particular.

Tomando em consideração os fatos acima citados, a presente pesquisa visa estudar:

1. A transmissão de *X. phaseoli* pela semente em variedades consideradas resistentes e suscetíveis.
2. Um método que permita a detecção rápida da bactéria na semente.
3. A correlação entre a resistência das folhas e vagens com o grau de transmissibilidade do patógeno pelas sementes.
4. O comportamento de variedades inoculadas com vários isolados de *X. phaseoli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes e Sobrevivência

O "Crestamento Comum" foi reconhecido pela primeira vez nos Estados Unidos em 1892, sendo constatado, atualmente, em numerosas regiões produtoras de feijão do mundo, constituindo-se numa das principais doenças bacterianas desta cultura (CRISPIN e CAMPOS, 1976; HARRISON et alii, 1964; ZAUMEYER e THOMAS, 1957).

De acordo com ZAUMEYER e THOMAS (1957), em 1897, Smith descreveu e denominou o agente causal do "Crestamento Comum" como *Bacillus phaseoli* (E.F.Sm.). Em 1901, o mesmo pesquisador delineou as características culturais do organismo e transferiu-o ao gênero *Pseudomonas*. Até este período, a maioria dos bacteriologistas seguia a classificação de Migula. Em 1905, Smith transferiu o patógeno para o gênero *Bacterium*, chamando-o então *Bacterium phaseoli*. Posteriormente, foi proposto outro sistema de classificação, que se fosse adotado, definiria o patógeno como *Phytomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Bergey et alii. Mais recentemente outra modificação foi feita, e a bactéria passou a ser citada como *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows, 1939.

YOUNG et alii (1978) propuseram uma mudança na classificação das espécies de *Xanthomonas*, baseados na emenda reportada por DYE e LELLIOT (1974), na qual as espécies e subespécies deste gênero são geralmente indistinguíveis em provas morfológicas e bioquímicas, salvo por sua série hospedeira, sugerindo a denominação de patovares de *X. campestris*. Assim,

na atualidade, alguns pesquisadores já estão utilizando a nova nomenclatura, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Dye 1978b (DYE et alii, 1980). Neste trabalho utilizou-se a classificação sugerida por Dowson, *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows. 1939, que é mais conhecida, pois a nova classificação ainda não está em uso generalizado.

As bactérias fitopatogênicas, em sua maioria, são aeróbias e não formam endosporos ou estruturas similares, como ocorre com outros organismos. Segundo SCHUSTER e COYNE (1974), a uniformidade genética das culturas vegetais favorece o estabelecimento e perpetuação dos patógenos, mas o êxito da sobrevivência das bactérias fitopatogênicas depende, em parte, da quantidade de inóculo produzido e da continuidade ou descontinuidade das culturas hospedeiras. Mesmo uma pequena quantidade de inóculo primário pode originar rapidamente uma epidemia, devido ao curto tempo de geração do patógeno.

De acordo com SCHUSTER e COYNE (1977), as células bacterianas em estado hipobiótico podem viver longos períodos sem exigir nutrientes e têm grande aptidão para sobreviver em condições físicas e químicas adversas. Uma das formas mais eficientes de sobrevivência é sobre ou dentro da semente (ZALMEYER e THOMAS, 1957; SAETTLER e PERRY, 1972; SCHUSTER e COYNE, 1974). As células bacterianas sobrevivem tanto tempo quanto a semente permanece viável (SCHUSTER e COYNE, 1974; KIMATI, 1980); na literatura, porém, constata-se relatos contraditórios em relação à recuperação de células bacterianas de sementes de diferentes idades. Provavelmente, isto se deve a diversas condições de temperatura e umidade de armazenagem, linhagens diferentes e à duração das pesquisas.

BURKHOLDER (1921) informou que, em sementes de feijão Red Kidney, de dois anos de idade, detectou-se a presença de *X. phaseoli* e que sementes de três anos, plantadas, produziram plantas com "Crestamento Comum". De igual forma, BASU e WALLEN (1966) isolaram esta bactéria de sementes armazenadas a 20-35°C durante três anos.

ZALMEYER e THOMAS (1957) isolaram a bactéria de semente de feijão de dez anos de idade e SCHUSTER e SAYRE (1967) informaram que a bactéria foi recuperada de semente armazenada a 10°C durante quinze anos. Segundo trabalhos feitos por numerosos pesquisadores, considera-se que as bactérias isoladas de semente são normalmente viáveis e apresentam patoge-

nicidade (SCHUSTER e COYNE, 1971, 1975; SCHUSTER et alii; 1973, 1979).

Além da infecção da semente, deve-se considerar a presença da bactéria sobre resíduos da cultura, que conserva o inóculo de um ano para outro. Segundo SCHUSTER (1967, 1970), palha infectada com *X. phaseoli*, que permaneceu sobre a superfície do solo durante dez meses, foi mais favorável para manter a sobrevivência da bactéria do que aquela que foi incorporada a uma profundidade de 10-20 cm, pois a decomposição orgânica pode ter originado condições de antibiose para a bactéria patogênica. O mesmo pesquisador determinou que culturas puras e folhas infectadas, em condições de casa de vegetação, apresentaram bactérias patogênicas durante seis semanas. ZAUMEYER e THOMAS (1957) constataram que o "Crestamento Comum" apresenta-se em campos onde não se pratica a rotação de culturas, ainda que se utilize semente sadia. Esta circunstância, apontaram estes pesquisadores, sugere a possibilidade de sobrevivência da bactéria no solo. Não obstante, SUTTON e WALLEN (1970) não conseguiram isolar *X. phaseoli* e/ou *X. phaseoli* var. *fuscans*, por métodos culturais ou detectá-los usando fagos, de amostras do solo onde cresceram plantas de feijão infectadas.

Em algumas oportunidades conseguiu-se isolados patogênicos, da bactéria em estudo, de plantas de feijão que aparentemente se apresentavam sadias (THOMAS e GRAHAM, 1952; SCHAREN, 1959; WELLER e SAETTLER, 1978).

Na sobrevivência de *X. phaseoli* é fundamental também a participação de outras plantas além de *Phaseolus vulgaris*. Segundo SCHUSTER (1967), palhas infectadas de *Amaranthus retroflexus* e *Chenopodium album*, plantas não hospedeiras, tinham cepas patogênicas de *X. phaseoli*, depois de permanecerem dez meses no campo. De acordo com KIMATI (1980), para as condições do Brasil, *Amaranthus retroflexus* e *Phaseolus atropurpureus* devem ter um papel muito importante na sobrevivência da bactéria. Segundo CAFATI e SAETTLER (1980a), as folhas de plantas não hospedeiras podem suportar uma multiplicação epífita da bactéria do "Crestamento Comum". Isto tem importância epidemiológica por constituir material disponível para infecções primárias ou para posteriores disseminações da bactéria, além de proporcionar às células bacterianas condições de sobrevivência.

Além de *Phaseolus vulgaris*, *X. phaseoli* também causa doença nos seguintes hospedeiros: *Phaseolus coccineus*, *P. mungo* (*Vigna mungo*), *P.*

aureus (*V. radiata*), *P. acutifolius*, *P. aconitifolius* (*V. aconitifolia*), *P. angularis* (*V. angularis*), *Lablab niger* (*L. purpureus*), *Strophostyles helvola*, *Glycine max*, *Stizolobium decringianum*, *Lupinus polyphyllus*, *V. sinensis* (*V. unguiculata*), *P. multiflorus* (*P. coccineus*), *P. lunatus*, *P. lunatus* var. *macrocarpus* (ZAUMEYER e THOMAS, 1957, HARRISON et alii, 1964; YOSHII, 1980). Os nomes científicos que estão entre parênteses correspondem à nova classificação apresentada por Marechal et alii, mencionados por SCHWARTZ e GÁLVEZ (1980).

2.2. Processos de Disseminação, Infecção e Sintomatologia

Uma das principais formas de disseminação é a semente infectada, que determina novos focos de infecção nas mesmas áreas, na vizinhança e em áreas distantes; desta forma, a semente infectada é uma importante fonte de inóculo primário (ZAUMEYER e THOMAS, 1957; HARRISON et alii, 1964; SUTTON e WALLEN, 1970; SAETTLER, 1977; WELLER e SAETTLER, 1980).

Plantas que crescem de semente infectada frequentemente apresentam lesões nos cotilédones, nodos cotiledonares ou nas folhas primárias e, quando as condições são propícias, há a produção de exsudatos bacterianos (ZAUMEYER e THOMAS, 1957).

Além da semente, os resíduos culturais de feijão infectado podem servir como fonte iniciadora do "Crestamento Comum" (BURKE, 1957; SCHUSTER e COYNE, 1977). A partir das lesões formadas, os talos bacterianos dos exsudatos são disseminados principalmente pela chuva e pelo vento, produzindo novas infecções nas mesmas plantas ou nas vizinhas (ZAUMEYER e THOMAS, 1957). Partículas do solo, removidas pelo vento, podem transportar talos bacterianos infectivos (BURKE, 1957); além disso, agentes disseminadores, como o homem, maquinaria agrícola, animais, irrigação, etc. também podem levar a bactéria para outros locais.

Os insetos também disseminam as bactérias fitopatogênicas de planta a planta, levando talos bacterianos em diferentes partes de seus corpos. Com relação a isto, ZAUMEYER e THOMAS (1957) consideraram o gafaf-

nhoto *Melanopluss* e o escaravelho do feijão mexicano, *Epilachna varivestis*, como agentes disseminadores de importância. SABET e ISHAG (1969) determinaram que a mosca branca *Bemisia tabaci* transmite *X. phaseoli* entre plantas, presumindo-se que a bactéria é transportada mecanicamente no aparelho bucal do inseto. A bactéria pode sobreviver no corpo dos insetos e alguns deles, como *Diaprepes abbreviata* e *Cerotoma ruficornis*, a transmitem através dos ferimentos que causam ao alimentarem-se das folhas (KAISER e VAKILI, 1978).

Xanthomonas phaseoli penetra nas folhas pelos estômatos, hidatódios e ferimentos, invade os espaços intercelulares, ocasionando uma gradual dissolução da lamela média (ZAUMEYER e THOMAS, 1957). Nas folhas, os sintomas iniciais apresentam-se como pequenas manchas úmidas, irregulares, angulosas, de cor verde escura, sobre a face inferior das folhas, podendo coalescer. Na área afetada o tecido fica flácido e rodeado por um estreito halo amarelo, depois se necrosa e toma uma cor parda. Com infecções severas pode ocorrer desfolhação (ZAUMEYER e THOMAS, 1957; YOSHII, 1980).

No caule, a bactéria penetra através dos estômatos do epicôtilo e hipocôtilo e chega até os elementos vasculares desde as folhas e/ou cotilédones infectados. Inicialmente, sobre o caule e pecíolos, formam-se estrias ou manchas encharcadas que, posteriormente, se tornam avermelhadas, sendo mais notórias nas regiões nodais do caule; com severas infecções há uma descoloração do sistema vascular e formação de cancrios no primeiro nó, o que ocasiona "podridão nodal" (ZAUMEYER e THOMAS, 1957, KIMATI, 1980).

As vagens podem infectar-se por via sistêmica ou pelos estômatos; os sintomas iniciais apresentam-se como manchas translúcidas que se tornam posteriormente avermelhadas e ligeiramente deprimidas; as lesões, às vezes, atingem o sistema vascular e há formação de exsudatos (KIMATI, 1980). A bactéria chega à sutura da vagem desde o sistema vascular do pedicelo, atravessa o funículo através da rafe até atingir a casca da semente; o micrôpilo também serve de via de penetração, quando a semente está em formação. A penetração direta através da casca não tem sido observada, mas não se descarta esta possibilidade (ZAUMEYER e THOMAS, 1957; YOSHII, 1980). Pode-se encontrar a bactéria tanto dentro da semente como

sobre a casca (WELLER e SAETTLER, 1980). As sementes afetadas podem perder a sua coloração típica, enrugarem-se, tomando um brilho de aspecto envernizado, ou podem não apresentar sintomas (KIMATI, 1980). Em vagens fortemente infectadas frequentemente observa-se a presença de sementes que não atingem seu total desenvolvimento, ficando atrofiadas e totalmente descoloridas. Em sementes brancas, ou de cor clara, observa-se facilmente manchas amarelas, o que não ocorre em sementes escuras. A infecção da semente pelo sistema vascular só se evidencia pela coloração amarela do hilo (BURKHOLDER, 1921; HARRISON et alii, 1964; SAETTLER e PERRY, 1972; YOSHII, 1980). Segundo WELLER e SAETTLER (1980), as vagens com lesões sobre a sutura dorsal apresentavam a semente com uma típica coloração amarela-manteiga, e a característica mancha do hilo foi o sintoma mais evidente da semente com infecção interna.

2.3. Métodos de Inoculação e Avaliação

Numerosos métodos têm sido empregados para se avaliar a resistência ao "Crestamento Comum" de variedades e de progênies de feijão.

O método de inoculação por "agulhas múltiplas" em folhas primárias tem sido empregado para avaliar resistência de feijão a *X. phaseoli* e *Pseudomonas phaseolicola*; segundo alguns pesquisadores, este método oferece duas importantes vantagens: ausência de escape e dá condições para que se possa fazer avaliações quantitativas (ANDRUS, 1948; COREY e STARR, 1957; POMPEU e CROWDER, 1973).

Outra técnica usada é a descrita por COYNE et alii (1963) e ARP et alii (1971) que consiste na eliminação de um cotilédone e na inserção de uma agulha ou escalpelo, previamente mergulhado no inóculo, na cicatriz cotiledonar; CAFATI (1971) empregou uma técnica similar a esta, eliminando uma das folhas primordiais já estendidas, isto é, com 12 a 14 dias de idade.

A fricção das folhas primárias ou segundas trifoliadas, com inóculo misturado com carborundum, foi mencionado por COREY e STARR (1957).

SCHUSTER (1955) usou um método que teve por fim forçar o ingresso do inóculo pelos estômatos. Para tanto, empregou um atomizador De Vilbiss, pulverizando as folhas a uma pressão de 15 lb, tendo obtido um encharcamento satisfatório. Com o mesmo propósito se tem utilizado a infiltração de folhas no vácuo (VENETTE e NAYES, 1978).

Uma das técnicas mais empregadas na atualidade é a incisão de folhas primárias ou primeiras trifoliadas com tesouras previamente mergulhadas no inóculo (WEBSTER et alii, 1980; SARTORATO e RAVAS, 1979).

BEEBE e PASTOR-CORRALES (1981) estudaram dois métodos para avaliar a eficácia da seleção para resistência ao "Crestamento Comum": o procedimento das lâminas de barbear e uma modificação usando lâminas cirúrgicas; a inoculação efetuou-se mediante cortes nas primeiras trifoliadas. Segundo estes pesquisadores o uso das lâminas cirúrgicas foi mais fácil e os genótipos resistentes foram melhor evidenciados.

A concentração do inóculo pode influir notoriamente na reação à doença; por isto, o critério generalizado entre os pesquisadores é o de usar uma concentração de 10^7 - 10^8 células bacterianas/ml, embora já se tenha feito uso de concentrações menores, tal como 10^6 (SCHAREN, 1959; SCHUSTER e COYNE, 1971; CAFATI, 1971; POMPEU e CROWDER, 1973; SAETTLER e EKPO, 1975; WEBSTER et alii, 1980).

Ekpo, mencionado por SAETTLER (1977), sugere que para avaliar resistência genética de feijão a *X. phaseoli* deve-se expor o material a um vasto espectro de potencial patogênico pela variação genética na patogenicidade da bactéria.

A maioria das escalas de avaliação usadas para avaliar as reações à doença das plantas inoculadas são de natureza tanto quantitativa, como qualitativa, obviamente segundo o método de inoculação empregado. Escalas de avaliação com valores de 1-5, considerando-se desde uma alta resistência até uma acentuada suscetibilidade, têm sido utilizada por alguns pesquisadores (SCHUSTER e COYNE, 1971; ARP et alii, 1971; YOSHII et alii, 1978; SCHUSTER et alii, 1979). Quando a técnica de inoculação é por incisão de folhas primárias ou primeiras trifoliadas, a escala de avaliação

tem valores de 0-5 ou 0-6 determinados por: zero, ausência de sintomas; 1-4, categorias intermediárias e 5 ou 6, severa clorose nos cortes além de murcha total do bordo da folha compreendido entre as incisões (SARTORATO e RAVAS, 1979; WEBSTER et alii, 1980).

A reação das vagens à doença também é pesquisada devido à sua estreita relação com infecção da semente e pela diferente resposta que apresenta em relação à infecção com outras partes das plantas. A presença de sintomas típicos do "Crestamento Comum" ocorrem quando as plantas são inoculadas por pulverização, uma vez que as vagens atingem 2 cm de comprimento e ainda estão achatadas (SABET e ISHAG, 1969; SCHUSTER e SAYRE, 1967; YOSHII, 1980). COYNE e SCHUSTER (1974) estudaram a reação diferencial de vagens e folhagem de feijão ao "Crestamento Comum"; as vagens foram inoculadas pelo método das agulhas múltiplas descrito por ANDRUS (1948), mencionado anteriormente. A inoculação da sutura ventral de vagens ainda em desenvolvimento, com *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*, determinou inevitavelmente a infecção da semente (SCHUSTER e SAYRE, 1967). Em relação a isto, e dada a possível aplicabilidade do método com *X. phaseoli*, CAFATI e SAETTLER (1980) e WELLER e SAETTLER (1980) inocularam esta bactéria por riscadura da sutura dorsal, para estudar a transmissão da bactéria pela semente em genótipos de *Phaseolus* resistentes a suscetíveis. Além das técnicas descritas anteriormente, também usa-se a injeção da bactéria no ponto de inserção do pedicelo com o caule (WELLER e SAETTLER, 1980).

Geralmente, os pesquisadores, para a inoculação de vagens, empregam como inóculo 10^7 - 10^8 células bacterianas/ml, de culturas de 48 horas de idade, que crescem sobre os meios de cultura EDCA ou ECA-R (SCHUSTER e SAYRE, 1967; COYNE e SCHUSTER, 1974a e 1974b; YOSHII, 1978; CAFATI e SAETTLER, 1980; WELLER e SAETTLER, 1980).

Sobre técnicas de avaliação de vagens infectadas com *X. phaseoli*, pouco existe na literatura. Para infecções que ocorram no campo, naturalmente ou quando se inocula por pulverização, existe uma escala em porcentagem de área lesionada, com valores que oscilam entre 1% a 50% (CLIVE, 1971).

COYNE e SCHUSTER (1974b) e YOSHII et alii (1978) avaliaram a reação das vagens ao "Crestamento Comum" utilizando uma escala de três valores: 1. resistente, ausência de lesões; 2. intermédia, poucas lesões e

3. suscetível, numerosas lesões grandes.

A maioria dos pesquisadores inocula as plantas em sua fase reprodutiva, pois se considera que neste período apresentam uma maior suscetibilidade (YOSHII, 1980).

COYNE e SCHUSTER (1974b) evidenciaram que as vagens e folhagem de cultivares resistentes e/ou suscetíveis, podem dar uma resposta independente à inoculação com *X. phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans*, o que se acredita esteja ligado a diferentes genes que codificam, independentemente, a reação de folhas e vagens.

Finalmente, SAETTLER (1977), analisando a grande variabilidade de técnicas em uso nos diferentes centros de pesquisa, considera importante padronizar os métodos, época de inoculação e a escala de avaliação da doença.

