

DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *phaseoli* (SMITH) DYE
EM SEMENTES DE FEIJOEIRO E CONSEQUÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS

ANTONIO CARLOS MARINGONI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 1993

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

Maringoni, Antonio Carlos
M337d Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
(Smith) Dye em sementes de feijoeiro e conseqüências
epidemiológicas. Piracicaba, 1993.
132p. ilustr.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Crestamento bacteriano
comum do feijoeiro - Epidemiologia 3. Feijão - Se-
mente - Doença I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652
632.32


**DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *phaseoli* (SMITH) DYE
EM SEMENTES DE FEIJOEIRO E CONSEQUÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS**

ANTONIO CARLOS MARINGONI

Aprovada em: 15.09.93

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Chukichi Kurozawa	FCA/UNESP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Otávio Machado Menten	ESALQ/USP
Dr ^a Maria Aparecida de Souza Tanaka	IAC
Prof ^a Dr ^a Rita de Cássia Panizzi	FCAVJ/UNESP


Prof. Dr. HIROSHI KIMATI
Orientador

A boca do justo fala da sabedoria:

sua língua fala do que é certo.

Salmos 37.30

A Sônia, aos meus pais e
à minha sobrinha Juliana,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pela valiosa orientação, estímulo e amizade;
- . Ao Prof. Dr. Chukichi Kurozawa da FCA/UNESP, pela amizade, apoio e incentivo para a realização do presente trabalho;
- . Aos Docentes do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos e amizade;
- . A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PICD), pela bolsa de estudos concedida;
- . A FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a execução do presente trabalho;
- . Ao Eng^o Agr^o, M.S., Marco Antonio Lollato do IAPAR, pelo fornecimento das sementes de feijoeiro;
- . A Bióloga, M.S., Margarida Fumito Ito do IAC, pelo fornecimento de isolados bacterianos;
- . Aos funcionários Hercílio Antonio da Rocha, Norberto Vaz de Carvalho e Paulo Silva da FCA/UNESP, pelo auxílio na realização dos trabalhos de laboratório;
- . Aos funcionários da Fazenda Experimental de São Manuel da FCA/UNESP, pelo auxílio na condução e avaliação dos experimentos de campo;

- . Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelo convívio e amizade;
- . E a todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização do presente trabalho.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISAO DE LITERATURA	4
2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro ..	4
2.2. Variabilidade sorológica	12
2.3. Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes	16
2.4. Resistência do feijoeiro à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Obtenção de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	32
3.1.1. Isolamento	32
3.1.2. Preservação	33
3.1.3. Teste de patogenicidade	34
3.1.4. Produção de melanina	34
3.2. Sorologia	35
3.2.1. Preparo dos antígenos imunizantes e imunização	35
3.2.2. Obtenção dos antissoros	37
3.2.3. Preparo dos antígenos para a reação em dupla difusão em gel-de-ágar	37

3.2.4. Titulação dos antissoros e testes em dupla difusão em gel-de-ágar	38
3.3. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para isolamento de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> de sementes de feijão	39
3.3.1. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (I)	39
3.3.2. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (II)	41
3.3.3. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> sobre isolados de bactérias saprófitas obtidas de sementes de feijão e sobre <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	42
3.3.4. Ação de garamicina e gentamicina <i>in vitro</i> sobre bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e sobre <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	43
3.3.5. Efeito de alguns fungicidas e antibióticos adicionados ao meio de cultura nutriente ágar modificado sobre o crescimento de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	44
3.4. Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão naturalmente infectadas, através de dois métodos de extração	45
3.5. Caracterização de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> obtidos de sementes	47
3.6. Avaliação da resistência de feijoeiro à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e transmissão da bactéria pelas sementes	49

3.6.1. Avaliação da germinação e transporte de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> pelas sementes de feijão	51
3.6.2. Avaliação do desenvolvimento do crescimento bacteriano comum	55
3.6.3. Avaliação de parâmetros agronômicos .	56
4. RESULTADOS	58
4.1. Obtenção de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	58
4.2. Reações sorológicas entre isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	60
4.3. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	62
4.3.1. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (I)	62
4.3.2. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> na inibição de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (II)	63
4.3.3. Ação de antibióticos <i>in vitro</i> sobre bactérias saprófitas obtidas de sementes de feijão e sobre isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	65
4.3.4. Ação de garamicina e gentamicina <i>in vitro</i> sobre bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e sobre <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	67
4.3.5. Efeito de alguns antibióticos e fungicidas adicionados ao meio nutriente ágar modificado, no crescimento de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> .	68

4.4. Detecção de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão, através de dois métodos de extração	70
4.5. Caracterização de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> obtidos de sementes de feijão	73
4.6. Avaliação da resistência de variedades de feijoeiro à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> sob condições de campo	74
4.6.1. Germinação e população de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> nas sementes	74
4.6.2. Quantificação da resistência de feijoeiro à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> sob condições de campo	77
4.6.3. Parâmetros agronômicos observados .	86
5. DISCUSSAO	90
5.1. Variabilidade sorológica de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	90
5.2. Meio de cultura semi-seletivo para o isolamento de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> de sementes de feijão	93
5.3. Métodos de extração de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> de sementes de feijão e caracterização dos isolados bacterianos	97
5.4. Resistência de variedades de feijoeiro à <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> sob condições de campo	100
6. CONCLUSOES	108
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Temperaturas médias máxima e mínima (°C) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra das águas de 1988. São Manuel, SP.	52
2. Temperaturas médias máxima e mínima (°C) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra das águas de 1989. São Manuel, SP.	53
3. Temperaturas médias máxima e mínima (°C) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra da seca de 1990. São Manuel, SP.	54
4. Características culturais e hidrólise de amido de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> , provenientes de sementes de feijão, no meio de cultura nutriente ágar modificado acrescido de antibióticos e fungicidas	72
5. Curvas do progresso da epidemia causada por <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> , em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safra das águas de 1988. São Manuel, SP.	78

6. Curvas do progresso da epidemia causada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safra das águas de 1989. São Manuel, SP. 79
7. Curvas do progresso da epidemia causada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safra da seca de 1990. São Manuel, SP. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Épocas de realização das diferentes operações nos três ensaios conduzidos na Fazenda Experimental de São Manuel, FCA/UNESP. São Manuel, SP. ..	50
2. Relação dos isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> obtidos de folhas de feijoeiro, durante a safra das águas de 1988, de diferentes regiões do Estado de São Paulo, sua patogenicidade e produção de melanina no meio YCA.	59
3. Reação sorológica em dupla difusão em gel-de-ágar entre isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> com dois antissoros.	61
4. Efeito de antibióticos <i>in vitro</i> no crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão.	63
5. Efeito de antibióticos <i>in vitro</i> no crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão.	64
6. Sensibilidade <i>in vitro</i> de dezesseis isolados de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijão e de dois isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	66
7. Comportamento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseo-</i>	

- li, in vitro*, a diferentes concentrações de garamicina e gentamicina. 68
8. Ação de alguns antibióticos e fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente ágar modificado sobre o crescimento de quatro isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*. 69
9. Recuperação de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão naturalmente infectadas, através de dois métodos de extração 71
10. Características morfológica, fisiológica, bioquímica, sorológica e patogênica de quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes de sementes de feijão. 73
11. Avaliação da germinação e da população de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em ufc/ml, transportada pelas sementes de três variedades de feijão, de dois lotes, empregadas nas semeaduras dos três experimentos. 75
12. Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x_0) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do crestamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes. Safra das águas de 1988, São Manuel, SP. 83
13. Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x_0) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do crestamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lo-

- tes de sementes. Safra das águas de 1989, São Manuel, SP. 83
14. Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x_0) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do crestamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes. Safra da seca de 1990, São Manuel, SP. 84
15. Valores dos coeficientes de determinação da reta obtidos para os métodos de avaliação através da severidade e incidência de folíolos de feijoeiro com crestamento bacteriano comum, utilizando-se a transformação logística dos dados, para três variedades de feijoeiro, em três safras agrícolas. 85
16. Avaliação de alguns parâmetros agronômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra das águas de 1988. São Manuel, SP. 87
17. Avaliação de alguns parâmetros agronômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra das águas de 1989. São Manuel, SP. 88
18. Avaliação de alguns parâmetros agronômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra da seca de 1990. São Manuel, SP. 88

DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *phaseoli* (SMITH) DYE
EM SEMENTES DE FEIJOEIRO E CONSEQUÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS

Autor: ANTONIO CARLOS MARINGONI

Orientador: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Foi constatada a variabilidade sorológica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, através da técnica de dupla difusão em gel-de-ágar. Antígenos de *X. campestris* pv. *phaseoli* e da variante *fuscans* reagiram apenas com os antissoros homólogos: entre os isolados da variante *fuscans* houve dois que não reagiram com o antissoro homólogo.

O meio de cultura semi-seletivo desenvolvido, constituído de: extrato de carne - 3,0 g, peptona - 5,0 g, sacarose - 10 g, amido solúvel - 2,0 g, ágar - 15,0 g, água destilada - 1000 ml, acrescido, após a autoclavagem, a 45 - 50 °C, de chlorothalonil - 20 µg/ml, benomyl - 20 µg/ml, cefalexina - 30 µg/ml, ácido nalidixico - 1 µg/ml e nitrofurantoina - 2 µg/ml, foi eficiente no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão naturalmente infectadas.

Verificou-se que o processo de extração da bactéria das sementes através de trituração propiciou uma maior recuperação da *X. campestris* pv. *phaseoli* quando comparado com a maceração.

Nos ensaios conduzidos em campo, nas safras das águas de 1988 e 1989 e da seca de 1990, evidenciou-se maior nível de resistência horizontal à *X. campestris* pv. *phaseoli* na variedade IAPAR 16, tanto nos folíolos quanto na vagem. As variedades Carioca e IAPAR 20 foram mais suscetíveis a essa bacteriose e a variedade IAPAR 20 apresentou menor produção e peso de mil sementes.

O sistema de avaliação do crestamento bacteriano comum através da severidade (porcentagem de área foliar infectada por folíolo) foi mais eficiente do que a incidência (porcentagem de folíolos doentes) para quantificar a doença nos folíolos e permitiu discriminar os diferentes níveis de resistência horizontal presentes nas variedades de feijoeiro ensaiadas.

O desenvolvimento da epidemia do crestamento bacteriano comum nas variedades de feijoeiro ensaiadas dependeu mais do nível de resistência horizontal presente nas variedades e das condições climáticas favoráveis do que da população de *X. campestris* pv. *phaseoli* presente nas sementes.

DETECTION OF *Xanthomonas campestris* PV. *phaseoli* (SMITH)
DYE ON DRY BEAN SEEDS AND EPIDEMIOLOGICAL CONSEQUENCES

Author: ANTONIO CARLOS MARINGONI

Adviser: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

The serological variability among *X. campestris* pv. *phaseoli* strains was detected through the agar double diffusion method. Antigens of *X. campestris* pv. *phaseoli* and *fuscans* strains reacted only with the homologous antisera. There were two *fuscans* strains that did not react with the homologous antiserum.

The semiselective medium developed (beef extract - 3,0 g, peptone - 5,0 g, sucrose - 10,0 g, soluble starch - 2,0 g, agar - 15,0 g, distilled water - 1000 ml, plus chlorothalonil - 20 µg/ml, benomyl - 20 µg/ml, cephalixin - 30 µg/ml, nalidixic acid - 1 µg/ml and nitrofurantoin - 2 µg/ml, added after sterilization at 45-50 °C) was efficient to recover *X. campestris* pv. *phaseoli* from naturally infected bean seeds. The extraction of this bacterium from seeds by crunching was more efficient than by maceration.

The experiments carried out in the field during wet (1988 and 1989) and dry (1990) seasons showed the greatest level of horizontal resistance of leaves and pods of bean cultivar IAPAR 16 to *X. campestris* pv. *phaseoli*. Bean cultivars Carioca and IAPAR 20 were more susceptible than IAPAR 16 to the disease. IAPAR 20 however had lower yield and weight of thousand seeds than Carioca and IAPAR 16.

Disease evaluation by a severity index (percentage of diseased area per leaflet) was better than incidence (percentage of diseased leaflet) for discriminating the levels of horizontal resistance to bean common bacterial blight among bean cultivars.

The development of the common bacterial blight epidemic in IAPAR 16, Carioca and IAPAR 20 cultivars depended more on the level of horizontal resistance and climatic conditions than on the *X. campestris* pv. *phaseoli* population present in bean seeds.

1. INTRODUÇÃO

A produtividade da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil é muito baixa, embora nosso país seja um dos maiores produtores e consumidores dessa leguminosa, que constitui a principal fonte protéica da população brasileira. Isso se deve à predominância de culturas de subsistência, em numerosas lavouras consorciadas, sem uso de tecnologias agronômicas adequada. O advento de culturas solteiras, irrigadas, convencionalmente adubadas e fitossanitariamente bem conduzidas - inclusive com o uso de variedades resistentes a algumas doenças e sementes de boa qualidade - tem viabilizado a cultura em áreas maiores, com bom retorno econômico.

Em áreas pequenas ou nas lavouras mais extensas, as doenças continuam, entretanto, sendo um dos principais fatores que diminuem a produtividade. Dentre as doenças mais importantes destaca-se o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas campestris* pv.

phaseoli (Smith) Dye. Essa doença, amplamente disseminada nas principais regiões produtoras do país, pode ser controlada através do uso de sementes saudáveis, associado à rotação de cultura, e do cultivo de variedades resistentes. Entretanto, no Brasil sementes de feijão não são submetidas, rotineiramente, a testes de sanidade; quando o são visam apenas a detecção de fungos, apesar de existirem métodos que revelem a presença de bactérias; por outro lado, existem poucos trabalhos de campo mostrando o grau de resistência das cultivares em desenvolvimento. Com a finalidade de preencher essas lacunas o presente trabalho objetivou:

- a - Constatar a variabilidade sorológica, através da técnica de dupla difusão em gel-de-ágar, entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*;
- b - Desenvolver um meio de cultura semi-seletivo para o isolamento e quantificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão;
- c - Comparar dois métodos de extração de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão; e
- d - Verificar o desenvolvimento epidemiológico do cretamento bacteriano comum em três variedades de feijoeiro, com diferentes níveis de resistência, a

partir de sementes naturalmente infectadas, durante três safras agrícolas consecutivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) é uma doença cosmopolita que ocorre na cultura do feijoeiro, principalmente nas regiões úmidas e quentes do globo (SAETTLER, 1991).

Segundo VALARINI (1990), Smith*, nos USA, foi o pioneiro a isolar e a descrever o agente causal da doença, em 1897. No Brasil, o CBCF foi constatado inicialmente no estado do Pará por Caldeira e Travassos, sendo que ROBBS (1954) foi quem isolou o patógeno de material doente proveniente do Rio de Janeiro. Posteriormente, KIMATI & MASCARENHAS (1967) constataram a existência do CBCF em ensaios de competição de variedades

* SMITH, E.F. The cultural characters of *Pseudomonas hyacinthi*, *P. campestris*, *P. phaseoli* and *P. stewartii* - for one - flagellate yellow bacteria parasitic on plants. Washington, USDA, 1901. 153p. (USDA. Technical bulletin, 28)

de feijoeiro, na safra das águas, no estado de São Paulo e, em 1967, NAKAMURA & KIMATI (1987) e PARADELA FILHO (1967) relataram a existência do crestamento bacteriano fosco, causado pela variante *fuscans* de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, no estado de São Paulo.

Atualmente, o CBCF encontra-se instalado em quase todas as regiões produtoras de feijão do país, apresentando grande importância, principalmente nas safras das águas nos estados do Paraná e Rio de Janeiro e em algumas localidades da região Centro Oeste (RAVA, 1988; MARINGONI & KOMORI, 1989). Perdas acentuadas na produção podem ocorrer devido a essa bacteriose. WALLEN & GALWAY (1977) realizaram estudos durante três anos consecutivos em Ontário, Canadá, e verificaram perdas da ordem de 32,0 a 33,1 % na produção devido ao crestamento bacteriano comum.

A bactéria incitadora desta doença é atualmente denominada *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Dye, 1978, conforme a nomenclatura proposta por YOUNG et al (1978) e DYE et al. (1980). Nesta nova nomenclatura são agrupadas as antigas denominações *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows, agente causal do crestamento bacteriano comum, e *X. phaseoli* var. *fuscans* (E.F.Sm.) Dows, agente do crestamento bacteriano fosco do feijoeiro (DYE et al., 1980; BRADBURY, 1986). Apresentam similaridades quanto às características morfológicas, fisiológicas e patogênicas, diferenciando a variante *fuscans* pela sua capacidade de produzir melanina em vários

meios de cultura (nutriente ágar, YDC, etc.), que se colorem de marrom (WALLEN & SUTTON, 1965; BASU & WALLEN, 1966; BRADBURY, 1986). Essa capacidade da variante *fuscans* está relacionada, segundo BASU & WALLEN (1966), com a fonte de carbono no meio de cultura. Esses pesquisadores verificaram a produção de pigmento, quando a bactéria foi cultivada em meio líquido na presença das seguintes fontes de carbono: adonitol, dulcitol, d-mannitol, sorbitol, rhamnose, alfa-metil-d-glicosídeo e inulina; mas não observaram a formação da melanina na presença de l-arabinose, celobiose, dextrina, dextrose, frutose, galactose, glicogênio, alfa-lactose, maltose, d+mannose, melibiose, sacarose, trehalose, xilose, raffinose, d(-) ribose e salicina. Por outro lado, segundo BRADBURY (1986), a variante *fuscans* produz melanina, *in vitro*, na presença do aminoácido tirosina.

Os sintomas típicos do CBCF são perceptíveis em toda parte aérea da planta. Inicialmente, são observadas manchas encharcadas nas folhas, que gradualmente aumentam em tamanho e progridem para a necrose do tecido. Essas lesões necróticas podem apresentar um tênue halo amarelado ao seu redor. As lesões podem estar esparsas no limbo, bem como na parte marginal, progredindo para o centro dos folíolos. Com o desenvolvimento da doença as folhas infectadas tornam-se necróticas e podem ficar presas à planta ou se destacarem. No caule, inicialmente, são observadas manchas alongadas e encharcadas, as quais

tornam-se, posteriormente, avermelhadas. Em alguns casos, quando a infecção ocorre na região do nó do primeiro par de folhas primárias pode ocorrer a quebra da planta nesta região, durante a fase reprodutiva, originando o sintoma denominado de podridão nodal. Dependendo da suscetibilidade das variedades de feijoeiro, pode ocorrer o desenvolvimento de sintomas de murcha nas plantas, devido a colonização vascular. Nas vagens, as lesões variam de forma e tamanho mas, inicialmente, são circulares e encharcadas tornando-se, posteriormente, necróticas de cor avermelhada. Quando há infecção na sutura das vagens, as lesões são alongadas. As sementes podem apresentar descoloração no hilo, manchas amarelas no tegumento, enrugamento e estarem mal formadas (BURKHOLDER, 1921; ZAUMEYER & THOMAS, 1957; SAETTLER, 1991).

Certas condições ambientes, entre as quais altas temperaturas (28-32 °C) e alta umidade (SAETTLER, 1991), favorecem o desenvolvimento da doença. Sob condições controladas, GOSS (1940) verificou que a temperatura influenciava o período de incubação: plantas submetidas a 28 °C após a inoculação desenvolveram sintomas da doença nos folíolos após nove dias, enquanto que aquelas submetidas a 20 ou 16 °C apresentaram os primeiros sintomas, respectivamente, aos 23 e 27 dias após a inoculação. PATEL & WALKER (1963) concluíram, em seus estudos, que a 28 °C o CBCF desenvolveu mais rapidamente. Com relação às condições de umidade, GOSS (1940) verificou que plantas de

feijoeiro inoculadas, submetidas à condição de baixa umidade relativa, após terem sido incubadas durante 24 h em condições de alta umidade, apresentaram maior severidade da doença que aquelas que permaneceram sob condições de alta umidade relativa.

A *X. campestris* pv. *phaseoli* apresenta várias formas de sobrevivência. Em sementes, a bactéria sobrevive no estado hipobiótico, por longos períodos, sob condições adversas (SCHUSTER & COYNE, 1977), podendo estar localizada interna ou externamente (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; SAETTLER & PERRY, 1972; SCHUSTER & COYNE, 1974; WELLER & SAETTLER, 1980a), sem perder a patogenicidade (SCHUSTER & COYNE, 1971; 1975; SCHUSTER et al., 1973).

Trabalhos pioneiros de BURKHOLDER (1921) demonstraram que sementes de feijão da cultivar Red Kidney de três anos deram origem a plantas com sintomas de CBCF. Já, SABET & ISHAG (1969) demonstraram que sementes de *Dolichos lablab*, quando infectadas pela *X. campestris* pv. *phaseoli* transmitiram o patógeno para as plântulas num período máximo de armazenamento de 549 dias.

A *X. campestris* pv. *phaseoli* foi isolada de sementes após estas terem sido armazenadas por dois (BURKHOLDER, 1921), três (BASU & WALLEN, 1966), dez (ZAUMEYER & THOMAS, 1957) ou quinze anos (SCHUSTER & SAYRE, 1967).

Além das sementes, existem outras formas de sobrevivência da *X. campestris* pv. *phaseoli*. SABET & ISHAG

(1969) verificaram a sobrevivência da bactéria no máximo por dez dias em solo autoclavado umedecido. Em contra partida, a bactéria sobreviveu por um período superior a 150 dias em condições de solo seco. Com relação a sobrevivência em material vegetal infectado, a bactéria pode permanecer viável por dezoito meses em folhas de *D. lablab* sob condições ambientes (SABET & ISHAG, 1969) ou seis anos em folhas de feijão secas e trituradas armazenadas a 4 °C (GILBERTSON et al., 1988).

Algumas pesquisas têm demonstrado a sobrevivência da *X. campestris* pv. *phaseoli*, no solo, em restos de cultura infectados, porém, os resultados são variáveis, conforme os locais e as condições em que os experimentos foram conduzidos. De forma geral, parece que a bactéria sobreviveu por um período mais longo quando os restos culturais permaneceram na superfície do solo. SAETTLER et al. (1986) chegaram a conclusão, com base nos dados de dez anos de observação, nas condições de Michigan, U.S.A., que *X. campestris* pv. *phaseoli* sobreviveu no máximo por três meses em restos de cultura infectados. Já, nas condições de Wisconsin, U.S.A, a bactéria sobreviveu por um período variável de três a oito meses, sendo o menor período de sobrevivência para os restos de cultura enterrados a uma profundidade de 20 a 40 cm (GILBERTSON et al., 1990). ARNAUD-SANTANA et al. (1991) desenvolveram seus estudos, nas condições da República Dominicana, e constataram que *X. campestris* pv. *phaseoli* permaneceu viável em folhas

doentes de feijoeiro por um período de cinco meses ou inferior a trinta dias, quando estas estavam, respectivamente, na superfície ou a uma profundidade de 15 cm no solo.

Algumas ervas daninhas são hospedeiras da *X. campestris* pv. *phaseoli* tais, como: *Amaranthus* sp. (TRUJILLO-PINTO, 1989), *A. retroflexus* (SCHUSTER, 1967), *Chenopodium album* (SCHUSTER, 1967; GILBERTSON et al., 1990), *Ambrosia artemisifolia*, *Vicia sativa*, *V. villosa* (GILBERTSON et al., 1990), *Acalypha aloperoides*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Cyperus rotundus*, *Physalis* sp, *Portulaca oleraceae*, *Sida rhombifolia*, *Ruellia tuberosa* (TRUJILLO-PINTO, 1989) e *Strophostyles helvola* (BRADBURY, 1986). Além do feijoeiro e das ervas daninhas, outras plantas são hospedeiras da bactéria, entre elas: *Phaseolus lathyroides*, *P. lunatus*, *P. acutifolius* var. *latifolius*, *P. aconitifolius*, *P. coccineus*, *D. lablab*, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna mungo*, *V. radiata* e *V. umbellata* (BRADBURY, 1986).

