

**DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
phaseoli EM SEMENTES DE FEIJÃO E
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

NILVANIRA DONIZETE TEBALDI

2005

NILVANIRA DONIZETE TEBALDI

**DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* EM SEMENTES
DE FEIJÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CRESTAMENTO
BACTERIANO COMUM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Tebaldi, Nilvanira Donizete

Detecção de *Xanthomonas axonopodis* var. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum / Nilvanira Donizete Tebaldi. – Lavras : UFLA, 2005.

102 p. : il.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Citometria de fluxo. 2. PCR. 3. Microscopia de fluorescência. 4. Sondas fluorescentes de viabilidade. 5. Meio de cultura semi-seletivo. 6. Anticorpo policlonal. 7. Progresso temporal e espacial da epidemia. 8. Taxa de progresso da doença.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.652932

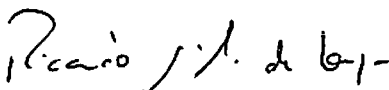
NILVANIRA DONIZETE TEBALDI

**DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* EM SEMENTES
DE FEIJÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CRESTAMENTO
BACTERIANO COMUM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 15 de julho de 2005

Prof. Dr. José Rogério de Oliveira	UFV
Profª. Dra. Édila Vilela de Rezende Von Pinho	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA


Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

Dedico,

Aos meus pais, Orlando e Maria Rosa;

Às minhas irmãs, Irene e Eliegi;

Aos meus cunhados, Mark e Charles.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a qual concedeu bolsa no Brasil e no exterior para a realização do doutorado sanduíche em Wageningen, Holanda (BEX 1382039).

A Murillo Lobo Junior (EMBRAPA, CNPAF) e Joice Aparecida Marques Santos (EMBRAPA, CNPMS) pelo fornecimento das sementes de feijão.

A Isabella Nougalli Tonaco pela recepção em Wageningen, Holanda.

Ao Fabyano Fonseca e Silva pela ajuda na análise estatística.

Obrigada a todos que contribuíram para minha formação profissional durante o curso de doutorado; a UFLA, aos professores, aos funcionários e aos colegas de pós-graduação.

Obrigada meu DEUS, pela oportunidade da reencarnação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	5
2.1 Técnicas utilizadas para detectar bactérias em sementes.....	5
2.1.1 Plaqueamento em meios seletivos e semi-seletivos.....	5
2.1.2 Sorologia.....	6
2.1.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	6
2.1.2.2 Imunofluorescência (IF).....	7
2.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	7
2.1.4 Sondas fluorescentes.....	8
2.1.5 Citometria de fluxo.....	10
2.2 Determinação de padrões de tolerância.....	12
3 Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meio de cultura semi-seletivo	27
1 Resumo.....	28
2 Abstract.....	29
3 Introdução.....	30
4 Materiais e Métodos.....	32
4.1 Obtenção de sementes de feijão.....	32
4.2 Concentração mínima de inóculo necessária para causar sintomas em plantas indicadoras.....	32

4.3 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em extratos de sementes de feijão.....	33
4.3.1 Métodos de Extração.....	33
4.3.2 Plaqueamento em meio de cultura.....	34
4.4 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes inteiras em meio de cultura.....	35
4.5 Teste de germinação.....	35
5 Resultados e Discussão.....	36
5.1 Concentração mínima de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> necessária para causar sintomas em plantas indicadoras.....	36
5.2 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em extratos de sementes de feijão.....	37
5.3 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes inteiras, em meio de cultura semi-seletivo.....	40
5.4 Teste de germinação.....	41
6 Conclusões.....	43
7 Referências Bibliográficas.....	44
CAPÍTULO 3 Detection of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> in bean seeds using flow cytometry applying immunostaining and direct viable staining.....	48
1 Resumo.....	49
2 Abstract.....	50
3 Introduction.....	51
4 Material and Methods.....	53
4.1 Seed lots.....	53
4.2 Bacterial strains and growth conditions.....	53
4.3 Immunostaining and flow cytometry (Immuno-FCM).....	53
4.4 Dilution plating.....	54