2.4. Resistência Varietal e Patogenicidade de Isolados

SCHUSTER (1955) verificou que uma linhagem de feijão Tepary (*Phaseolus acutifolius*) era resistente a *Xanthomonas phaseoli*; esta informação foi confirmada por numerosos pesquisadores, entre eles CAFATI (1971), que realizou testes com diferentes isolados da bactéria mencionada e *X. phaseoli* var. *fuscans*.

Investigações efetuadas por HONMA (1955; 1956) iniciaram-se com o uso do feijão Tepary 4 como fonte de resistência para ser incorporada na variedade Great Northern (*P. vulgaris*). Este cruzamento interespecífico resultou num aborto do embrião entre 3-24 dias após a polinização, pelo que se recorreu à cultura dos embriões, in vitro, obtendo-se só quatro plantas maduras. A partir das mesmas, obtiveram-se as plantas F₂ e F₃, as quais apresentavam vários graus de resistência, sugerindo que esta característica era herdada quantitativamente, pela variação apresentada na descendência. Desta forma, mediante o cruzamento interespecífico e a seleção posterior, derivou-se a variedade Great Northern (G.N.) Nebraska nº 1 que

manifesta maturação tardia e alta resistência a *X. phaseoli*.

COYNE et alii (1963) e COYNE e SCHUSTER (1973) avaliaram a resistência ao "Crestamento Comum" e ao "Crestamento Fosco" de uma extensa coleção de linhas introduzidas (P.I.) de diversas espécies e variedades do gênero *Phaseolus* e de linhas melhoradas de *P. vulgaris*; destes trabalhos obtiveram-se as seguintes variedades e linhas de *P. vulgaris* que exibiam um alto grau de resistência: P.I. 207262 e ICA-Guali (introduções da Colômbia); P.I. 163117 (introdução da Índia); P.I. 167399 e P.I. 169727 (introduções da Turquia); P.I. 197687 (introdução do México); e G.N. Nebraska nº 1 sel. 27. Algumas linhas de *P. coccineus* apresentaram também certo grau de resistência, mas menor do que *P. acutifolius*.

Tepary Buff e P.I. 169932 comportam-se como altamente resistentes e não manifestam sintomas (COYNE e SCHUSTER, 1973 e YOSHII et alii 1978).

COYNE et alii (1965) estudaram a herança da resistência em seleções procedentes do cruzamento de G.N. 1140, precoce e suscetível, com duas seleções de G.N. Nebraska nº 1, resistentes e tardios. Na F₂ verificaram uma variação contínua nas taxas de doença na geração segregante, indicando que a reação à doença é herdada quantitativamente e apresentando uma alta herdabilidade.

As variedades Tara e Jules foram derivadas por seleção genética do cruzamento mencionado no parágrafo anterior. Jules possui um nível maior de resistência ao "Crestamento Comum" que Tara e foi mais produtiva que todas as outras variedades ensaiadas sob severas condições de infecção, mas tem a desvantagem de ser tardia e apresentar crescimento indeterminado. Outra variedade que tem uma origem similar é Valley, que se diferencia das anteriores por sua precocidade (COYNE e SCHUSTER, 1970; 1974c).

A variedade G.N. Star, de maturação precoce, foi obtida a partir de seis retrocruzamentos de P.I. 165028 com G.N. Nebraska nº 1 sel. 27. A primeira serviu como fonte de resistência para *Corynebacterium flaccumfaciens* e a segunda como fonte para *X. phaseoli*. Desta forma, a variedade em questão possui resistência a ambos patógenos bacterianos (COYNE e SCHUSTER, 1976).

POMPEU e CROWDER (1972) estudaram a herança da resistência de duas linhagens de feijoeiro procedentes de cruzamentos interespecíficos,

7272-1 e 7299-2, resistentes a *X. phaseoli*, e duas suscetíveis, Black Turtle Soup e Red Kidney. Os resultados mostraram que a resistência foi quantitativa e estava condicionada por poucos genes, apresentando uma dominância parcial, com alta herdabilidade. Também observaram segregação transgressiva, demonstrando que o nível de resistência a esta bactéria pode ser aumentado através de cruzamentos entre linhagens resistentes ou entre resistentes e suscetíveis.

Conforme já mencionado, muitas variedades podem ter um grau moderado de resistência durante seu desenvolvimento vegetativo, mas tornam-se suscetíveis durante sua fase reprodutiva. COYNE e SCHUSTER (1974d) observaram uma reação diferencial a *X. phaseoli* em folhas e vagens, em algumas linhas e variedades. Assim P.I. 207262 apresentou alta resistência na folhagem e vagens ligeiramente suscetíveis; Busch Romano nº 14 teve a folhagem moderadamente suscetível e vagens severamente suscetíveis. G.N. 1140 exibiu folhagem severamente suscetível e vagens moderadamente suscetíveis. Os autores sugeriram que este comportamento se deve a diferentes genes que controlam a reação nas diversas partes das plantas. Dessas observações decorre a importância de selecionar resistência para folhagem e vagens.

Trabalhos preliminares efetuados no Centro Nacional de Pesquisa Arroz-Feijão, em Goiânia-GO, visando a detecção de novas fontes de resistência ao "Crestamento Comum", verificaram que as variedades Retinto Dulce, tr (B) 41 Retinto Sta. Rosa, Wisconsin HBR-40, Feijão de 60 dias, S-67 e Fulcrop x Record 2366 apresentaram uma reação melhor ou igual à da variedade resistente G.N. Jules (SARTORATO e RAVAS, 1979).

A linha ICA L-23, que será lançada brevemente como variedade comercial na Colômbia, teve seu nível de resistência aumentado graças a um cruzamento com a variedade Jules e retrocruzamento com a linha original (VICTORIA et alii, 1981).

Os materiais considerados como promissores estão sendo testados em diferentes centros de pesquisa do mundo, fazendo-se a inoculação com isolados mais patogênicos que os empregados anteriormente.

Com relação à patogenicidade da bactéria, SCHUSTER e COYNE (1971) verificaram que os isolados colombianos Xp-C₆ e Xp-C₇ apresentaram-se mais virulentos que o isolado padrão Nebraska Xp-5. Assim, os autores

consideram os isolados em questão como novas linhagens de *X. phaseoli*. SCHUSTER et alii (1973) estudaram uma outra linhagem procedente de Uganda com patogenicidade maior que a do isolado Nebraska e quase tão patogênica quanto as linhagens colombianas. Em investigações posteriores, SAETTLER e EKPO (1975) e EKPO e SAETTLER (1976) demonstraram que os isolados de *X. phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans* obtidos na Colômbia, Guatemala e Michigan foram mais patogênicos do que os obtidos em Nebraska, Idaho e Canadá, quando inoculados na variedade G.N. Tara, G.N. Jules e G.N. Nebraska nº 1 seleç. 27. Além disso, também verificaram que os isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans* comportaram-se significativamente mais patogênicos do que os isolados de *X. phaseoli*.

2.5. Recuperação de *X. phaseoli* de Sementes

A presença de *X. phaseoli* na semente constitui um importante fato, que determina a necessidade de se contar com métodos rápidos para sua detecção uma vez que a bactéria foi isolada tanto de variedades consideradas resistentes como suscetíveis.

SAETTLER e PERRY (1972) constataram a presença de bactérias fitopatogênicas em sementes de feijões Michigan Navy. Em 101 lotes de sementes, *X. phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans* foram mais frequentemente isolados do que *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*.

Trabalho feito por SCHUSTER et alii (1979) demonstrou que a semente das variedades G.N. Star, G.N. Jules, G.N. Tara, G.N. Valley e a linha G.N. Early Valley, consideradas como resistentes, apresentaram infecção interna com a bactéria que ocasiona o "Crestamento Comum". As suspensões bacterianas recuperadas destas sementes contaminadas, quando inoculadas em plantas da variedade suscetível Dark Red Kidney, determinaram, respectivamente, os seguintes níveis de infecção: 33, 33, 66, 68 e 50%. No entanto, as variedades suscetíveis G.N. 1140 e G.N. VI 59 chegaram a 83 e 100% de infecção, respectivamente.

Em estudos destinados a verificar a transmissão de *X. phaseoli* em sementes de genótipos resistentes e suscetíveis, CAFATI e SAETTLER (1980) recuperaram o mutante R 15-1 em 40% das sementes que apresentavam sintomas visíveis de infecção do genótipo Tepary, 42% de Nebraska nº 1 seleç. 27, 46% de Valley, 51% de Jules, 42% de MSU-51319 e finalmente 70% de Tuscola. Neste mesmo estudo, em sementes que não apresentavam sintomas, encontrou-se respectivamente 1.3, 2.0, 1.5, 1.9, 2.0 e 10.4% de sementes infectadas.

Diversas técnicas têm sido empregadas para se detectar sementes infectadas com *X. phaseoli*. A presença de sintomas é usada para avaliar quantitativamente a semente visivelmente infectada, embora não constitua um método totalmente eficaz pois escapam as sementes com infecção interna porém não manifesta, ou pode-se, erradamente, avaliar sementes com sintomas correspondentes a outras doenças.

CAFATI e SAETTLER (1980) inocularam em vagens um isolado patogênico de *X. phaseoli*, mutante resistente a 50 ppm de rifampim, para estudar a eventual transmissão do patógeno na semente. As sementes visualmente consideradas como infectadas e não infectadas foram colocadas com o hilo diretamente sobre o meio de cultura ECA-R, deixando-se em incubação por 18 horas. Depois foram passadas individualmente a tubos com o meio líquido CEE-R, onde ficaram durante 48 horas em constante agitação, para cultivo posterior no primeiro meio. Em ambos os casos colônias típicas do mutante foram recuperadas.

Outros métodos usados para detectar a bactéria na semente têm como princípio a incubação da semente em água destilada estéril durante 12-36 horas, fazendo-se, posteriormente, diluições sucessivas e cultivo sobre ECA. As colônias formadas são identificadas mediante provas bioquímicas e de patogenicidade (SAETTLER e PERRY, 1972). Uma variação deste método é a inoculação direta da água com talos bacterianos infectivos por meio de encharcamento de folhas, injeção em plântulas, vagens e no nodo das folhas primárias (WALLEN e SUTTON, 1965; NATI, 1970; SCHUSTER e COYNE, 1975; SCHUSTER *et alii*, 1979).

WALLEN e SUTTON (1965), visando detectar vestígios de infecção em sementes, pesquisaram o método de placas de lise para identificar bactérias isoladas de sementes de feijão, utilizando preparações dos fagos

Pgl76 e Pg60 e a prova de diluição de rotina do fago Pgl76. Deste modo, por meio da fagotipagem verificou-se a afinidade entre *X. phaseoli* var. *fuscans*, *X. phaseoli* e isolados intermediários.

NATTI (1970) informou que, plantando amostras representativas de sementes, pode-se determinar a porcentagem de infecção, ao considerar o número de plântulas que apresentam sintomas.

Alguns investigadores têm empregado técnicas serológicas para identificar bactérias em sementes; para tanto a semente é macerada, após prévia desinfecção da superfície. Centrifuga-se o macerado a baixas rotações e o sobrenadante é cultivado em ágar nutritivo. As colônias formadas são então analisadas serologicamente pelo método de aglutinação (KIRALY et alii, 1974).

GUTHRIE et alii (1965), estudando *Pseudomonas phaseolicola* em sementes infectadas, desenvolveram a técnica de se incubar a bactéria em água destilada estéril por 36 horas, utilizando-se o sobrenadante como antígeno. Os testes serológicos empregados foram: aglutinação em lâminas, precipitina em tubo, micro-precipitina e difusão em gel ágar de Ouchterlony. Os resultados variaram conforme a técnica usada. No entanto, observaram alta especificidade para *Ps. phaseolicola* e ausência de reação para outros 12 isolados heterólogos. O teste de micro-precipitina apresentou menor sensibilidade.

O uso de meio de cultura semi-seletivo, conjuntamente com testes serológicos de dupla difusão em gel ágar, deram resultados altamente satisfatórios para detectar a presença de *X. phaseoli* em sementes de feijão com infecção interna (TRUJILLO e SAETTLER, 1979).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local da Pesquisa

O presente trabalho constou de ensaios sob condições controladas para avaliar a transmissibilidade de *Xanthomonas phaseoli* pela semente de cinco variedades de feijoeiro, assim como para estudar a reação à inoculação artificial com diversos isolados desta bactéria. A pesquisa foi efetuada nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fito-patologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

3.2. Origem das Variedades de Feijoeiro

As variedades testadas neste trabalho foram:

<u>Variedades</u>	<u>Procedência</u>
México-29	Centro Nacional de Pesquisa Arroz, Feijão EMBRAPA, Goiânia, GO.
PI 310-725	Centro Nacional de Pesquisa Arroz, Feijão EMBRAPA, Goiânia, GO.
Great Northern Jules	Centro Nacional de Pesquisa Arroz, Feijão EMBRAPA, Goiânia, GO.
Carioca	Centro de Energia Nuclear para a Agricultura-Piracicaba.
Tepary (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas.

3.3. Isolados

Os isolados de *Xanthomonas phaseoli*, usados na pesquisa, foram os seguintes:

<u>Isolado</u>	<u>Origem</u>	<u>Procedência</u>
82-Da	Piracicaba, SP	Centro de Energia Nuclear para a Agricultura-Piracicaba.
270-2	Botucatu, SP	Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas.
3133-7	Campinas, SP	Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas.
3291	Campinas, SP	Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas.
3074	Campinas, SP	Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas.

3.3.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados, nos diferentes testes, foram:

Meio de cultura para isolamento do patógeno de sementes, repicagem, conservação de isolados e preparo de inóculo: ECA (SAETTLER e EKPO, 1975).

Extrato de levedura	10 g
Carbonato de cálcio	2,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

Meio de cultura para contagem de colônias: Ágar nutritivo (PELTIER et alii, 1965).

Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml.
pH	6.8-7.0

3.3.2. Conservação dos isolados

Os isolados de *X. phaseoli* foram cultivados em tubos com o meio de cultura ECA, após o que foram mantidos em estufa por 72 horas a 27°C para crescimento. Finalmente, adicionou-se 1 ml de óleo mineral estéril conservando-se os tubos em geladeira a 5°C ou em câmara fria a 12°C .

3.3.3. Caracterização dos isolados e testes de patogenicidade

Todos os isolados utilizados na pesquisa foram devidamente identificados em seus lugares de procedência, porém nesta pesquisa isto foi verificado serologicamente, sendo o antígeno o isolado 82-Da, cujo anti-soro apresentou reações análogas com os isolados alistados no item 3.3. Para esta finalidade empregou-se a técnica serológica de dupla difusão em ágar de Ouchterlony (KIMATI, 1975).

A patogenicidade dos isolados foi testada pelo método das "agulhas múltiplas", descrito por ANDRUS (1948), na variedade Carioca, que é suscetível. Além disso, o isolado 82-Da também foi testado pelo método de pulverização (SCHUSTER, 1955).

3.4. Resistência Varietal e Transmissão de *X. phaseoli* pela Semente

3.4.1. Condições de casa de vegetação

Os testes efetuaram-se em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura e na ausência de pragas e/ou outras doenças.

3.4.2. Preparo de inóculo

O inóculo foi preparado segundo a técnica usada por SAETTLER e EKPO (1975), com modificação na temperatura de incubação. Culturas puras de *X. phaseoli* foram obtidas em tubos de ensaio com o meio de cultura BICA inclinado, incubados a 27°C. Depois de 48 horas de incubação, preparou-se a suspensão bacteriana em água destilada esterilizada, até obter-se

uma transmitância de 62%, medida no colorímetro BAUSH & LOMB Spectronic 20, que corresponde a 2.8×10^8 células bacterianas/ml, aproximadamente. Este valor foi determinado através de contagem de colônias bacterianas desenvolvidas em placas com ágar nutritivo pelo método das diluições (KIRALY, et alii, 1974), conforme pode-se verificar na Figura 1. O inóculo usado nos diferentes ensaios foi sempre preparado na mesma forma.

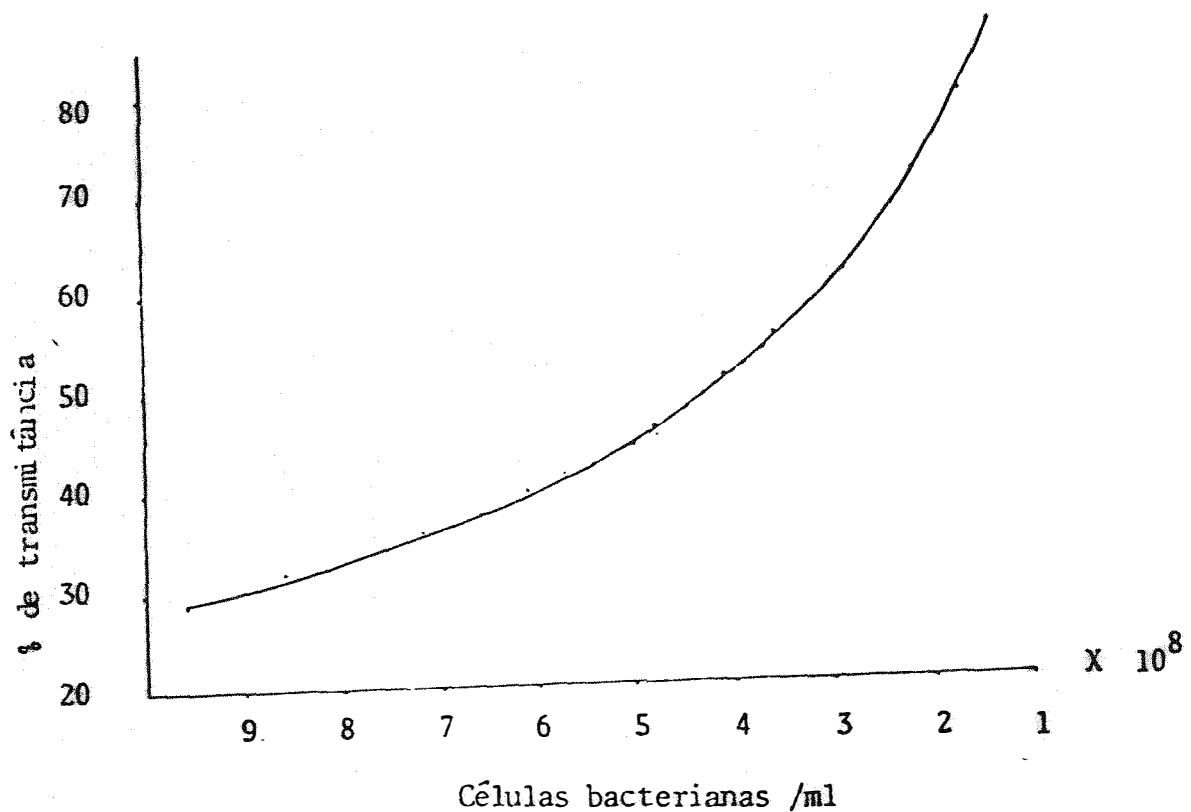


Figura 1. Porcentagens de transmitância de diferentes suspensões e número de colônias correspondentes de *X. phaseoli*/ml.

3,4,3, Métodos de inoculação

As plantas foram atomizadas na face inferior das folhas, até ocasionar um leve encharcamento. Esta operação foi efetuada com um atomizador De Villbis , acoplado a um compressor Primar. A pressão utilizada foi de 15 psi (SCHUSTER, 1955). A inoculação de vagens empregada foi a mencionada por CAFATI e SAETTLER (1980) com ligeiras variações. Vagens imaturas foram inoculadas quando ainda se apresentavam achatadas, mediante riscas sobre a sutura dorsal, com agulha de injeção esterilizada previamente mergulhada no inóculo.