Em condições normais de campo ou de casa de vegetação, *X. campestris* pv. *phaseoli* sobrevive na forma epífita na superfície de plantas de feijoeiro. Sob condições de casa de vegetação, CAFATI & SAETTLER (1979) constatarem diferenças no crescimento epífito desta bactéria em folhas de vários genótipos de feijoeiro; desta forma a variedade Seafarer, suscetível, e a G. N. Nebraska # 1 sel. 27, resistente, apresentaram, respectivamente, $1,1 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (ufc) por

100 cm² de área foliar. WELLER & SAETTLER (1980a) constataram, que houve a necessidade de uma população epífita de pelo menos 5.0×10^6 ufc por 20 cm² de área foliar, de *X. campestris* pv. *phaseoli*, para que houvesse o desenvolvimento dos sintomas da doença. Gotas de água de chuva podem remover 10 % da população epífita desta bactéria (WELLER & SAETTLER, 1980a) e disseminá-la a uma distância de até 1,40 m da fonte de inóculo (TRUJILLO-PINTO & VERDE, 1986).

Com relação à disseminação, as sementes merecem uma atenção especial, pois transportam o patógeno a longas distâncias e são importantes fontes primárias de inóculo no campo (SCHUSTER et al., 1973; NEERGAARD, 1979).

WALLEN & SUTTON (1965) verificaram em Ontário, Canadá, que 0,5 % de sementes com *X. campestris* pv. *phaseoli* foi suficiente para iniciar a epidemia da doença. Posteriormente, WELLER & SAETTLER (1980b) demonstraram experimentalmente que a população mínima de 10^3 - 10^4 ufc de *X. campestris* pv. *phaseoli* por semente foi necessária para originar plantas doentes em condições de campo. Sementes de feijão contendo infecção de 0,02 % (WALKER & PATEL, 1964) ou 0,006 % (GUTHRIE et al., 1965) com *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* foram suficientes para iniciar a epidemia de crestamento bacteriano de halo. Em repolho, SCHAAD et al. (1980) constataram que 0,01 % de sementes com *X. campestris* pv. *campestris* deram origem a epidemia de podridão negra, resultando aos 56 dias após a

semeadura 0,01 e 0,03 % de plantas doentes, respectivamente nos ensaios conduzidos em 1976 e 1977.

A água da chuva ou de irrigação é eficiente na disseminação da *X. campestris* pv. *phaseoli* e de outros patógenos bacterianos do feijoeiro (MENZIES, 1954; GROGAN & KIMBLE, 1967; TRUJILLO-PINTO & VERDE, 1986; SAETTLER, 1991). Alguns insetos são considerados disseminadores do agente causal do CBCF, destacando-se a *Bemisia tabaci* (SABET & ISHAG, 1969; SAETTLER, 1991), *Cerotoma ruficornis*, *Chalcodermus ebeninus*, *Diaprepes abbreviata*, *Empoasca* sp e *Nezara viridula* (KAISER & VAKILI, 1978).

2.2. Variabilidade Sorológica

Pesquisas pioneiras, desenvolvidas no final da década de 20, deram início aos estudos sorológicos com *X. campestris* pv. *phaseoli*. LINK & SHARP (1927) demonstraram, através de reações de aglutinação, que o antissoro obtido para *X. campestris* pv. *phaseoli*, além de reagir com o antígeno homólogo, reagia também com o heterólogo de *X. campestris* pv. *campestris*. Porém, esses autores constataram que o antissoro obtido para *X. campestris* pv. *campestris* foi específico e só reagiu com o antígeno homólogo e não com os heterólogos de *X. campestris* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *glycines* e *Curtobacterium flaccumfaciens*.

SHARP (1927) verificou especificidade nos antíssoros obtidos para *X. campestris* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *glycines* e *C. flaccumfaciens* e constatou que esses antíssoros aglutinaram apenas seus antígenos homólogos e não reagiram com os respectivos antígenos heterólogos dessas bactérias. Entretanto, a especificidade do antíssoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* não foi mantida com outras patovares de *X. campestris* e com outros gêneros de fitobactérias, pois apresentou reação de aglutinação positiva para: *X. campestris* pv. *barbareae*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *heredade*, *X. campestris* pv. *papavericola*, *X. campestris* pv. *pelargonii*, *X. campestris* pv. *vasculorum* (EROLDE & BRAUN, 1947a), *X. campestris* pv. *campestris* (LINK & SHARP, 1927; VALARINI, 1990), *X. campestris* pv. *malvacearum* (EROLD & BRAUN, 1947a; VALARINI, 1990), *X. campestris* pv. *citri*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *P. solanacearum* (VALARINI, 1990).

Na literatura, os resultados são conflitantes no que diz respeito à variabilidade sorológica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* e da variante *fuscans*. Antíssoros obtidos para *X. campestris* pv. *phaseoli* e para a variante *fuscans* foram inespecíficos e reagiram indistintamente para os antígenos de *X. campestris* pv. *phaseoli* e para os da variante *fuscans*, quando foram empregadas as técnicas de aglutinação ou de microprecipitação (EROLD & BRAUN, 1947a; b; VALARINI, 1990). DIAS & NOLIMOVA (1987), utilizando o método de aglutinação, consegui-

ram separar quarenta e um isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* cubanos em três grupos sorológicos distintos, que estavam relacionados com o local de origem e não com a produção de melanina em meio de cultura.

Através da técnica de dupla difusão em gel-de-ágar, AFANADOR & VICTORIA (1981) constataram a não formação de bandas de precipitação para o isolado CBP-48 de *X. campestris* pv. *phaseoli*, enquanto que outros sete isolados desta bactéria formaram bandas de precipitação na presença do antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli*. OLEAS-ARIAS (1982) verificou a especificidade do antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* para antígenos homólogos (cinco isolados), formando duas bandas de precipitação no gel-de-ágar, enquanto que o antígeno da variante *fuscans* (um isolado) não apresentou reação. Já, os resultados de VALARINI (1990) contradizem os de OLEAS-ARIAS (1982), pois o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* por ele obtido apresentou reação positiva, tanto para os antígenos homólogos (oito isolados) quanto para os heterólogos da variante *fuscans* (cinco isolados). Contudo, o antissoro da variante *fuscans* apresentou especificidade e só formou bandas de precipitação para os antígenos homólogos. MALIN et al. (1983) comprovaram a não variabilidade sorológica entre oito isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, através do método de dupla difusão em gel-de-ágar, na presença do antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli*. KHALIF & VENETTE (1987), empregando a técnica de dupla difusão em gel-de-

ágar, separaram quarenta isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* em quatro sorogrupos distintos e constataram que os isolados provenientes de folhas eram sorológicamente diferentes daqueles oriundos de sementes.

Empregando o método de ELISA indireta ('indirect enzyme linked immunosorbent assay'), AFANADOR & VICTORIA (1981) constataram reações negativas para dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* (CBP-045 e CBP-048), enquanto que outros seis isolados desta bactéria apresentaram reações positivas para o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* testado. MALIN et al. (1985) verificaram a inespecificidade do teste de ELISA indireta para o antissoro de *X. campestris* pv. *phaseoli* por eles obtidos, pois além de reagir com antígenos homólogos, obtiveram reações positivas para os antígenos heterólogos de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *C. flaccumfaciens*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. putida*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e para isolados bacterianos saprófitas provenientes de sementes de feijão.

MALIN et al. (1983) não evidenciaram variabilidade sorológica entre vinte e quatro isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provenientes de sementes de feijão de várias partes do mundo, quando empregou a técnica de imunofluorescência indireta. A não variabilidade sorológica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* também foi constatada por MALIN et al. (1985) quando eles

empregaram os métodos RIA (‘radioimmunoassay’) e ‘dot blot assay’.

2.3. Detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes

Inúmeras técnicas foram desenvolvidas e adaptadas com a finalidade de detectar a presença de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.

A observação visual dos sintomas apresentados pelas sementes, tais como descoloração no hilo, manchas amarelas no tegumento e enrugamento, são indicativos da infecção das sementes pela bactéria. Porém, esse método não é preciso pois pode sub ou super estimar a infecção das sementes, uma vez que sementes assintomáticas podem estar colonizadas internamente (CAFATI & SATTLER, 1980; MARINGONI et al., 1992a).

O emprego de bacteriófagos, visando a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, foi adotado por KATZNELSON & SUTTON (1951) e KATZNELSON et al. (1954). Este método apresenta limitações e pode apresentar resultados falsos na certificação de sementes, devido à variabilidade da bactéria quanto à suscetibilidade ao bacteriófago. Isto ocasionou, no Canadá, em 1962, uma epifitotia do crestamento bacteriano comum, causado pela variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli* (WALLEN & SUTTON, 1965; SHEPARD, 1983a).

EDNIE & NEEDHAN (1973) e SHEPPARD et al. (1989) comentam o uso de bacteriófagos para a caracterização de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidos de sementes de feijão.

A inoculação de plântulas de feijão com suspensões oriundas da maceração de sementes são empregadas em algumas técnicas com o intuito de detectar bactérias associadas às sementes de feijão. SAETTLER (1971) descreveu a técnica de inoculação através de injeção no caule na região do nó da folha primária, na cultivar Manitou, para a detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *syringae* e *X. campestris* pv. *phaseoli*. Ele conseguiu diferenciar a presença dessas bactérias através do quadro sintomatológico que as plantas inoculadas apresentavam. Para *X. campestris* pv. *phaseoli*, os sintomas típicos observados nas plantas eram lesões alongadas de coloração marrom avermelhada, oito a dez dias após a inoculação.

VALARINI (1990) adaptou a técnica do número mais provável desenvolvida por TAYLOR (1970), inicialmente empregada para a detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* de sementes de feijão, para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Uma subamostra de quinhentas, cinco subamostras de cem e cinco subamostras de dez sementes são maceradas em volumes pré determinados de água destilada esterilizada, por 18 - 24 h, a 5 - 10 °C, e essas suspensões são inoculadas, separadamente, através de corte, nas folhas primárias de plântulas de feijão da cultivar CNF 10,

submetidas às condições de casa de vegetação. Sete a dez dias após a inoculação, os sintomas são observados nas folhas inoculadas e os resultados obtidos são interpretados em uma tabela para se estimar a porcentagem de sementes infectadas (VALARINI, 1990).

Um método mais simples foi desenvolvido por OLIVEIRA & ROMEIRO (1992), baseado na inoculação de vagens verdes de feijão com suspensões provenientes da maceração de sementes de feijão. Esses autores comentaram que esta metodologia foi eficiente para a detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em amostras de sementes de feijão, bem como para a constatação da viabilidade da bactéria associada às sementes.

Outra forma de detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão é através de plaqueamento em meio de cultura. Alguns pesquisadores têm empregado a deposição direta das sementes, previamente desinfestadas, com o hilo em contato com a superfície do meio de cultura (CAFATI & SAETTLER, 1980; OLEAS-ARIAS, 1982) ou a maceração individual das sementes em tampão fosfato ou solução salina tampão fosfato ou em meio de cultura líquido e posterior plaqueamento em meio de cultura agarizado para o isolamento da bactéria (CAFATI & SAETTLER, 1980; AGGOUR et al., 1989; MARINGONI et al., 1992a).

Para a certificação de lotes de sementes de feijão, EDNIE & NEEDHAN (1973) utilizaram 1,6 kg de sementes desinfestadas em hipoclorito de sódio e estas

foram trituradas e submetidas à maceração em água durante 2 h. Alíquotas da suspensão obtida foram plaqueadas em meio nutriente ágar e as colônias típicas de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidas eram caracterizadas através de teste de patogenicidade e com bacteriófagos.

KLEMENT (1983) utilizou uma técnica semelhante a de EDNIE & NEEDHAN (1973), porém empregou o meio de cultura YDC para o plaqueamento da suspensão de maceração das sementes com o intuito de isolar a *X. campestris* pv. *phaseoli*, e indicou a utilização de caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos para a caracterização das bactérias isoladas, além do teste de hipersensibilidade em folhas de fumo.

O emprego de meios de cultura não seletivos tem dificultado o isolamento da *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão, uma vez que inúmeras bactérias saprófitas podem ser veiculadas às sementes, principalmente naquelas provenientes de vagens que entraram em contato com o solo e essas bactérias saprófitas interferem na recuperação da bactéria alvo (EDNIE & NEEDHAN, 1973; SHEPARD, 1983a; SHEPARD et al., 1989).

Inicialmente, TRUJILLO & SAETTLER (1980) produziram o meio semi-seletivo SSM com o objetivo de propiciar o crescimento da *X. campestris* pv. *phaseoli*, presentes nas sementes de feijão, e submeteram o líquido obtido da maceração das sementes a testes sorológicos em dupla difusão em gel-de-ágar para detectar a bactéria.

CLAFLIN et al. (1987) desenvolveram o meio de cultura semi-seletivo, denominado MXP, o qual se mostrou eficiente no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de folhas, sementes e restos de cultura infectados remanescentes no solo. Posteriormente, MAGABALA & SAETTLER (1992) desenvolveram o meio semi-seletivo M-SSM que propiciou melhor crescimento de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, quando comparado com o meio MXP. Esses autores obtiveram sucesso no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de folhas doentes de feijoeiro quando empregaram o meio M-SMM.

Na França, RAT (1987) e RAT* utilizam o meio B de King acrescido de cefalexina e ciclohexamida para o isolamento de *P. syringae* pv. *syringae* e *X. campestris* pv. *phaseoli*. Cinco subamostras de 200 g de sementes por lote são maceradas individualmente durante uma noite a 4 °C, em 500 ml de água destilada. As suspensões obtidas são plaqueadas em meio B de King, contendo os produtos adicionais; após quatro a seis dias de incubação, as colônias amarelas desenvolvidas, típicas de *X. campestris* pv. *phaseoli*, são repicadas, plaqueadas em meio GYCA e submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para a identificação.

VAN VUURDE et al. (1983), na Holanda, utilizaram uma metodologia mista para a detecção de *P.*

* RAT, B. (INRA. Station de Pathologie Végétale - Angers - France) Comunicação pessoal, 1987.

syringae pv. *syringae* e *X. campestris* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão. Cinco subamostras de mil sementes são maceradas isoladamente em água a 5 °C e após 6 h de maceração, procedem-se as coletas das suspensões, submetendo-as ao teste sorológico de imunofluorescência indireta. Caso haja resultado positivo, prossegue-se a maceração até completar 24 h, e novamente retiram-se outras subamostras das suspensões, submetendo-as ao teste de imunofluorescência indireta e ao plaqueamento em meio B de King, para a detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, e em meio PST, para a detecção da variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Esta metodologia tem sido empregada em rotina para a detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em lotes de sementes comerciais de feijão e tem demonstrado elevada fidedignidade nos resultados para a certificação de sementes na Holanda (VAN VUURDE et al., 1991).

MALIN et al. (1983), empregando antissoro policlonal, e WONG (1991), utilizando antissoro monoclonal, obtiveram sucesso na detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, empregando apenas o método de imunofluorescência indireta. Foi possível detectar 0,01 % de sementes infectadas (MALIN et al., 1983) e este método foi mais sensível que o de ELISA indireta para a detecção da bactéria associada às sementes (WONG, 1991).

MALIN et al. (1985) comentaram que os testes sorológicos RIA, ELISA indireta e 'dot blot assay'

foram ineficazes para detectar baixos níveis de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em extratos de sementes de feijão, e que os métodos RIA e 'dot blot assay' podem ser empregados na identificação de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provenientes de isolamentos efetuados em meio de cultura.

O método de dupla difusão em gel-de-ágar tem sido empregado com sucesso na detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (TRUJILLO & SAETTLER, 1979a; b; VELAZQUES & TRUJILLO, 1984). Inicialmente, as sementes, desinfestadas ou não, são incubadas no meio SMM (TRUJILLO & SAETTLER, 1980) durante 24 - 36 h. Posteriormente, o líquido de maceração das sementes é centrifugado e as bactérias decantadas são suspensas e submetidas a 100 °C durante 1 h. As bactérias fervidas são empregadas como antígenos contra os antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e da variante *fuscans* (TRUJILLO & SAETTLER, 1979a; b; VELAZQUES & TRUJILLO, 1984).

Outra forma de se avaliar a sanidade de sementes de feijão, quanto a presença de bactérias, é através do 'dome test'. KHLAIF & VENETTE (1986) desenvolveram este método que consiste em avaliar, através do teste de dupla difusão em gel-de-ágar, a presença de *X. campestris* pv. *phaseoli*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* e *P. syringae* pv. *syringae* nos folíolos de feijão com sintomas dessas bacterioses. Esses folíolos foram coletados de plantas desenvolvidas sob condições de alta umidade.

oriundas de sementes que estão sendo analisadas para a constatação dessas bactérias.

2.4. Resistência do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli*

Dentro do gênero *Phaseolus* existem várias espécies que apresentam resistência à *X. campestris* pv. *phaseoli*. Inúmeros trabalhos têm confirmado a resistência foliar ou de vagem de *P. acutifolius*, feijão Tepary, sob condições de inoculação artificial à *X. campestris* pv. *phaseoli* (SCHUSTER, 1955; SCHAREN, 1959; CAFATI-KOMPATZKI, 1971; COYNE & SCHUSTER, 1973; YOSHII et al., 1978; OLEAS-ARIAS, 1982).

Pesquisas desenvolvidas, visando avaliar diferentes genótipos de *P. acutifolius*, quanto à resistência foliar e de vagem à *X. campestris* pv. *phaseoli*, têm revelado a superioridade de alguns materiais, tais como: PI 169932, Tepary Nebraska Acession # 10 (YOSHII et al., 1978), P 597 (RAVA, 1985), Nebr # 7, Nebr # 19, Nebr # 3-B, CIAT 640005, L 242-45, Nebr # 22, Nebr # 5, Pi 321638, Nebr # 8-B, Nebr # 1, Nebr # 11-B (ZAITER & COYNE, 1989).

Cruzamentos interespecíficos entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, visando a transferência da resistência para *P. vulgaris*, foram iniciados por HONMA (1956) o qual conseguiu, através da técnica de cultivo de

embrião *in vitro*, obter materiais que deram origem a variedade G.N. Nebraska # 1. Posteriormente, COYNE et al. (1963) encontraram bom nível de resistência foliar na seleção 27 da G.N. Nebraska # 1, para isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes dos U.S.A..

Empregando-se a G.N. Nebraska # 1 sel. 27 como progenitor resistente à *X. campestris* pv. *phaseoli*, algumas variedades de feijoeiro foram obtidas com resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli*, dentre elas: a 'Tara' (COYNE & SCHUSTER, 1969), 'Jules' (COYNE & SCHUSTER, 1970) e algumas linhagens com resistência foliar e de vagem, desenvolvidas por MOHAN & MOHAN (1983), as quais deram origem às variedades IAPAR 14 e IAPAR 16 que são resistentes à *X. campestris* pv. *phaseoli* (FREGONESE & MARINGONI, 1991; MARINGONI et al., 1992a).

Vários genótipos de *P. vulgaris* apresentam algum nível de resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli* dentre eles: California Small White (ARP et al., 1971), PI 169727, PI 197687, PI 167399, PI 163117 (COYNE & SCHUSTER, 1973), PI 207262 (COYNE & SCHUSTER, 1973; 1974a; MOHAN & MOHAN, 1983; VALLADARES-SANCHEZ, 1983; RAVA, 1985), Guali (COYNE & SCHUSTER, 1973), G.N.-CB-BW-71-44 (COYNE & SCHUSTER, 1974a), PI 282086, PI 313343 (YOSHII et al., 1978), 50987-C, Nicaragua 90, Pintado, Red Kote, linhagens L-22, L-23 e L-24 (VICTORIA et al., 1981), linhagens IAPAR Bac 1, Bac 2, Bac 4, Bac 6, Bac 9, Bac 21, Bac 27, Bac 32, Bac 35, Bac 39 e Bac 40 (MOHAN & MOHAN, 1983), Tacarigua

(VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983), Feijão 60 Dias, Colección 108, México 29, México 168, México 240, Desconhecido Amarelo, 65 (B) Retinto Santa Rosa, Retinto Dulce, Col. 736652, S-67, Sacavem 705 (RAVA, 1985), linhagens Cornell 79-1981-14, 79-1982-N, 79-1984-N e 79-1987-N (ZAPATA et al., 1985).

Porém, nem sempre as variedades que apresentam resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentam também resistência na vagem, uma vez que essas reações são independentes (COYNE & SCHUSTER, 1974a, YOSHII et al., 1978; VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983; RAVA, 1985; PARK & DHANVANTARI, 1987).

Em alguns casos, têm-se conseguido aliar essas duas características de reação em um mesmo genótipo. Os genótipos G.N. Nebraska # 1 sel. 27 (COYNE & SCHUSTER, 1974a; MARINGONI et al., 1992a), G.N.-CB-BW-71-44 (COYNE & SCHUSTER, 1974a), PI 313343 (YOSHII et al., 1978), JULES (OLEAS-ARIAS, 1982), linhagens IAPAR Bac 4, Bac 20 e Bac 35 (MOHAN & MOHAN, 1983), linhagens Cornell 79-1981-14, 79-1982-N, 79-1984-N, 79-1987-N (ZAPATA et al., 1985), IAPAR 14 e IAPAR 16 (MARINGONI et al., 1992a) apresentam esse tipo de resistência.

Já, a variedade G.N. 1140 apresenta suscetibilidade nas folhas e moderada suscetibilidade nas vagens, e o PI 207262 alto nível de resistência nas folhas e suscetibilidade nas vagens (COYNE & SCHUSTER, 1974a; VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983).

Sob condições de campo, SCHUSTER et al. (1983) verificaram diferenças no comportamento de algumas variedades 'Great Northern' (G.N.) quanto à severidade do crestamento bacteriano comum nas vagens. Desta forma, a G.N. Jules, G.N. Star, G.N. Valley e G.N. Harris apresentaram menores severidades da doença, enquanto que as variedades G.N. Nebraska # 1, G.N. Tara, G.N. UI59 e G.N. US1140 foram mais suscetíveis.

Têm-se constatada resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli* em *P. coccineus*. SCHAREN (1959) comentou que a variedade Scarlet Runner apresentava reação de resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli*. COYNE & SCHUSTER (1973) relataram os seguintes genótipos: PI 165421, PI 175829, PI 175858, PI 181957, PI 243003, PI 177048, PI 223803, PI 176672, PI 176697 e OSA acc # 2014, e MOHAN (1982) M-7701, PI 201297, PI 201304 e NI 15, como sendo resistentes à *X. campestris* pv. *phaseoli*.

POMPEU & CROWDER (1972), empregando os materiais resistentes 7272-1, oriundo da variedade G.N. Nebraska # 1 sel. 27, e 7299-2, proveniente da linhagem 6650-1 do cruzamento entre *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. polyanthus*, cruzando-os com as variedades suscetíveis Red Kidney e Black Turtle Soup, constataram que a resistência foliar à *X. campestris* pv. *phaseoli* era quantitativa, condicionada por poucos genes, cujo efeito médio foi de dominância parcial e este caráter foi de alta herdabilidade. COYNE & SCHUSTER (1974b), empregando o PI 207262 como

fonte de resistência em cruzamentos com as variedades suscetíveis G.N. 1140 e Red Kidney, demonstraram que um pequeno número de genes maiores estavam envolvidos na resistência foliar do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Cruzamentos realizados por VALLADARES-SANCHEZ et al. (1983) e RAVA (1985) confirmaram o efeito aditivo da resistência foliar e de vagem do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* e este caráter foi herdado quantitativamente, tanto nas folhas (COYNE et al., 1965; 1973; VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983) quanto nas vagens (VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983).