4.5 Immunostaining in combination with direct viable staining	54
4.6 Staining of bacteria with viability probes.....	55
4.7 Fluorescence microscopy.....	55
4.8 Cytometric flow analysis.....	56
4.9 Sorting of the seed extract.....	57
4.10 Polymerase chain reaction (PCR).....	57
5 Results and Discussion.....	58
5.1 Detection of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> by immuno-flow cytometry, dilution plating and immunofluorescence in artificially contaminated bean seeds.....	58
5.2 Detection of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> in naturally infected seed.....	60
5.3 Sorting and Polymerase Chain Reaction (PCR).....	63
5.4 Immunostaining and direct viable staining.....	64
5.5 Direct viable staining.....	66
6 Conclusions.....	70
7 References.....	71
CAPÍTULO 4 Progresso temporal e espacial do crestamento bacteriano comum a partir de sementes de feijão com diferentes níveis de inóculo.....	76
1 Resumo.....	77
2 Abstract.....	78
3 Introdução.....	79
4 Materiais e Métodos.....	82
4.1 Área experimental.....	82
4.2 Preparo da área experimental.....	82
4.3 Delineamento experimental.....	82
4.4 Inoculação das sementes.....	83

4.5 Análise do progresso temporal da doença.....	83
4.6 Taxa de progresso do crestamento bacteriano.....	84
4.7 Análise espacial da doença.....	84
4.8 Dados meteorológicos.....	84
4.9 Análise dos dados.....	85
5 Resultados e Discussão.....	86
5.1 Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro.....	86
5.2 Curva do progresso do crestamento bacteriano comum.....	87
5.3 Taxa de progresso do crestamento bacteriano comum.....	89
5.4 Correlação entre a incidência da doença e as variáveis climáticas.....	91
5.5 Análise do progresso espacial da doença.....	92
6 Conclusões.....	97
7 Referências Bibliográficas.....	98

RESUMO

TEBALDI, Nilvanira Donizete. *Deteccção de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum*. Lavras: UFLA, 2005. 102p. Tese (Doutorado em Fitopatologia).*

Para detectar *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* (Xap) em sementes de feijão naturalmente contaminadas foram utilizados os meios de cultura semi-seletivos XCP1 e MT e não seletivo 523. Assim como, o uso do citômetro de fluxo em combinação com anticorpo policlonal e sondas fluorescentes para detectar e quantificar células viáveis e não-viáveis de Xap nas sementes. Também foi avaliado o progresso temporal e espacial da doença, usando sementes com diferentes níveis de inóculo. O meio de cultura semi-seletivo XCP1 foi mais eficiente na quantificação e deteção de Xap em extratos de sementes de feijão. O uso do citômetro de fluxo em combinação com anticorpo policlonal foi promissor na deteção de Xap em extratos de sementes, assim como o uso de sondas fluorescentes para detectar e avaliar a viabilidade das células bacterianas. Para os ensaios realizados na época da seca não houve progresso temporal e espacial da epidemia, devido ao ambiente desfavorável. No plantio das águas, a maior área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) e taxa do progresso da doença foram observadas para as sementes com 9% de inóculo. Os diferentes níveis de inóculo não interferiram na disseminação do crestamento bacteriano comum, na época das águas, nas condições avaliadas, embora tenha ocorrido transmissibilidade da semente para a planta.