Finalmente, outra técnica de inoculação foi usada: incisão de folhas primárias com tesoura 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. O segundo corte, paralelo ao primeiro e de igual tamanho, foi feito a uma distância aproximada de 2 cm. Esta técnica foi mencionada por WEBSTER et alii (1980).

As plantas antes de serem inoculadas foram colocadas em câmara úmida durante 24 horas e, depois, por mais 48 horas. No piso da casa de vegetação colocou-se serragem, que foi umidecida periodicamente para proporcionar uma alta umidade relativa.

3,4,4, Isolamento de *X. phaseoli* de sementes

Os isolados de *X. phaseoli* das sementes foram obtidos de acordo com a técnica utilizada por CAFATI e SAETTLER (1980), com ligeiras variações. As sementes foram desinfectadas em hipoclorito de sódio 2.5% durante 3 minutos, lavadas três vezes em água destilada estéril, eliminando-se, em seguida, o excesso de água com papel de filtro estéril. Dez sementes por cada placa de Petri foram colocadas em incubação a 27°C, com o hilo diretamente sobre o meio ECA, sendo retiradas após 24 horas. As placas permaneceram conservadas na mesma temperatura por mais 48 horas, antes de serem avaliadas.

3.4.5. Cinética do crescimento de *X. phaseoli* no tecido foliar de feijoeiro.

O desenvolvimento da bactéria, dentro do tecido foliar inoculado, foi determinado utilizando-se a técnica mencionada por KIRALY et alii (1974). Três folhas de diferentes idades foram amostradas de cada planta. Lavou-se a amostra em água de torneira durante 10 minutos aproximadamente, e o excesso foi eliminado colocando-as sobre papel de filtro es téril. Com um tubo de ensaio de 6 mm de diâmetro, retirou-se ao acaso, por folha, 6 discos de lâmina foliar que, conjuntamente com pequenas quantidades de areia estéril fina (tamisada em peneira de 0,250 mm), foram macerados em vidros de siracusa estéreis. A seguir se adicionou 0,1 ml de água destilada esterilizada por disco de lâmina foliar. A partir desta suspensão formada foram feitas diluições sucessivas inoculando-se 0,1 ml das últimas diluições em placas de Petri contendo ágar nutritivo. Segundo a quantidade de colônias bacterianas desenvolvidas sobre este meio de cultura, o número de diluições alterou-se de 1:1000 até 1:1.000.000. As placas de Petri foram colocadas em estufa a 27°C durante 72 horas; ao final deste tempo foram feitas as contagens. A primeira amostragem das folhas foi efetuada após 1 hora da inoculação, e as posteriores cada dois dias até completar um total de seis amostragens.

As variedades de feijão utilizadas para este estudo foram : Tepary, México-29 e Carioca, consideradas como resistente (SCHUSTER, 1955), intermediária (SARTORATO e RAVAS, 1979) e suscetível (verificado em testes preliminares), respectivamente. Os dados obtidos foram transformados para ln a fim de se realizar o cálculo de regressão linear, pelo método dos quadrados mínimos (GONZÁLEZ, 1974), fatível, em vista da dependência entre as duas variáveis. A variável dependente Y correspondeu ao incremento populacional de *X. phaseoli* no tecido foliar e a variável independente X aos dias de amostragem e análise após a inoculação.

3.4.6. Verificação dos isolados das sementes através de método serológico.

Culturas puras de colônias bacterianas que apresentavam a característica cor amarela e contaminantes de outra cor foram cultivadas em tubos com ECA inclinado, durante 48 horas, a 27°C. Suspensões concentradas dos isolados constituíram os antígenos que, uma vez fervidos durante dois minutos, foram usados nas provas serológicas. Devido às respostas prévias mais evidentes, foram utilizados os anti-soros XpAs-15 e XpAs-18, tendo-se empregado a técnica de dupla difusão em gel de ágar de Ouchterlony, conforme descrito no item 3.5.3.

Tendo-se obtido numerosos isolados, um correspondente a cada semente infectada, para os testes serológicos foram utilizadas colônias bacterianas que apresentavam características macroscópicas iguais, escolhidas ao acaso.

3.4.7. Provas de patogenicidade dos isolados de sementes.

Isolados previamente verificados por serologia, e que correspondiam a *X. phaseoli*, foram utilizados na execução de provas de patogenicidade, na variedade Carioca, que é suscetível. A técnica de inoculação utilizada foi a descrita por WEBSTER et alii (1980), conforme mencionado no item 3.4.3.

3.4.8. Planejamento dos ensaios e análise estatística.

Três ensaios independentes foram feitos a fim de se determinar a reação de folhas e vagens à infecção de *X. phaseoli*, assim como a eventual transmissão pelas sementes. Os ensaios tiveram as seguintes características:

ENSAIO 1: Comportamento de variedades de feijoeiro inoculadas por atomização com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*, em três idades diferentes.

Inoculação de plantas de 35, 50 e 65 dias de idade, por atomização, com o isolado 82-Da. As observações realizadas neste ensaio corresponderam aos seguintes assuntos: reação das folhas à inoculação; cinética de crescimento de *X. phaseoli* no tecido foliar; infecção de vagens; infecção de sementes; verificação serológica dos isolados de sementes e prova de patogenicidade destes isolados. As plantas foram cultivadas em vasos com solo esterilizado, sendo que cada unidade experimental foi constituída por um vaso com duas plantas, com três repetições.

ENSAIO 2: Inoculação do isolado 82-Da de *X. phaseoli* em vagens de variedades de feijoeiro pelo método de riscas na sutura dorsal.

Inoculação de vagens imaturas em plantas de 64 dias de idade por meio de riscas sobre a sutura dorsal, com o isolado 82-Da. As observações realizadas neste ensaio corresponderam aos seguintes assuntos: comportamento das vagens à inoculação; avaliação visual de sementes com sintomas; avaliação da porcentagem de infecção interna das sementes, em laboratório; verificação serológica dos isolados de sementes e prova de patogenicidade destes isolados. As plantas foram cultivadas em vasos com solo esterilizado, sendo que cada unidade experimental foi constituída por um vaso e uma planta, com quatro repetições.

ENSAIO 3: Comportamento de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com cinco isolados de *X. phaseoli*.

Inoculação de folhas primárias de plantas de 10 dias de idade, que se desenvolveram em vasos com solo esterilizado. Foram empregados os isolados: 82-Da, 270-2, 3133-7, 3291 e 3074, e as variedades: Tepary, Jules, Carioca, México-29 e PI 310-725. O método de inoculação foi o de incisão com tesoura mergulhada no inóculo. A reação apresentada pelas folhas à inoculação foi avaliada. A unidade experimental esteve constituída por um vaso com duas plantas e quatro repetições. As provas de patogenicidade dos isolados de sementes foram realizadas com a mesma metodologia descrita neste item, com a diferença de só se ter utilizado a variedade Carioca e cinco repetições.

Os ensaios tiveram características comuns, além das próprias para cada ensaio, que são enunciadas nos itens: 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3.

Os dados que permitiram análise estatística foram examinados segundo o modelo de experimentos inteiramente casualizados, ou inteiramente casualizados com arranjo fatorial e a prova de Duncan, de acordo com GONZÁLES (1974) e PIMENTEL GOMES (1978). Para os cálculos estatísticos os valores foram transformados em \sqrt{x} , $\sqrt{x+0.5}$ ou arco-seno, segundo a necessidade (GONZÁLES, 1974).

3.4.9. Avaliações

Nos três ensaios e nas provas de patogenicidade foram feitas observações desde o aparecimento dos primeiros sintomas até a avaliação final, conforme o ensaio em questão. No primeiro ensaio, a avaliação final realizou-se aos 21 dias após cada uma das inoculações, considerando-se a escala numérica utilizada por COYNE et alii (1965) e SAETTLER (1977), cuja escala de notas se apresenta no Quadro 1.

QUADRO 1. Escala de avaliação de reação do feijoeiro a *Xanthomonas phaseoli* inoculado pela técnica de atomização.

-
- | | |
|----|---|
| 1 | R Resistente, ausência de sintomas visíveis. |
| 2 | LS Ligeiramente suscetível, desenvolvimento de pequenas lesões em 1-5% das folhas. |
| 3 | MS Moderadamente suscetível, desenvolvimento de lesões moderadas sobre as folhas, de tamanho variado. Algumas folhas tornam-se cloróticas |
| 4 | SS Severamente suscetível, a maioria das folhas apresentam grandes lesões, com pronunciada clorose e necrose. |
| 5. | Infecção muito severa; as plantas aparecem cloróticas, necróticas, e estão grandemente desfolhadas. |
-

A avaliação final de vagens foi feita após 35 dias da inoculação, tendo-se empregado a chave sugerida por CLIVE (1971) que considera a porcentagem de área infectada e cuja escala de notas se apresenta na Figura 2.

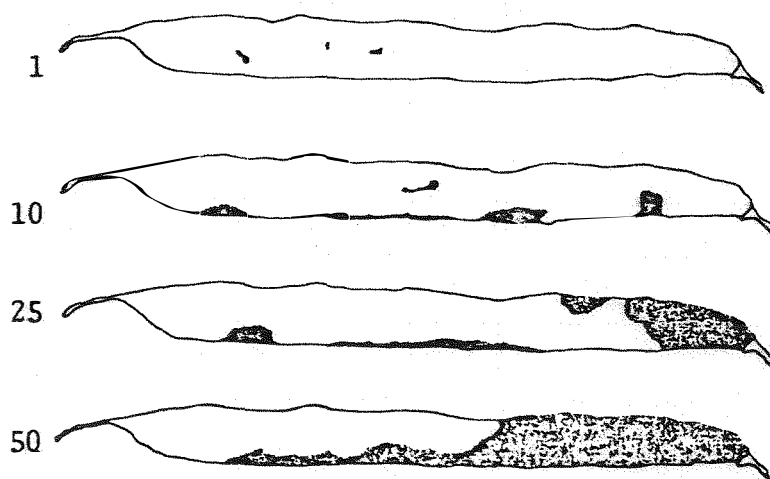
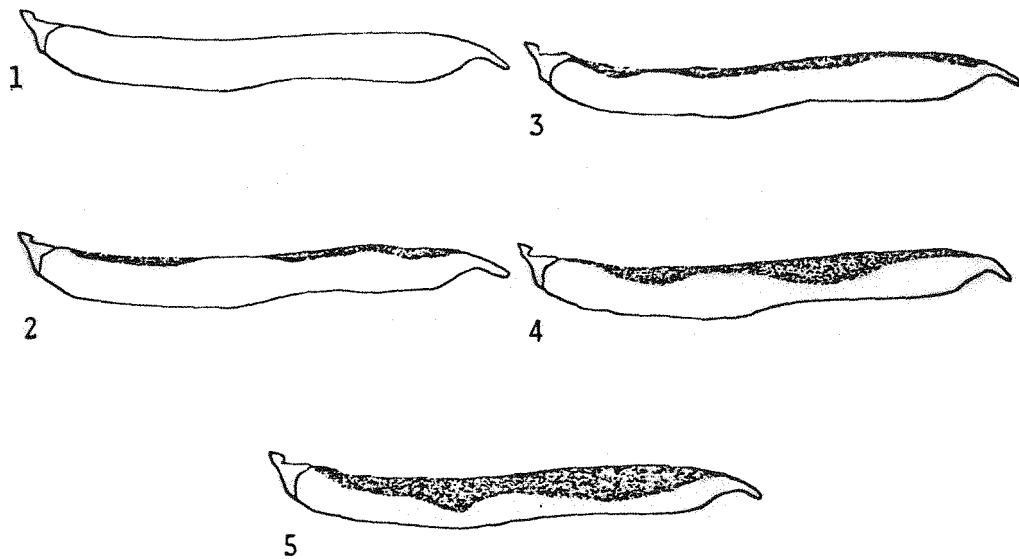


Figura 2. Porcentagem de área de vagens infectadas com *Xanthomonas phaseoli*.

No referido ensaio, a inoculação de vagens foi feita por meio de riscas na sutura dorsal, cuja escala de avaliação foi estabelecida segundo o desenvolvimento da infecção a partir do ferimento. A última avaliação foi feita aos 35 dias de inoculação conforme a escala de notas que se apresenta na Figura 3.



1. ausência de sintomas visíveis; 2. encharcado leve não contínuo nos bordos da risca, atinge a 5% da área da vagem; 3. encharcado moderado nos bordos da risca, atinge a 10% da área da vagem; 4. forte encharcado nos bordos da risca, atingindo a 25% da área da vagem; 5. perda da turgidez, amadurecimento prematuro; encharcado que atinge 50% da vagem.

Figura 3. Escala de avaliação da reação de vagens de feijoeiro a *Xanthomonas phaseoli*.

No terceiro ensaio e nas provas de patogenicidade, as avaliações foram realizadas aos 9 dias após a inoculação, seguindo-se a metodologia usada por WEBSTER, et alii (1980) e cuja escala de notas apresenta-se no Quadro 2.

QUADRO 2. Escala de avaliação de reação de folhas de feijoeiro a *X. phaseoli*, inoculadas pelo método de incisão.

-
0. Ausência de clorose e/ou perda de turgidez.
 1. Clorose irregular ao longo das margens do tecido cortado.
 2. Clorose uniforme ao longo das margens do tecido cortado.
 3. Clorose e perda de turgidez do bordo da folha, circunscrita entre os cortes, mas sem atingir a primeira nervura lateral.
 4. Clorose e perda de turgidez da metade do quadro exterior da primeira nervura lateral.
 5. Clorose e perda de turgidez do quadro inteiro.
-

3.5. Serologia

3.5.1. Preparo do antígeno

O isolado 82-Da de *Xanthomonas phaseoli* foi cultivado em placas de Petri com o meio ágar-nutritivo, a 27°C durante 72 horas. Após este período, as colônias foram removidas do meio e transferidas com alça de platina para um erlenmeyer contendo 100 ml de solução salina (NaCl 0.85%) esterilizada. Tendo-se homogeneizado a suspensão, as bactérias foram lavadas por três vezes em volumes iguais de solução salina, por meio de centrifugação (Centrífuga Sorvall SS-4) a 7.000 rpm durante 10 minutos cada vez.

As bactérias decantadas foram resuspensas em solução salina, obtendo-se uma concentração aproximada de 2.5×10^8 células bacterianas/ml, (69,4% de transmitância), com auxílio do colorímetro. Aliquotas de 5 ml foram introduzidas em frascos de antibióticos que, uma vez selados, foram conservados em congelador.

3.5.2. Obtenção do anti-soro

Antígeno do isolado 82-Da foi inoculado em um coelho da raça Nova Zelândia de aproximadamente 2,65 kg para a obtenção do anti-soro. Dois ml do antígeno, conservado no congelador, foram misturados com adjuvante incompleto de Freund (Difco), obtendo-se uma emulsão por agitação constante através de uma seringa. Um ml de antígeno emulsionado foi injetado por via intramuscular, num total de 21 aplicações, com intervalos semanais. Antes da primeira injeção do antígeno foi feita uma sangria para a obtenção do soro normal para posterior uso como controle (NAMEKATA, 1971).

Sangrias semanais foram feitas a partir da terceira injeção do antígeno. O soro foi obtido a partir do sangue coagulado que permaneceu durante uma hora à temperatura de laboratório e a 5°C, num refrigerador, por uma noite. O soro foi centrifugado a 7000 rpm, por 10 minutos, e guardado em frascos com prévia adição de uma gota de merthiolate 1:10000 (KIMATI, 1975). O anti-soro foi conservado em congelador até o momento do uso. A identificação dos isolados fez-se na seguinte forma: Xp.As-1 , Xp.As-2 ... XpAs-18.

3.5.3. Titulação do anti-soro.

A titulação do anti-soro foi realizada através das técnicas de microprecipitina em placas, seguindo a metodologia descrita por BALL (1974), com ligeiras modificações sugeridas por KIMATI (1981, comunicação pessoal). Em uma placa de Petri esterilizada foi espalhada uma camada de óleo sílico e fez-se um desenho de um modelo quadriculado com lápis de cera. Uma série de diluições de anti-soro foram pipetadas em cada quadrilátero e, a seguir, foi acrescentada uma gota de antígeno (2.5×10^8 cel./ml) sobre as anteriores. A incubação foi realizada colocando-se uma camada de óleo mineral. Foram feitas três leituras: aos 45, 60 e 120 minutos. A formação de um precipitado indicou reação positiva; cada diluição teve três repetições.

3.5.4, Reação serológica dos isolados de sementes

A técnica empregada se encontra descrita no item 3.4.6. Na realização destas provas foi utilizada a técnica de dupla difusão em gel de ágar de Ouchterlony, segundo KIMATI (1975).

Sobre lâminas de vidro foram colocados 4.0 ml de meio gel ágar (1% de ágar Difco; K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0.1 M; a pH 7.2 e 0.01% de merthiolate) ainda líquido e deixado solidificar. Posteriormente foram feitos orifícios distribuídos em hexágonos, com o aparelho Furagar (LEITE e OLIVEIRA 1975). Com auxílio de micropipeta de Pasteur foram distribuídos os antígenos e anti-soros nos orifícios. As lâminas foram conservadas em placas de Petri estéreis, com algodão unedecido em água, à temperatura de laboratório, até o aparecimento das linhas de precipitação. Em todos os testes foi utilizado como controle o antígeno homólogo 82-Da, que conjuntamente com os antígenos dos isolados, tiveram duas repetições.

3.5.5, Reação serológica de isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas* sp.

Além do mencionado no item 3.4.6., para o preparo de antígenos aquecidos, foi utilizada a maceração das células bacterianas. Suspensões concentradas dos isolados em solução salina estéril foram colocadas em vidros de siracusa estéreis, contendo areia estéril (peneira 0.250 mm), e levadas ao congelador. Após a congelação, procedeu-se à maceração com auxílio de bastonetes de vidro, até obter-se a sua liquefação. Esta operação foi efetuada quatro vezes. Finalmente, foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recoletado em frascos, para usar-se imediatamente nos testes de dupla difusão em gel de ágar, conforme se menciona no item anterior.

4. RESULTADOS

4.1. ENSAIO 1: Comportamento de Variedades de Feijoeiro Inoculadas por Atomização com o Isolado 82-Da idê *X. phaseoli*, em Três Idades Diferentes.

4.1.1. Reação das folhas à inoculação

Os resultados obtidos neste primeiro ensaio aparecem nos Quadros 1 e 2. A análise da variância foi feita com os valores transformados para \sqrt{x} e apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade para variedades, época de inoculação (idades) e a sua interação. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 1 e 2.

Quadro 1. Reação de cinco variedades de feijoeiro inoculadas por atomização com *X. phaseoli*, isolado 82-Da.

Variedades	Índice de infecção		Tipo de infecção ***
	[*] x	^{**} \sqrt{x}	
Tepary	1.333	1.136 a	R
Jules	1.777	1.273 a	LS
PI 310-725	2.444	1.511 b	MS
Carioca	2.555	1.541 b	MS
México-29	2.666	1.576 b	MS

* Média de três repetições e de inoculações em três épocas diferentes, baseando-se numa escala de notas de 1 (ausência de sintomas) a 5 (infecção muito severa).

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

*** Baseado em SAETTLER (1977): R = resistente, LS = ligeiramente suscetível e MS = moderadamente suscetível.

Quadro 2. Reação de variedades de feijoeiro inoculadas por atomização com *X. phaseoli*, em três diferentes épocas.