A segregação transgressiva foi notada em vários cruzamentos, pois o nível de resistência à *X. campestris* pv. *phaseoli* foi aumentado através de cruzamento entre linhagens resistentes ou entre pais resistentes e suscetíveis (POMPEU & CROWDER, 1972), surtindo em alguns casos segregantes com maiores níveis de resistência do que o progenitor resistente (MOHAN, 1982; MOHAN & MOHAN, 1983). Este tipo de segregação também foi constatado para o aumento de suscetibilidade à *X. campestris* pv. *phaseoli* em progênies provenientes do cruzamento entre os genótipos resistentes PI 207262 e G.N. Nebraska # 1 sel. 27 (COYNE & SCHUSTER, 1974b).

Normalmente as plantas de feijoeiro são mais suscetíveis à *X. campestris* pv. *phaseoli* durante a fase reprodutiva do que na fase vegetativa (COYNE et al.,

1973; YOSHII et al., 1978; OLEAS-ARIAS, 1982; WEBSTER et al., 1983; ZAPATA et al., 1985).

Alguns fatores ambientes podem influenciar a expressão da resistência do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli*. A variedade Jules e o PI 207262 são resistentes à *X. campestris* pv. *phaseoli* nas regiões temperadas porém foram suscetíveis em condições tropicais. Tal fato foi relacionado com as condições de fotoperíodo que as plantas foram submetidas. Sob condições de 12 h de fotoperíodo estes genótipos floresceram precocemente (29 - 30 dias) e sob condições de 16 h de fotoperíodo floresceram mais tardiamente (43 - 45 dias), além do que as plantas submetidas a 12 h de fotoperíodo apresentaram um crescimento débil e foram mais suscetíveis que as plantas normais desenvolvidas sob o fotoperíodo de 16 h (WEBSTER et al., 1983).

Materiais de feijoeiro considerados resistentes à *X. campestris* pv. *phaseoli* em algumas regiões podem ser suscetíveis em outras. YOSHII et al. (1978) constataram a suscetibilidade em PI 16927, PI 207262, PI 19768 e nas variedades Guali e G.N. Nebraska # 1 sel 27, nas condições da Colômbia. No entanto, esses genótipos foram considerados resistentes por COYNE & SCHUSTER (1973), nas condições dos U.S.A..

Normalmente, os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, oriundos das regiões tropicais, são mais agressivos quando comparados com aqueles provenientes das

regiões temperadas. SCHUSTER & COYNE (1971) e SCHUSTER et al. (1973) verificaram que isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provenientes da Colômbia e Uganda, foram mais agressivos que o isolado norte americano Nebraska XpS. Este fato também foi constatado para outros isolados provenientes da Colômbia (SAETTLER & EKPO, 1975; EKPO & SAETTLER, 1976; RAVA, 1984), Guatemala (SAETTLER & EKPO, 1975; EKPO & SAETTLER, 1976), Brasil (VALLADARES-SANCHEZ et al., 1983; RAVA, 1984) e República Dominicana (SCHUSTER, 1983; SCHUSTER & SMITH, 1983). Têm-se constatada também a diferença de agressividade entre isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *phaseoli* (OLEAS-ARIAS, 1982; RAVA, 1985).

OLEAS-ARIAS (1982) concluiu em seus estudos que a diferença na resistência foliar e da vagem dos genótipos de feijoeiro por ele avaliados era de natureza horizontal e os diferentes graus de patogenicidade apresentados pelos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram de natureza agressiva.

Segundo VAN DER PLANK (1963; 1984), sob o ponto de vista epidemiológico, existem dois tipos de resistência de plantas a patógenos: resistência horizontal e vertical.

A resistência horizontal apresenta uma série de características, sendo permanente e não superada pelo aparecimento de um novo patótipo, indicando que os mecanismos de defesa do hospedeiro estão além da capacidade microevolucionária do patógeno. Normalmente, este tipo de

resistência dificulta o crescimento do patógeno no tecido do hospedeiro, pois é poligênica e em alguns casos oligogênica, de efeito aditivo e quantitativo, e é afetada pelo ambiente (VAN DER PLANK, 1963; ROBINSON, 1973; ROBINSON, 1976; VAN DER PLANK, 1984).

A resistência horizontal atua reduzindo o desenvolvimento da doença durante o ciclo da cultura, diminuindo a taxa aparente de infecção (r), sem afetar a quantidade de inóculo inicial (x_0). Sob condições naturais de infecção, pode-se discriminar o nível de resistência horizontal em plantas e ela será maior quanto menor for o valor de r (VAN DER PLANK, 1963; NELSON, 1978; VAN DER PLANK, 1984).

Por outro lado, a resistência vertical é temporária, podendo ser quebrada devido a mudança da população do patógeno. Os mecanismos de resistência oferecidos pelo hospedeiro estão dentro da capacidade de mudança microevolucionária do patógeno. Desta forma, ela é efetiva contra alguns patótipos e ineficiente para outros. Aplica-se o conceito gene-a-gene de Flor, isto é, para cada gene de resistência no hospedeiro há um gene complementar de virulência no patógeno. Ela proporciona uma proteção temporária ou incompleta no hospedeiro e a reação de hipersensibilidade é uma das características deste tipo de resistência da resistência vertical. No geral, a resistência vertical é governada por mono ou oligogenes (VAN DER PLANK, 1963; VAN DER PLANK, 1984).

Uma das características da expressão epidemiológica da resistência vertical no hospedeiro é o atraso no início da epidemia, manifestando-se através da diminuição da quantidade do inóculo inicial (x_0) e não afeta a taxa aparente de infecção (r). Quanto menor o valor de x_0 , maior será o nível de resistência vertical presente no hospedeiro (VAN DER PLANK, 1963; NELSON, 1978; VAN DER PLANK, 1984).

A resistência oferecida por *Phaseolus* spp. à *X. campestris* pv. *phaseoli* é do tipo horizontal, segundo as características dessa resistência, descritas por VAN DER PLANK (1963; 1984) e ROBINSON (1973; 1976), uma vez que os genótipos considerados resistentes apresentam baixa severidade da doença (SCHAREN, 1959; COYNE & SCHUSTER, 1963; COYNE & SCHUSTER, 1973; COYNE & SCHUSTER, 1974a; YOSHII et al., 1978; VICTORIA et al., 1981; MOHAN, 1982; OLEAS-ARIAS, 1982; MOHAN & MOHAN, 1983; RAVA, 1985; ZAPATA et al., 1985; PARK & DHANVANTARI, 1987; ZAITER & COYNE, 1989; FREGONESE & MARINGONI, 1991; MARINGONI et al., 1992a) e seu efeito é aditivo, herdado quantitativamente e controlado por poucos genes (COYNE et al., 1965; POMPEU & CROWDER, 1972; COYNE & SCHUSTER, 1974b; VALLADARES-SANCHEZ, 1983; RAVA, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*

3.1.1. Isolamento

Amostras de plantas de feijoeiro com sintomas do CBCF foram coletadas em diferentes localidades do Estado de São Paulo, durante a safra das águas de 1988.

Pequenos fragmentos de tecidos foliares, retirados das regiões de transição entre tecido sadio e doente, foram desinfestados com álcool a 70%, durante 30 seg., e em hipoclorito de sódio a 1,2%, por um min, e enxaguados em água destilada esterilizada. Após o enxágue, os fragmentos de tecidos foram triturados em 5 ml de água destilada esterilizada, com o auxílio de um bastão de vidro previamente flambado, com a finalidade de extrair a bactéria do tecido.

Duas placas de Petri contendo meio nutriente ágar + sacarose (extrato de carne - 3,0 g, peptona - 5,0 g, sacarose - 10 g, ágar - 12 g, água destilada 1000 ml) foram utilizadas para o isolamento da bactéria de cada uma das amostras obtidas. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas a 28 °C, durante 72 - 96 h.

As colônias individualizadas formadas, que se apresentavam convexas, amarelas e mucóides, típicas do gênero *Xanthomonas*, foram selecionadas das placas de Petri, diluídas em água destilada esterilizada e submetidas a um novo plaqueamento em meio nutriente ágar + sacarose. Após 72 h de incubação a 28 °C, as colônias puras foram transferidas para o meio PSA (sacarose - 20,0 g, peptona - 5,0 g, K_2HPO_4 - 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25 g, ágar - 12 g, água destilada - 1000 ml, pH 7,2 - 7,4), contido em tubos de ensaio.

3.1.2. Preservação

Os isolados bacterianos puros obtidos foram preservados pelos métodos de óleo mineral esterilizado, sob refrigeração, liofilização (TUIE, 1969) e em tiras de papel de filtro dessecadas (TAKATSU, 1980).

3.1.3. Teste de patogenicidade

Os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram repicados para tubos de ensaio contendo meio PSA inclinado. Decorridas 96 h de incubação, a 27 - 28 °C, as colônias bacterianas desenvolvidas foram suspensas em água destilada (5ml/tubo de ensaio) e as suspensões, na concentração aproximada de 10^8 - 10^9 ufc/ml, foram empregadas nas inoculações. Foram inoculadas seis a oito folhas primárias de plantas de feijoeiro da variedade Carioca, para cada um dos isolados. As plantas foram obtidas em vaso, sob condições de casa de vegetação. O método de inoculação empregado foi o de riscas, provocado por um palito dental previamente umedecido nas suspensões bacterianas, na face dorsal das folhas. Aproximadamente doze dias após a inoculação, os sintomas foram avaliados. Foram considerados patogênicos os isolados que causaram sintomas da doença nas folhas inoculadas.

3.1.4. Produção de melanina

Para verificar a produção do pigmento melanina pelos isolados bacterianos em estudo, empregou-se o meio de cultura YCA (extrato de levedura - 10,0g, CaCO_3 - 10,0 g, ágar - 12,0 g, água destilada - 1000 ml) conforme BASU & WALLEN (1966), no qual a variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli* produz abundantemente esse

pigmento. A melanina é perceptível através do escurecimento do meio de cultura. Cada isolado foi semeado em três placas de Petri, contendo o meio YCA e foi incubado a 27 - 28 °C, durante 96 h. Seguido a incubação, verificou-se a presença ou a ausência de produção da melanina no meio de cultura.

3.2. Sorologia

3.2.1. Preparo dos antígenos imunizantes e imunização

Os isolados Feij-1 e Feij-20 foram cultivados em meio nutriente líquido (extrato de carne - 3,0 g, peptona - 5,0 g e água destilada 1000 ml) sob agitação, durante 48 h, em ambiente de laboratório. Seguido a esse período, adicionou-se à suspensão bacteriana volume igual de uma solução de formaldeído a 1,25 %. Após 72 h, efetuaram-se centrifugações a 8000 g, durante 30 min, com a finalidade de coletar as bactérias mortas contidas na suspensão. As bactérias decantadas foram lavadas três vezes em solução salina tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 - 7,4, sob centrifugação, e o precipitado resultante da última centrifugação foi suspenso em solução salina tampão fosfato e padronizado por colorimetria a 0.5 % de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm. As

suspensões bacterianas padronizadas foram transferidas para frascos de vidro esterilizados e, para cada 5 ml de suspensão bacteriana, adicionou-se uma gota de thimerosal a 1 % como preservativo. Os frascos permaneceram armazenados a 4 - 5 °C. A metodologia empregada para a obtenção dos antígenos imunizantes foi adaptada de MALIN et al. (1985).

Coelhos machos da raça Norsffolk foram imunizados separadamente com as suspensões bacterianas, previamente homogeneizadas em adjuvante completo de Freund. O esquema de imunização adotado foi o seguinte:

- a - Coleta do soro normal, injeção endovenosa de 0,5 ml da suspensão bacteriana e injeção subcutânea, em cada lado da coxa, de 1,5 ml da suspensão bacteriana homogeneizada em adjuvante;
- b - Sete dias após a primeira imunização, injeção subcutânea, em cada lado da coxa, de 1,5 ml da suspensão bacteriana homogeneizada em adjuvante;
- c - Sete dias após a segunda imunização, idem a b;
- d - Sete dias após a terceira imunização, idem a b;
- e - Sete dias após a quarta imunização, idem a b;
- f - Sete dias após a quinta imunização, aplicação apenas de 1,5ml da suspensão bacteriana homogeneizada em uma das coxas;
- g - Sete dias após a sexta imunização, idem a f;
- h - Sete dias após a sétima imunização, idem a f.

3.2.2. Obtenção dos antissoros

Sangrias periódicas foram realizadas a partir da sétima semana após a primeira imunização e repetidas aproximadamente a cada 12 - 15 dias. Para a coleta do sangue foi realizado corte na veia marginal da orelha do coelho, sendo coletado aproximadamente 15 ml de sangue. O sangue coletado permaneceu por aproximadamente duas horas a temperatura ambiente e depois, por uma noite, a 4 - 5 °C. O plasma sanguíneo obtido foi centrifugado a 6000 g durante 15 min. e o sobrenadante foi transferido para frascos de vidro esterilizados e adicionou-se uma gota de thimerosal a 1 % para cada 5 ml de antissoro. Os antissoros obtidos foram codificados e mantidos a - 20 °C.

3.2.3. Preparo dos antígenos para a reação em dupla difusão em gel-de-ágar

Todos os isolados bacterianos foram cultivados em meio nutriente líquido durante 48 h, a temperatura ambiente, sob agitação constante. Imediatamente após esse período, efetuaram-se centrifugações das suspensões bacterianas a 8000 g durante 30 min. As células decantadas foram lavadas por três vezes consecutivas, através de centrifugação (8000 g/30 min), com solução salina tampão fostato esterilizada. As suspensões

bacterianas obtidas foram padronizadas por colorimetria, a 10 % de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm. Essas suspensões bacterianas foram aquecidas em banho maria, a 100 °C, durante uma hora, conforme recomendação de KHLAIF & VENETTE (1986), resfriadas à temperatura ambiente e adicionou-se uma gota de thimerosal a 1 %, para cada 5 ml de suspensão bacteriana aquecida. As suspensões bacterianas foram armazenadas a - 20 °C.

3.2.4. Titulação dos antissoros e testes em dupla difusão em gel-de-ágar

Os antissoros AS-Feij-1 e AS-Feij-20, obtidos respectivamente aos 62 e 55 dias após a primeira imunização, foram titulados segundo a técnica de microprecipitina em placa, conforme ROMEIRO & FUKUDA (1983). Foram realizadas leituras aos 60 e 120 min após a mistura dos antígenos homólogos com os respectivos antissoros em diferentes concentrações, para a verificação dos títulos.

Para a reação em dupla difusão em gel de ágar, cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro recebeu 5 ml do gel fundente (NaCl - 0,85 g, metil violeta a 1 % - 10 ml, thimerosal a 1 % - 10 ml, bacto ágar Difco - 1,5 g e água destilada - 80 ml) e aproximadamente 48 h após, perfurou-se o meio com um vazador de rolhas de 2 mm de diâmetro, em formato hexagonal inscrito num círculo de 1,25

cm de diâmetro e com um orifício central. Após ter sido perfurado, retiraram-se os pequenos blocos de ágar e os orifícios periféricos formados foram preenchidos duas vezes com os antígenos bacterianos fervidos e o orifício central com o antissoro puro. Em seguida, as placas de Petri permaneceram em condições de ambiente de laboratório, durante 48 a 72 h, quando as bandas de precipitação formadas foram avaliadas.

3.3. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão

3.3.1. Ação de antibióticos *in vitro* na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (I)

Foram obtidos dezesseis isolados de bactérias saprófitas de sementes de feijão. Esses isolados foram cultivados em meio nutriente líquido por 24 h a 28 °C e, posteriormente, plaqueados através de estrias na superfície dos meios de cultura contendo os diferentes antibióticos. Cada isolado foi semeado em três placas de Petri contendo os diferentes meios.

O meio de cultura basal utilizado foi o nutriente ágar, no qual, após a autoclavagem e a 50 °C,

adicionaram-se os seguintes antibióticos: ácido nalidíxico (Laboratório Wintrop), nitrofurantoína (Furadantina* - Laboratório Schering) e cefalexina monohidratada (Laboratório Eli Lilly do Brasil Ltda.). Os antibióticos foram previamente diluídos em água destilada esterilizada e alíquotas destes foram tomadas e adicionadas aos meios de cultura. Para a ácido nalidíxico, fez-se uma diluição prévia de 0,1 g do princípio ativo do produto em 2 ml de NaOH 1N e, em seguida, adicionou-se 98 ml de água destilada esterilizada e a solução resultante foi filtrada em filtro bacteriológico para a esterilização. As concentrações finais dos antibióticos nos meios de cultura foram:

- a - Acido nalidíxico a 1 $\mu\text{g/ml}$ **
- b - Nitrofurantoína a 2 $\mu\text{g/ml}$
- c - Cefalexina monohidratada a 30 $\mu\text{g/ml}$
- d - Acido nalidíxico + cefalexina a 1 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$
- e - Nitrofurantoína + cefalexina a 2 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$
- f - Acido nalidíxico + nitrofurantoína + cefalexina a 1 $\mu\text{g/ml}$ + 2 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$
- g - Acido nalidíxico + nitrofurantoína a 1 $\mu\text{g/ml}$ + 2 $\mu\text{g/ml}$
- h - Meio basal sem antibiótico

Após o plaqueamento, as placas de Petri permaneceram incubadas a 28 °C durante 72 h. Considerou-se

* - denominação atual: Macrofantina
**- micrograma por mililitro

na avaliação apenas o crescimento (+) ou a inibição (-) das bactérias nos meios de cultura.

3.3.2. Ação de antibióticos *in vitro* na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (II)

Foram utilizados neste experimento oito isolados de bactérias saprófitas. Os antibióticos adicionados ao meio de cultura nutriente ágar foram: gentamicina (CEME), ácido nalidíxico, nitrofurantoína, cefalexina monohidratada, penicilina g benzataína (CEME), garamicina (Laboratório Shering) e ampicilina (Ampicilina Recofarma - Laboratórios Silva Araujo - Rousol).

A obtenção das suspensões dos isolados das bactérias saprófitas, o preparo dos meios de cultura, a semeadura das bactérias, a incubação, a leitura das placas de Petri e o número de repetição foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1.

Os tratamentos empregados neste experimento e as concentrações finais dos antibióticos nos meios de cultura foram:

- a - Gentamicina + ácido nalidíxico + nitrofurantoína a 0,05 µg/ml + 1 µg/ml + 2 µg/ml
- b - Gentamicina a 2 µg/ml
- c - Cefalexina + gentamicina a 30 µg/ml + 2 µg/ml

- d - Cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$
- e - Cefalexina a 100 $\mu\text{g/ml}$
- f - Penicilina b benzetaína a 101 u.i./l*
- g - Garamicina a 1 $\mu\text{g/ml}$
- h - Ampicilina a 1 $\mu\text{g/ml}$
- i - Meio basal sem antibiótico

3.3.3. Ação de antibióticos *in vitro* sobre isolados de bactérias saprófitas obtidas de sementes de feijão e sobre *X. campestris* pv. *phaseoli*

A sensibilidade de dezesseis isolados de bactérias saprófitas, provenientes de sementes de feijão, e dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram avaliados *in vitro* frente aos antibióticos gentamicina (2 $\mu\text{g/ml}$), cefalexina gentamicina (30 $\mu\text{g/ml}$ + 2 $\mu\text{g/ml}$) e garamicina (1 $\mu\text{g/ml}$).

Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura nutriente ágar, após a esterilização, de tal forma que atingissem as concentrações finais relacionadas. O tratamento testemunha foi representado pelo meio nutriente ágar sem antibiótico.

Cada isolado bacteriano foi semeado em três placas de Petri por tratamento, com uma suspensão

* - unidades internacionais por litro

bacteriana previamente cultivada a 28 °C, durante 24 h (bactérias saprófitas) ou 48 h (*X. campestris* pv. *phaseoli*). A leitura dos crescimentos bacterianos na superfície dos meios de cultura, foi realizada após 72 h de incubação, a 28 °C, examinando-se o crescimento (+) ou a inibição (-) dos isolados (-).

3.3.4. Ação de garamicina e gentamicina *in vitro* sobre bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e sobre *X. campestris* pv. *phaseoli*

Dois isolados de bactérias saprófitas obtidos de sementes de feijão, e dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Feij-34 e Feij-36), foram avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* aos antibióticos garamicina e gentamicina a diferentes concentrações. Os antibióticos garamicina e gentamicina foram adicionados ao meio de cultura nutriente ágar após a autoclavagem, a 50 °C, para se obter as concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 µg/ml. O tratamento testemunha foi representado pelo meio nutriente ágar sem antibiótico.

A obtenção das suspensões bacterianas, semeadura, número de repetições, incubação e avaliação foram idênticas ao ensaio do item 3.3.3..

3.3.5. Efeito de alguns fungicidas e antibióticos adicionados ao meio de cultura nutriente ágar modificado sobre o crescimento de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Os isolados Feij-26 (var. *fuscans*), Feij-27, Feij-29 e Feij-41 foram previamente cultivados em meio nutriente líquido durante 48 h, a 28 °C, e diluídos em solução salina tampão fosfato esterilizada. Alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-6} a 10^{-8} foram semeadas na superfície dos meios de cultura com auxílio de uma alça de Drigalski.

Os meios de cultura ensaiados foram:

- a - Nutriente ágar modificado (extrato de carne - 3,0 g, peptona - 5,0 g, amido solúvel - 2,0 g, sacarose - 10 g, bacto ágar Difco - 15 g e água destilada - 1000 ml);
- b - Nutriente ágar modificado acrescido por litro, após a autoclavagem, a 45 - 50 °C, de benomyl - 0,02 g, chlorothalonil - 0,02 g, cefalexina monohidratada 0,03 g, ácido nalidíxico - 0,001 g e nitrofurantoina - 0,002 g.

Cada uma das diluições dos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* foi semeada em quatro placas de Petri, contendo os meios de cultura. Após 96 h de incubação, a 28 °C, procedeu-se a contagem das colônias desenvolvidas e, em seguida, verteu-se lugol para se

verificar a hidrólise de amido. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 2. Para análise estatística os resultados obtidos foram transformados em raiz quadrada de x.

3.4. Detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão naturalmente infectadas, através de dois métodos de extração

Quinze amostras de 200 g de sementes de feijão, da cultivar Rio Negro, produzidas na safra das águas de 1988, em Londrina - PR, foram empregadas no experimento.

Cada amostra de semente foi previamente lavada em água de torneira, por duas a três vezes consecutivas, com a finalidade da remoção dos detritos mais grosseiros veiculados às sementes. Em seguida, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2 % (EDNIE & NEEDHAN, 1973; TRUJILLO & SAETTLER, 1979a), na razão de 500 ml da solução de hipoclorito para 200 g de sementes, durante cinco minutos. Seguida à desinfestação, as sementes foram enxaguadas por duas vezes consecutivas, em 500 ml de água de torneira esterilizada. Posteriormente, foram transferidas para frascos contendo 430 ml de solução salina tampão fosfato esterilizada e submetidas à maceração

durante 24 h, à temperatura de 5 °C. Após o período de maceração das sementes, foi adicionado 0,1 ml de uma solução de Tween-20 a 1 % em cada frasco e estes foram agitados durante 15 min., em agitador de bancada, sob condições de laboratório.