Variedades	Índice de doença (x) [*] e tipo de infecção (TI) ^{**} em plantas inoculadas com idade de					
	35 dias		50 dias		65 dias	
	^{***} x	TI	^{***} x	TI	^{***} x	TI
Tepary	2.00 a	LS	1.00 a	R	1.00	R
Jules	3.33 b	MS	1.00 a	R	1.00	R
PI 310-725	3.66 b	SS	2.66 b	MS	1.00	R
Carioca	4.00 b	SS	2.66 b	MS	1.00	R
México-29	4.00 b	SS	3.00 b	MS	1.00	R

* Média de três repetições, cada uma com duas plantas, baseada numa escala de 1 (ausência de sintomas) a 5 (infecção muito severa).

** Baseado em SAETTLER (1977): R = resistente, LS = ligeiramente suscetível, MS = moderadamente suscetível e SS = severamente suscetível.

*** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

4.1.2. Cinética do crescimento de *X. phaseoli* no tecido foliar das variedades Carioca, México-29 e Tepary.

O desenvolvimento bacteriano no tecido foliar, conforme descrito no item 3.4.5, também foi utilizado para se discriminar possíveis níveis de resistência das variedades Tepary, México-29 e Carioca, consideradas como resistente, intermediária e suscetível, respectivamente. As equações de regressão estão no Quadro 3, e os gráficos correspondentes se apresentam nas Figuras 4, 5 e 6. Os resultados originais e sua transformação em ln estão apresentados nos Apêndices 3, 4 e 5.

Quadro 3. Equações de regressão linear do crescimento de *X. phaseoli* no tecido foliar de variedades de feijoeiro.

Variedades	Equações de regressão linear nas épocas de inoculação (dias)		
	35	50	65
Carioca	$Y=11.3647+0.7743X$	$Y=9.6751+0.4255X$	$Y=10.0857+0.4363X$
México-29	$Y=10.8688+0.8856X$	$Y=6.8137+1.0165X$	$Y=9.7008+0.2531X$
Tepary	$Y=11.7077+0.2521X$	$Y=7.7906+0.3835X$	$Y=9.9029+0.1506X$

C = Carioca	$Y = 11.3647 + 0.7743X$	$r = 0.9279$
M = México-29	$Y = 10.8688 + 0.8856X$	$r = 0.9656$
T = Tepary	$Y = 11.7077 + 0.2521X$	$r = 0.5537$

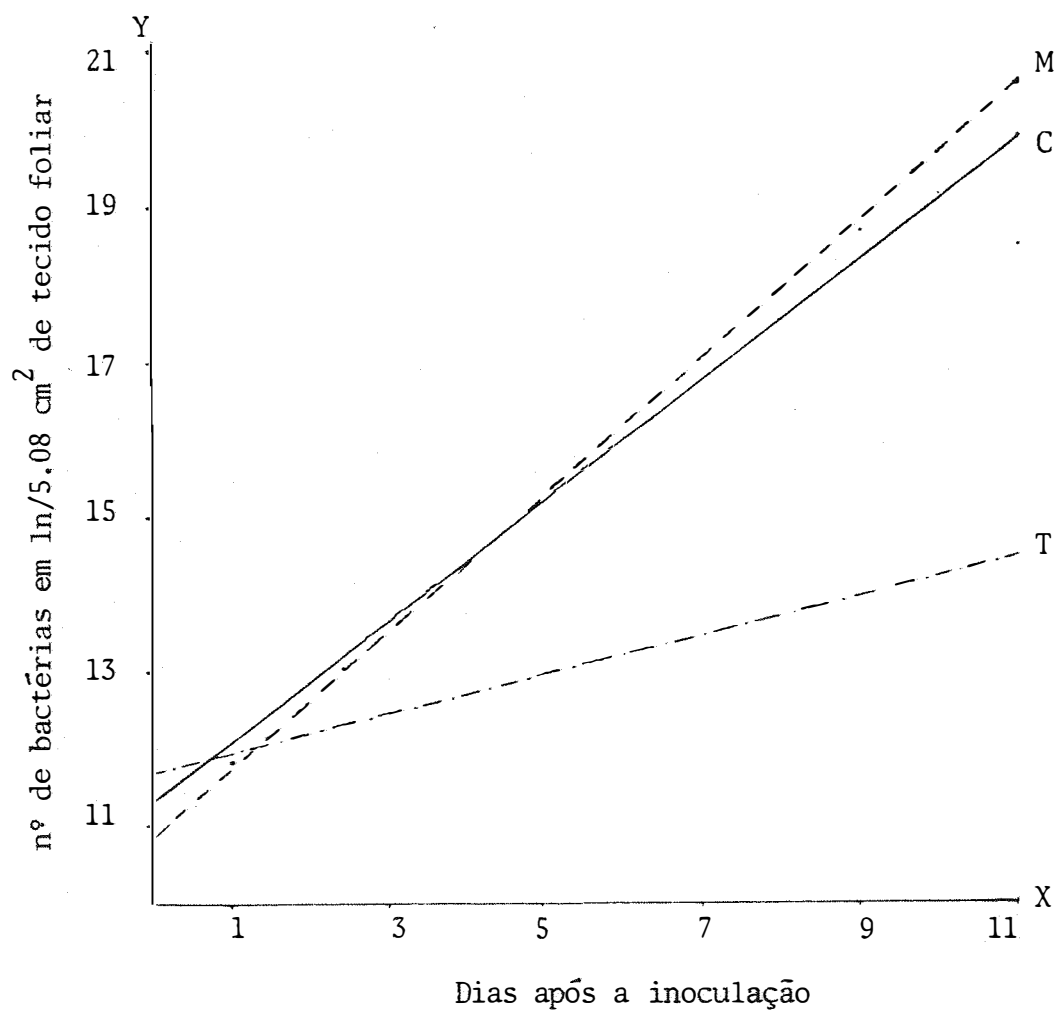


Figura 4. Curvas de regressão linear para o crescimento populacional de *X. phaseoli* no tecido foliar das variedades: Tepary, Carioca e México-29, inoculadas aos 35 dias.

C = Carioca	$Y = 9.6751 + 0.4255X$	$r = 0.9357$
M = México-29	$Y = 6.8137 + 1.0165X$	$r = 0.9760$
T = Tepary	$Y = 7.7906 + 0.3835X$	$r = 0.9449$

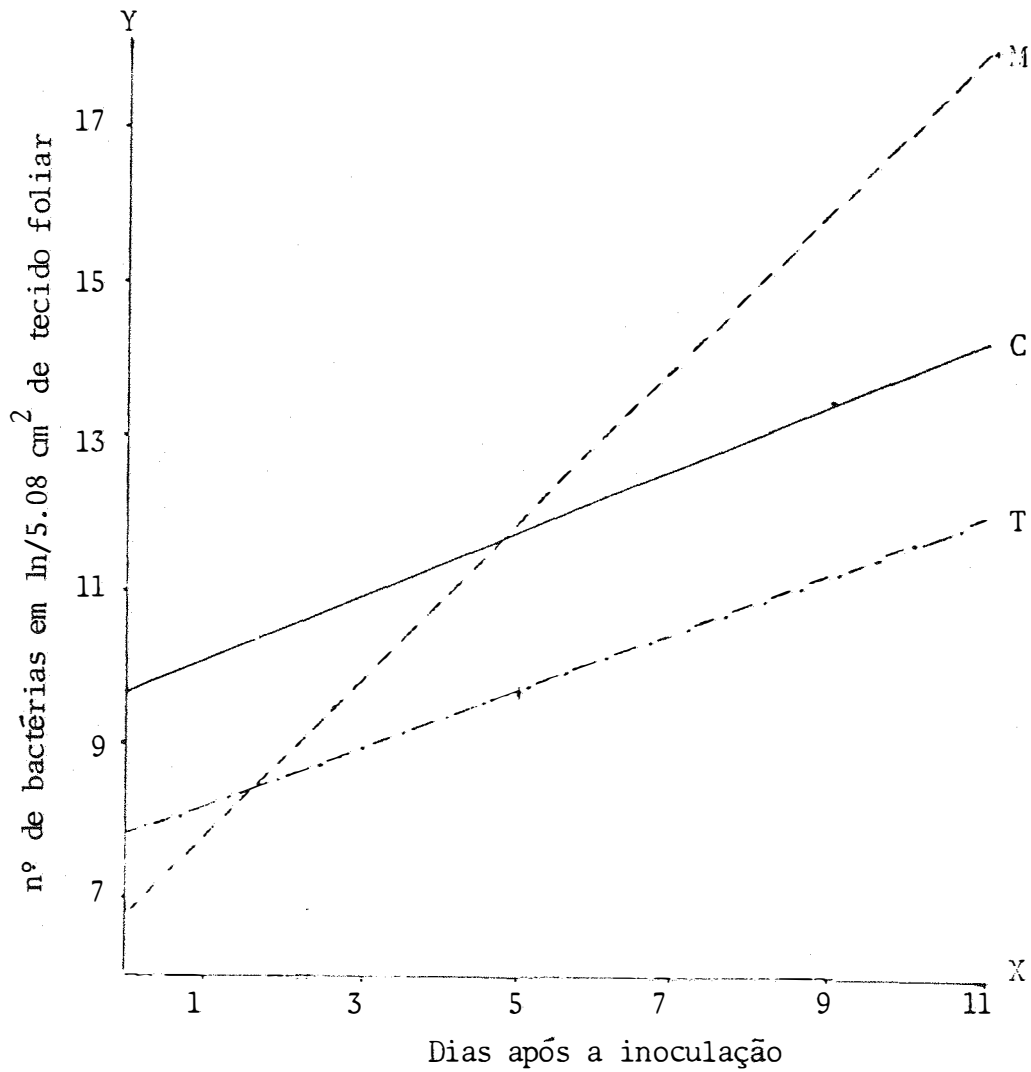


Figura 5. Curvas de regressão linear para o crescimento populacional de *X. phaseoli* no tecido foliar das variedades: Tepary, Carioca e México-29, inoculadas aos 50 dias.

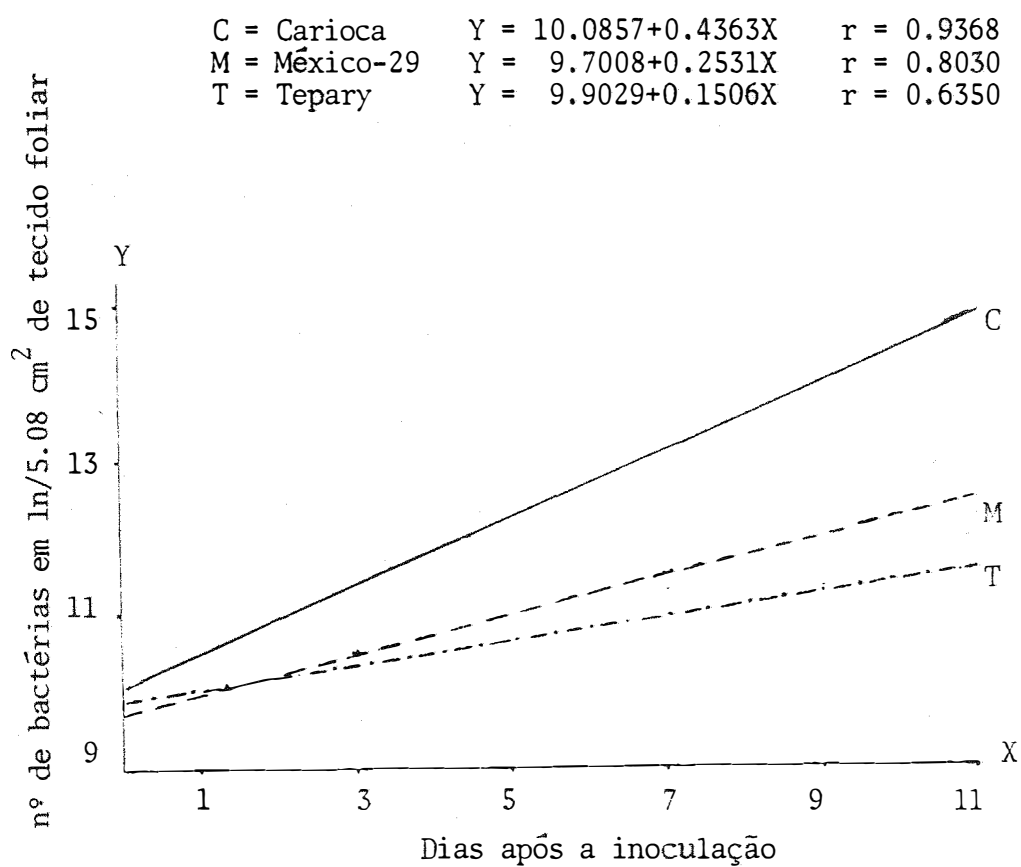


Figura 6. Curvas de regressão linear para o crescimento populacional de *X. phaseoli* no tecido foliar das variedades: Tepary, Carioca e México-29, inoculadas aos 65 dias.

4.1.3. Estudo de infecção de vagens

Os resultados médios correspondentes à porcentagem de infecção de vagens aparecem no Quadro 4, e os dados originais para cada repetição, por época de inoculação, no Apêndice 6.

Quadro 4. Médias de infecção de vagens de variedades de feijoeiro inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*.

Épocas de inoculação	Infecção de vagens das variedades*				
	Tepary	Jules	Carioca	PI 310-725	México-29
35	0	0	0	0.240	0
50	0	0.470	1.133	2.500	1.110
65	0	0	0.06	0.213	0

* Médias, de três repetições, de infecção de vagens, em porcentagem, de plantas de feijão inoculadas aos 35, 50 e 65 dias de idade. A escala de avaliação usada foi a sugerida por CLIVE (1971).

4.1.4. Infecção das sementes

Os resultados sobre porcentagem de sementes infectadas, obtidos no laboratório, são apresentados no Quadro 5, e os dados originais para cada repetição estão no Apêndice 7.

Quadro 5. Frequência de sementes infectadas em variedades de feijoeiro obtidas em meio de cultura.

Variedades	Porcentagem de sementes infectadas em vagens de plantas com idades (em dias) de *		
	35	50	65
Tepary	0	0	0
Jules	0	0	0
México-29	0	1.91	0
Carioca	5.10	1.34	0
PI 310-725	2.89	8.20	0

* Valores que correspondem à porcentagem de sementes infectadas, da totalidade de sementes testadas no laboratório, para cada variedade e época de inoculação.

4.1.5. Verificação serológica dos isolados de sementes

Os resultados das reações de precipitina entre os isolados de sementes, fervidos, e o anti-soro XpAs-15 estão apresentados no Quadro 6.

Conforme se pode notar, o comportamento dos isolados foi semelhante, observando-se especificidade da reação serológica para o antígeno homólogo 82-Da e os isolados de semente. A reação de identidade foi evidenciada pela presença de duas linhas de precipitação que, uma vez unidas, assemelharam-se a um círculo interno e a um hexágono externo. Este fato não ocorreu com os isolados contaminantes, de cor levemente rosada, Ca-III-D₁ e Ca-II-B₂, que não reagiram com o anti-soro Xp.As-15, verificando-se isto pela ausência de linhas de precipitação, nos testes de dupla difusão em gel-ágar.

Quadro 6. Resultados da análise serológica dos isolados de *X. phaseoli* obtidos de sementes de variedades de feijoeiro, inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*.

Variedades	Idade (Dias)	Isolado	Reação serológica	
	*	**	***	
Carioca (Ca)	35	Ca-III-A1	++	
		-A2	++	
		-A3	++	
		-B1	++	
		-B2	++	
		-B3	++	
		-C1	++	
		-C2	++	
		-C3	++	
		-D1	--	
		50	Ca- II-A1	++
			-B1	++
			-B2	--
México-29 (Me)	50	Me- II-A1	++	
		-B1	++	
		-C1	++	
		-D1	++	
PI.310-725 (PI)	35	PI- I-A1	++	
		-B1	++	
		-C1	++	
		PI-III-A1	++	
		-C1	++	
		-D1	++	
	50	PI- I-A1	++	
		-A2	++	
		-C1	++	
		-D1	++	
		-D2	++	
		PI- II-A1	++	
		-A2	++	
-B1	++			
PI-III-A1	-A2	++		
	-A3	++		
	-B1	++		
	-B1	++		

(continua)

(continuação)

Variedades	Idade (Dias)	Isolado	Reação serológica
PI.310-725	50	PI-III-C1	++
		-C2	++
		-D1	++
		-D2	++
		-E1	++

* Idade que as plantas foram inoculadas, por atomização, segundo o método sugerido por SCHUSTER (1955).

** A denominação dos isolados correspondem ao seguinte: Ca, Me, PI, = variedades em estudo; I, II, III = número de repetição; A1, A2, B1, C1, etc = a placa de Petri com sementes infectadas; deve-se considerar que cada placa levava 10 sementes (A1, ... A10).

*** O teste serológico usado foi de dupla-difusão em gel-ágar, de Ouchterlony, em lâminas, segundo KIMATI (1975).

4.1.6. Prova de patogenicidade com os isolados de semente.

Isolados de sementes das variedades Carioca, México-29 e PI 310-725, uma vez verificadas suas identidades como *X. phaseoli*, através do anti-soro Xp.As-15 e o homólogo 82-Da, foram usados para provas de patogenicidade.

As notas médias de infecção da variedade Carioca, inoculada com isolados de semente das variedades antes mencionadas, estão apresentados no Quadro 7, e a análise da variância, que não apresentou significação, no Apêndice 8.

Quadro 7. Reação da variedade Carioca a isolados de *X. phaseoli* provenientes de sementes de três variedades de feijoeiro.

Isolados	Índice de doença nas repetições*				
	1	2	3	4	5
Ca-III-A1	4,5	4,5	4,5	4,75	4,5
Ca-III-A3	4,5	4,5	4,25	4,5	4,5
Ca- II-A1	5,0	4,75	3,75	3,75	4,5
Ca- II-B1	4,75	4,0	3,50	3,50	3,50
PI- I-C1	4,5	4,5	5,0	4,0	3,75
PI- I-A1	4,0	4,0	4,5	4,0	4,25
PI- II-A1	4,0	4,25	4,0	4,0	4,0
PI-III-A1	4,75	4,5	4,25	3,75	3,75
Me- II-A1	5,0	4,0	4,0	3,75	3,75
Me- II-B1	4,25	4,25	3,75	3,75	3,75
Me- II-C1	4,0	4,75	4,0	4,5	4,25
Me- II-D1	4,0	4,5	4,5	3,75	4,5

* Cada valor representa a média das notas de quatro folhas primárias inoculadas. A escala de notas usada foi a sugerida por WEBSTER et alii (1980)

4.2. ENSAIO 2: Inoculação do Isolado 82-Da de *X. phaseoli* em Vagens de Variedades de Feijoeiro pelo Metodo de Riscas na Sutura Dorsal.

4.2.1. Comportamento de vagens de variedades de feijão inoculadas com *X. phaseoli*.

Os resultados obtidos neste ensaio aparecem no Quadro 8. A análise da variância foi feita com os valores transformados para \sqrt{x} e apresentou significação ao nível de 1% de probabilidade. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 9 e 10.

Quadro 8. Reação das vagens de variedades de feijoeiro inoculadas na sutu-
ra dorsal, com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*.

Variedades	Índice de infecção	
	X*	\sqrt{X} **
México-29	3.162	1.778 a
PI-310-725	3.137	1.771 a
Carioca	3.132	1.769 a
Jules	2.200	1.482 b
Tepary	1.000	1.000 c

* Notas médias de infecção de vagens, correspondentes a quatro repetições, segundo a escala de notas de 1 (ausência de sintomas) a 5 (encharcado de 50% da vagem).

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

4.2.2. Avaliação visual de sementes com sintomas de infecção de *X. phaseoli*.

Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados no Quadro 9. A análise da variância foi feita com os valores transformados para arco-seno, e apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 11 e 12.

Quadro 9. Porcentagem de semente de variedades de feijoeiro, infectadas com *X. phaseoli*, avaliadas visualmente.

Variedades	% de sementes infectadas*	Valores transformados a arco-seno **
México-29	14.4	21.872 a
Jules	15.28	23.040 a
Tepary	17.76	24.857 a
Carioca	29.84	33.017 b
PI 310-725	32.06	34.315 b

* Porcentagem média, de quatro repetições, de sementes infectadas com *X. phaseoli*, avaliadas visualmente, por sintomas.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

No primeiro ensaio não foi possível fazer esta avaliação por que as sementes não apresentaram sintomas discerníveis. No segundo ensaio teve-se sementes com sintomas evidentes, o que permitiu a avaliação.

4.2.3. Avaliação de sementes infectadas de variedades de feijoeiro analisadas no laboratório.

Os resultados obtidos neste ensaio aparecem no Quadro 10. A análise da variância foi feita com os valores transformados para $\sqrt{x+0.5}$ e apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 13 e 14.

Quadro 10. Porcentagem média de sementes de feijão infectadas, determinada no laboratório.

Variedades	% de sementes infectadas*	Valores em $\sqrt{x+0.5}$ **
Carioca	80.69	8.978 a
PI 310-725	76.15	8.699 a
México-29	23.07	4.666 b
Jules	18.32	3.647 b
Tepary	0.0	0.707 c

* Porcentagem média, de quatro repetições, de sementes infectadas com *X. phaseoli*, avaliadas por isolamento em meio de cultura ECA, no laboratório.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

4.2.4. Verificação serológica dos isolados de sementes

Os resultados das reações de precipitina entre os isolados de sementes, fervidos, e os anti-soros Xp.As-15 e Xp.As-18 estão apresentados no Quadro 11.

Conforme se pode notar, o comportamento dos isolados foi semelhante, observando-se especificidade da reação serológica para o antígeno homólogo 82-Da e os isolados de semente.

A reação de identidade evidenciou-se pela presença de duas linhas de precipitação, que uma vez unidas assemelharam-se a um círculo interno e a um hexágono externo.

Deve-se considerar que duas repetições nas variedades Carioca e PI 310-725 apresentaram todas as sementes contaminadas com uma bactéria de características morfológicas diferentes a *X. phaseoli*. Serologicamente não foi possível evidenciar algum tipo de reação, pois em todos os testes não se formaram linhas de precipitação. Tal fato também ocorreu para outros contaminantes conforme se observa no Quadro 11.

Quadro 11. Resultados de análise serológica dos isolados de *X. phaseoli* obtidos de sementes de variedades de feijoeiro. (*).

Variedades	Isolados	Reação serológica		
Jules (J)	J-I- ^{**}	-A1	***	
		-A2	++	
		-A3	++	
		-B1	++	
	J-III	-A1	++	
		-A2	++	
		-A3	++	
		-A4	++	
		-B1	+	
		-B2	+	
		-B3	++	
		-B4	++	
	-C1	++		
	J-IV	-A1	++	
	Carioca (Ca)	Ca-I	-A1	++
			-A2	++
-A3			++	
-B1			++	
-B2			++	
-C1			++	
Carioca (Ca)	Ca-I	-C2	++	
		-D1	++	
		-D2	++	
	Ca-II	-A1	++	
		-A2	++	
		-B1	++	
		-B2	++	
		-C1	++	
		-C2	-	
		-D1	-	
		-D2	++	
	-E1	++		
	Ca-III	-(a)	--	
	Ca-IV	-A1	++	
		-A2	++	
-B1		++		
-B2		++		
-B3		++		
-C1		++		
-C2	++			

(continua)

(continuação)

Variedades	Isolados	Reação serológica
Carioca	Ca-IV -D1	++
	-E1	++
PI.310-725 (PI)	PI-I -A1	++
	-A2	++
	-B1	++
	-B2	++
	-C1	++
	-C2	++
	-D1	++
	-D2	++
	-E1	++
	PI-II -(a)	--
	PI-III -A1	++
	-A2	++
	-A4	++
	-B1	++
	-B2	++
	-B3	++
	-C1	++
	-C2	++
	-C4	++
	PI-IV	-A1
-A2		++
-A4		-
-B1		++
-B2		++
-C1		++
-C2		++
-D1		++
-D2	++	
México-29 (Me)	Me-I -B2	++
	-B1	++
	-C2	++
	-C3	++
	-D1	++
	-D2	++
	-D3	++
	Me-I -E1	++
	-E2	++
	Me-II -A1	++
-B1	++	
(continua)	-B2	

(continuação)

Variedades	Isolados	Reação serológica
	-C1	++
	-E1	++
	-E2	++
	-F1	++
	Me-III -A1	++
	-C1	++
	-C2	++
	-D1	++
	-D2	++
	-E1	++
	-E2	++
	-F1	++
	-F2	++
	Me-IV -B1	++
	-B2	++
	-C1	++
	-C2	++
	-C3	++
	-E1	++
	-E2	++
Tepary (Te)	Te-III -A1	-
	-A2	-

* Sementes colhidas de vagens que foram inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*, segundo a técnica empregada por CAFATI e SAETTLER (1980).

** A denominação dos isolados corresponde ao seguinte: J, Ca, Pi, Me, Te: Variedades em estudo; I, II, III, IV: número de repetição; A, A1, B1, C1, etc: placa de Petri com semente infectada. (a): bactérias de cor branca presentes na totalidade de semente nas repetições.

*** O teste serológico usado foi o de dupla-difusão em gel-ágar de Ouchterlony, em lâminas, segundo KIMATI (1975).

4.2.5. Prova de patogenicidade dos isolados de semente

Isolados de sementes das variedades Carioca, México-29 , PI 310-725 e Jules, uma vez verificadas suas identidades como *X. phaseoli*, por serologia, foram usados para provas de patogenicidade.

Os resultados obtidos neste ensaio aparecem no Quadro 12. A análise da variância foi feita com valores transformados para \sqrt{x} e apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 15, 16 e 17.

Quadro 12. Comportamento da variedade Carioca inoculada com isolados de *X. phaseoli*, obtidos de semente infectada de quatro variedades de feijoeiro.

Isolados	Índice de infecção	
	\bar{x} *	$\sqrt{\bar{x}}$ **
Me-I-E1	4.70	2.167 a
Me-I-C3	4.55	2.132 ab
Me-III-A1	4.55	2.132 ab
Me-IV-C2	4.45	2.108 abc
Ca-I-C1	4.40	2.097 abcd
J-III-B3	4.30	2.072 bcd
J-III-A4	4.20	2.048 cd
Ca-IV-C1	4.20	2.048 cd
PI-I-A1	4.20	2.048 cd
J-IV-A1	4.15	2.036 cd
PI-I-B2	4.15	2.036 cd
Ca-I-B1	4.10	2.024 d
Ca-II-A2	4.10	2.024 d
PI-III-C2	4.10	2.023 d
PI-IV-D1	4.10	2.023 d
J-I-A1	4.05	2.011 d

* Média de cinco repetições, cada uma correspondente a quatro folhas inoculadas pelo método de incisão, de acordo com o trabalho de WEBSTER et alii (1980).

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

4.3. ENSAIO 3: Comportamento de Cinco Variedades de Feijoeiro Inoculadas com Cinco Isolados de *X. phaseoli*.

Os resultados obtidos neste terceiro ensaio aparecem nos quadros 13, 14 e 15. A análise de variância foi feita com os valores transformados para \sqrt{x} e apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade para variedades, isolados e sua interação. Os dados originais juntamente com a análise da variância estão nos Apêndices 18 e 19.

Quadro 13, Comportamento de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com cinco isolados de *X. phaseoli*.

Variedades	Índice de infecção	
	x^*	\sqrt{x}^{**}
Carioca	4.265	2.063 a
PI 310-725	4.108	2.022 ab
México-29	3.895	1.962 b
Jules	2.694	1.631 c
Tepary	0.977	0.983 d

* Médias, de quatro repetições, das notas de avaliação da reação de folhas de cinco variedades, inoculadas com cinco isolados de *X. phaseoli*, pelo método de incisão e escala de notas estabelecidas por WEBSTER et alii (1980).

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

Quadro 14. Comportamento de cinco isolados de *X. phaseoli* inoculados em cinco variedades de feijoeiro.

Isolados	Índice de infecção	
	\bar{X}^{**}	$\sqrt{\bar{X}}^{***}$
82-Da	3.869	1.920 a
3291	3.435	1.802 b
3074	3.132	1.719 bc
3133-7	3.085	1.704 c
270-2	2.419	1.516 d

* Médias, de quatro repetições, das notas de avaliação da reação das variedades inoculadas com cinco isolados.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

Quadro 15. Relação de patogenicidade de isolados de *X. phaseoli* inoculados em variedades de feijoeiro.

Variedades	Isolados				
	82-Da	3291	3074	3133-7	270-2
Carioca	5* a**	5 a	4 a	4 a	4 a
PI 310-725	5 a	4 a	4 a	4 a	3 a
México-29	5 a	4 a	4 a	4 a	2 b
Jules	4 b	3 b	2 b	2 b	2 b
Tepary	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c

* Notas de avaliação da reação das variedades de feijoeiro a isolados de *X. phaseoli*. As notas correspondem às médias das leituras, cujos decimais foram transformados a valores inteiros imediatos.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Duncan).

4,4. Serologia

4,4,1. Reação serológica dos isolados.

Os resultados dos testes de dupla-difusão em ágar (Ouchter - lony) dos isolados de sementes já foram mencionados nos itens 4.1.5 e 4.2.4. Não obstante fizeram-se comparações com outros isolados de *X. phaseoli*, *X. phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas* sp.

Todos os isolados de *X. phaseoli*, previamente aquecidos em bico de bunsen, reagiram com o antissoro Xp As-18. Em contraste, não houve reação com os isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas* sp. tanto aquecidos como macerados; desta forma nota-se que o anti-soro apresentou uma alta especificidade (Quadro 16).

Quadro 16. Comportamento serológico de isolados de *Xanthomonas phaseoli*, *X. phaseoli* var. *fuscans* e *Pseudomonas* sp.

Isolados	Antígenos aquecidos	Antígenos macerados
82-Da	++ *	++
3291	++	(a)
3074	++	
3133-7	++	
270-2	++	
253-80 (**)	--	--
A	--	--
B	--	--
<i>Pseudomonas</i> sp (***)	--	--

(*) Presença de duas linhas de precipitação (++)

Ausência de linhas de precipitação (--)

(**) Isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans*: 253-80 - Instituto Biológico-Campinas; A e B - Centro Nacional de Pesquisa Arroz-Feijão, EMBRAPA, Goiânia.

(***) *Pseudomonas* sp isolado de semente de feijão Bolinha-Amarelo - Ilha Solteira.

(a) Testes serológicos com os isolados 3291, 3094, 3133-7 e 270-2 de *X. phaseoli* previamente macerados não foram feitos, por evidenciar-se reação de identidade com o isolado 82-Da.

4.4.2. Titulação de anti-soros

Os resultados estão apresentados no Quadro 17 onde pode-se observar que as mais altas diluições dos anti-soros são as que produziram uma reação evidenciável, usando o método de microprecipitina em placa de Petri.

Quadro 17. Titulação de anti-soros de *X. phaseoli* (*)

Diluição	Anti-soros. (Xp - As)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1:1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:128	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:256	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1:1.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1:2.048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) Reação avaliada às duas horas.

(+) Reação de microprecipitina evidenciável.

5. DISCUSSÃO

5.1. Reação de Variedades de Feijoeiro Inoculadas com *X. phaseoli* em Diferentes Idades.

A análise da variância dos resultados da inoculação do isolado 82-Da por atomização, em cinco variedades de feijoeiro, apresentou uma alta significância, tanto para variedades como para épocas e sua interação (Quadros 1 e 2 do item 4.1.1. e Apêndice 2). Esta alta significância se deve ao comportamento das variedades Tepary e Jules que apresentam, de forma geral, resistência e ligeira suscetibilidade, respectivamente. Tal fato contrasta com as variedades restantes que se manifestaram como moderadamente suscetíveis.

A resistência apresentada pelo feijão Tepary foi verificada pela ausência de sintomas, o que está de acordo com os resultados obtidos por diferentes pesquisadores, entre eles SCHUSTER (1955); HONMA (1956); COYNE et alii (1963); CAFATI (1971) e YOSHII et alii (1978). No entanto, na inoculação realizada aos 35 dias, Tepary apresentou-se como levemente suscetível, sendo possível que a coincidência com a fase reprodutiva tenha determinado este comportamento. Este resultado coincide com as observações de EKPO e SAETTLER (1976) de que plantas de feijão nesta fase apresentam maior suscetibilidade a *X. phaseoli*. No mesmo sentido, SCHUSTER e COYNE (1971) notaram ligeira suscetibilidade em feijão Tepary Ac. nº 10, inoculado com o isolado Xp-C₇, se bem que não tenham mencionado a idade de inoculação.

A qualificação da variedade Jules como ligeiramente suscetível, considerando seu comportamento geral, não está inteiramente de acordo com outras pesquisas, obviamente pela disparidade de métodos e materiais empregados. Assim, COYNE e SCHUSTER (1970) consideraram a variedade Jules como altamente resistente. No entanto, YOSHII et alii (1978) e CAFATI e SAETTLER (1980) a classificaram como moderadamente suscetível e moderadamente resistente respectivamente. A qualificação dada pelos últimos pesquisadores coincide com a avaliação obtida neste ensaio.

A variedade Jules, quando inoculada aos 35 dias, apresentou uma moderada suscetibilidade. A data de inoculação coincidiu com a fase reprodutiva, o que provavelmente determinou uma maior suscetibilidade, de acordo com COYNE et alii (1973) e EKPO e SAETTLER (1976). Da mesma forma, pesquisa realizada por YOSHII et alii (1978) mostrou reação semelhante em plantas da variedade Jules inoculadas com cinco semanas de idade.

O comportamento das variedades Carioca, México-29 e PI 310-725, quando inoculadas aos 35 dias, foi semelhante, apresentando uma severa suscetibilidade, o que poderia se explicar pelo fato de estarem na fase reprodutiva, conforme observado anteriormente.

Na avaliação feita aos 50 dias notou-se uma diminuição na suscetibilidade das variedades e aos 65 dias todas reagiram como resistentes. Os resultados obtidos para estas épocas de inoculação não concordam com dados de outras pesquisas. Assim, alguns pesquisadores observaram que variedades de feijoeiro, na fase madura, apresentaram suscetibilidade, como por exemplo YOSHII et alii (1978) que a observaram para a variedade Jules, mas não para o feijão Tepary. No mesmo sentido, COYNE et alii (1973), GOSS (1940) e EKPO e SAETTLER (1976) apontam que plantas que estão amadurecendo apresentam maior suscetibilidade. Por outro lado, PATEL e WALKER (1963) mencionaram que plantas mais jovens apresentaram maior suscetibilidade que plantas velhas. Como se vê, na literatura existe discrepância, o que provavelmente tenha sua explicação, no sentido de que cada genótipo determina um comportamento distinto para cada época de desenvolvimento das plantas.

5.2. Cinética do Crescimento Bacteriano no Tecido Foliar

Os resultados do crescimento populacional de *X. phaseoli* permitiram claramente visualizar uma marcada diferença na capacidade das bactérias multiplicarem-se no hospedeiro. Nas três épocas de inoculação, a variedade Tepary apresentou uma menor taxa de multiplicação do que as variedades México-29 e Carioca (Quadro 3, Figuras 4, 5 e 6 e Apêndices 3, 4 e 5).

Estes resultados se relacionam com os sintomas apresentados pelas plantas. Assim, a inoculação aos 35 dias determinou níveis de infecção maiores do que os obtidos para as inoculações aos 50 e 65 dias, que manifestaram níveis inferiores e ausência de sintomas, respectivamente. Obviamente, a discriminação visual de resistência ou suscetibilidade das plantas está em estreita relação com o crescimento bacteriano no seu tecido foliar. No entanto, a variedade Tepary inoculada aos 50 dias e as variedades Carioca, México-29 e Tepary inoculadas aos 65 dias, se bem que permitindo crescimento bacteriano, não exibiram sintomas, provavelmente pelo baixo grau de desenvolvimento do patógeno.

Em relação ao parágrafo anterior, ALLINGTON e CHAMBERLAIN (1949) demonstraram que plantas de feijão consideradas como imunes apresentaram multiplicação de *X. phaseoli*, quando estas foram introduzidas em seus tecidos; e mais recentemente CAFATI e SAETTLER (1980) verificaram que folhas de plantas não hospedeiras podiam suportar multiplicação epífita da bactéria do "Crestamento Comum". Por outro lado, se considera que uma densidade de inóculo de pelo menos 5×10^6 talos bacterianos de *X. phaseoli* por 20 cm^2 de tecido foliar são necessários para produzir sintomas em plantas de feijão (WELLER e SAETTLER, 1980); notaram ainda estes pesquisadores que esta densidade corresponde ao início da fase estacionária.

O resultado obtido por estes pesquisadores concorda, parcialmente, com os dados observados neste ensaio. As populações para os diferentes dias de inoculação, conforme se vê nos dados para os isolamentos correspondentes aos 10 dias, nos Apêndices 3, 4 e 5, foram as seguintes:

<u>Variedades</u>	<u>Época de inoculação</u>		
	<u>35</u>	<u>50</u>	<u>65</u>
Tepary	68.6 x 10 ^{5*}	36.4 x 10 ⁴	20.0 x 10 ⁴
Carioca	42.0 x 10 ⁷	60.4 x 10 ⁵	57.7 x 10 ⁵
México-29	14.8 x 10 ⁸	90.0 x 10 ⁶	14.0 x 10 ⁵

* Número de talos bacterianos para 20 cm² de tecido foliar, após 10 dias da inoculação.

O exame dos resultados enunciados no item 4.1.1. evidencia - ram que a presença de sintomas se relaciona com a quantidade de talos bacterianos obtidos do tecido foliar, tanto na inoculação aos 35 dias como na inoculação aos 50 dias. A inoculação aos 65 discorda da observação dos pesquisadores citados anteriormente, pela ausência de sintomas nas variedades Carioca e México-29; no entanto, o comportamento do feijão Tepary está de acordo, pois na inoculação aos 35 dias manifestou sintomas não usuais e, nas outras datas, ausência de sintomas.

A presença de sintomas não usuais, caracterizados por uma rápida necrose e morte dos tecidos sem a presença de encharcado, foi observada em plantas de feijão Tepary inoculadas aos 35 dias. Anotações semelhantes fez SCHAREN (1959), que verificou também ausência de sintomas em plantas desta variedade, embora tenham apresentado desenvolvimento bacteriano.

A população bacteriana foi determinada pelo método de diluições sucessivas em placas. Os resultados obtidos mostram um rápido crescimento bacteriano nas variedades Carioca, México-29 e Tepary, embora as primeiras populações máximas fossem diferentes, segundo as épocas de inoculação. Isto ocorreu após 4, 6 ou 8 dias da inoculação e, na maioria dos casos, foi observado um declínio da população seguido por um crescimento posterior, o que contrasta com as observações de SCHAREN (1959); ALLINGTON e CHAMBERLAIN (1949); HSU e DICKEY (1972) e COYNE et alii (1973). Estes autores verificaram crescimento até 5-6 dias após a inoculação, seguido por declínio imediato e novo incremento da população.