Uma alíquota de 1 ml foi retirada da suspensão de maceração das sementes e diluições em série foram feitas em solução salina tampão fosfato esterilizada. Colocou-se 0,1 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-4} em cada placa de Petri contendo o meio nutriente ágar modificado acrescido de fungicidas e antibióticos, conforme descrito no item 3.3.5., sendo as suspensões espalhadas na superfície do meio de cultura com auxílio de uma alça de Drigalski. Além do plaqueamento do líquido de maceração das sementes, efetuou-se a trituração das mesmas em aparelho eletrodoméstico denominado "Mix", previamente desinfestado em álcool a 70%, por 3 min, e em hipoclorito de sódio a 2%, por 5 min, e enxaguado em água destilada esterilizada. O triturado obtido foi coado em peneira de arame, utilizada para coar chá, previamente flambada. A suspensão coada resultante foi refrigerada, a 4 - 5 °C, por 1 - 2 h, com a finalidade da decantação das partículas grosseiras suspensas. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em solução salina tampão fosfato esterilizada e 0,1 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram submetidas a plaqueamento, conforme descrito anteriormente, em meio de

cultura nutriente ágar modificado acrescido de fungicidas e antibióticos.

Cada diluição foi plaqueada em quatro placas de Petri, incubadas a 28 °C durante 72 - 96 h. As colônias típicas de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram contadas e algumas delas repicadas para tubos de ensaio contendo meio PSA, para posterior caracterização. A observação da hidrólise de amido pela bactéria foi realizada através da adição de lugol nas placas.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística não paramétrica, pelo teste t, para verificar a possível diferença existente entre os dois métodos de extração da *X. campestris* pv. *phaseoli* das sementes de feijão.

3.5. Caracterização de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidos de sementes

Quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, obtidos de sementes de feijão naturalmente infectadas, foram submetidos a testes de caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica, sorológica e de patogenicidade.

Os testes de caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica foram realizados conforme DYE (1980), para o gênero *Xanthomonas*, e DYE & LELLIOTT (1974)

e DYE (1980), para a diferenciação das espécies dentro deste gênero. Já, as metodologias adotadas para a realização dos testes foram aquelas descritas por KIRALY et al. (1974) e FAHY & PERSLEY (1983).

Os testes sorológicos foram realizados em dupla difusão em gel-de-ágar, conforme descrito no item 3.2.4. e os antissoros empregados foram AS-Feij-1 e AS-Feij-20. Os antígenos bacterianos foram obtidos a partir de culturas bacterianas desenvolvidas durante 72-96 h em meio PSA, contido em tubos de ensaio. As colônias bacterianas formadas foram suspensas em 5 ml de solução salina tampão fosfato, para cada tubo de ensaio, e fervidas em banho maria durante 1 h. As placas de Petri contendo o gel-de-ágar permaneceram sob condições de laboratório, durante 48 - 72 h, quando foram avaliadas as bandas de precipitação formadas.

Para o teste de patogenicidade, inocularam-se folhas primárias de duas a três plantas de feijoeiro, cultivar Rio Negro, contidas em vaso, com as suspensões bacterianas. O inóculo foi obtido cultivando-se os isolados bacterianos em meio PSA, durante 72 - 96 h. As inoculações foram realizadas com o inóculo suspenso em água, através de riscas na face dorsal das folhas com um palito dental previamente umedecido no inóculo. Seguido as inoculações, as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação e os sintomas avaliados quinze dias após a inoculação.

3.6. Avaliação da resistência de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes

Três ensaios foram conduzidos, a nível de campo, na Fazenda Experimental de São Manuel, São Manuel - SP, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP, durante o período de 1988 a 1990.

O primeiro ensaio foi instalado na safra das águas de 1988, utilizando-se as cultivares de feijoeiro Carioca, IAPAR 16 e IAPAR 20, provenientes de dois lotes distintos de sementes para cada cultivar. Posteriormente, as sementes colhidas em 1988 foram empregadas na semeadura da safra das águas de 1989 e as sementes produzidas nesta safra foram utilizadas na semeadura da safra das secas de 1990, conforme a Tabela 1.

Cada parcela experimental foi representada por doze linhas de 9 m de comprimento, espaçadas de 0,50 m, semeando-se quinze sementes por metro linear, nos três ensaios. As parcelas foram distribuídas em blocos ao acaso com quatro repetições. Entre e ao redor das parcelas, foram semeadas quatro linhas de milho pipoca, com a finalidade de barreira, em uma faixa aproximada de 2 m. A semeadura do milho antecedeu aproximadamente vinte dias a do feijão. Foi considerada área útil da parcela apenas três linhas centrais de 5 m de comprimento, totalizando 7,5 m², onde foram efetuadas as diferentes avaliações.

Tabela 1 - Épocas de realização das diferentes operações nos três ensaios conduzidos na Fazenda Experimental de São Manuel, FCA/UNESP. São Manuel, SP.

Operações	Safras		
	Águas de 1988	Águas de 1989	Seca de 1990
Semeadura	21/09	20/09	06/02
Avaliações da doença			
primeira	18/10 - 20 DAE (a)	20/10 - 20 DAE	02/03 - 20 DAE
segunda	28/10 - 30 DAE	30/10 - 30 DAE	12/03 - 30 DAE
terceira	07/11 - 40 DAE	09/11 - 40 DAE	23/03 - 41 DAE
quarta	17/11 - 50 DAE	20/11 - 51 DAE	03/04 - 52 DAE
quinta	28/11 - 61 DAE	30/11 - 61 DAE	-
sexta	08/12 - 71 DAE	12/12 - 73 DAE	-
Colheita	16/12	21/12	25/04

a - Dias após a emergência

Calagens e adubações foram realizadas conforme a análise do solo (BULISANI, 1985) e os tratamentos fitossanitários, visando o controle das doenças fúngicas e pragas, conforme as indicações da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (1985), com exceção da safra das secas de 1990 quando empregou-se o inseticida granulado aldicarb, no sulco de plantio, para o controle da mosca branca vetora do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (YUKI et al., 1989), além de outros tratamentos fitossanitários. Capinas e irrigações foram efetuadas quando necessárias. Os dados climáticos foram obtidos de um posto meteorológico instalado a aproximadamente 200 m dos ensaios e a quantidade de água empregada nas irrigações foi coletada

através de pluviômetros colocados dentro dos ensaios, conforme ilustram as Figuras 1, 2 e 3.

As observações efetuadas nos ensaios foram:

3.6.1. Avaliação da germinação e transporte de *X. campestris* pv. *phaseoli* pelas sementes de feijão

Para verificar o poder germinativo das sementes, empregaram-se duzentas sementes, divididas em quatro repetições de cinquenta. Estas foram distribuídas em duas folhas de papel "Germ test" umedecidas e posteriormente cobertas com outra folha do mesmo papel umedecida. As folhas contendo as sementes foram enroladas e permaneceram sob incubação, a 30 °C, com 100 % de umidade relativa, durante nove dias. As avaliações foram realizadas aos cinco e aos nove dias após a instalação do ensaio (BRASIL, 1976). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e para análise estatística, os dados obtidos foram transformados em arc seno da raiz quadrada de $x/100$.

Realizou-se a quantificação de *X. campestris* pv. *phaseoli* nas sementes, utilizadas na semeadura das três safras, através do método de plaquamento da suspensão resultante da trituração das sementes em meio semi-seletivo, conforme descrito no item 3.4.. Cinco subamostras de 200 g de sementes, para cada lote das

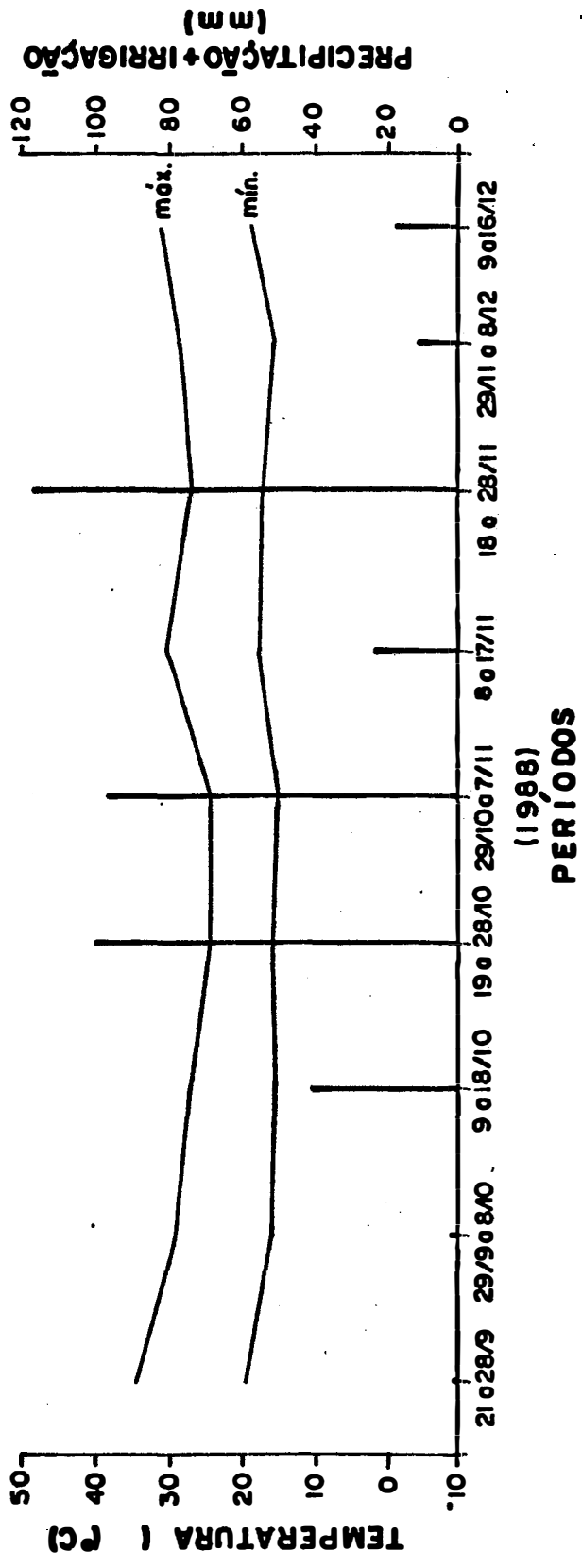


Figura 1 - Temperaturas médias máxima e mínima (°C) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra das águas de 1988. São Manuel, SP.

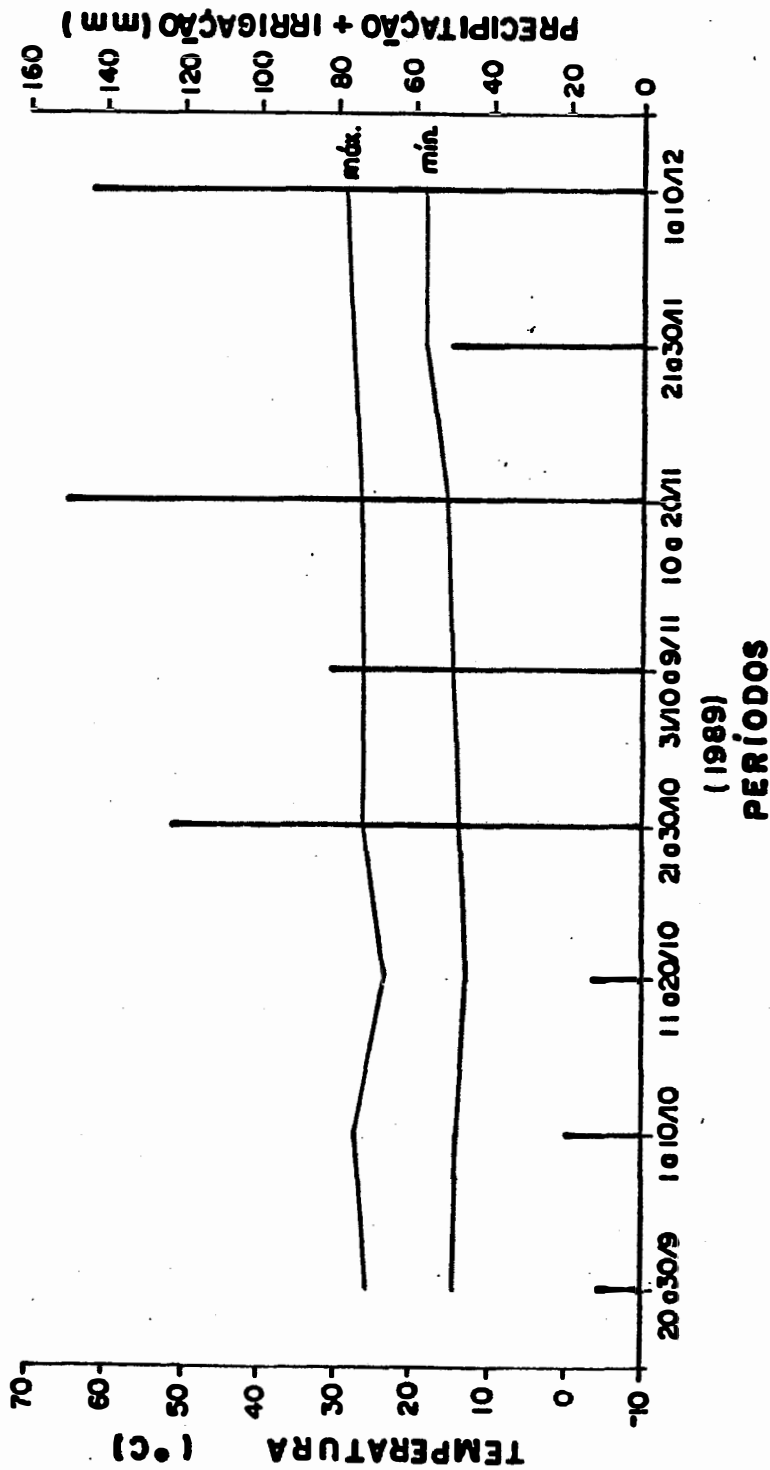


Figura 2 - Temperaturas médias máxima e mínima (°C) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra das águas de 1989. São Manuel, SP.

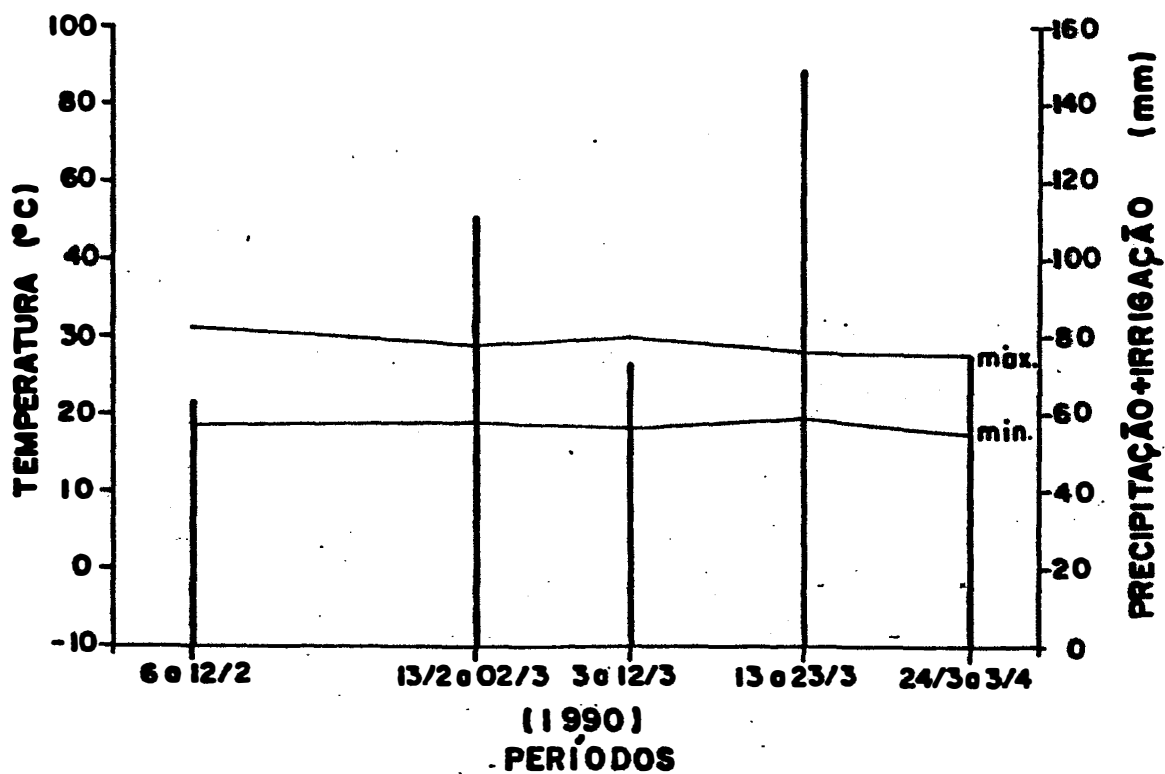


Figura 3 - Temperaturas médias máxima e mínima ($^{\circ}\text{C}$) e precipitação mais irrigação (mm) ocorridos no ensaio conduzido na safra da seca de 1990. São Manuel, SP.

variedades, foram analisadas. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Para análise estatística os dados obtidos, em número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/ml), foram transformados em raiz quadrada de x .

3.6.2. Avaliação do desenvolvimento do crestamento bacteriano comum

Para a avaliação do crestamento bacteriano comum nos folíolos das plantas, tomaram-se ao acaso cinco plantas em cada linha, totalizando quinze plantas por parcela. Foram avaliadas a severidade dos sintomas, conforme a escala diagramática recomendada por JAMES (1971), e a porcentagem de folíolos com sintomas da doença (incidência). Na primeira e na segunda avaliações, todos os folíolos das plantas foram avaliados e, a partir da terceira avaliação, apenas vinte folíolos do terço mediano de cada planta foram analisados nas diferentes épocas (Tabela 1).

Os resultados obtidos, nas avaliações da severidade e da incidência da doença nos folíolos, foram submetidos à análise de regressão linear para a obtenção dos valores da taxa aparente de infecção (r) e do inóculo inicial (x_0). Para o cálculo dos referidos índices (r e x_0), empregou-se a transformação logística ($\ln(x/1-x)$), conforme VAN DER

PLANK (1963), onde x corresponde à centésima parte da porcentagem do tecido afetado ou de folíolos infectados. Antes do emprego da transformação logística, foi acrescentado em todos os dados o valor 0,01, devido à presença de zero nas avaliações (BERGAMIN FILHO, 1983; SALGADO, 1983).

A taxa aparente de infecção (r) correspondeu ao coeficiente angular (b) e o inóculo inicial (x_0) correspondeu ao coeficiente linear (a) da reta na fórmula da regressão linear: $y = a + bx$.

Por ocasião da colheita, vinte plantas foram coletadas ao acaso, por parcela, e suas vagens avaliadas quanto à incidência de crestamento bacteriano comum. Para análise estatística, os resultados referentes aos valores de r e x_0 não sofreram transformação e os referentes à incidência de vagens doentes foram transformados em arc seno da raiz quadrada de $x/100$.

3.6.3. Avaliação de parâmetros agronômicos

Aferiram-se o número de vagens por planta, o número de sementes por vagem, a produção e o peso de mil sementes, em grama. Por ocasião da colheita, vinte plantas foram coletadas ao acaso e suas vagens contadas. Para verificar o número de sementes por vagem, contaram-se as sementes de cem (safras das águas) ou de trinta vagens (safra das secas).

Apenas os dados referentes ao número de vagens por planta e o número de sementes por vagem foram previamente transformados em raiz quadrada de x , para se efetuar as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*

A relação dos vinte e três isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, obtidos durante a safra das águas de 1988, de diferentes localidades do Estado de São Paulo, sua patogenicidade ao feijoeiro e produção de melanina em meio YCA encontram-se na Tabela 2. Verificase que todos os isolados foram patogênicos à cultivar de feijoeiro Carioca. Destes, doze não produziram o pigmento melanina no meio YCA (Feij 1, Feij 4, Feij 13, Feij 14, Feij 18, Feij 21, Feij 23, Feij 27, Feij 29, Feij 35, Feij 36 e Feij 41) e onze isolados produziram o referido pigmento (Feij 2, Feij 5, Feij 20, Feij 22, Feij 24, Feij 26, Feij 28, Feij 32, Feij 33, Feij 34 e Feij 42), sendo estes considerados variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Tabela 2 - Relação dos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidos de folhas de feijoeiro, durante a safra das águas de 1988, de diferentes regiões do Estado de São Paulo, sua patogenicidade e produção de melanina no meio YCA.

Isolados	Datas de coleta	Municípios	Variedades	Patogenicidade	Produção de melanina
Feij 1	05/11	Itaporanga	Carioca 80	+ (a)	- (b)
Feij 2	05/11	Itaporanga	Carioquinha	+	+
Feij 4	05/11	Itaporanga	não identificado	+	-
Feij 5	05/11	Itaporanga	Carioquinha	+	+
Feij 13	05/11	Cel. Macedo	Carioquinha	+	-
Feij 14	05/11	Cel. Macedo	Carioquinha	+	-
Feij 18	05/11	Cel. Macedo	Carioquinha	+	-
Feij 20	25/09	São Manuel	Rio Negro	+	+
Feij 21	25/09	São Manuel	Rio Negro	+	-
Feij 22	27/10	São Manuel	IAPAR 20	+	+
Feij 23	11/11	Capão Bonito	Jaloba	+	-
Feij 24	11/11	Capão Bonito	Mãezinha	+	+
Feij 26	25/11	Itararé	Carioca	+	+
Feij 27	25/11	Itararé	Carioquinha	+	-
Feij 28	25/11	Itararé	Carioquinha	+	+
Feij 29	25/11	Itararé	Carioca Pitoco	+	-
Feij 32	25/11	Riversul	Carioquinha	+	+
Feij 33	25/11	Itaporanga	Carioquinha	+	+
Feij 34	30/11	Botucatu	Carioquinha	+	+
Feij 35	01/12	São Manuel	Carioca	+	-
Feij 36	30/11	Botucatu	Carioquinha	+	-
Feij 41	01/12	Itai	IAC Carioca	+	-
Feij 42	02/12	Pardinho	Carioca	+	+

a - reação positiva

b - reação negativa

4.2. Reações sorológicas entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Os antissoros As-Feij 1 e AS-Feij 20, obtidos respectivamente aos 62 e 55 dias após a primeira imunização, foram titulados conforme a técnica de microprecipitina em placa e apresentaram o título 1:2048. Os resultados obtidos, referentes às reações sorológicas em dupla difusão em gel-de-ágar entre os antígenos bacterianos com os dois antissoros, encontram-se na Tabela 3.

Observa-se especificidade de reação para cada um dos antissoros obtidos. Todos os isolados bacterianos pertencentes ao sorogrupo I reagiram igualmente com antissoro As-Feij 1, formando duas bandas de precipitação no gel-de-ágar. Entretanto, não foi observada reação deste antissoro com os isolados pertencentes ao sorogrupo II (variante *fuscans*).

O antissoro As-Feij 20 reagiu apenas com os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* variante *fuscans*, do sorogrupo II, formando apenas uma banda de precipitação no gel-de-ágar, com exceção dos isolados Feij 5 e Feij 22, ambos da variante *fuscans*, que não formaram nenhuma banda de precipitação (sorogrupo III).

Tabela 3 - Reação sorológica em dupla difusão em gel-de-água entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* com dois antissoros.

Antígenos dos Isolados	Reação(*) dos Antissoros		Sorogrupo
	As-Feij 1	As-Feij 20	
Feij 1	++	-	I
Feij 2	-	+	II
Feij 4	++	-	I
Feij 5	-	-	III
Feij 13	++	-	I
Feij 14	++	-	I
Feij 18	++	-	I
Feij 20	-	+	II
Feij 21	++	-	I
Feij 22	-	-	III
Feij 23	++	-	I
Feij 24	-	+	II
Feij 26	-	+	II
Feij 27	++	-	I
Feij 28	-	+	II
Feij 29	++	-	I
Feij 32	-	+	II
Feij 33	-	+	II
Feij 34	-	+	II
Feij 35	++	-	I
Feij 36	++	-	I
Feij 41	++	-	I
Feij 42	-	+	II

* - ++ = duas bandas

+ = uma banda

- = ausência de bandas de precipitação

Com esses resultados, foi possível agrupar os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* em três sorogrupos distintos, conforme relacionados na Tabela 3.