O fato da multiplicação de grandes populações de *X. phaseoli* em tecidos de variedades resistentes ou moderadas é importante do ponto de vista epidemiológico, para os trabalhos de melhoramento e para a produ-

ção de semente, pela oportunidade que as bactérias têm de sofrer mutações e seleção para maior patogenicidade. Isto evidentemente pode ocorrer, como observou LINCOLN (1940), ao passar uma população bacteriana por um hospedeiro resistente.

5.3. Infecção de Vagens

Os valores apresentados nos Quadros 4 (item 4.1.3) e 8 (item 4.2.1) contrastam marcadamente pelo tipo de avaliação e fundamentalmente pelos métodos de inoculação empregados.

O método de inoculação por atomização apresentou uma resposta variável das vagens em diferentes fases de desenvolvimento. Isto pode explicar a baixa porcentagem média de área infectada. O método de riscas determinou uma resposta mais evidente e uniforme, apesar deste tipo de inoculação ser muito drástica.

A variedade Tepary nos dois ensaios não apresentou sintomas, não obstante o fato de vagens imaturas, após 4-5 dias da inoculação, terem manifestado pontinhos de tecido ou riscas necrosadas, conforme o método de inoculação empregado. Assim, considera-se que seu comportamento foi de resistência, conforme também foi observado por CAFATI (1971), YOSHII et alii (1978) e CAFATI e SAETTLER (1980).

A presença de sintomas sobre as variedades Carioca, México-29, PI 310-725 e Jules, inoculadas por atomização, não permitiu fazer uma avaliação qualitativa. De qualquer forma se observa que as notas estão de acordo com o comportamento de resistência ou suscetibilidade da folhagem e a idade fisiológica das plantas.

A variedade Jules apresentou infecção em vagens, em plantas inoculadas aos 50 dias de idade, sendo que nesta fase as plantas apresentam flores e vagens imaturas. No segundo ensaio, Jules manifestou uma nota de infecção média de 2.2, que a grosso modo se pode considerar como uma resistência moderada. Este valor está próximo aos obtidos por YOSHII et alii (1978) e CAFATI e SAETTLER (1980). Não obstante, deve-se considerar

as diferentes respostas que exhibe esta variedade à inoculação com diferentes isolados, o que obviamente permite certa flexibilidade na avaliação (SAETTLER e EKPO, 1975; EKPO e SAETTLER, 1976; YOSHII et alii, 1978).

As variedades Carioca, México-29 e PI 310-725 apresentaram maior infecção de vagens nas inoculações feitas aos 50 dias. A idade fisiológica das plantas teve um papel fundamental neste caso, como foi observado por COYNE et alii (1973), em estudo onde relaciona fase reprodutiva e suscetibilidade. Por outro lado, os mesmos pesquisadores observaram que plantas na fase adiantada de desenvolvimento de vagens apresentaram maior suscetibilidade que plantas em floração. Os resultados observados por inoculação em riscas concordam com o descrito anteriormente, o que foi evidenciado pela resposta de suscetibilidade das variedades Carioca, México-29 e PI 310-725, que estatisticamente não apresentaram diferenças.

As observações realizadas por COYNE et alii (1973), enunciadas anteriormente, também são válidas para analisar o comportamento das variedades Carioca e PI 310-725, inoculadas aos 65 dias de idade, que se comportaram como tardios, permitindo a infecção de vagens ainda imaturas. A presença de vagens infectadas em plantas de feijão PI 310-725, inoculadas aos 35 dias de idade, têm como explicação e ocorrência de uma provável infecção sistêmica. Este fato também foi observado por WELLER e SAETTLER (1980) em outras variedades.

5.4. Infecção de Sementes

Os dados obtidos estão apresentados nos Quadros 5, 9 e 10 dos itens 4.1.4, 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente. Conforme se observa no Quadro 5, plantas de feijão das variedades Carioca, México-29 e PI 310-725 ,

inoculadas aos 35 e 50 dias de idade, tiveram sementes com infecção interna, enquanto que as variedades Tepary e Jules não apresentaram infecção. A ausência de sintomas é característica em feijão Tepary, assim como a presença de tecido necrosado como resposta imediata à inoculação de *X. phaseoli*. Estes fatos também foram observados por SCHAREN (1959), CAFATI (1971) e YOSHII et alii (1978), tanto para folhagem como para vagens. Característica similar foi observada na variedade Jules, embora tendo apresentado, nas vagens, pequenas zonas com tecido encharcado, junto às riscas, como foi também constatado por CAFATI e SAETTLER (1980). Esta reação imediata à infecção provavelmente determinou a ausência de semente infectada nas duas variedades. No entanto, em pesquisas realizadas por CAFATI e SAETTLER (1980), encontrou-se semente de feijão Tepary com infecção externa, mas não com infecção interna.

Com relação à variedade Jules, inoculada aos 50 dias, embora apresentando sintomas em vagens, sementes com infecção interna não foram recuperadas em laboratório. É provável que a porcentagem restrita de tecido infectado de vagens não permitiu que as bactérias atingissem o interior da semente. Deve-se considerar como um fato de provável ocorrência a impossibilidade da penetração direta da bactéria através do tegumento das sementes, conforme foi observado por ZAUMEYER e THOMAS (1957) em outras variedades. Finalmente, deve-se observar que SCHUSTER et alii (1979) obtiveram semente infectada do feijão Jules em ensaios de campo.

As variedades PI 310-725, Carioca e México-29, em ordem de crescente segundo a porcentagem de sementes infectadas, estão relacionadas no Quadro 5. Embora os valores sejam pequenos, do ponto de vista epidemiológico representam um evidente perigo, pois por um lado se menciona que o limite tolerado de contaminação bacteriana, na produção de semente de feijão, é de 1% segundo Román e Pereira, mencionados por CARVALHO e NAKAGAWA (1980), e por outro lado categoricamente se observou que uma infecção de sementes, no campo, tão leve como 0.5% estaria em condições de provocar uma séria epifitotia na cultura (WALLEN e SUTTON, 1964). Isto determina a importância de se contar com variedades comerciais com alto nível de resistência para folhas e vagens.

A presença de *X. phaseoli* em semente da variedade Carioca, de plantas inoculadas aos 35 dias de idade, cujas vagens não apresentaram

sintomas, faz suspeitar que estejamos diante de um tipo de infecção eminentemente de natureza sistêmica. Este fato tem sido comprovado por numerosos pesquisadores, entre eles BURHOLDER (1921), ZAUMEYER e THOMAS (1957), SCHUSTER et alii (1979) e CAFATI e SAETTLER (1980).

Analisando os Quadros 9 e 10 dos resultados, observa-se uma total disparidade na avaliação de sementes infectadas por sintomatologia e por isolamento em meio de cultura. Isto sugere que uma apreciação visual, subjetiva, não concorda com os valores reais obtidos no laboratório. O método de inoculação por riscas produziu sintomas evidentes em vagens das variedades Carioca, México-29 e PI 310-725, necrose e leve encharcado no feijão Jules e somente necrose no feijão Tepary, conforme se observa no Quadro 8. Tal fato, teoricamente, deveria determinar sementes visivelmente infectadas pois, segundo as observações de WELLER e SAETTLER (1980), vagens com sintomas evidentes é um requisito para a produção de sementes com infecção manifesta.

As sementes de feijão Tepary analisadas em laboratório não apresentaram colônias de *X. phaseoli* sobre o meio de cultura YCA. Estes resultados estão em contradição com os dados obtidos por CAFATI e SAETTLER (1980) que determinaram, na variedade Tepary Arizona-Buff, 46% de sementes infectadas naquelas que apresentavam sintomas visíveis, e 5.4% naquelas que não apresentavam. É provável que o imediato necrosamento dos tecidos impediu a disseminação bacteriana nos tecidos das vagens, apesar de ter havido uma drástica inoculação.

O comportamento das variedades, em relação à predisposição de infecção de sua semente, se visualiza no Quadro 10. Os valores permitem distinguir três grupos definidos: o feijão Tepary que manifestou ausência de sementes infectadas, as variedades Jules e México-29 que apresentaram uma porcentagem moderada de infecção e as variedades Carioca e PI 310-725 que tiveram alta porcentagem de sementes infectadas. Estas observações se relacionam com a reação de resistência e/ou suscetibilidade que apresentaram estas variedades à infecção de folhas e vagens com *X. phaseoli*, já analisadas anteriormente. Embora a reação do feijão México-29 provavelmente devesse ser diferente, esta circunstância permite acreditar que diferentes genes podem controlar a reação de resistência das diferentes partes das plantas.

Com relação à variedade Jules, a porcentagem média de sementes infectadas foi de 18.32%, em condições de casa de vegetação. Este valor contrasta com 51% obtido por CAFATI e SAETTLER (1980) em condições de campo.

As observações opostas encontradas nos diversos ensaios sugere, mais uma vez, a necessidade de se padronizar a metodologia empregada na pesquisa com *X. phaseoli*, como já foi proposto por SAETTLER (1977).

5.5. Verificação Serológica dos Isolados de Sementes

O uso da serologia como um recurso para a rápida determinação de um agente causal é um assunto bastante conhecido. De acordo com KIRALY et alii (1974) e SCHAAD (1979), representa um instrumento de inestimável valor na identificação de bactérias fitopatogênicas, que por testes rotineiros requereria muito tempo e não seriam inteiramente satisfatórios. No entanto, considera-se difícil sua total substituição pela serologia.

Os resultados serológicos apresentados no Quadro 16, para isolados homólogos e heterólogos, e nos Quadros 6 e 11, para isolados de sementes, comprovam o anteriormente mencionado. Desta forma, o teste de dupla difusão em ágar de Ouchterlony pode ser usado na rápida identificação de *Xanthomonas phaseoli*, uma vez que todos os isolados homólogos reagiram com os anti-soros XpAs-15 e XpAs-18. Em relação ao trabalho em discussão, GUTHRIE et alii (1965) obtiveram muito sucesso na determinação de *Pseudomonas phaseolicola*, presente em semente infectada de feijoeiro; de igual forma BECKER (1980) informou a possibilidade de uma rápida identificação de *Pseudomonas glycinea* em folhas de soja.

A especificidade do anti-soro permitiu diferenciar claramente os isolados homólogos dos isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans*, um isolado de *Pseudomonas* sp. e bactérias contaminantes. Isto foi verificado pela formação de duas linhas de precipitação que se uniram formando um círculo interno e um hexágono externo, com ausência de esporão para os isolados homólogos, enquanto que a ausência de linhas de precipitação caracterizou

os outros isolados. Este fato foi evidenciado por Feinberg, citado por KIRALY et alii, (1974), para antígenos homólogos.

O aquecimento do antígeno, no bico de bunsen, provocou aumento na sensibilidade, provavelmente pela liberação de componentes antigênicos das células bacterianas, fato que foi constatado por BECKER (1980), ao relacionar a sensibilidade de antígenos aquecidos e macerados de *Ps. glycinia*. Não obstante, CHARUDATTAN et alii (1973) consideraram que antígenos não aquecidos podem ajudar na diferenciação de serotipos de *Xanthomonas* spp.

Com relação à titulação dos anti-soros, observa-se no Quadro 17, item 4.4.2, um aumento paulatino do título em cada um deles, à medida que se aumentava o número de imunizações.

O anti-soro XpAs-18, conforme foi mencionado anteriormente, apresentou especificidade para seus isolados homólogos, e ausência de reação com os heterólogos *X. phaseoli* var. *fuscans*, *Pseudomonas* sp e bactérias contaminantes. Este padrão de comportamento já foi constatado em pesquisas anteriores, como se mencionou nos trabalhos de LINK e SHARP (1927) e SHARP (1927). Estes mesmos autores determinaram, ainda, que *X. phaseoli* contém proteínas que produzem anticorpos que reagem com *X. campestris*, não tendo ocorrido o contrário.

Posteriormente, ELROD e BRAUN (1947) demonstraram a presença de grupos imunológicos, considerando que o grupo "*phaseoli*" estava constituído por *X. phaseoli*, *X. phaseoli* var. *fuscans*, *X. gerani*, *X. pelargonii* e *X. malvacearum*. Tal fato foi determinado mediante reações de aglutinação cruzada.

5.6. Provas de Patogenicidade

O comportamento dos isolados de sementes para os dois ensaios foi contrastante. No primeiro teste, descrito no item 4.1.6. os isolados não diferiram significativamente; não obstante, no segundo teste, descrito no item 4.2.5, foi observada variação das notas médias de infecção devido, principalmente, ao comportamento dos isolados da variedade Mé-

xico-29 e o isolado Carioca -I-C₁. Obviamente há também outras diferenças que foram avaliadas estatisticamente, conforme consta no Quadro 12.

As variedades México-29, Carioca e PI 310-725 nos diferentes testes efetuados se comportaram como suscetíveis, enquanto que o feijão Jules manifestou resistência. A presença de isolados mais patogênicos, ainda, é difícil de ser explicado à luz dos conhecimentos atuais. Em todo caso não se descarta a possibilidade de adaptação ao hospedeiro com a produção de linhagens com esta característica. Não obstante, foi verificada a ausência de um padrão de comportamento quer seja para variedades resistentes e/ou suscetíveis.

Os isolados que apresentaram maior patogenicidade foram os obtidos da variedade México-29, considerada como de resistência intermediária. Os isolados procedentes das outras variedades apresentaram uma patogenicidade variável. A fim de se ter certeza do comportamento dos isolados, seria necessário uma pesquisa mais completa em vista de algumas discrepâncias existentes com outros trabalhos. De qualquer forma, os dados obtidos no presente ensaio concordam com observações efetuadas por diversos pesquisadores. Assim, por exemplo, WALLEEN e SUTTON (1965), estudando 50 isolados de *X. phaseoli* var. *fuscans* de uma amostra de sementes de feijão, obtiveram diferenças culturais entre eles e sua patogenicidade variou consideravelmente.

Outra referência que ajuda a explicar o comportamento dos isolados de sementes neste trabalho é a pesquisa feita por COREY e STARR (1957) que verificaram que colônias de *X. phaseoli* originárias do isolado XP 104 diferiam em características culturais e em sua habilidade de produzir lesões, embora apresentassem a mesma taxa de crescimento dentro do tecido hospedeiro.

Outras evidências de alteração patogênica foram mencionadas na literatura; assim, por exemplo, a passagem de linhagens não patogênicas de *Erwinia amylovora* através de tecidos suscetíveis usualmente restaurou a sua patogenicidade. No entanto, a maioria dos isolados desta bactéria demonstrou considerável variabilidade, desde uma alta patogenicidade até perda total da mesma, tendo ocorrido em condições de cultura normais para conservação em laboratório (HILDEBRAND, 1954). Por outro lado, WELLHAUSEN (1937) verificou que passagens sucessivas de *Phytomonas stewarti* (*Erwinia*

stewartii (Smith) Dye, 1963) através de milho altamente resistente incrementou a patogenicidade dos novos isolados. Em contraste, passagens sucessivas através de milho suscetível diminuiu a patogenicidade.

Alguns autores informaram que estas modificações são temporárias e não implicam mudanças genéticas. Outros consideram que os patógenos não são estáveis e que ocorrem mudanças genéticas com perda ou ganho de patogenicidade (CHRISTENSEN e DeVAY, 1955). Finalmente, um incremento da patogenicidade de *X. phaseoli* não foi constatada em quatro passagens sucessivas por feijão resistente (CAFATI, 1971).

Os isolados, em síntese, apresentaram variabilidade em sua patogenicidade, embora tivessem uma origem comum, o isolado 82-Da. O comportamento de maior patogenicidade dos isolados anteriormente mencionados sugere a ocorrência de um provável processo de adaptação. Os resultados obtidos nas provas de patogenicidade demonstraram que os isolados de sementes foram patogênicos. Isto tem sua importância pois, além de constituir inóculo primário, a doença se perpetua, constituindo um problema potencial no desenvolvimento de possíveis epidemias e de novas linhagens mais patogênicas, o que obviamente dificulta os trabalhos de melhoramento.

5.7. Reação de Variedades de Feijoeiro à Inoculação com Isolados de *Xanthomonas phaseoli*.

A análise da variância dos resultados mostrou diferenças altamente significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre variedades, isolados e a interação variedades por isolados (Quadros 13, 14 e 15 e Apêndices 18 e 19).

Com relação às cinco variedades testadas frente aos cinco isolados, de uma maneira geral, considera-se que a reação à doença apresentada por estas foi similar à obtida no primeiro ensaio; não obstante, comparando as notas médias de infecção das variedades, observou-se uma diferente posição das mesmas, provavelmente devido ao emprego de outra metodologia e época de inoculação. O feijão Tepary comportou-se como resistente, a variedade Jules como levemente suscetível e os outros cultivares

apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade, segundo os isolados testados.

Os isolados manifestaram variação de patogenicidade. O isolado 82-Da comportou-se como altamente patogênico, os isolados 3291, 3074 e 3133-7 de comportamento intermediário e o isolado 270-2 de patogenicidade fraca. A interação diferencial significativa entre cultivares e isolados deve-se ao comportamento da variedade México-29, inoculada com o isolado 270-2, que não apresentou diferença significativa com a variedade Jules, alterando sua classificação em relação aos outros isolados.

A fim de fazer uma análise das observações anotadas nos parágrafos anteriores, menciona-se literatura pertinente. Segundo VAN DER PLANK (1968), a resistência vertical taxativamente implica numa interação diferencial entre variedades do hospedeiro e raças do patógeno, podendo ser analisada por métodos estatísticos ordinários. Indicou, ainda, que esta resistência provavelmente nunca ocorre desligada de resistência horizontal. No entanto, atualmente, este conceito está desvirtuado por observações feitas em pesquisas posteriores; assim por exemplo, PARLEVLIT (1977) discordou da validade do teste de interação hospedeiro-patógeno ao evidenciar esta característica no sistema poligênico *Hordeum vulgare-Puccinia*. Outros pesquisadores observaram que os dois tipos de resistência podem ser confundidos, e que em relações quantitativas foram encontradas pequenas interações (CATEN, 1974; NELSON, 1978).

Apesar de uma ligeira interação diferencial ter sido identificada na análise estatística, a interpretação dos dados obtidos indicam que os diferentes graus de resistência exibidos pelas variedades são de natureza horizontal assim como, de modo semelhante, os diferentes graus de patogenicidade exibidos pelos isolados são de natureza agressiva.

A diferença em patogenicidade apresentada pelos isolados merece atenção, em vista de resultados contrastantes que pode determinar. TUIE (1969) informou que mudanças em patogenicidade, características culturais e diminuição de esporulação ocorrem em meio de cultura de rotina. Há numerosas informações sobre a atenuação da patogenicidade de bactérias fitopatogênicas quando crescem sobre meios de cultura artificiais (CHRISTENSEN e DeVAY, 1955).

Por outro lado, SMALE e WORLEY (1956) diferenciaram a patogenicidade de colônias individuais de *X. phaseoli* utilizando tetrazólio; além disto também observaram que isolamentos recentes causavam infecções mais severas em feijoeiro que isolados velhos conservados em meios de cultura comuns. Isolados de *X. phaseoli* inoculados em diferentes variedades de feijão apresentaram diversos níveis de patogenicidade (SCHUSTER e COYNE 1971; SCHUSTER et alii, 1973; EKPO e SAETTLER, 1976).

Os antecedentes anteriormente mencionados podem de certo modo ajudar a explicar o comportamento dos isolados. O isolado 82-Da esteve em constante reisolamento, os outros estiveram mantidos em meios de cultura de rotina (BDA, YCA). No entanto, é preciso considerar que os isolados foram passados uma vez pela variedade Carioca antes de serem usados no terceiro ensaio.

Dos fatos observados neste item considera-se de fundamental importância o uso de isolados de diferentes procedências a fim de ter certeza da resposta de resistência e ou suscetibilidade que as variedades pos sam apresentar.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem as seguintes conclusões:

1. As variedades Tepary, Jules, México-29, Carioca e PI 310-725 reagiram distintamente a *X. phaseoli* conforme as épocas de inoculação da folhagem. No entanto, a reação geral foi de resistência em Tepary, ligeira suscetibilidade em Jules e moderada suscetibilidade nas três variedades restantes. Este comportamento determinou que, com exceção feita às variedades Jules e Tepary, as variedades tivessem apresentado sementes infectadas, quando inoculadas por atomização na fase reprodutiva.
2. Todas as variedades apresentaram maior suscetibilidade na fase reprodutiva e maior resistência na fase madura. Assim, as variedades de feijoeiro devem ser inoculadas na fase reprodutiva para que se tenha uma melhor discriminação de resistência e suscetibilidade.
3. Os tecidos foliares das variedades Tepary, Carioca e México-29 permitem diferentes intensidades de crescimento bacteriano, conforme a época de inoculação. Em Tepary, o crescimento bacteriano foi menor que em México-29 e Carioca,
4. As vagens apresentaram diferentes níveis de infecção conforme o método de inoculação e a resposta da variedade. O método de inoculação de vagens por riscas na sutura dorsal permitiu uma melhor discriminação

de resistência e suscetibilidade. Em Tepary verificou-se uma rápida necrose do tecido, em Jules necrose com leve encharcamento e nas variedades Carioca, México-29 e PI 310-725 típico encharcamento. Este comportamento das vagens à infecção determinou que Tepary não apresentasse sementes infectadas. As variedades México-29 e Jules tiveram uma porcentagem moderada, Carioca e PI 310-725 uma alta porcentagem.

5. A avaliação visual das sementes infectadas não foi exata e diferiu marcadamente das porcentagens obtidas no laboratório. Por isto não se sugere seu emprego, ainda, em trabalhos de avaliação de rotina.
6. Os testes serológicos de isolados de sementes permitiram identificar *X. phaseoli* com alta especificidade, sugerindo possível aplicação prática em trabalhos de certificação de sementes de feijoeiro.
7. As provas de patogenicidade de isolados de sementes revelaram que as bactérias em estado de hipobiose na semente conservam sua patogenicidade. Os isolados mais patogênicos não corresponderam claramente a um grupo definido de isolados obtidos de variedades com uma reação particular à doença. Desta forma, deve-se contar com variedades que apresentam resistência na folhagem e vagens, a fim de que se possa diminuir o risco de transmissão do patógeno pela semente.
8. Os diferentes graus de resistência exibidos pelas variedades Tepary, Jules, México-29, Carioca e PI 310-725 são de natureza horizontal assim como, de modo semelhante, os diferentes graus de patogenicidade exibidos pelos isolados utilizados são de natureza agressiva.

7. RESUMO

Pesquisas em laboratório e casa de vegetação foram efetuadas para estudar o comportamento de *X. phaseoli*. Diversas técnicas foram utilizadas para inocular variedades resistentes e suscetíveis, usando uma cultura com uma concentração de 2.8×10^8 células bacterianas/ml (62% de transmitância ótica). A ocorrência de sintomas foi observada durante o período experimental de estudo. Testes serológicos foram utilizados para a identificação do patógeno.

A análise e interpretação dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. Das cinco variedades usadas no estudo (Tepary, Jules, México-29, Carioca e PI 310-725), Tepary foi mais resistente ao patógeno. No entanto, em geral, todas foram suscetíveis durante sua fase reprodutiva e resistentes durante sua fase madura.
2. O crescimento da bactéria foi menor na variedade Tepary quando comparada com Carioca e México-29. Sementes de Tepary não foram infectadas, enquanto que Carioca e PI 310-725 apresentaram uma alta porcentagem de sementes infectadas. Isolados mais patogênicos foram obtidos a partir de sementes da variedade México-29.
3. O diferente grau de resistência exibido pelas variedades foi de natureza horizontal. Similarmente, os diferentes graus de patogenicidade apresentados pelos isolados foram de natureza agressiva.

8. SUMMARY

Greenhouse and laboratory studies were conducted to determine the overall behavior and infecting pattern of *X. phaseoli*. Resistant and susceptible varieties were inoculated by various techniques using a culture with a concentration of 2.8×10^8 bacteria cells/ml (62% optical transmittance). The occurrence of symptoms was observed throughout the experimental phase of the study. Serological tests were used for the identification of the pathogen.

Analysis and interpretation of the results allowed for the following conclusions:

1. Of the five bean varieties used in the study (Tepary, Jules, México-29, Carioca and PI 310-725), Tepary appeared to be more resistant to the pathogen. In general, however, all were susceptible during their reproductive phase and resistant during the maturing period.

2. Growth of the bacteria was less in the Tepary variety when compared with Carioca and México-29. Seeds of Tepary were not affected whereas Carioca and PI 310-725 showed a high percentage of affected seeds. Seeds from the México-29 variety yielded the most pathogenic isolates.

3. The different degree of resistance exhibited by the varieties were found to be of a horizontal kind. Similarly, the different degrees of pathogenicity shown by the isolates were of an aggressive nature.

9. LITERATURA CITADA

- ALLINGTON, W.B. e D.W. CHAMBERLAIN. 1949. Trends in the population of pathogenic bacteria within leaf tissues of susceptible and immune plant species. *Phytopathology*. 39:656-660.
- ANDRUS, C.F. 1948. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. *Phytopathology*. 38:757-759.
- ARP, G., D.P. COYNE e M.L. SCHUSTER. 1971. Disease reaction of bean varieties to *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* using two inoculation methods. *Plant Dis. Repr.* 55:577-579.
- BALL, E.M. 1974. Serological tests for identification of plant viruses. St. Paul, Minnesota. The Amer. Phytopath. Soc., Plant Virology Committee. 31 p.
- BASU, P.K. e V.R. WALLEN. 1966. Influence of temperature on the viability, virulence and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in vivo and in vitro. *Canadian J. Bot.* 44:1239-1245.
- BECKER, W.F. 1980. Atividade bacteriocinogênica, resistência a antibióticos e métodos rápidos para determinação da patogenicidade em *Pseudomonas glycinea* Coerper. Piracicaba. ESALQ/USP, 107 p. (Tese de Mestrado).
- BEEBE, S.E. e M.A. PASTOR-CORRALES. 1981. Comparison of two inoculation techniques for the evaluation of resistance in beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: Abstracts. 5th International Conference on "Plant Pathogenic Bacteria". Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 55.

- BURKE, D.W. 1957. Incidence of bacterial pathogens in dry beans in irrigated districts of Nebraska, Wyoming and Colorado in 1954 and 1955. *Plant Dis. Repr.* 41:488-490.
- BURKHOLDER, W.H. 1921. The bacterial blight of the bean: a systemic disease. *Phytopathology* 11:61-69.
- CAFATI, C.K. 1971. Reação de variedades de feijoeiro a *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows. e *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk. Piracicaba. ESALQ/USP, 59 p. (Tese de Mestrado).
- CAFATI, C.K. e A.W. SAETTLER. 1980. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. *Phytopathology* 70:638-640.
- CAFATI, C.K. e A.W. SAETTLER. 1980a. Role of nonhost species as alternate inoculum sources of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease*. 64:194-96
- CARVALHO, N.M. e J. NAKAGAWA. 1980. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. Campinas. Fundação CARGILL. 326 p.
- CATEN, C.E. 1974. Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaptation to field resistance for potato blight. *Ann. appl. Biol.* 77: 259-270.
- CHARUDATTAN, R., R.E. STALL e D.L. BATCHELOR. 1973. Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology*. 63: 1260-1265.
- CHRISTENSEN, J.J. e J.E. DeVAY. 1955. Adaptation of plant pathogen to host. *Annual Rev. of Plant Physiology*. 6:367-392.
- CLIVE, W.J. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Can. Plant Dis. Surv.* 51:39-65.
- COREY, R.R. e M.P. STARR. 1957. Colony types of *Xanthomonas phaseoli*. *Journal of Bacteriology*. 74:137-140.
- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1970. "Jules", a Great Northern dry bean variety tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Dis. Repr.* 54:557-559.

- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1973. *Phaseolus* germplasm tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Dis. Repr.* 57:111-114
- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1974a. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. *Euphytica*. 23:651-656.
- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1974b. Differential reaction of pods and foliage of beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Dis. Repr.* 58:278-282.
- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1974c. Great Northern Valley dry bean. *Hort Science*. 9:482.
- COYNE, D.P. e M.L. SCHUSTER. 1974d. A morphological and physiological component genetic approach to breeding for tolerance to the bacterial pathogens *Pseudomonas phaseolicola* and *Xanthomonas phaseoli*. *Ann. Rept. Bean Imp. Crop*. 17:23-25.
- COYNE, D.P. e M. L. SCHUSTER. 1976. "Great Northern Star" dry bean tolerant to bacterial diseases. *HortScience*. 11:621.
- COYNE, D.P., M.L. SCHUSTER e S. AL-YASIRI. 1963. Reaction studies of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt. *Plant Dis. Repr.* 47:534-537.
- COYNE, D.P., M.L. SCHUSTER e L. HARRIS. 1965. Inheritance, heritability and response to selection for common blight (*Xanthomonas phaseoli*) tolerance in *Phaseolus vulgaris* field bean crosses. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 86:373-379.
- COYNE, D.P., M.L. SCHUSTER e K. HILL. 1973. Genetic control of reaction to common blight bacterium in bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by plant age and bacterial multiplication. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 98:94-99.
- CRISPIN, A. e J. CAMPOS. 1976. Bean diseases of importance in México in 1975. *Plant Dis. Repr.* 60:534-535.
- DOSSA, D. 1981. Abastecimento e comercialização do feijão. *A Lavoura* 34:14-17 (maio/junho).

- DYE, D.W., J.F. BRADBURY, M. GOTO, A.C. HAYWARD, R.A. LELLIOT e M.N. SCHROTH. 1980. International standars for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains . *Review of Plant Pathology*. 59:153-167.
- DYE, D.W. e R.A. LELLIOT. 1974. Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. 187. In BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS. Eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. Baltimore. Williams & Wilkins Co. P. 243-249.
- EKPO, E.J.A. e A.W. SAETTLER. 1976. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Dis. Repr.* 60:80-83.
- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN. 1947. Serological studies of the Genus *Xanthomonas* I. Cross-Agglutination Relationships. *J. Bacteriol.* 53:509-518
- GONZALEZ, G.B. 1974. *Métodos estadísticos y principios de diseño experimental*. Quito. Universidad Central del Ecuador. 331 p.
- GOSS, R.W. 1940. The relation of temperature to common and halo blight to beans. *Phytopathology*. 30:258-264.
- GÜTHRIE, J.W., D.M. HUBER e H.S. FENWICK. 1965. Serological detection of halo blight. *Plant Dis. Repr.* 49:297-299.
- HARRISON, D.E., H. FREEMAN e P.R. SMITH. 1964. Common and fuscous blights of french bean. *J. Agric. Vict. Dep. Agric.* 62:508-514.
- HILDEBRAND, E.M. 1954. Relative stability of fire blight bacteria. *Phytopathology*. 44:192-197.
- HONMA, S. 1955. A technique for artificial culturing of bean embryos . *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 65:405-408.
- HONMA, S. 1956. A bean interspecific hybrid. *J. Heredity*. 47:217-220.
- HSU SHIH-TIEN e R.S. DICKEY. 1972. Comparative growth of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas vesicatoria* and development of symptoms in bean and tomato leaves. *Phytopathology*. 62:329-332.

- KAISER, W.J. e N.G. VAKILI. 1978. Insect transmission of pathogenic xanthomonads to bean and cowpea in Puerto Rico. *Phytopathology*. 68:1057-1063.
- KIMATI, H. 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (*sensu* Arx, 1957). Piracicaba. ESALQ / USP, 103 p. (Tese Livre-Docência).
- KIMATI, H. 1980. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F., Coord. *Manual de Fitopatologia. Vol. II. Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo. Editora Agronômica CERES LTDA., p. 297-318.
- KIRALY, Z., Z. KLEMENT, F. SOLYMOSSY e J. VOROS. 1974. *Methods in Plant Pathology*. Budapest. Elsevier Scientific Publishing Company, 509 p.
- LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA. 1975. Furagar. *Summa Phytopathologica* 1: 143-146.
- LINCOLN, R.E. 1940. Bacterial wilt resistance and genetic host-parasite interactions in maize. *Jour. Agric. Res.* 60:217-239.
- LINK, G.K.K. e C.G. SHARP. 1927. Serological differentiation of *Bacterium campestre* from *Bact. phaseoli*, *Bact. phaseoli sojense* and *Bact. flaccum faciens*. *Phytopathology*. 17:53-54.
- NAMEKATA, T. 1971. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do "Cancro Cítrico" e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., n.f.sp. *aurantifolia*, agente causal do "Cancro do Limoeiro Gale-go". Piracicaba. ESALQ/USP. 65 p. (Tese de Doutorado).
- NATTI, J.J. 1970. Control of bacterial diseases of bean. *Ann.Rept. Bean Imp. Coop.* 13:20-26.
- NELSON, R.R. 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 16:359-378.
- PARLEVLIET, J.E. 1977. Evidence of differential interaction in the polygenic *Hordeum vulgare* - *Puccinia* relation during epidemic development. *Phytopathology*. 67:776-778.

- PATEL, P.N. e J.C. WALKER. 1963. Relation of air temperature and age and nutrition of the host to the development of halo and common bacterial blights of bean. *Phytopathology*. 53:407-411.
- PELTIER, G.L., C.E. GEORGI e L.F. LINDGREN. 1965. *Laboratory manual for General Bacteriology*. 5th edition. New York, John Willey & Sons. Inc. 295 p.
- PIMENTEL GOMES, F. 1978. *Curso de Estatística Experimental*. 8a. edição. Piracicaba, Livraria Nobel S.A. 430 p.
- POMPEU, A.S. e L.V. CROWDER. 1972. Inheritance of resistance of *Phaseolus vulgaris* (dry beans) to *Xanthomonas phaseoli* Dows. (common blight). *Ciência e Cultura*, São Paulo, 24:1055-1063.
- POMPEU, A.S. e L.V. CROWDER. 1973. Methods of inoculation and bacterial concentration of *Xanthomonas phaseoli* Dows. for the inheritance of disease reaction in *Phaseolus vulgaris* L. crosses (dry beans), under growth chamber conditions. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 25:1078-081
- SABET, K.A. e F. ISHAG. 1969. Studies on the bacterial diseases of Sudan crops. VIII Survival and dissemination of *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Sm.) Dowson. *Ann. appl. Biol.* 64:65-74.
- SAETTLER, A.W. 1977. Breeding dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for tolerance to *Xanthomonas* bacterial blights. *Fitop. Brasileira*. 2: 179-186.
- SAETTLER, A.W. e E.J.A. EKPO. 1975. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. *Ann. Rept. Bean Imp. Coop.* 18: 67-70.
- SAETTLER, A.W. e S.K. PERRY. 1972. Seed-transmitted bacterial diseases in Michigan navy (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. *Plant Dis. Reprtr.* 56:378-381.
- SARTORATO, A. e C.A.S. RAVAS. 1979. Detecção de novas fontes de tolerância ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Goiânia. Centro Nacional de Pesquisa Arroz-Feijão - EMBRAPA p. 1-3.

- SCHAAD, N.W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17:123-147.
- SCHAREN, A.L. 1959. Comparative population trends of *Xanthomonas phaseoli* in susceptible, field tolerant and resistant hosts. *Phytopathology.* 49:425-428.
- SCHUSTER, M.L. 1955. A method for testing resistance of beans to bacterial blights. *Phytopathology.* 45:519-520.
- SCHUSTER, M.L. 1967. Survival of bean bacterial pathogens in the field and greenhouse under different environmental conditions. *Phytopathology.* 57:830.
- SCHUSTER, M.L. 1970. Survival of bacterial pathogens of beans. *Ann.Rept. Bean Improv. Coop.* 13:68-70.
- SCHUSTER, M.L. e D.P. COYNE. 1971. New virulent strains of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Dis. Repr.* 55:505-506.
- SCHUSTER, M.L. e D.P. COYNE. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* 12:199-221.
- SCHUSTER, M.L. e D.P. COYNE. 1975. Detection of bacteria in bean seed. *Ann. Rept. Bean Improv. Coop.* 18:71.
- SCHUSTER, M.L. e D.P. COYNE. 1977. Supervivência de patógenos bacterias de plantas en el trópico con énfasis en frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Fitopatologia Colombiana.* 6:101-111.
- SCHUSTER, M.L., D.P. COYNE e B. HOFF. 1973. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. *Plant Dis. Repr.* 57:74-75.
- SCHUSTER, M.L., D.P. COYNE, D.S. NULAND e C.C. SMITH. 1979. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* and other bacterial species of varieties in seeds of tolerant bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Plant Dis. Repr.* 63:955-959.
- SCHUSTER, M.L. e R.M. SAYRE. 1967. A coryneform bacterium induces purple colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae. *Phytopathology.* 57:1064-1066.

- SHARP, C.G.S. 1927. Serological and physiological studies of *Bacterium phaseoli*, *Bact. phaseoli sojense* e *Bact. flaccumfaciens*. *Phytopathology*. 17:54.
- SCHWARTZ, H.F. e G.E. GÁLVEZ, Coord. 1980. *Problemas de producción del frijol. Enfermedades, Insectos, Limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 413-424.
- SMALE, B.C. e WORLEY, J.F. 1956. Evaluation of 2, 3, 4 triphenyl tetrazolium chloride for obtaining pathogenic types from stock cultures of halo blight and common blight organisms. *Plant Dis. Repr.* 40:628.
- SUTTON, M.D. e V.R. WALLEEN. 1970. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in southwestern Ontario, 1961-1968. *Canadian J. Bot.* 48:1329-1334.
- THOMAS, W.D. Jr. e R.W. GRAHAM. 1952. Bacteria in apparently healthy Pin to beans. *Phytopathology*. 42:214.
- TRUJILLO, G.E. e A.W. SAETTLER. 1979. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *Journal of Seed Technology*. 4:35-41.
- TUITE, J. 1969. *Plant Pathology Methods, Fungi and Bacteria*. Minneapolis, Burger's Publishing Company. 239 p.
- VAN DER PLANK, J.E. 1968. *Disease Resistance in Plants*. New York & London, Academic Press. 206 p.
- VENETTE, J.R. e J.B. NAYES. 1978. A seed test to detect internally borne bacterial pathogens of beans. *Phytopath. News*. 12:92.
- VICTORIA, J.I., G. BASTIDAS e O. AGUDELO. 1981. Resistance to bacterial common blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in beans. In: Abstracts. 5th International Conference on "Plant Pathogenic Bacteria". Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 72.
- WALLEEN, V.R. e M.D. SUTTON. 1965. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (BURK.) Starr & Burk. on field bean in Ontario. *Canadian J. Bot.* 43: 437-446.