4.3. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *X. campestris* pv. *phaseoli*

4.3.1. Ação de antibióticos *in vitro* na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (I)

Os resultados referentes a esse experimento encontram-se na Tabela 4. Observa-se que nenhum dos antibióticos ou suas misturas conseguiram inibir todos os isolados de bactérias saprófitas.

A nitrofurantoina não inibiu nenhum dos isolados, o ácido nalidíxico inibiu apenas 12,5 % e a cefalexina, 37,5 % dos isolados das bactérias saprófitas ensaiadas. Entretanto, nota-se que a associação de dois ou mais antibióticos foi mais eficiente na inibição dos isolados bacterianos do que o emprego de um só produto. Deste modo, a mistura do ácido nalidíxico com a nitrofurantoina inibiu 31,25 %, nitrofurantoina + cefalexina inibiu 37,5 %, ácido nalidíxico + cefalexina inibiu 47,75 % e a mistura de ácido nalidíxico + nitrofurantoina + cefalexina inibiu o crescimento de 62,5 % dos isolados de bactérias saprófitas.

Tabela 4 - Efeito de antibióticos *in vitro* no crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão.

Antibióticos	Concentrações µg/ml	Ausência (-) ou presença (+) de crescimento ^(*) dos																Inibição (%)
		isolados de bactérias saprófitas																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Ac. nalidixico	1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	12,50
Nitrofurantoina	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Cefalexina	30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	37,50
Ac. nalidixico + cefalexina	1 + 30	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	47,75
Nitrofurantoina + cefalexina	2 + 30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	37,50
Ac. nalidixico + nitrof. + cefalexina	1 + 2 + 30	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	62,50
Ac. nalidixico + nitrofurantoina	1 + 2	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	31,25
Testemunha		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

* - + = crescimento

- = inibição

4.3.2. Ação de antibióticos *in vitro* na inibição do crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão (II)

Os resultados referentes à avaliação da ação dos diferentes antibióticos *in vitro* sobre oito isolados de bactérias saprófitas, oriundas de sementes de feijão, encontram-se na Tabela 5. Observa-se que a mistura de gentamicina + ácido nalidixico + nitrofurantoi-

na, penicilina g benzatina e ampicilina nas concentrações testadas não inibiram os isolados bacterianos em estudo.

Tabela 5 - Efeito de antibióticos *in vitro* no crescimento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão.

Antibióticos	Concentrações µg/ml	Ausência (-) ou presença (+) de crescimento ^(*) dos Isolados de bactérias saprófitas								Inibição (%)
		2	3	5	6	7	8	13	14	
Gentamicina+ac. nalidíxico+nitrofurantoina	0,05 + 1 + 2	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Gentamicina	2	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Cefalexina + gentamicina	30 + 2	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Cefalexina	50	+	+	+	+	-	+	+	+	25
Cefalexina	100	+	+	+	+	-	-	+	+	25
Penicilina g benzatina	101 ^(**)	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Garamicina	1	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Ampicilina	1	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Testemunha		+	+	+	+	+	+	+	+	0

* - + = crescimento

- = inibição

** - unidades internacionais por litro

A cefalexina nas concentrações de 50 e 100 µg/ml inibiu apenas 25 % dos isolados, sendo que os isolados comportaram-se de maneira semelhante nas duas concentrações deste antibiótico. Já, a gentamicina, a 2 µg/ml, associada ou não à cefalexina, a 30 µg/ml, e a garamicina, a 1 µg/ml, inibiram 100 % dos isolados em estudo.

4.3.3. Ação de antibióticos *in vitro* sobre bactérias saprófitas obtidas de sementes de feijão e sobre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Os resultados referentes à avaliação da sensibilidade *in vitro* de dezesseis isolados de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijão, e sobre dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, frente aos antibióticos gentamicina, cefalexina + gentamicina e garamicina, nas diferentes concentrações testadas, encontram-se na Tabela 6. Observa-se que todos os antibióticos ensaiados inibiram 100 % das bactérias saprófitas e também os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Tabela 6 - Sensibilidade *in vitro* de dezesseis isolados de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijão e de dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Ausência (-) ou presença (+) do crescimento** dos isolados	Antibióticos e concentrações			
	Gentamicina 2 µg/ml	Cefalexina + gentamicina 30 + 2 µg/ml	Garamicina 1 µg/ml	Testemunha
1	-	-	-	+
2	-	-	-	+
3	-	-	-	+
4	-	-	-	+
5	-	-	-	+
6	-	-	-	+
7	-	-	-	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	+
10	-	-	-	+
11	-	-	-	+
12	-	-	-	+
13	-	-	-	+
14	-	-	-	+
15	-	-	-	+
16	-	-	-	+
Feij 14	-	-	-	+
Feij 36	-	-	-	+

* - - = inibição
+ = crescimento

4.3.4. Ação de garamicina e gentamicina *in vitro* sobre bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e sobre *X. campestris* pv. *phaseoli*

Os resultados referentes a ação de diferentes concentrações de garamicina e gentamicina sobre o crescimento de dois isolados de bactérias saprófitas (5 e 15), provenientes de sementes de feijão e dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, são apresentados na Tabela 7. Verifica-se que a garamicina e a gentamicina nas concentrações igual ou superiores a 0,3 µg/ml inibiram o isolado 5. Já, o isolado 15 foi sensível a todas as concentrações de garamicina testadas e a 0,2 µg/ml de gentamicina.

Os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Feij 34 e Feij 36) apresentaram crescimento débil nas concentrações de 0,2, 0,3 e 0,4 µg/ml de garamicina e 0,2 e 0,3 µg/ml de gentamicina, quando comparados com o crescimento em meio de cultura sem antibiótico. As concentrações mínimas inibitórias dos isolados Feij 34 e Feij 36 foram 0,5 µg/ml e 0,3 µg/ml, respectivamente, para a garamicina e a gentamicina.

Tabela 7 - Comportamento de bactérias saprófitas isoladas de sementes de feijão e de *X. campestris* pv. *phaseoli*, *in vitro*, a diferentes concentrações de garamicina e gentamicina.

Antibióticos	Concentrações µg/ml	Ausência (-) ou presença (+) de crescimento ^(*) dos isolados bacterianos			
		5	15	Feij 34	Feij 36
Garamicina	0,1	+	-	+	+
	0,2	+	-	+/-	+/-
	0,3	-	-	+/-	-
	0,4	-	-	+/-	-
	0,5	-	-	-	-
Gentamicina	0,1	+	+	+	+
	0,2	+	-	+/-	+/-
	0,3	-	-	+/-	-
	0,4	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
Testemunha		+	+	+	+

* - + = crescimento
 - = inibição
 +/- = crescimento débil

4.3.5. Efeito de alguns antibióticos e fungicidas adicionados ao meio nutriente ágar modificado, no crescimento de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Na Tabela 8, são apresentados os resultados referentes a sensibilidade de quatro isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Feij 26, Feij 27, Feij 29 e

Feij 41) à mistura de antibióticos e fungicidas (cefalexina, nitrofurantoina, ácido nalidixico, benomyl e chlorothalonil), adicionados ao meio de cultura nutriente ágar modificado após a autoclavagem. Verifica-se que os produtos adicionados ao meio de cultura não interferiram significativamente no crescimento dos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Observou-se diferença significativa entre o crescimento dos isolados.

As colônias desenvolvidas em ambos meios de cultura eram circulares, amarelas, convexas, brilhantes de bordo liso e apresentaram hidrólise de amido. Observou-se o não escurecimento dos meios de cultura pelo isolado Feij 26 (variante *fuscans*), indicando a não produção de melanina.

Tabela 8 - Ação de alguns antibióticos e fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente ágar modificado sobre o crescimento de quatro isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Isolados	Número de ufc x 10 ⁷ por ml nos meios		Média de isolados
	Nutriente ágar modificado sem fungicidas e antibióticos	Nutriente ágar modificado com fungicidas e antibióticos	
Feij 26	83,25 A (a)	105,75 A	94,50 c
Feij 27	123,50 A	124,25 A	123,88 b
Feij 29	77,75 A	86,00 A	81,88 c
Feij 41	209,50 A	194,00 A	202,75 a
Média de meios	123,50 A	127,50 A	-
C.V. (%)	8,10		

a - Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, ou de letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Para análise estatística os dados foram transformados em raiz quadrada de x.

4.4. Detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, através de dois métodos de extração

Os resultados referentes ao número de colônias de *X. campestris* pv. *phaseoli* recuperadas das amostras de sementes de feijão, em ufc/ml, através de dois métodos de extração, encontram-se na Tabela 9. Observa-se que o método de extração da bactéria através da trituração das sementes foi significativamente superior ao da maceração, pelo teste t, ao nível de 1 % de probabilidade, recuperando-se em média cem vezes mais bactéria.

As colônias de *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentavam-se circulares, mucóides, brilhantes, amarelas, convexas e com a adição de lugol no meio de cultura constatou-se a hidrólise de amido pela bactéria, conforme ilustra a Figura 4. Em algumas placas de Petri, foi constatada a presença de bactérias saprófitas além da *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Tabela 9 - Recuperação de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão naturalmente infectadas, através de dois métodos de extração.

Amostras	Número de ufc/ml	
	Maceração das sementes	Trituração das sementes
1	8,75 x 10 ³	4,93 x 10 ⁵
2	1,06 x 10 ⁴	1,28 x 10 ⁶
3	7,25 x 10 ³	1,10 x 10 ⁵
4	8,78 x 10 ³	6,18 x 10 ⁵
5	1,69 x 10 ⁴	1,64 x 10 ⁵
6	8,73 x 10 ³	8,60 x 10 ⁵
7	1,21 x 10 ⁵	1,21 x 10 ⁵
8	4,68 x 10 ⁴	1,00 x 10 ⁶
9	3,25 x 10 ³	1,56 x 10 ⁵
10	1,81 x 10 ⁴	1,58 x 10 ⁶
11	2,45 x 10 ³	9,82 x 10 ⁵
12	3,08 x 10 ⁴	5,62 x 10 ⁵
13	1,46 x 10 ⁴	8,60 x 10 ⁵
14	3,54 x 10 ⁴	7,40 x 10 ⁵
15	3,95 x 10 ⁴	1,55 x 10 ⁵
Média	2,49 x 10 ⁴ b (a)	1,00 x 10 ⁵ a

a - Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste t, ao nível de 1 % de probabilidade.

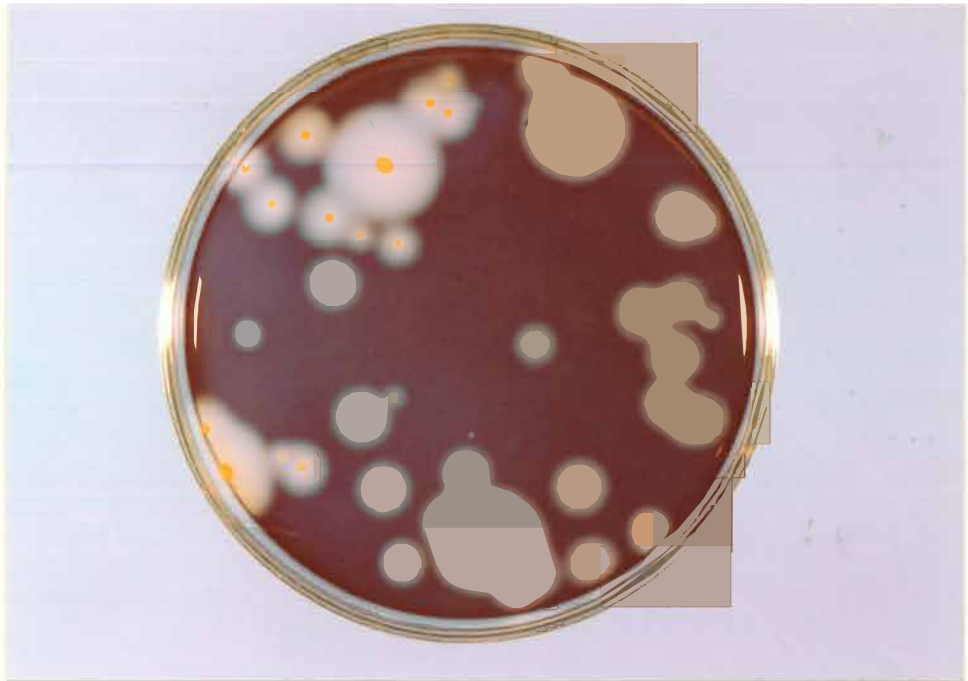


Figura 4 - Características culturais e hidrólise de amido de *X. campestris* pv. *phaseoli*, proveniente de sementes de feijão, no meio de cultura nutriente ágar modificado acrescido de antibióticos e fungicidas.

4.5. Caracterização de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* obtidos de sementes de feijão

Os resultados referentes aos testes de caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica, sorológica e patogênica dos quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, provenientes de sementes de feijão encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Características morfológica, fisiológica, bioquímica, sorológica e patogênica de quinze isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes de sementes de feijão.

Testes	Reação dos isolados ^(*)
Bastonetes gram negativos	+
Crescimento mucóide e colônias amarelas em PSA	+
Aerobiose	+
Hidrólise de amido	+
Hidrólise de Tween 20	+
Proteólise de leite	+
Produção de ácido de:	
arabinose	+
glicose	+
sacarose	+
Reação com os antissorços:	
As-Feij 1	-
As-Feij 20	+
Patogenicidade em feijoeiro 'Rio Negro'	+

* - + = reação positiva
 - = reação negativa

Observou-se que todos os isolados eram bastonetes gram negativos; apresentavam colônias amarelas de aspecto mucóide em meio PSA, aeróbicos; hidrolisaram amido e Tween-20; reação positiva para proteólise de leite; produziram ácido de arabinose, glicose e sacarose, reagiram com o antissoro As-Feij 20 e foram patogênicos à variedade de feijoeiro Rio Negro.

Cultivos posteriores destes isolados em meio de cultura YCA apresentaram o escurecimento do meio de cultura, indicando a produção de melanina que é típica da variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli*.

4.6. Avaliação da resistência de variedades de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* sob condições de campo

4.6.1. Germinação e população de *X. campestris* pv. *phaseoli* nas sementes

A Tabela 11 mostra os resultados referentes à avaliação do poder germinativo das sementes e a população de *X. campestris* pv. *phaseoli* transportada pelas sementes empregadas nos três experimentos. Verificam-se diferenças estatísticas significativas na germinação das sementes empregadas na semeadura das safras das águas de 1988 e da seca de 1990, mas essas diferenças não foram observadas para a safra das águas de 1989. Na

safrã das águas de 1988, as sementes das variedades IAPAR 20, lotes a e b, e Carioca, lotes a e b, e IAPAR 16, lote a, apresentaram os maiores índices de germinação e não diferiram estatisticamente entre si. As variedades Carioca, lote b, e IAPAR 16, lote a, foram semelhantes entre si e comportaram-se como intermediárias, não diferindo da IAPAR 16, lote b, que apresentou o menor índice de germinação (Tabela 11).

Tabela 11 - Avaliação da germinação e da população de *X. campestris* pv. *phaseoli*, em ufc/ml, transportada pelas sementes de três variedades de feijão, de dois lotes, empregadas nas sementeiras dos três experimentos.

Variedades	Lotes	Experimentos					
		Águas de 1988		Águas de 1989		Seca de 1990	
		% germ.	Xp ¹ (ufc/ml)	% germ.	Xp (ufc/ml)	% germ.	Xp (ufc/ml)
Carioca	a	97,00 a(a)	2,93 x 10 ⁶ bc(b)	96,00 a	1,22 x 10 ⁷ a	97,50 a	2,94 x 10 ⁷ c
Carioca	b	90,00 ab	4,38 x 10 ⁶ bc	96,50 a	2,05 x 10 ⁷ a	98,00 a	3,94 x 10 ⁷ bc
IAPAR 16	a	91,00 ab	2,26 x 10 ⁶ c	94,50 a	3,10 x 10 ⁶ b	91,00 b	9,30 x 10 ⁶ c
IAPAR 16	b	83,00 b	4,48 x 10 ⁶ c	90,50 a	7,46 x 10 ⁶ b	95,00 ab	2,52 x 10 ⁶ c
IAPAR 20	a	94,50 a	7,79 x 10 ⁶ b	90,50 a	2,27 x 10 ⁷ a	98,50 a	1,18 x 10 ⁶ b
IAPAR 20	b	94,50 a	4,60 x 10 ⁷ a	93,00 a	3,61 x 10 ⁷ a	97,00 ab	4,63 x 10 ⁶ a
.C.V. (%)		6,43	43,17	5,80	41,83	2,88	37,46

1 - *X. campestris* pv. *phaseoli*

a - Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatísticas os dados foram transformados em arc seno da raiz quadrada de x (a) ou raiz quadrada de x (b).

As sementes empregadas na sementeira da safra da seca de 1990, das variedades Carioca, lotes a e b, IAPAR 16, lote b, e IAPAR 20, lotes a e b, apresenta-

ram os maiores índices de germinação e não diferiram estatisticamente entre si. O menor índice de germinação foi constatado nas sementes da IAPAR 16, lote a, qual diferiu estatisticamente da Carioca, lotes a e b, e da IAPAR 20, lote a (Tabela 11).

Com relação ao transporte de *X. campestris* pv. *phaseoli* pelas sementes, verificam-se diferenças entre as variedades e lotes empregados nos diferentes experimentos (Tabela 11).

Constatou-se nas sementes empregadas na semeadura da safra das águas de 1988 da variedade IAPAR 20, lote b, uma maior população bacteriana, sendo esta estatisticamente diferente das demais variedades e lotes. Já, a variedade Carioca, lotes a e b, apresentou-se intermediária no transporte da *X. campestris* pv. *phaseoli*, não diferindo da variedade IAPAR 20, lote a, a qual apresentou o segundo maior número de bactérias, e nem da IAPAR 16, lotes a e b, que apresentou o menor transporte de bactérias nas sementes (Tabela 11).

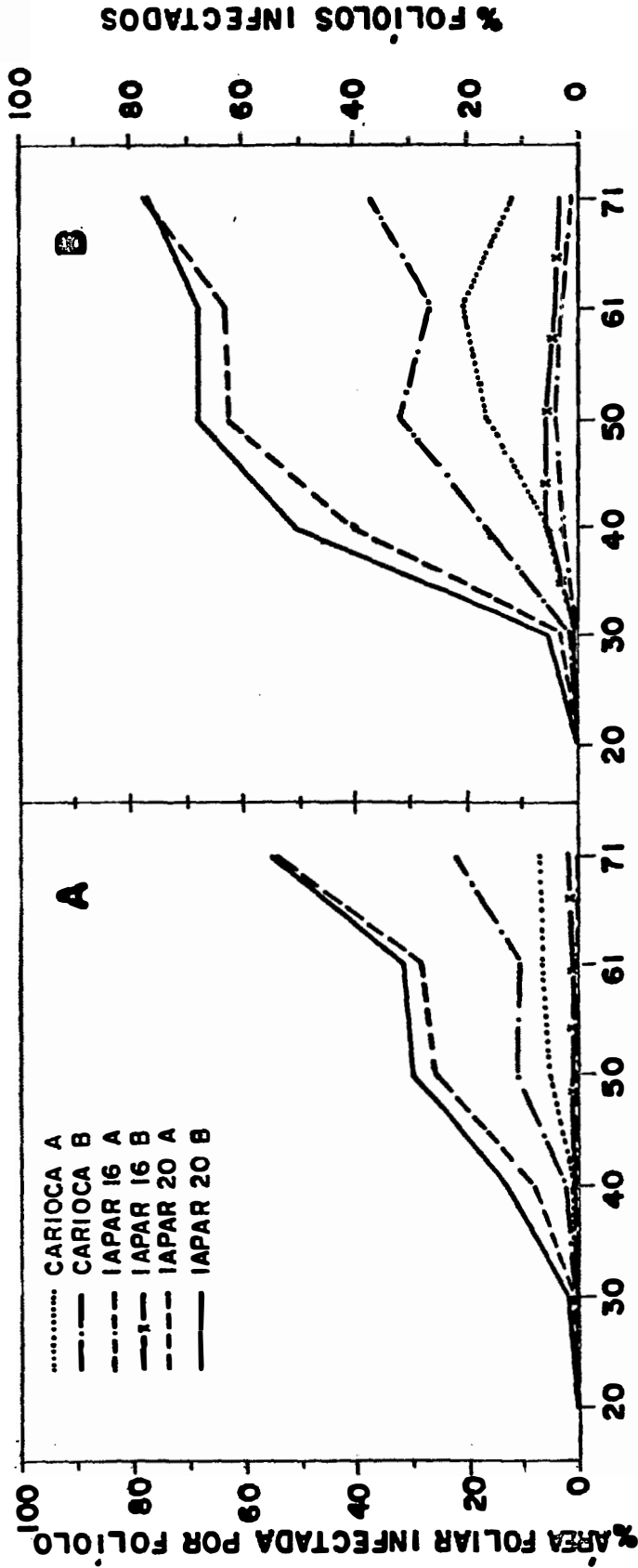
Verifica-se para a safra das águas de 1989, independente dos lotes de sementes, que as variedades IAPAR 20 e Carioca foram as que transportaram as maiores populações de *X. campestris* pv. *phaseoli* sendo que estas variedades não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram da IAPAR 16 que apresentou o menor transporte da bactéria (Tabela 11).

As sementes, empregadas na semeadura da safra da seca de 1990, apresentaram diferenças significativas entre as variedades e os lotes no transporte da *X. campestris* pv. *phaseoli*. As maiores populações bacterianas foram detectadas nos lotes a e b, da variedade IAPAR 20, sendo o valor do lote b estatisticamente diferente dos demais. Entre aqueles que apresentaram os menores valores no transporte da bactéria, está a variedade IAPAR 16, lotes a e b, sendo estatisticamente semelhante a variedade Carioca, lotes a e b. Entretanto, a população bacteriana transportada pelos lotes de sementes da variedade Carioca foi superior à IAPAR 16 e inferior à IAPAR 20 (Tabela 11).

4.6.2. Quantificação da resistência de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* sob condições de campo

As Figuras 5, 6 e 7 ilustram o desenvolvimento do crestamento bacteriano comum do feijoeiro quantificado através da severidade e da incidência da doença nas variedades Carioca, IAPAR 16 e IAPAR 20, provenientes de dois lotes de sementes (a e b), respectivamente, para as safras das águas de 1988 e 1989 e safra da seca de 1990.

As Tabelas 12, 13 e 14 evidenciam os resultados da taxa aparente de infecção (r) e inóculo



DIAS APÓS A EMERGÊNCIA

Figura 5 - Curvas do progresso da epidemia causada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safra das águas de 1988. São Manuel, SP.

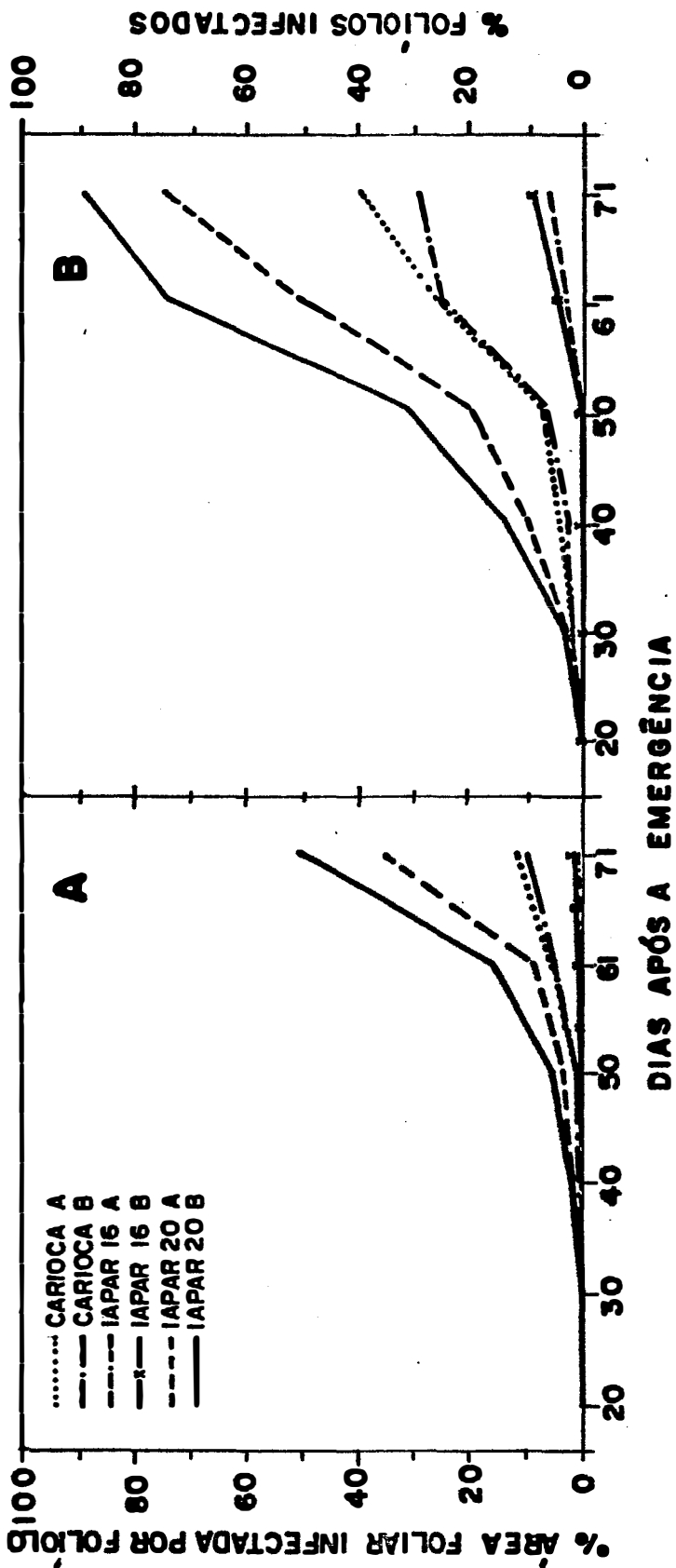


Figura 6 - Curvas do progresso da epidemia causada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safra das águas de 1989. São Manuel, SP.

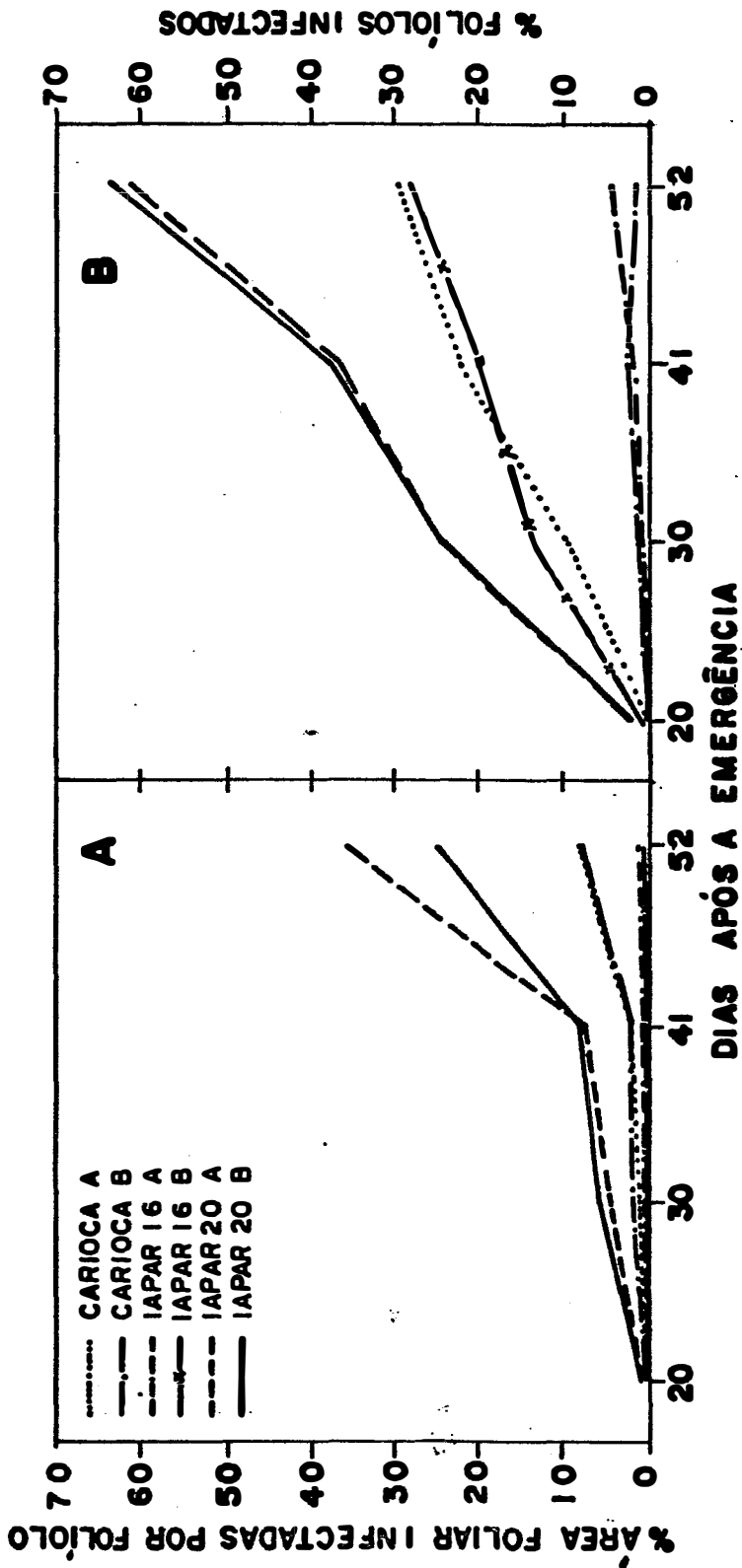


Figura 7 - Curvas do progresso da epidemia causada por *X. campestris* pv. *phaseoli*, em três variedades de feijoeiro, em dois lotes de sementes (A e B), determinadas pela severidade (A) e incidência (B) de folíolos doentes. Safrã da seca de 1990. São Manuel, SP.

inicial (xo), para os dois sistemas de avaliação da doença (incidência e severidade) e a porcentagem de vagens doentes, respectivamente, para as três safras agrícolas.

Com relação ao sistema de avaliação da doença através da severidade, nos três ensaios, verifica-se que os menores valores de r foram obtidos para a variedade IAPAR 16, para ambos os lotes de sementes (Tabelas 12, 13 e 14). Nas safras das águas de 1988 e 1989 a variedade IAPAR 16 diferiu significativamente das variedades Carioca e IAPAR 20 as quais apresentaram os maiores valores de r, independente dos lotes de sementes (Tabelas 12 e 13). Já, na safra da seca de 1990, também os menores valores de r foram observados para a variedade IAPAR 16, porém esses valores não diferiram significativamente das variedades Carioca e IAPAR 20, ambas do lote b.

Para o sistema de avaliação através da incidência de folíolos doentes, os menores valores de r foram constatados na variedade IAPAR 16, nas safras das águas de 1988 e 1989 (Tabelas 12 e 13), porém, esses valores não diferiram significativamente entre as variedades e lotes de sementes na safra das águas de 1988, mas diferiram da variedade IAPAR 20, lotes a e b, na safra das águas de 1989. A variedade Carioca portou-se intermediária, na safra das águas de 1989, não diferindo significativamente das variedades IAPAR 16 e IAPAR 20. Na safra da seca de 1990, o menor valor de r foi observado

para a variedade IAPAR 16, lote b, o qual diferiu significativamente apenas da variedade Carioca, lote a, e as demais variedades e lotes de sementes comportaram-se intermediários não diferindo significativamente das variedades IAPAR 16, lote b, e Carioca, lote a (Tabela 14).

Os valores de xo obtidos para ambos sistemas de avaliação da doença não diferiram significativamente entre si, para todas variedades e lotes de sementes, nas safras das águas de 1988 e 1989 (Tabelas 12 e 13). Entretanto, na safra da seca de 1990 houve diferença no comportamento das variedades. Os menores valores de xo foram observados para a variedade Carioca, lote a, para os dois sistemas de avaliação da doença, e para a IAPAR 16, lote b, quando foi empregado o sistema de avaliação através da incidência de folíolos doentes. Para o sistema de avaliação através da severidade a variedade Carioca, lote a, diferiu significativamente da variedade IAPAR 20, lote b, e as demais variedades e lotes foram intermediárias não diferindo dessas duas variedades (Tabela 14). No sistema de avaliação através da incidência de folíolos doentes as variedades Carioca e IAPAR 16, ambas do lote a, diferiram significativamente apenas da variedade IAPAR 20, lote b, e as demais variedades e lotes de sementes comportaram-se intermediários (Tabela 14).

Tabela 12 - Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x0) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do cretamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes. Safra das águas de 1988, São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Porcentagem de vagens doentes (a)	Severidade		Incidência	
			r	x0	r	x0
Carioca	a	13,12 b (b)	0,1355 ab	-11,3992 a	0,1280 a	-9,6672 a
Carioca	b	18,25 b	0,1502 a	-11,1663 a	0,1433 a	-9,4644 a
IAPAR 16	a	26,44 b	0,0669 c	-9,7508 a	0,0917 a	-9,7542 a
IAPAR 16	b	28,32 b	0,0714 bc	-9,5019 a	0,0892 a	-8,8003 a
IAPAR 20	a	59,86 a	0,1665 a	-10,6569 a	0,1665 a	-9,1625 a
IAPAR 20	b	52,51 a	0,1492 a	-9,4402 a	0,1501 a	-8,0243 a
.C.V. (%)		15,61	24,05	13,99	35,52	26,85

b - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Para análise estatísticas os dados de (a) foram transformados em arc seno da raiz quadrada de $x/100$.

Tabela 13 - Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x0) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do cretamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes. Safra das águas de 1989, São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Porcentagem de vagens doentes (a)	Severidade		Incidência	
			r	x0	r	x0
Carioca	a	12,23 cd (b)	0,1289 abc	-11,4020 a	0,1589 ab	-11,3955 a
Carioca	b	16,43 bc	0,1333 ab	-11,8496 a	0,1582 ab	-11,6240 a
IAPAR 16	a	3,99 d	0,0791 c	-11,4000 a	0,1042 b	-11,3720 a
IAPAR 16	b	4,40 d	0,0839 bc	-11,7336 a	0,1312 b	-12,9864 a
IAPAR 20	a	34,36 a	0,1610 a	-12,3805 a	0,1998 a	-12,5946 a
IAPAR 20	b	30,46 ab	0,1600 a	-11,2755 a	0,1974 a	-11,0575 a
.C.V. (%)		21,52	17,38	12,21	25,00	19,84

b - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Para análise estatísticas os dados de (a) foram transformados em arc seno da raiz quadrada de $x/100$.

Tabela 14 - Porcentagem de vagens doentes, taxa aparente de infecção (r) e inóculo inicial (x₀) para os sistemas de avaliação através da severidade e incidência do crestamento bacteriano comum em folíolos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes. Safra da seca de 1990, São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Porcentagem de vagens doentes (a)	Severidade		Incidência	
			r	x ₀	r	x ₀
Carioca	a	29,62 a (b)	0,1966 a	-12,6452 b	0,2550 a	-12,9859 b
Carioca	b	29,90 a	0,1427 ab	-9,8251 ab	0,1711 ab	-9,0097 ab
IAPAR 16	a	6,46 b	0,0964 ab	-11,1443 ab	0,1612 ab	-12,2601 b
IAPAR 16	b	5,25 b	0,0456 b	-9,6443 ab	0,0738 b	-9,2521 ab
IAPAR 20	a	36,02 a	0,1706 a	-9,3943 ab	0,1657 ab	-7,5422 ab
IAPAR 20	b	49,41 a	0,1272 ab	-7,6180 a	0,1286 ab	-5,8491 a
C.V. (%)		19,55	39,75	19,60	47,41	28,91

b - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Para análise estatísticas os dados de (a) foram transformados em arc seno da raiz quadrada de x/100.

Quanto à incidência em vagens, verifica-se, na safra das águas de 1988, que a variedade IAPAR 20 apresentou a maior porcentagem de vagens doentes, diferindo estatisticamente das variedades Carioca e IAPAR 16 (Tabela 12). Na safra das águas de 1989 (Tabela 13) observa-se o comportamento distinto entre as variedades, sendo que a IAPAR 20 apresentou a maior incidência de vagens doentes, seguida da Carioca, incidência intermediária, sendo a menor incidência constatada para a variedade IAPAR 16 (Tabela 13). Já, na safra das secas de 1990, constatou-se um comportamento semelhante entre as variedades IAPAR 20 e Carioca, as quais não diferiram estatisticamente entre si, mas sim da variedade IAPAR 16 que apresentou a menor incidência de vagens doentes

(Tabela 14). Não foi constatado, nos três experimentos, diferença estatística significativa entre os lotes de cada uma das variedades de feijoeiro ensaiadas (Tabelas 12, 13 e 14).

Com relação aos sistemas de avaliação da doença, a Tabela 15 mostra os valores dos coeficientes de determinação obtidos para as regressões lineares da transformação logistida dos dados originais, referentes à severidade e à incidência de folíolos de feijoeiro com crestamento bacteriano comum. Observa-se que os maiores valores dos coeficientes de determinação foram obtidos para os dados de severidade das três variedades de feijoeiro, nas três safras agrícolas. Fez-se exceção, apenas a variedade IAPAR 16 que na safra das águas de 1989 apresentou um maior valor do coeficiente de determinação para os dados da incidência do que da severidade da doença.

Tabela 15 - Valores dos coeficientes de determinação da reta obtidos para os métodos de avaliação através da severidade e incidência de folíolos de feijoeiro com crestamento bacteriano comum, utilizando-se a transformação logística dos dados, para três variedades de feijoeiro, em três safras agrícolas.

Variedades	Águas de 1988		Águas de 1989		Seca de 1990	
	Severidade	Incidência	Severidade	Incidência	Severidade	Incidência
Carioca	0,8932 (a)	0,7111	0,9552	0,9546	0,9319	0,8103
IAPAR 16	0,6333	0,5190	0,8423	0,8659	0,8556	0,6842
IAPAR 20	0,8601	0,7916	0,9845	0,9500	0,9033	0,8556

a - Valor da média das repetições de dois lotes de sementes.

4.6.3. Parâmetros agronômicos observados

Nas Tabelas 16, 17 e 18 são apresentados os resultados referentes às avaliações efetuadas, respectivamente, nas safras das águas de 1988 e 1989 e da seca de 1990.

Com relação ao número de vagens por planta não foi observada diferença estatística significativa entre as variedades nos três experimentos (Tabelas 16, 17 e 18). Já, para o número de sementes por vagem, a variedade IAPAR 20, lote b, produziu menor número de sementes e foi significativamente diferente da variedade IAPAR 16, lote b, que produziu maior número de sementes por vagem na safra das águas de 1988. Entretanto, as demais variedades situaram-se intermediárias e não diferiram entre si (Tabela 16). Porém, nos experimentos das safras subsequentes (Tabelas 17 e 18) não foram acusadas diferenças estatísticas significativas entre as variedades e lotes de sementes quanto ao número de sementes produzidas por vagem.

O peso de mil sementes foi variável entre as variedades de feijoeiro nos diferentes experimentos. Na safra das águas de 1988 (Tabela 16) e da seca de 1990 (Tabela 18), as variedades Carioca e IAPAR 16 foram as que apresentaram os maiores pesos de sementes e diferiram significativamente da IAPAR 20. Na safra das águas de 1989 (Tabela 17) houve diferença significa-

Tabela 16 - Avaliação de alguns parâmetros agrônômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra das águas de 1988. São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Número de vagens por planta	Número de sementes por vagem	Peso de mil sementes (g)	Produção da parcela (g).
Carioca	a	12,80 a (a)	4,52 ab (a)	225,25 a	1312,50 ab
Carioca	b	13,76 a	4,71 ab	222,50 a	1210,00 ab
IAPAR 16	a	14,80 a	4,72 ab	240,00 a	1507,50 a
IAPAR 16	b	15,38 a	4,92 a	229,50 a	1537,50 a
IAPAR 20	a	16,98 a	4,45 ab	172,00 b	1145,00 ab
IAPAR 20	b	12,79 a	4,11 b	164,00 b	905,00 b
C.V. (%)		10,72	3,63	5,09	17,78

a - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatística os dados de (a) foram transformados em raiz quadrada de x.

tiva no peso de mil sementes entre as variedades. A variedade IAPAR 16, lotes a e b, e a Carioca, lote a, foram as que apresentaram sementes mais pesadas e diferiram significativamente da IAPAR 20, lotes a e b, que apresentou o menor peso. A variedade Carioca, lote b, exibiu um valor intermediário não diferindo da Carioca, lote a, e da IAPAR 16, lotes a e b, mas diferiu da IAPAR 20.

Com relação à produção, verifica-se diferença entre as variedades na safra das águas de 1988 e da seca de 1990 (Tabelas 16 e 18). Na safra das águas de 1988, a variedade IAPAR 16, lotes a e b, apresentou maior produção e diferiu da variedade IAPAR 20, lote b. Já, as variedades Carioca, lotes a e b, e IAPAR 20, lote a,

Tabela 17 - Avaliação de alguns parâmetros agrônômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra das águas de 1989. São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Húmero de vagens por planta	Húmero de sementes por vagem	Peso de mil sementes (g)	Produção da parcela (g)
Carioca	a	14,78 a (a)	5,57 a (a)	262,50 a	1910,00 ab
Carioca	b	14,58 a	5,18 a	256,13 b	1775,00 ab
IAPAR 16	a	14,35 a	5,56 a	285,88 a	1992,50 ab
IAPAR 16	b	16,80 a	5,55 a	280,63 ab	2215,00 a
IAPAR 20	a	16,65 a	5,43 a	197,50 c	1767,50 ab
IAPAR 20	b	17,33 a	5,25 a	189,50 c	1582,50 b
.C.V. (%)		11,15	3,39	5,07	12,92

a - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatística os dados de (a) foram transformados em raiz quadrada de x.

Tabela 18 - Avaliação de alguns parâmetros agrônômicos de três variedades de feijoeiro, de dois lotes de sementes, obtidos na safra da seca de 1990. São Manuel, SP.

Variedades	Lotes	Húmero de vagens por planta	Húmero de sementes por vagem	Peso de mil sementes (g)	Produção da parcela (g)
Carioca	a	5,70 a (a)	4,98 a (a)	205,00 a	955,00 a
Carioca	b	6,70 a	4,83 a	198,50 a	950,00 a
IAPAR 16	a	5,35 a	5,48 a	213,50 a	1015,00 a
IAPAR 16	b	6,33 a	5,03 a	214,38 a	925,00 a
IAPAR 20	a	7,39 a	5,07 a	148,50 b	835,00 a
IAPAR 20	b	8,33 a	5,55 a	150,88 b	900,00 a
.C.V. (%)		11,33	4,91	10,41	22,79

a - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatística os dados de (a) foram transformados em raiz quadrada de x.

apresentaram-se intermediárias e não diferiram das variedades mais produtivas (Tabela 16).

Na safra das águas de 1989, a variedade IAPAR 16, lote b, foi a mais produtiva e diferiu estatisticamente apenas da variedade IAPAR 20, lote b. As variedades Carioca, lotes a e b, IAPAR 16, lote a, e IAPAR 20, lote a, apresentaram-se intermediárias (Tabela 17). Na safra da seca de 1990, não foi evidenciada diferença significativa na produção das variedades ensaiadas (Tabela 18).

5. DISCUSSÃO

5.1. Variabilidade sorológica de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Apesar da controvérsia existente sobre a variabilidade sorológica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, no presente trabalho, ficou evidenciada claramente esta variação, quando se empregou a técnica de dupla difusão em gel-de-ágar (Tabela 3). Desta forma, o antissoro obtido para *X. campestris* pv. *phaseoli* reagiu apenas com os antígenos homólogos e não com os heterólogos da variante *fuscans*, vindo a confirmar os resultados anteriormente obtidos por OLEAS-ARIAS (1982) e não aqueles de VALARINI (1990). Já, o antissoro obtido para a variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli* apresentou especificidade de reação e reagiu apenas com os antígenos homólogos, concordando com os resultados de VALARINI

(1990), com exceção dos isolados Feij 5 e Feij 22 que não apresentaram reação.

A ausência de reação no teste de dupla difusão em gel-de-ágar vem confirmar a especificidade dos antissoros e também a presença de sorogrupos diferentes entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* ou da variante *fuscans*. AFANADOR & VICTORIA (1981) observaram a reação sorológica negativa, em dupla difusão em gel-de-ágar, para dois isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, porém esses autores não relataram para qual tipo de *X. campestris* pv. *phaseoli* o antissoros foi obtido. Desta forma, não dá para saber se essa variação foi devida ao tipo de antissoros ou se esses isolados formavam um sorogrupo distinto, conforme constatado no presente trabalho. Já, KHALIF & VENETTE (1987) obtiveram diferenças sorológicas distintas entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* provenientes de folhas e de sementes de feijoeiro, sendo que esses formavam quatro sorogrupos diferentes. Provavelmente, esta diferença seja devido à especificidade do antissoros, conforme verificado na presente pesquisa e por OLEAS-ARIAS (1982), e não quanto à origem dos isolados. Em Cuba, DIAS & NOLIMOVA (1987), empregando a técnica de aglutinação, relataram a presença de três sorogrupos entre os isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* e essas diferenças estavam relacionadas com o local de origem dos isolados e não com a produção de melanina em meio de cultura. Os resultados de DIAS & NOLIMOVA (1987)

sugerem a existência de sorogrupos distintos de *X. campestris* pv. *phaseoli*, conforme a região de origem dos isolados. Porém, esses resultados são discordantes daqueles da literatura, uma vez que a técnica de aglutinação ou de microprecipitina apresenta reacções inespecíficas entre os antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e da variante *fuscans* com os respectivos antígenos heterólogos (EROLD & BRAUN, 1947a; b; VALARINI, 1990).

O conhecimento da variabilidade sorológica entre isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* corrobora a fidedignidade dos testes sorológicos empregados na identificação de isolados bacterianos, bem como no seu emprego em testes de detecção da bactéria em sementes de feijão.

Embora TRUJILLO & SAETTLER (1979a;b) e VELAZQUES & TRUJILLO (1984) tenham obtido sucesso em empregar o teste sorológico de dupla difusão em gel-de-ágar, com a finalidade de detectar a *X. campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, resultados errôneos poderão ser encontrados, mesmo utilizando os dois tipos diferentes de antissoros, uma vez que houve isolados da variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli* que não reagiram com nenhum dos antissoros, conforme constatado na presente pesquisa.

5.2. Meio de cultura semi-seletivo para o isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão

O desenvolvimento e/ou adaptação de meios de cultura semi-seletivos é de fundamental importância para o monitoramento de bactérias fitopatogênicas em estudos de ecologia. É de interesse a existência de um meio de cultura que iniba a maior parte dos microrganismos saprófitas, sejam fungos ou bactérias, e não interfira no crescimento da bactéria alvo e que seja relativamente de baixo custo e fácil confecção.