- WALLEN, V.R. e H.R. JACKSON. 1975. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. *Phytopathology*. 65:942-948.
- WEBSTER, D.M., S.R. TEMPLE e H.F. SCHWARTZ. 1980. Selection for resistance to *Xanthomonas phaseoli* in dry beans. *Crop Science*. 20:519-522.
- WELLER, D.M. e A.W. SAETTLER. 1978. Rifampin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: tools for field study of bean blight bacteria. *Phytopathology*. 68:778-781.
- WELLER, D.M. e A.W. SAETTLER. 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. *Phytopathology*. 70:500-506.
- WELLHAUSEN, E.J. 1937. Effect of the genetic constitution of the host on the virulence of *Phytophthora stewartii*. *Phytopathology*. 27:1070-1089
- YOSHII, K. 1980. Los añublos común y fusco. In: SCHWARTZ, H.F. e G.E. GÁLVEZ, Coord. *Problemas de producción del frijol. Enfermedades, Insectos, Limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 155-172.
- YOSHII, K., G.E. GÁLVEZ e G. ALVAREZ. 1976. Estimation of yield losses in beans caused by common blight. *Proc. Amer. Phytopath. Soc.* 3:198-299
- YOSHII, K., G.E. GÁLVEZ e G. ALVAREZ. 1978. Screening bean germplasm for tolerance to common blight caused by *Xanthomonas phaseoli* and the importance of pathogenic variation to varietal improvement. *Plant Dis. Repr.* 62:343-347.
- YOUNG, J.M., D.W. DYE, J.F. BRADBURY, C.G. PANAGOPOULOS e C.F. ROBBS. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z. Journal of Agricultural Research*. 21:153-177.
- ZAUMEYER, W.J. e H.R. THOMAS. 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. *U.S.D.A. Ag. Tech. Bull.* N° 868 p. 65-74.

APÊNDICE 1: Comportamento de variedades de feijoeiro frente ao isolado 82—
Da de *X. phaseoli*, inoculadas em três épocas diferentes.

Variedades	Época de inoculação (dias)	Repetições		
		1	2	3
Tepary	35	2*	2	2
	50	1	1	1
	65	1	1	1
Jules	35	3	4	3
	50	1	1	1
	65	1	1	1
Carioca	35	4	4	4
	50	2	3	3
	65	1	1	1
PI 310-725	35	3	4	4
	50	3	3	2
	65	1	1	1
México-29	35	4	4	4
	50	3	3	3
	65	1	1	1

* Notas da reação das variedades à inoculação de *X. phaseoli* por atomização aos 35, 50 e 65 dias. A escala de notas usadas foi a descrita por COYNE et alii (1965) e SAETTLER (1977).

APENDICE 2: Análise da variância dos dados da reação de cinco variedades de feijão inoculadas com *X. phaseoli* em três épocas.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Repetições	2	0.0258	0.0129	
Variedades (V)	4	1.3370	0.3342	45.16**
Épocas (E)	2	5.1453	2.5726	347.64**
V x E	8	0.9707	0.1213	16.39**
Resíduo	28	0.2080	0.0074	
Total	44	7.6868		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV = 6.11%

APÊNDICE 3: Desenvolvimento de *X. phaseoli* no tecido foliar de três variedades de feijão inoculadas aos 35 dias de idade.

Isolamento dias	X	Carioca			México			Tepary		
		Y**	Yi *	Yc***	Y	Yi	Yc	Y	Yi	Yc
0	1	13.33x10 ⁴	11.800	12.1391	20.5x10 ⁴	12.230	11.7545	6.83x10 ⁴	11.131	11.9598
2	3	39.82x10 ⁴	12.894	13.6878	19.5x10 ⁴	12.180	13.5259	22.00x10 ⁴	12.301	12.4641
4	5	49.83x10 ⁵	15.421	15.2366	58.8x10 ⁵	15.587	15.2973	8.5 x10 ⁵	13.652	12.9683
6	7	137.83x10 ⁶	18.741	16.7853	50.83x10 ⁶	17.743	17.0686	7.16x10 ⁶	15.784	13.4726
8	9	137.83x10 ⁶	18.741	18.3341	33.5 x10 ⁷	19.629	18.8400	18.0 x10 ⁴	12.100	13.9768
10	11	10.5 x10 ⁷	18.469	19.8828	37.0 x10 ⁷	19.729	20.6114	17.16x10 ⁵	14.355	14.4811

* Valores correspondentes ao número de talos bacterianos de *X. phaseoli* em 5.08 cm² de tecido foliar, obtidos por isolamentos feitos cada dois dias.

** Valores das leituras em ln.

*** Valores esperados aplicando as equações de regressão pertinentes.

Equações de regressão: Carioca : $Y = 11.3647 + 0.7743 X$ $r = 0.9279$

México-29 : $Y = 10.8688 + 0.8856 X$ $r = 0.9656$

Tepary : $Y = 11.7077 + 0.2521 X$ $r = 0.5537$

APÊNDICE 4: Desenvolvimento de *x. phaseoli* no tecido foliar de três variedades de feijão inoculadas aos 50 dias.

Isolamento dias	Carioca			México-29			Tepary			
	X	Y*	Yi**	Yc***	Y	Yi	Yc,	Y	Yi	Yc
0	1	3.3×10^4	10.404	10.1006	0.3×10^4	8.006	7.8302	0.2×10^4	7.600	8.1741
2	3	5.3×10^4	10.878	10.9516	1.2×10^4	9.392	9.8633	1.3×10^4	9.472	8.9412
4	5	5.0×10^4	10.819	11.8026	11.2×10^4	11.626	11.8964	1.6×10^4	9.680	9.7083
6	7	7.3×10^5	13.500	12.6536	13.5×10^5	14.115	13.9295	4.2×10^4	10.645	10.4753
8	9	7.6×10^5	13.541	13.5046	36.4×10^6	17.410	15.9626	12.5×10^4	11.736	11.2424
10	11	15.1×10^5	14.227	14.3556	22.5×10^6	16.929	17.9957	9.1×10^4	11.418	12.0094

* Valores correspondentes ao número de talos bacterianos de *X. phaseoli* em 5.08 cm^2 de tecido foliar, obtidos por isolamentos feitos cada dois dias.

** Valores das leituras em ln.

*** Valores esperados aplicando as equações de regressão pertinentes.

Equações de regressão: Carioca : $Y = 9.6751 + 0.4255 X$ $r = 0.9357$

México-29 : $Y = 6.8137 + 1.0165 X$ $r = 0.9760$

Tepary : $Y = 7.7906 + 0.3835 X$ $r = 0.9449$

APÊNDICE 5: Desenvolvimento de *x. phaseoli* no tecido foliar de três variedades de feijão inoculadas aos 65 dias.

Isolamento dias	X	Carioca			México-29			Tepary		
		Y*	Yi**	Yc***	Y	Yi	Yc	Y	Yi	Yc
0	1	4.8 x10 ⁴	10.778	10.5221	1.0x10 ⁴	9.210	9.9539	1.0x10 ⁴	9.210	10.0536
2	3	5.6 x10 ⁴	10.953	11.3948	5.8x10 ⁴	10.968	10.4602	3.6x10 ⁴	10.491	10.3549
4	5	16.3 x10 ⁴	12.001	12.2676	13.5x10 ⁴	11.813	10.9665	11.3x10 ⁴	11.635	10.6561
6	7	61.6 x10 ⁴	13.331	13.1403	10.0x10 ⁴	11.512	11.4728	7.5x10 ⁴	11.225	10.9574
8	9	32.7 x10 ⁵	15.000	14.0131	6.3x10 ⁴	11.050	11.9790	9.5x10 ⁴	11.461	11.2587
10	11	14.42x10 ⁵	14.181	14.8858	35.0x10 ⁴	12.765	12.4853	5.0x10 ⁴	10.819	11.5600

* Valores correspondentes ao número de talos bacterianos de *X. phaseoli* em 5.08 cm² de tecido foliar, obtidos por isolamentos feitos cada dois dias.

** Valores das leituras em ln.

*** Valores esperados aplicando as equações de regressão pertinentes.

Equações de regressão: Carioca: $Y = 10.0857 + 0.4363 X$ $r = 0.9368$

México-29: $Y = 9.7008 + 0.2531 X$ $r = 0.8030$

Tepary: $Y = 9.9029 + 0.1506 X$ $r = 0.6350$

APÊNDICE 6: Dados originais da reação de vagens de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli* *

Variedades	Idade **	Repetições		
		1	2	3
Tepary	35	-	-	-
	50	-	-	-
	65	-	-	-
Jules	35	-	-	-
	50	1.25	0.07	0.09
	65	-	-	-
Carioca	35	-	-	-
	50	0.76	1.58	1.06
	65	0.20	-	-
PI 310-725	35	-	-	0.74
	50	3.57	1.37	2.56
	65	0.14	-	0.5
México-29	35	-	-	-
	50	0.43	1.4	1.5
	65	-	-	-

* Cada valor representa a média das notas de vagens infectadas ou não, de duas plantas. A escala de avaliação, usada para isto, é a descrita por CLIVE (1971), ver a descrição no item 3.4.8.

** Idade que as plantas foram inoculadas, por atomização, segundo o método sugerido por SCHUSTER (1955), ver item 3.4.3.

APÊNDICE 7: Dados originais da quantidade de semente colhida de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*, em três épocas diferentes; número de sementes infectadas e porcentagens de infecção.

Variedades	Idade (dias)*	Repetições	Nº total semente**	Nº semente infectada	% semente infectada
Tepary	35	1	85	-	-
		2	106	-	-
		3	53	-	-
Jules	35	1	45	-	-
		2	50	-	-
		3	42	-	-
Carioca	35	1	75	-	-
		2	77	-	-
		3	64	11	17.18
PI 310-725	35	1	103	3	2.91
		2	83	-	-
		3	125	6	4.80
México-29	35	1	74	-	-
		2	74	-	-
		3	121	-	-
Tepary	50	1	121	-	-
		2	124	-	-
		3	119	-	-
Jules	50	1	25	-	-
		2	40	-	-
		3	63	-	-
Carioca	50	1	65	-	-
		2	83	3	3.61
		3	75	-	-
PI 310-725	50	1	156	4	2.56
		2	104	9	8.65
		3	118	18	15.25
México-29	50	1	65	-	-
		2	71	4	5.63
		3	73	-	-

(continua)

(continuação)

Variedades	Idade (dias)*	Repetições	Nº total semente**	nº semente infectada	% semente infectada
Tepary	65	1	108	-	-
		2	133	-	-
		3	90	-	-
Jules	65	1	56	-	-
		2	58	-	-
		3	53	-	-
Carioca	65	1	87	-	-
		2	98	-	-
		3	135	-	-
PI 310-725	65	1	88	-	-
		2	137	-	-
		3	104	-	-
México-29	65	1	84	-	-
		2	66	-	-
		3	66	-	-

* Idade em que as plantas foram inoculadas por atomização, segundo o método sugerido por SCHUSTER (1955), ver item 3.4.3.

** Número total de sementes colhidas e analisadas no laboratório, em meio de cultura ECA, de acordo com CAFATI e SAETTLER (1980), ver item 3.4.4.

*** Número de sementes infectadas, verificadas no laboratório segundo o parágrafo anterior.

APÊNDICE 8: Análise da variância do ensaio do comportamento da variedade Carioca à inoculação de diversos isolados de *X. phaseoli*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Isolados	II	0.140	0.0127	1.494 ns
Grupos de Isolados	2	0.013	0.0065	0.76 ns
Resíduo	46	0.395	0.0085	
Total	59	0.548		

ns: não significativo
CV = 1.84%

APÊNDICE 9: Comportamento de vagens de cinco variedades de feijoeiro, inoculadas com o isolado 82-Da de *X. phaseoli*.

Variedades	Repetições			
	1	2	3	4
Tepary	1.00	1.00	1.00	1.00
Jules	2.00	2.25	2.28	2.27
Carioca	3.15	3.09	3.23	3.06
PI 310-725	3.05	3.43	3.07	3.00
México-29	3.00	3.11	3.27	3.27

* Vagens inoculadas segundo a metodologia usada por CAFATI e SAETTLER (1980) ver item 3.4.3.

** Cada valor representa a média das notas de todas as vagens inoculadas. A escala de notas usadas variou de 1-5.

APÊNDICE 10: Análise da variância do ensaio da inoculação a vagens, pelo método de riscas.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Variedades	4	1.8207	0.4551	329.782 **
Resíduo	15	0.02208	0.00138	
Total	19	1.8415		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.
CV = 2.38%

APÊNDICE 11: Avaliação visual de sementes com sintomas de infecção de *Xanthomonas phaseoli*. *

Variedades	Repetições			
	1	2	3	4
Tepary	22.50 **	13.88	17.77	16.92
Jules	14.28	16.66	15.38	14.81
Carioca	33.33	24.79	36.61	24.63
PI 310-725	30.43	45.90	23.88	28.03
México-29	16.94	12.19	20.63	7.84

* Sementes colhidas de vagens inoculadas pelo método de riscas sobre a sututa dorsal, de acordo com CAFATI e SAETTLER (1980).

** Cada valor representa a porcentagem de semente sintomatologicamente considerada como infectada por *Xanthomonas phaseoli*.

APÊNDICE 12: Análise da variância para a avaliação visual da semente infectadas,

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Variedades	4	514.1738	128.5434	8.05 **
Resíduo	15	239.4458	15.963	
Total	19	753.6196		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

CV = 14.57%

APÊNDICE 13: Dados originais da quantidade de sementes colhidas de cinco variedades de feijoeiro, número de sementes infectadas e por centagem de infecção.

Variedades	Repetição	Nº total de semente	Nº semente infectada	% de semente infectada
Tepary	1	49*	-**	-
	2	72	-	-
	3	45	-	-
	4	65	-	-
Jules	1	14	4	28,57
	2	30	-	-
	3	39	16	41,02
	4	27	1	3,70
Carioca	1	99	88	88,88
	2	121	110	90,90
	3	71	(a)	-
	4	69	43	62,31
PI 310-725	1	92	89	96,73
	2	122	(a)	-
	3	67	37	55,22
	4	132	71	76,51
México-29	1	59	18	30,50
	2	82	7	8,53
	3	63	25	39,68
	4	51	7	13,72

* Cada valor representa o número total de sementes colhidas por variedade e repetição, analisadas no laboratório.

** Número total de sementes que apresentou infecção com *X. phaseoli*, uma vez isoladas em placas de Petri em meio de cultura ECA, de acordo com CAFATI e SAETTLER (1980); (a): se refere à totalidade de sementes que apresentou infecção com outra bactéria contaminante.

APÊNDICE 14: Análise da variância para a porcentagem de sementes infectadas, verificada em laboratório*

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Variedades	4	169.972	42.493	16.368 **
Resíduo	13	33.753	2.596	
Total	17	203.725		

* Análise da variância feita para ensaio inteiramente casualizado com parcelas perdidas, de acordo com PIMENTEL GOMES (1978).

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

CV = 32.54%

APÊNDICE 15: Dados originais e transformados do comportamento da variedade Carioca, inoculada com isolados de semente de quatro variedades de feijoeiro.

Isolados	Repetições				
	1	2	3	4	5
J-I-A1	4.25	4.25	4.00	4.00	3.75
J-III-A4	4.25	4.50	4.00	4.25	4.00
J-III-B3	4.00	4.50	4.50	4.25	4.25
J-IV-A1	4.25	4.00	4.25	4.00	4.25
Ca-I-B1	4.00	4.00	4.25	4.00	4.25
Ca-II-A2	4.00	4.00	4.00	4.25	4.25
Ca-IV-C1	4.00	4.00	4.25	4.25	4.50
Ca-I-C1	4.25	4.50	4.25	4.50	4.50
PI-I-A1	4.25	4.00	4.25	4.00	4.50
PI-I-B2	4.00	4.00	4.50	4.00	4.25
PI-III-C2	4.00	4.50	4.25	3.75	4.00
PI-IV-D1	4.00	3.75	4.50	4.00	4.25
Me-I-C3	4.50	4.75	4.50	4.75	4.25
Me-II-E1	4.50	4.75	4.50	4.75	5.00
Me-III-A1	4.75	4.50	4.50	4.25	4.75
Me-IV-C2	4.50	4.50	4.00	4.50	4.75

* Cada valor representa a média das notas de quatro folhas primárias inoculadas. A escala de notas usadas foi a sugerida por WEBSTER et alii (1980).

APÊNDICE 16: Análise da variância do ensaio do comportamento da variedade Carioca à inoculação de diversos isolados de *X. phaseoli*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Isolados	15	0.172	0.0114	21.11 **
Grupos de isolados	3	0.134	0.0446	82.44 **
Resíduo	61	0.033	0.00054	
Total	79	0.339		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

CV = 1.12%

APÊNDICE 17: Análises da variância do comportamento da variedade Carioca a grupo de isolados inoculados.

Grupos de Isolados	Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	CV
Jules (J)	Isolados-J	3	0.0106	0.00353	1.575 ns	2.31%
	Resíduo	16	0.0359	0.00224		
	Total	19	0.0465			
México (Me)	Isolados-Me	3	0.0093	0.0031	1.08 ns	2.50%
	Resíduo	16	0.0457	0.00285		
	Total	19	0.0550			
Carioca(Ca)	Isolados Ca**	3	0.0178	0.00593	4.06*	1.86%
	Resíduo	16	0.0235	0.00146		
	Total	19	0.0413			
PI 310-725 (PI)	Isolados-PI	3	0.003	0.001	0.26 ns	3.03%
	Resíduo	16	0.061	0.0038		
	Total	19	0.064			

n.s. = não significativo.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**

Isolados de Carioca	Índice de infecção	
	X*	\sqrt{X} **
Ca-I-C1	4.4	2.097 a
Ca-IV-C1	4.2	2.048 a
Ca-II-A2	4.1	2.024 b
Ca-I-B2	4.1	2.024 b

* Médias de cinco repetições, cada uma correspondente a quatro folhas inoculadas de acordo com a metodologia sugerida por WEBSTER et alii (1980).

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si ao nível de 5% (Teste de Duncan).

APENDICE 18: Dados originais e transformados do comportamento de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com cinco isolados de *X. phaseoli*.

Isolados	Variedades	Repetições			
		1	2	3	4
82-Da	Carioca	4.87*	5,00	4,87	5,00
	México-29	4.87	4.62	4.50	4.75
	Jules	3.62	3.43	4.00	3.75
	PI 310-725	4.75	5.00	4.87	4.75
	Tepary	1.37	1.12	1.37	0.88
3133-7	Carioca	4.00	4.12	4.00	4.12
	México-29	3.75	4.25	4.25	4.12
	Jules	2.12	2.50	2.12	2.50
	PI 310-725	3.87	4.37	3.75	4.25
	Tepary	0.87	1.00	0.75	1.00
270-2	Carioca	3.62	3.37	3.37	3.75
	México-29	2.25	2.12	3.12	2.37
	Jules	2.12	2.00	2.12	2.12
	PI 310-725	2.87	3.25	3.20	3.50
	Tepary	0.75	0.87	0.87	0.75
3074	Carioca	4.25	4.25	4.50	4.12
	México-29	4.00	4.12	3.71	4.00
	Jules	2.00	2.25	2.75	2.37
	PI 310-725	3.87	4.25	4.25	4.00
	Tepary	0.85	0.87	0.87	1.37
3291	Carioca	4.62	4.50	4.37	4.62
	México-29	4.12	3.87	4.37	4.75
	Jules	3.25	3.12	2.75	3.00
	PI 310-725	4.25	4.37	4.25	4.50
	Tepary	0.87	1.25	0.87	1.00

* Cada valor corresponde à média das notas de quatro folhas primárias inoculadas, pelo método de incisão. A escala de notas está de acordo com o trabalho de WEBSTER *et alii* (1980).

APENDICE 19: Análise de variância do comportamento de cinco variedades de feijoeiro inoculadas com cinco isolados de *X. phaseoli*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Repetições	3	0.0237	-	
Variedades (V)	4	16.343	4.085	897.80**
Isolados (I)	4	1.754	0.4385	96.37**
V x I	16	0.414	0.025	5.49**
Resíduo	72	0.3283	0.00455	
Total	99	18.863		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV = 3.89%