Os experimentos aqui conduzidos demonstraram que a associação do ácido nalidixico e nitrofurantoina, nas concentrações indicadas por VELASQUEZ & TRUJILLO (1984), não inibiu por completo todos os isolados de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijão (Tabela 4) e também essa mistura associada a 0,05 µg/ml de gentamicina (Tabela 5), conforme a indicação de TRUJILLO & SATTLER (1979a; b; 1980), não apresentou efeito inibitório a essas bactérias saprófitas. Algumas bactérias saprófitas foram sensíveis à concentração de 30 µg/ml de cefalexina (Tabela 4) enquanto que outras foram insensíveis às concentrações de 50 e 100 µg/ml desse antibiótico (Tabela 5). Normalmente, a cefalexina, associada ou não a outros antibióticos, faz parte de meios de cultura semi-seletivos visando o isolamento de fitobactérias de sementes como *X.*

campestris pv. *campestris* (SCHAAD, 1989), *X. campestris* pv. *phaseoli* (CLAFLIN et al., 1987), *X. campestris* pv. *translucens* (SCHAAD & FORSTER, 1985), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (GITAITIS et al., 1991; SIJAM et al., 1991) e *P. syringae* pv. *syringae* (MOHAN & SCHAAD, 1985). MOHAN & SCHAAD (1985) obtiveram sucesso na inibição de bactérias saprófitas associadas a sementes de feijão quando utilizaram 80 µg/ml de cefalexina, no meio de cultura por eles desenvolvido, visando o isolamento de *P. syringae* pv. *syringae*. Porém, os resultados aqui obtidos para a cefalexina não foram tão promissores quanto aqueles verificados por MOHAN & SCHAAD (1985).

Foi observada elevada sensibilidade das bactérias saprófitas à concentração de 2 µg/ml de gentamicina e a 1 µg/ml de garamicina (Tabela 6). Entretanto, esses antibióticos foram inibitórios a isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* nessas concentrações. A concentração de 0,2 µg/ml de gentamicina ou de garamicina inibiu o crescimento de bactérias saprófitas e também afetou o crescimento da *X. campestris* pv. *phaseoli* (Tabela 7).

TRUJILLO & SAETTLER (1979a; b; 1980) recomendaram o uso de 0,05 µg/ml, MAGABALA & SAETTLER (1992) a concentração de 0,5 µg/ml e CLAFLIN et al. (1987) a concentração de 2 µg/ml de gentamicina associada a outros antibióticos, nos meios de cultura semi-seletivos por eles desenvolvidos, para o isolamento de *X. campestris* pv.

phaseoli. Contudo, nos estudos aqui desenvolvidos, a gentamicina, quando empregada em concentrações mais baixas que aquelas indicadas por CLAFLIN et al. (1987) e MAGABALA & SAETTLER (1992), mostrou-se inibitória aos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* aqui ensaiados indicando a impossibilidade de seu uso em meios de cultura semi-seletivos para o isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão. CLAFLIN et al. (1987) já tinham comentado a alta sensibilidade de isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* à gentamicina, e a concentração de 4 µg/ml inibiu o crescimento dos isolados por eles testados. MAGABALA & SAETTLER (1992) também comentaram que altas concentrações de gentamicina inibiram o crescimento de *X. campestris* pv. *phaseoli*, tendo por isso, empregado a concentração de 0,5 µg/ml.

Entretanto, a substituição da gentamicina por cefalexina, a 30 µg/ml, associada a 1 µg/ml de ácido nalidíxico e a 2 µg/ml de nitrofurantoina inibiu 62,50 % dos isolados de bactérias saprófitas oriundas de sementes de feijão (Tabela 4) e também não afetou o crescimento dos isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*, quando essa mistura de antibióticos foi adicionada ao meio de cultura semi-seletivo aqui desenvolvido (nutriente ágar modificado acrescido de antibióticos e fungicidas) junto com os fungicidas benomyl, a 20 µg/ml, e chlorothalonil, a 20 µg/ml (Tabela 8).

O uso do fungicida chlorothalonil, a 15 µg/ml, foi indicado por CLAFLIN et al. (1987) sendo um dos componentes do meio semi-seletivo MXP. MARINGONI & KUROZAWA (1987) verificaram a ação inibitória desse fungicida, em diferentes concentrações, a vários fungos, mas não à *X. campestris* pv. *vesicatoria* e propuseram o uso desse fungicida em vez de ciclohexamida (McGUIRE et al., 1986; GITAITIS et al., 1991; SIJAM et al., 1991) em meios de cultura semi-seletivos para o isolamento dessa bactéria.

As sementes de feijão normalmente transportam inúmeros fungos e um simples tratamento com fungicidas pode erradicar ou reduzir consideravelmente a flora fúngica. Com esse intuito, ELLIS et al. (1976) verificaram a redução e/ou a erradicação dos fungos *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Macrophomina phaseoli*, *Colletrotichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* quando as sementes de feijão foram tratadas, separadamente, com os fungicidas captan, thiram e benomyl.

Estudos realizados por SHARMA & SOHI (1981) e MARINGONI et al. (1992b) evidenciaram que o fungicida benomyl, respectivamente, nas concentrações de 100 e 10 µg/ml, *in vitro*, inibiu o crescimento micelial de *R. solani*, mas o chlorothalonil, a 100 µg/ml, não inibiu o crescimento micelial desse fungo (SHARMA & SOHI, 1981).

Visto que o chlorothalonil não inibiu o crescimento micelial de *R. solani*, *in vitro*, utilizou-se a mistura dos fungicidas chlorothalonil + benomyl, nas

concentrações de 20 µg/ml + 20 µg/ml, conforme MARINGONI (1990), como alternativa a ciclohexamida (TRUJILLO & SAETTLER, 1979a; 1980; VELASQUES & TRUJILLO, 1984; MAGABALA & SAETTLER, 1992) para o meio de cultura semi-seletivo aqui desenvolvido.

5.3. Métodos de extração da *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão e caracterização dos isolados bacterianos

Através da metodologia adaptada de VAN VUURDE et al. (1983) e RAT (1987), foi possível recuperar substancialmente a *X. campestris* pv. *phaseoli* das amostras das sementes analisadas (Tabela 9), embora tenha sido realizada a desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio. Esse tratamento tem a finalidade de erradicar ou diminuir, o máximo possível, a população de microrganismos saprófitas existentes nas sementes, que interferem consideravelmente no isolamento da *X. campestris* pv. *phaseoli* ou de outras fitobactérias associadas às sementes de feijão em meio de cultura (WHARTON, 1967; TAYLOR, 1970; EDNIE & NEEDHAN, 1973). Porém, mesmo com a desinfestação das sementes, foi possível observar a presença de algumas colônias de bactérias saprófitas no meio de cultura semi-seletivo desenvolvido. Este resultado já era previsível, uma vez que a mistura dos antibióticos cefalexina, ácido nalidixico e nitrofurantonina não inibiu todos os isolados

de bactérias saprófitas provenientes de sementes de feijão (Tabela 4).

Embora algumas metodologias utilizadas para a detecção de fitobactérias em sementes de feijão não empreguem a trituração das sementes (VAN VUURDE et al., 1983; RAT, 1987; VALARINI; 1990), os resultados aqui obtidos indicam que este procedimento permitiu extrair 10^2 ufc/ml de *X. campestris* pv. *phaseoli* a mais em relação às amostras não trituradas (Tabela 9). Desta maneira, verifica-se a necessidade de se triturar as sementes de feijão para a extração da referida bactéria, em testes de sanidade, uma vez que ela, além de ficar aderida na superfície da semente (WELLER & SAETTLER, 1980b), coloniza internamente (BURKHOLDER, 1921).

As colônias de *X. campestris* pv. *phaseoli* recuperadas das sementes e desenvolvidas no meio de cultura semi-seletivo desenvolvido, apresentavam as características típicas do gênero *Xanthomonas* (DYE, 1980), porém não foi observado o escurecimento do meio de cultura, que é característico da variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli*. A não formação desse pigmento nesse meio de cultura pode ser explicado pela presença da sacarose, pois quando essa fonte de carbono está presente os isolados da variante *fuscans* não produzem melanina (BASU & WALLEN, 1966).

A fidelidade da recuperação da *X. campestris* pv. *phaseoli* das sementes de feijão foi

confirmada através dos testes empregados para a caracterização dos isolados (Tabela 10). Embora não tenham sido realizados todos os testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos recomendados por DYE (1980), foi possível enquadrar os isolados no gênero *Xanthomonas* e na espécie *campestris*. Quanto à produção de ácidos a partir de determinados carboidratos, DYE (1980) comenta que a espécie *campestris* o produz a partir de arabinose, glicose e mannose. Já, MOFFETT & CROFT (1983) referem a produção a partir de arabinose, cellobiose e trehalose. BASU & WALLEN (1966), ao caracterizarem isolados da variante *fuscans* de *X. campestris* pv. *phaseoli*, observaram que os isolados produziram ácido a partir dos carboidratos listados por DYE (1980) e MOFFETT & CROFT (1983) e de muitos outros, entre eles a sacarose. Para os carboidratos ensaiados observou-se a produção de ácido de arabinose, concordando com BASU & WALLEN (1966), DYE (1980) e MOFFETT & CROFT (1983); de glicose, confirmando os resultados de BASU & WALLEN (1966) e DYE (1980); e de sacarose, concordando os resultados de BASU & WALLEN (1966). A não detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli*, nas amostras de sementes analisadas, indica que apenas a variante *fuscans* estava infectando as sementes, mas isto não descarta a possibilidade da detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* de outras amostras de sementes.

5.4. Resistência de variedades de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* sob condições de campo

Alguns trabalhos têm evidenciado o efeito negativo da presença da *X. campestris* pv. *phaseoli* nas sementes de feijão sobre a germinação. ALVAREZ et al. (1979) relataram uma tendência na queda de germinação das sementes de feijão a medida que se aumentava a incidência de *X. campestris* pv. *phaseoli*. WELLER & SAETTLER (1980b) constataram que sementes parcialmente manchadas ou enrugadas apresentavam baixa germinação e deram origem a plantas deformadas, sendo que esses fatos não foram observados naquelas sementes que exibiam apenas descoloração no hilo. Já, VALARINI (1990), sob condições de inoculação artificial de sementes ou em sementes naturalmente infectadas da variedade de feijão Rio Tibagi, observou redução significativa da germinação. Os resultados aqui observados para as sementes empregadas nas semeaduras das diferentes safras apresentaram índices razoáveis de germinação, independente da presença da *X. campestris* pv. *phaseoli* (Tabela 11). Em alguns casos, foi observado elevado índice de germinação das sementes e alta população da *X. campestris* pv. *phaseoli* e, em outros casos, índices mais baixos de germinação na presença de baixa população de *X. campestris* pv. *phaseoli* (Tabela 11).

Provavelmente, tenha ocorrido, durante o processo de limpeza das sementes (abanação e peneiramento),

a eliminação daquelas que eram mal formadas, leves, pequenas e infectadas, sendo retidas na peneira apenas as sementes mais pesadas e maiores. Possivelmente, essas sementes menores e mal formadas não germinariam e levariam a um menor índice de germinação da amostra.

A resistência do feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* apresenta um efeito marcante no aspecto da semente e na colonização da bactéria. MARINGONI et al. (1992a), sob condições de inoculação artificial de vagem, verificaram que variedades de feijoeiro suscetíveis (Carioca e Rio Negro) à *X. campestris* pv. *phaseoli* deram origem a maior quantidade de sementes mal formadas e visualmente infectadas pela *X. campestris* pv. *phaseoli* em relação as variedades IAPAR 14, IAPAR 16 e G.N. Nebraska # 1 sel. 27, que foram mais resistentes.

Através da análise epidemiológica do desenvolvimento da doença nos folíolos, constataram-se os menores valores da taxa aparente de infecção (r) para a variedade IAPAR 16 e os maiores valores de r nas variedades IAPAR 20 e Carioca que foram mais suscetíveis à *X. campestris* pv. *phaseoli* nos experimentos aqui conduzidos (Tabelas 12, 13, 14). O tipo de resistência presente na variedade IAPAR 16 é do tipo horizontal (VAN DER PLANK, 1963; NELSON, 1978; VAN DER PLANK, 1984).

Esses resultados de campo vem confirmar a resistência da variedade IAPAR 16 e a suscetibilidade da variedade Carioca à *X. campestris* pv. *phaseoli*, quando

avaliadas sob condições de casa de vegetação (OLEAS-ARIAS, 1982; FREGONESE & MARINGONI, 1991; MARINGONI et al., 1992a).

Com relação ao sistema de avaliação do CBCF em campo, verificou-se que a severidade foi parâmetro que melhor se adequou em discriminar os valores de r para as três variedades de feijoeiro ensaiadas, nas três safras agrícolas (Tabelas 12, 13 e 14), além do que esse sistema de avaliação propiciou os maiores valores dos coeficientes de determinação da reta (Tabela 15).

Com base nos maiores valores dos coeficientes de determinação da reta, BERGAMIN FILHO (1983) e BERGAMIN FILHO et al. (1990) constataram que o melhor método de quantificação da ferrugem em cafeeiro, na fase ascendente da curva da epidemia, foi pústula por folha. Por outro lado, SALGADO (1983) e BERGAMIN FILHO et al. (1990) determinaram que o melhor método de avaliação na fase descendente da curva da epidemia da ferrugem do cafeeiro foi porcentagem de folhas infectadas.

Alguns trabalhos têm demonstrado a ineficácia da avaliação através da incidência de folhas doentes para a mensuração de doenças fúngicas em alguns patossistemas como: feijão - *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. (MENTEN, 1980), cana de açúcar - *Puccinia melanocephala* Sidow (AMORIN & BERGAMIN FILHO, 1991) e tomateiro - *Septoria lycopersici* Speg. (MORETTO & BARRETO, 1993). Segundo HORSFALL & COLLING (1978), o parâmetro

severidade está mais relacionado à produtividade do que a incidência e, conseqüentemente, às perdas causadas por doenças em plantas.

A respeito da resistência das vagens de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli*, verificou-se que a variedade IAPAR 16 apresentou um maior nível de resistência que as variedades Carioca e IAPAR 20 visto, principalmente, pela baixa incidência de vagens doentes nas safras das águas de 1989 e da seca de 1990 (Tabelas 13 e 14). Já, a variedade Carioca apresentou-se intermediária na suscetibilidade e a variedade IAPAR 20 foi a mais suscetível, nas três safras agrícolas, com os maiores níveis de infecção (Tabeas 12, 13 e 14). Segundo os estudos conduzidos por VALLADARES-SANCHEZ et al. (1983) e RAVA (1985), a resistência de vagem à *X. campestris* pv. *phaseoli* é de efeito aditivo e quantitativo. Isto demonstra que a variedade IAPAR 16 apresenta maior nível de resistência horizontal na vagem à *X. campestris* pv. *phaseoli* que as variedades Carioca e IAPAR 20. Com relação as variedades IAPAR 16 e Carioca os resultados aqui obtidos concordam com os de MARINGONI et al. (1992a).

Com relação ao peso de mil sementes e produção a variedade IAPAR 20 foi a que apresentou os menores valores em relação às variedades Carioca e IAPAR 16 (Tabelas 16, 17, 18). A baixa produção das variedades na safra da seca de 1990, provavelmente tenha sido devido à redução do número de vagens por planta (Tabela 18), quando

comparado com as produções das outras safras (Tabelas 16 e 17). Nessa safra houve uma elevada incidência de mancha angular, principalmente, na variedade IAPAR 16, e mesmo fazendo-se pulverizações com fungicidas indicados pela EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (1985), verificou-se um baixo nível de controle dessa doença.

A redução no peso de cem sementes e na germinação foi detectado por VALARINI (1990) em sementes da variedade Rio Tibagi, provenientes de campos com elevada incidência de plantas com CBCF, durante a fase de pré-colheita. A variedade Rio Tibagi apresentou elevada suscetibilidade nas folhas à *X. campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo (FARIA & MELO, 1989) ou em casa de vegetação (FREGONESE & MARINGONI, 1991), podendo ser comparada à variedade IAPAR 20, aqui ensaiada.

Nota-se que o maior desenvolvimento do CBCF ocorreu na variedade IAPAR 20, nas três safras agrícolas, resultando uma maior destruição dos tecidos foliares e, conseqüentemente, uma menor produção e peso das sementes.

Verificou-se que diferentes populações de *X. campestris* pv. *phaseoli* transportada pelas sementes de feijão (Tabela 11) não foram suficientes em amenizar o desenvolvimento da epidemia nas variedades de feijoeiro aqui testadas, visto pelos valores obtidos da taxa aparente de infecção (Tabelas 12, 13 e 14).

A importância do transporte da *X. campes-*
tris pv. *phaseoli* pelas sementes de feijão reside no fato

das mesmas serem fonte de inóculo inicial para o desenvolvimento de epidemias. No caso dessa bactéria, 0,5 % de sementes infectadas (WALLEN & SUTTON, 1965) ou a população de 10^3 - 10^4 ufc por semente (WALLER & SAETTLER, 1980b) foi suficiente para dar início à epidemia do CBCF em variedades suscetíveis. Mas, o desenvolvimento da epidemia depende, além da população do patógeno, das condições ambientes e da suscetibilidade do hospedeiro.

Sob condições de temperatura adequada e elevada precipitação, conforme ocorrido no início da safra da seca de 1990, ilustrado na Figura 3, observaram-se maiores níveis de severidade e incidência de folíolos doentes já aos 20 e 30 dias após a emergência das plântulas nas variedades IAPAR 20 e Carioca, independente do lote de sementes (Figura 6). Já, nas safras das águas de 1988 (Figura 1) e 1989 (Figura 2), a precipitação não foi tão intensa no início do desenvolvimento das plantas, o que resultou em baixa severidade e incidência de folíolos doentes, aos 20 e 30 dias após a emergência (Figuras 4 e 5).

Nos U.S.A. e no Canadá têm-se adotado a análise sanitária de sementes de feijão, visando detectar *X. campestris* pv. *phaseoli*, em lotes comerciais, além da inspeção em campos de produção. Normalmente, têm-se adotado o nível zero de *X. campestris* pv. *phaseoli* nas sementes, para que estas sejam comercializadas (COPELAND et al., 1975; SHEPPARD, 1983b). Recentemente, no Brasil,

MENTEN & MORAES (1991) propuseram padrões de sanidade para diferentes classes de sementes de feijão e indicaram a tolerância zero por cento de sementes com *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Nos estados de São Paulo e Paraná têm-se adotado como rotina, para campos de produção de sementes certificadas, no máximo de 20 % de plantas com sintomas do CBCF (METHA, 1986; COORDENADORIA DE ASSISTENCIA INTEGRAL, 1988). Entretanto, esse procedimento não é satisfatório, visto que VALARINI (1990), analisando amostras de sementes certificadas, produzidas no estado de São Paulo, nas safras da seca, inverno e das águas de 1988, obteve índices variáveis de infecção (0,1 a 1,1 %) por *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Com relação ao estabelecimento de padrões de sanidade de sementes de feijão com *X. campestris* pv. *phaseoli*, há necessidade de se conhecer os níveis de resistência que as variedades possuem a essa bactéria, sob condições ambientes locais, para que esses índices sejam determinados.

Sob as condições climáticas do estado de São Paulo, e utilizando-se variedades de feijoeiro com baixo nível de resistência horizontal à *X. campestris* pv. *phaseoli*, será muito difícil obter sementes isentas de bactéria. Isso seria possível se as sementes dessas variedades fossem produzidas em regiões nas quais as condições climáticas não favorecessem o desenvolvimento da

doença, como é feito nos U.S.A. (COPELAND et al., 1975), permitindo a obtenção de sementes com alto padrão sanitário.

Contudo, com a utilização de variedades com maiores níveis de resistência horizontal à *X. campestris* pv. *phaseoli* nos folíolos e na vagem, o desenvolvimento da epidemia será atenuado, mesmo sob condições climáticas favoráveis, e as sementes produzidas provavelmente apresentarão baixa infecção pela bactéria. Essas sementes infectadas, mesmo dando origem a plântulas que servirão de fonte inicial de inóculo, provocarão epidemia de baixa intensidade, pois o nível de resistência horizontal que a variedade apresenta governará o desenvolvimento da epidemia.

Ficou evidenciado, no presente trabalho, que a utilização sucessiva de sementes com *X. campestris* pv. *phaseoli* levou a um acúmulo progressivo da bactéria nas sementes produzidas e que o nível de resistência horizontal das variedades de feijoeiro à *X. campestris* pv. *phaseoli* é um fator essencial para o desenvolvimento da epidemia.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- a - Isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli* foram sorologicamente distintos dos isolados da variante *fuscans*. Os antissoros de *X. campestris* pv. *phaseoli* e da variante *fuscans* foram específicos e reagiram apenas com antígenos homólogos; houve isolados da variante *fuscans* que não reagiram com o antissoro homólogo;

- b - O meio de cultura semi-seletivo constituído de: extrato de carne - 3,0 g, peptona - 5,0 g, sacarose - 10 g, amido solúvel - 2,0 g, ágar - 15,0 g, água destilada - 1000 ml, acrescido após a autoclavagem, a 45 - 50 °C, de chlorothalonil - 20 µg/ml, benomyl - 20 µg/ml, cefalexina 30 µg/ml, ácido nalidixico -

1 µg/ml e nitrofurantoina - 2 µg/ml foi eficiente no isolamento de *X. campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão;

- c - A trituração das sementes de feijão liberou mais *X. campestris* pv. *phaseoli* do que a maceração;
- d - A variedade de feijão IAPAR 16 apresentou um maior nível de resistência horizontal à *X. campestris* pv. *phaseoli*, tanto nos folíolos quanto na vagem, do que as variedades Carioca e IAPAR 20.
- e - O melhor sistema de avaliação do CBCF para discriminar os diferentes níveis de resistência horizontal dos folíolos das variedades de feijoeiro Carioca, IAPAR 16 e IAPAR 20 à *X. campestris* pv. *phaseoli*, foi o parâmetro severidade;
- f - O desenvolvimento da epidemia do CBCF dependeu mais do nível de resistência horizontal presente nas variedades de feijoeiro IAPAR 16, Carioca e IAPAR 20 e das condições climáticas do que da população de *X. campestris* pv. *phaseoli* presente nas sementes;

- g - A variedade de feijoeiro IAPAR 20 apresentou menor produção e peso de mil sementes, sob condições de epidemia do CBCF, em relação às variedades Carioca e IAPAR 16.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANADOR, L. & VICTORIA, J.I. Specificity of Elisa to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* identification. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., Cali, 1981. **Proceedings**. Cali, CIAT, 1982. p.113-21.
- AGGOUR, A.R.; COYNE, D.P., VIDAVER, A.K.; ESKRIDGE, K.M. Transmission of the common blight pathogen in bean seed. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 114: 1002-8, 1989.
- ALVAREZ, C.E.; VANEGAS, G.G.; VICTORIA, J.I. Transmission por semilla de bacterias fitopatogenicas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Colombia. **Acta Agronomica**, Palmira, 29: 11-20, 1979.
- AMORIN, L. & BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de doenças com a utilização de escalas diagramáticas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, 17: 68-72, 1991.
- ARNAUD-SANTANA, E.; PENA-MATOS, E.; COYNE, D.P.; VIDAVER, A.K. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. *Plant Disease*, St. Paul, 75: 952-3, 1991.

ARP, G.P.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Disease reaction of bean varieties to *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* using two inoculations methods. *Plant Disease Reporter*, Washington, 55: 577-9, 1971.

BASU, P.K. & WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in vivo and in vitro. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 44: 1239-45, 1966.

BERGAMIN FILHO, A. Consequências epidemiológicas da resistência no sistema *Coffea arabica* L. - *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Pircicaba, 1983. 111p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L.; FEIGES, N.C.; RIBEIRO, I.J.A. Horizontal resistance in three *Coffea arabica* cultivars to *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 15: 308-13, 1990.

BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Farnham House, C.A.B. International, 1986. 332p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. *Regras para análise de sementes*. Brasília, 1976. 188p.

BULISANI, E.A. Feijão. In: RAIJ van, B., SILVA, N.M., BATAGLIA, O.C.; QUAGLIO, J.A.; HIROCE, R.; CANTARELLA, H.; BELLINAZZI JUNIOR, R.; DECHEN, A.R.; TRANI, P.E. ed. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado*

de São Paulo. Instituto Agronômico, IAC, Campinas, 1985. p.19. (IAC. Boletim Técnico, 100)

BURKHOLDER, W.H. The bacterial blight of the bean: a systemic disease. *Phytopathology*, St. Paul, 11: 60-9, 1921.

CAFATI, C.R. & SAETTLER, A.W. Effect of host genotype on multiplication and distribution of bean common blight bacteria (*Xanthomonas phaseoli*). *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, New York, 22: 43-5, 1979.

CAFATI, C.R. & SAETTLER, A.W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 638-40, 1980.

CAFATI-KOMPATZKI, C. Reação de variedades de feijoeiro a *Xanthomonas phaseoli* (E. F. SM.) Dows. e *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk. Piracicaba, 1971. 59p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

CLAFIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 730-4, 1987.

COPELAND, L.O.; ADAMS, N.W.; BELL, D.C. An improved seed programme for maintaining disease-free seed of field beans (*Phaseolus vulgaris*). *Seed Science and Technology*, Zurich, 3: 719-24, 1975.

COORDENADORIA DE ASSISTENCIA TÉCNICA INTEGRAL. Guia de inspeção de campo e padrões de certificação de sementes. Campinas, 1988. n.p.

- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L.; AL-YASIRI, S. Reaction studies of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt. *Plant Disease Reporter*, Washington, **47**: 534-37, 1963.
- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L.; HARRIS, L. Inheritance, heritability, and response to selection for common blight (*Xanthomonas phaseoli*) tolerance in *Phaseolus vulgaris* field bean crosses. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Alexandria, **86**: 373-79, 1965.
- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. Tara, a new Great Northern dry bean variety tolerant to common blight. Nebraska Agricultural Experimental Station, 1969. 10p. (Bulletin, 506)
- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. 'Jules', a Great Northern dry bean variety tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Disease Reporter*, Washington, **54**: 557-9, 1970.
- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. Phaseolus germplasm tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Disease Reporter*, Washington, **57**: 111-4, 1973.
- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. Differential reaction of pods and foliage of beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease Reporter*, Washington, **58**: 278-82, 1974a.
- COYNE, D.P. & SCHUSTER, M.L. Inheritance and linkage relation of reaction to *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Dowson (common blight), stage of plant development and plant habit in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, Wageningen, **23**: 195-204, 1974b.

- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L.; HILL, K. Genetic control of reaction to common blight bacterium in beans (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by plant age and bacterial multiplication. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, **98**: 94-9, 1973.
- DIAS, J. & NALIMOVA, M. Serological studies on *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye in Cuba. *Pochvoznanie, Agrokhimya i Rastitelna Zashita*, **22**: 77-81, 1987. In: *Review of Plant Pathology*, Wallingford, **69**(10): 822-3, 1990. (Resumo)
- DYE, D.W. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.E., ed. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, APS Press, 1980. p.45-9.
- DYE, D.W. & LELLIOTT, R.A. Genus II. *Xanthomonas*. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBOWS, N.E., ed. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 ed. Baltimore, Williams & Wikins, 1974. p.243-9.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOTT, R.A.; SCHROTH, M.N. International standarts for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and list of pathovars names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, Wallingford, **59**(4): 153-68, 1980.
- EDNIE, A.B. & NEEDHAN, S.M. Laboratory test for internally-borne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed. *Proceedings Association of Official Seed Analysts*, Okalahoma City, **63**: 76-82, 1973.
- EKPO, E.J.A. & SAETTLER, A.W. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var.

- fuscans*. **Plant Disease Reporter**, Washington, **60**: 80-3, 1976.
- ELLIS, M.A.; GALVEZ-E, G.E.; SINCLAIR, J.B. Efecto de tres fungicidas sobre la germinacion de semilla infectada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba, San José, **26**: 399-402, 1976.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Recomendações para o cultivo do feijoeiro**. 2 ed. Goiânia, 1985. 40p. (Circular Técnica, 13)
- EROLD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the genus *Xanthomonas* I. Cross - agglutination relationships. *Journal of Bacteriology*, Washington, **53**: 509-18, 1947a.
- EROLD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of genus *Xanthomonas* III. The *Xanthomonas vascularum* and *Xanthomonas phaseoli* groups: the intermediate position of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*, Washington, **54**: 349-57, 1947b.
- FARIA, J.C. & MELO, P.E. Inoculação do feijoeiro com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **24**: 987-90, 1989.
- FAHY, P.C. & PERSLEY, G.L. **Plant bacterial diseases**. Sydney, Academic Press, 1983. 393p.
- FREGONESE, L.H. & MARINGONI, A.C. Reação varietal de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum. In: SEMINARIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DE FEIJOEIRO, 4., Campinas, 1991. **Anais**. Campinas, CATI, IB, 1991. p.25.

- GILBERTSON, R.L.; RAND, R.E.; CARLSON, E.; HAGEDORN, D.J. The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of beans. **Plant Disease**, St. Paul, **72**: 385-9, 1988.
- GILBERTSON, R.L.; RAND, R.E.; HAGEDORN, D.J. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. **Plant Disease**, St. Paul, **74**: 322-27, 1990.
- GITAITIS, R.D.; CHANG, C.J.; SIJAM, K.; DOWLER, C.C. A differential medium for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and other cellulolytic xanthomonads from various natural sources. **Plant Disease**, St. Paul, **85**: 1274-8, 1991.
- GOSS, R.W. The relation of temperature to common and halo blight of bean. **Phytopathology**, St. Paul, **30**: 258-64, 1940.
- GROGAN, R.G. & KIMBLE, K.A. The role of seed contamination in the transmission of *Pseudomonas phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, **57**: 28-31, 1967.
- GUTHRIE, J.W.; HUBER, D.M.; FENWICK, H.S. Serological detection of halo blight. **Plant Disease Reporter**, Washington, **49**: 297-9, 1965.
- HONMA, S. A bean interespecific hybrid. **Journal Heredy**, New York, **47**: 217-20, 1956.
- HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B. Pathometry: the measurement of plant disease. In: HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B., ed. **Plant disease: an advanced treatise**. New York, Academic Press, 1978. v.2., p.120-36.

- JAMES, W.C. An illustrated series of assessment keys for plant diseases their preparation and usage. **Canadian Plant Disease Survey**, Ottawa, 51: 39-65, 1971.
- KAISER, W.J. & VAKILI, N.G. Insect transmission of pathogenic xanthomonads to bean and cowpea in Puerto Rico. **Phytopathology**, St. Paul, 68: 1057-63, 1978.
- KATZNELSON, H. & SUTTON, M.D. A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infection of seed. **Journal of Bacteriology**, Washington, 61: 689-701, 1951.
- KATZNELSON, H.; SUTTON, M.D.; BAYLEY, S.T. The use of bacteriophage of *Xanthomonas phaseoli* in detecting infection in beans, with observation on its growth and morphology. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 2: 22-9, 1954.
- KHALIF, H.M. & VENETTE, J.R. Serological variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Phaseolus beans in North Dakota. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY AND OF THE NORTH CENTRAL DIVISION, Cincinnati, 1987. Abstracts. **Phytopathology**, St. Paul, 77: 1763, 1987.
- KHLAIF, H.M. & VENETTE, J.R. Serological detection of bean bacterial pathogens from infected plants in the dome seed assay. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, 29: 40, 1986.
- KIMATI, H. & MASCARENHAS, H.A.A. Incidência de doenças em ensaios de variedades de feijoeiro na cultura das águas

no estado de São Paulo. *Bragantia*, Campinas, **26**: XVII-XXV, 1967. (Nota, 5)

KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOZY, F.; VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest, Elsvier Scientific Publ., 1975. 509p.

KLEMENT, Z. Detection of seedborne bacteria by hypersensitive reaction. **Seed Science and Technology**, Zurich, **11**: 589-93, 1983.

LINK, K.K. & SHARP, C.G. Serological differentiation of *Bacterium campestre* from *Bact. phaseoli*. *Bact. flaccunfaciens* Geo. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 18., Philadelphia, 1926. Abstracts. **Phytopathology**, St. Paul, **17**: 534, 1927.

MAGABALA, R.B. & SAETTLER, A.W. An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Disease**, St. Paul, **76**: 443-6, 1992.

MALIN, E.; BELDEN, E.L.; ROTH, D. Evaluation of the radio-immunoassay, indirect enzyme linked immunosorbent assay, and dot blot assay for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, **7**: 217-22, 1985.

MALIN, E.M.; ROTH, D.A.; BELDEN, E.L. Indirect immunofluorescence stain for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Disease**, St. Paul, **67**: 645-7, 1983.

MARINGONI, A.C. Controle químico do cretamento bacteriano comum do feijoeiro e seu efeito na transmissão de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye pelas

- sementes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 25: 1151-6, 1990.
- MARINGONI, A.C. & KOMORI, N. Levantamento das bacterioses do feijoeiro no Estado do Pararná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 14: 241-4, 1989.
- MARINGONI, A.C. & KUROZAWA, C. Efeito de captan, chlorothalonil, ciclohexamida e thiram em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, 14: 107-16, 1987.
- MARINGONI, A.C.; FREGONESE, L.H.; TOFFOLI, J.G.; KUROZAWA, C. Reação foliar e de vagens de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 25., Gramado, 1992. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 17: 157, 1992a.
- MARINGONI, A.C.; TOFOLI, J.G.; FREGONESE, L.H. Ação de fungicidas *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani* e no controle do tombamento do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, 18: 269-75, 1992b.
- McGUIRE, R.G.; JONES, J.B.; SASSER, M. Tween media for the semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, St. Paul, 70: 887-91, 1986.
- MENTEN, J.O.M. Avaliação da resistência horizontal e vertical e de tolerância do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. Piracicaba, 1980. 213p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

- MENTEN, J.O. & MORAES, M.H.D. Estabelecimento de padrões de sanidade de sementes de feijoeiro. In: SEMINARIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DE FEIJOEIRO, 4., Campinas, 1991. **Anais**. Campinas, CATI; IB. 1991. p.2.
- MENZIES, J.D. Effect of sprinkler irrigation in an arid climate on the spread of bacterial diseases of beans. **Phytopathology**, St. Paul, **44**: 553-6, 1954.
- METHA, Y.R. Estabelecimento de padrões de tolerância para sanidade no campo e na semente. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., Campinas, 1986. **Anais**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.41-7.
- MOFFETT, M. & CROFT, B.J. *Xanthomonas*. In: FAHY, P.C. & PERSLEY, G.L., ed. **Plant bacterial diseases a diagnostic guide**. Sydney, Academic Press, 1983. p.189-228.
- MOHAN, S.K. & SCHAAD, N.W. Semiselective agar media for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic to beans. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, Reno, 1985. Abstracts. **Phytopathology**, St. Paul, **75**: 1351, 1985.
- MOHAN, S.T. Evaluation of *Phaseolus coccineus* Lamb. germplasm to common bacterial blight of bean. **Turrialba**, San José, **32**: 489-90, 1982.
- MOHAN, S.T. & MOHAN, S.K. Novas linhagens do feijoeiro resistentes ao cretamento bacteriano comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **18**: 1117-20, 1983.
- MORETTO, K.C.K. & BARRETO, M. Avaliação da reação de sete cultivares de tomateiro à infecção por *Septoria*

lycopersici. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, 19: 18-20, 1993.

NAKAMURA, K. & KIMATI, H. Crestamento fosco do feijoeiro no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 12: 25-7, 1987. (Suplemento)

NEERGARD, P. **Seed pathology**. London, McMillan, 1979. v.1. 839p.

NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 16: 359-78, 1978.

OLEAS-ARIAS, A.R. Correlação entre resistência foliar e infecção de sementes em variedades de feijoeiro inoculadas com *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dows. 1939. Piracicaba, 1982. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

OLIVEIRA, J.R. & ROMEIRO, R.S. Uso de isca biológica na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 25., Gramado, 1992. Resumo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 17: 168, 1992.

PARADELA FILHO, O.; CARVALHO, A.M.B.; POMPEU, A.S. Ocorrência de *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk. nos feijoados do estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, 26: I-IV, 1967. (Nota, 1)

PARK, S.J. & DHANVANTARI, N. Transfer of common blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) resistance from *Phaseolus coccineus* Lamb. to *P. vulgaris* L. through interespecific hybridization. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, 67: 685-95, 1987.

- PATEL, P.N. & WALKER, J.C. Relation of air temperature and age and nutritional of the host to the development of halo and common bacterial blights of bean. **Phytopathology**, St. Paul, **53**: 407-11, 1963.
- POMPEU, A.S. & CROWDER, L.V. Inheritance of resistance of *Phaseolus vulgaris* L. (dry beans) to *Xanthomonas phaseoli* Dows. (common blight). **Ciência e Cultura**, São Paulo, **26**: 1078-81, 1972.
- RAT, B. How to use bacteria detection methods in seed pathology routine laboratory. In: SEED PATHOLOGY INTERNATIONAL ADVANCED COURSE, Passo Fundo, 1987. **Proceedings**, edited by L.C. NASSER and others. Brasília, ABRATES, 1987. p.103-7.
- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **19**: 445-8, 1984.
- RAVA, C.A. Fontes de resistência, variabilidade do patógeno e hereditariedade da reação a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye in *Phaseolus vulgaris* L. Viçosa, 1985. 145p. (D.S. - Universidade Federal de Viçosa)
- RAVA, C.A. Crestamento bacteriano comum. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. ed., **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Associação Brasileira de Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1988. p.527-41.
- ROBBS, C.F. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. **Agronomia**, Rio de Janeiro, **12** : 445-8, 1954.

- ROBINSON, R.A. Horizontal resistance. **Review of Plant Pathology**, Wallingford, 52: 483-501, 1973.
- ROBINSON, R.A. **Plant pathosystems**. Berlin. Springer-Verlag, 1976. 186p.
- ROMEIRO, R.S. & FUKUDA, C. Método simples de título de aglutinação e/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 8: 93-5, 1983.
- SABET, K. & ISHAG, F. Studies on the bacterial diseases of Sudan crops. VIII Survival and dissemination of *Xanthomonas phaseoli* (E.F.Sm.) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, 64: 65-74, 1969.
- SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid in identifying bean blight bacteria. **Plant Disease Reporter**, Washington, 55: 703-6, 1971.
- SAETTLER, A.W. Common bacterial blight. In: HALL, R., ed. **Compendium of bean disease**. St. Paul, APS Press, 1991. p.28-9.
- SAETTLER, A.W. & EKPO, E.J.A. Patogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, 18: 67-70, 1975.
- SAETTLER, A.W. & PERRY, S.K. Seed transmitted bacterial diseases in Michigan navy (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Reporter**, Washington, 56: 378-81, 1972.
- SAETTLER, A.W.; CAFATI, C.R.; WELLER, D.M. Nonoverwintering of *Xanthomonas* bean blight bacteria in Michigan. **Plant Disease**, St. Paul, 70: 285-7, 1986.

- SALGADO, C.L. Análise da fase decrescente da curva epidemiológica da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) em três cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Piracicaba, 1983. 147p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP)
- SCHAAD, N.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A., ed. **Detection of bacteria in seed and other planting material.** St. Paul, APS Press, 1989. cap.11, p.68-75.
- SCHAAD, N.W. & FORSTER, R.L. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**, St. Paul. **75**: 260-3, 1985.
- SCHAAD, N.W.; SITTERLY, W.R.; HUMAYDAN, H. Relationship of incidence on seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to black rot crucifers. **Plant Disease**, St. Paul, **64**: 91-2, 1980.
- SCHAREN, A.L. Comparative population trends of *Xanthomonas phaseoli* in susceptible, field tolerant and resistant hosts. **Phytopathology**, St. Paul, **49**: 425-8, 1959.
- SCHUSTER, M.L. A method of testing resistance of beans to bacterial blights. **Phytopathology**, St. Paul, **45**: 519-20, 1955.
- SCHUSTER, M.L. Survival of bean bacterial pathogens in the field and greenhouse under different environmental conditions. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 59. Washington, 1967. Abstracts. **Phytopathology**, St. Paul, **57**: 830, 1967.

- SCHUSTER, M.L. Variability in virulence of Dominican Republic *Xanthomonas phaseoli* in CIAT *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 8: 339-45, 1983.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. New virulent strain of *Xanthomonas phaseoli*. **Plant Disease Reporter**, Washington, 55: 505-6, 1971.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 12: 199-221, 1974.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Detection of bacteria in bean seed. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, New York, 18: 71, 1975.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival of parasitic bacteria of plants grows in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris* L). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2: 117-30, 1977.
- SCHUSTER, M.L. & SAYRE, R.M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. **Phytopathology**, St. Paul, 57: 1064-6, 1967.
- SCHUSTER, M.L. & SMITH, C.C. Variability of *Xanthomonas phaseoli* from Dominican Republic. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 8: 409-14, 1983.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P.; HOFF, B. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. **Plant Disease Reporter**, Washington, 57: 74-5, 1973.

- SCHUSTER, M.L.; NULAND, D.S.; SMITH, C.C. Comparison of pod reactions of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivars to natural infections of *Xanthomonas phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 8: 259-61, 1983.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P.; NULAND, D.S.; SMITH, C.C. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* and other bacterial species or varieties in seeds of tolerant bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Plant Disease Reporter*, Washington, 63: 955-9, 1979.
- SHARMA, R.S. & SOHI, H.S. Effect of different fungicides against rhizoctonia root rot of french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, Udaipur, 11: 216-20, 1981.
- SHARP, C.G. Serological and physiological studies of *Bacterium phaseoli*, *Bact. sojense*, and *Bact. flaccumfaciens*. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 18., Philadelphia, 1926. Abstracts. *Phytopathology*, St. Paul, 17: 54, 1927.
- SHEPPARD, J.W. Detection of seed-borne bacterial blights of bean. *Seed Science and Technology*, Zurich, 11: 561-7, 1983a.
- SHEPPARD, J.W. Historical perspectives of the of disease-free seed, control and management of bacterial blights of beans in Canada. *Seed Science and Technology*, Zurich, 11: 885-91, 1983b.
- SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SAETTLER, A.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A., ed. *Detection of bacteria in seed and other planting material*. St. Paul, APS Press, 1989. cap. 4, p.11-29.

- SIJAM, K.: CHANG, C.J.: GITAITIS, R.D. An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology*, St. Paul, 81: 831-4, 1991.
- TAKATSU, A. Preservação das bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 5: 461, 1980.
- TAYLOR, J.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burker) Dowson. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 66: 29-36, 1970.
- TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, 4: 35-41, 1979a.
- TRUJILLO, G.E. & SATTler, A.W. Serology and selective enrichment as aids in the detection of *Xanthomonas* blight bacteria. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative*, New York, 22: 45-6, 1979b.
- TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. *A liquid semi-selective medium for Xanthomonas phaseoli and X. phaseoli var. fuscans*. East Lansing, Michigan State University / Agricultural Experimental Station, 1980. 7p.
(Research Report, 411)
- TRUJILLO-PINTO, G.E. Papel de plantas no hospedes y malezas, en el ciclo epidemiológico de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, causante de la quemazon bacteriana de la caraota. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Maracay, 15: 69-84, 1989.

- TRUJILLO-PINTO, G.E. & VERDE, O. Tendencia de las proble-
 maciones de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcpvph)
 en la variedad de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) Taca-
 rigua en relacion con las condiciones ambientales. **Re-
 vista de la Facultad de Agronomia, Maracay, 14: 19-44,**
 1986.
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria.**
 Minneapolis, Burgerss Publ., 1969. 239p.
- VALARINI, P.J. Método para detecção de *Xanthomonas*
campestris pv. *phaseoli* em sementes de feijão. Pira-
 cicaba, 1990. 167p. (Doutorado - Escola Superior de
 Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- VALLADARES-SANCHEZ, N.E.; COYNE, D.P.; MUMM, R.F. Inherit-
 ance and association of leaf, external, and internal
 pod reaction to common light bacterium in *Phaseolus*
vulgaris L. **Journal of the American Society for Horti-
 cultural Science, Alexandria, 108: 273-8, 1983.**
- VAN DER PLANK, J.E. **Plant disease: epidemic and control.**
 New York, Academic Press, 1963. 348p.
- VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants. 2.ed.**
 New York, Academic Press, 1984. 194p.
- VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DEN BOVENKAMP, G.W.; BIRBAUM, Y.
 Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked
 immunosorbent assay as potential routine test for the
 detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and
Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* in bean seed. **Seed
 Science and Technology, Zurich, 11: 547-59, 1983.**
- VAN VUURDE, J.W.L.; FRANKEN, A.A.J.M.; BIRBAUM, Y.;
 JOCHEMS, G. Characteristics of immunofluorescence mi-

- microscopy and dilution - plating to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed lots and for risk assessment of field incidence of halo blight. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, **97**: 233-44, 1991.
- VELASQUEZ, N.C. & TRUJILLO, G. Comparation de metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. **Agro-nomia Tropical**, Maracay, **34**: 29-41, 1984.
- VICTORIA, J.I.; BASTIDAS, G.; AGUDELO, O. Resistance to bacterial common blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in beans. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., Cali, 1981. **Proceedings**, Cali, CIAT, 1982. p.476-81.
- WALKER, J.C. & PATEL, P.N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo-blight of bean. **Phytopathology**, St. Paul, **54**: 140-1, 1964.
- WALLEN, V.R. & GALWAY, D.A. Bacterial blight of field bean: disease progress, yield loss, and crop canopy development in principal cultivars in Ontario. **Canadian Plant Disease Survey**, Ottawa, **57**: 61-4, 1977.
- WALLEN V.R. & SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **43**: 437-46, 1965.
- WEBSTER, D.M.; TEMPLE, R.S.; GALVEZ, G. Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* under tropical condition. **Plant Disease**, St. Paul, **67**: 394-6, 1983.

- WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. **Phytopathology**, St. Paul, **70**: 500-6, 1980a.
- WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, St. Paul, **70**: 148-52, 1980b.
- WHARTON, A.L. Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson in white seeded dwarf seed stocks. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, **60**: 305-12, 1967.
- WONG, W.C. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. **Journal of Applied Bacteriology**, Osney Mead., **71**: 124-9, 1991.
- YOSHII, K.; GALVEZ-E, G.E.; ALVAREZ-A, G. Screening bean germplasm for tolerance to common blight caused by *Xanthomonas phaseoli* and the importance of pathogenic variation to varietal improvement. **Plant Disease Reporter**, Washington, **62**: 343-7, 1978.
- YOUNG, J.M.; DYE, D.M.; BRADBURY, J.E.; PARAGOPOULOS, C.F.; ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, **21**: 153-77, 1978.
- YUKI, V.A.; COSTA, A.S.; BULISANI, E.A.; NARDO, E.A.B. Redução da incidência precoce do mosaico dourado do feijoeiro através do controle da mosca branca vetora por meio de inseticidas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, **15**: 139-44, 1989.

- ZAITER, H.Z.. & COYNE, D.P. Differential reaction of Tepary bean lines to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **HortScience**, Alexandria, **24**: 134-7, 1989.
- ZAPATA, M.; FREYTAG, G.F.; WILKINSON, R.E. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. **Phytopathology**, St. Paul, **75**: 1032-9, 1985.
- ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington, USDA. 1957. 255p. (USDA. Technical bulletin, 868)