*Comitê de orientação: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

ABSTRACT

TEBALDI, Nilvanira Donizete. **Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and epidemiological aspects of bacterial blight.** Lavras: UFLA, 2005, 102p. Thesis (PhD in Phytopathology).*

To detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) in naturally contaminated bean seeds the semi-selective culture medium XCP1 and MT and non-selective 523 were used. As well as the use of the flow cytometry in combination with polyclonal antibodies and fluorescent probes to detect and to quantify viable and non-viable Xap cells in bean seeds. The temporal and spatial disease progress was also evaluated, using seeds with different inoculum levels. The semi-selective medium XCP1 was more efficient in the quantification and detection of Xap in bean seeds extracts. The use the flow cytometry in combination with polyclonal antibody was promising to detect Xap in seed extracts as well as the use of fluorescent probes to detect and to access the viability of the bacterial cells. There was no temporal and spatial progress of the epidemic in May, likely due to the unfavorable environmental conditions. The largest area under the disease progress curve (AUDPC) and disease progress rate were observed for the seeds at 9% of inoculum, in October and November. The different inoculum levels did not interfere in the bacterial blight dissemination, in October and November, for the conditions assessed, although, the transmission of the disease from seeds to plants had occurred.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Adviser); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é cultivado praticamente em todo o território nacional, com produtividade média de apenas 500 kg/ha, embora seu potencial seja de 3.000 a 3.500 kg/ha. As causas desta baixa produtividade estão relacionadas, além de outros fatores, às doenças de origem fúngica, bacteriana e virótica (Sartorato, 2000).

Dentre as doenças bacterianas, o crestamento bacteriano comum (CBC) cujo agente etiológico é *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Vauterin et al., 1995) apresenta maior importância econômica no Brasil (Rava & Sartorato, 1994).

Tal importância é devida à sua ampla distribuição, à capacidade de reduzir significativamente a produção e às dificuldades de controle. A doença ocorre em regiões de clima quente e úmido e tem sido problemática nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e na região Centro-Oeste, principalmente na safra das águas (Bianchini et al., 1997).

Perdas na produção devido ao CBC foram estimadas em cerca de 10 a 40% em cultivares suscetíveis (Opio et al., 1992; Wallen & Jackson 1975). No Brasil, não há estimativas de perdas, embora campos de produção com elevada intensidade da doença foram observados (Oliveira & Souza, 1997).

Para o controle efetivo desta bacteriose é necessário a rotação de cultura, o uso de variedades resistentes (Maringoni, 1993) e o plantio de sementes saudáveis, obtidas de campos de produção de sementes certificadas. Para comprovar a sua sanidade devem ser enviadas para a análise em laboratório (Schaad, 1988). Para explorar este último aspecto, é necessário dispor de métodos de detecção de bactérias em sementes, específicos, sensíveis, rápidos e de fácil execução.

Existem alguns métodos de detecção utilizados para verificar a presença de Xap em lotes de sementes, compreendendo desde o plaqueamento em meio de cultura, às técnicas mais complexas como: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), imunofluorescência (IF) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Entretanto, estes métodos podem apresentar limitações. O plaqueamento em meio de cultura é um processo lento e trabalhoso, podendo levar de 2 a 5 dias para a obtenção de resultados, porém, é o mais utilizado, devido à simplicidade. As técnicas de sorologia e DNA podem ser realizadas em um período de tempo menor do que o plaqueamento em meio de cultura, no entanto, fornecem somente informações semi-quantitativas, as quais, para muitos testes, não são satisfatórias. No caso da PCR, a presença de inibidores nos extratos de sementes tem sido um sério obstáculo (Schaad et al., 1997). Além disso, por meio destas técnicas não se distingue as células viáveis das não-viáveis, informação essencial para permitir, por exemplo, decisões sobre importação e exportação de sementes e sobre o tratamento ou não dos lotes.

Um dos problemas para desenvolver métodos rápidos e apropriados de detecção de patógenos em sementes é a determinação do tamanho das amostras e a quantidade de sementes, a serem testadas para fornecer resultado confiável sobre a presença ou não do patógeno. Os métodos existentes não são rápidos e sensíveis o suficiente para detectar o patógeno, quando o nível de infecção nas sementes é relativamente baixo. Assim, novas técnicas têm sido utilizadas na detecção de bactérias em sementes, como o uso de sondas fluorescentes em combinação com citômetro de fluxo, sendo uma técnica rápida, sensível e de fácil execução.

Outro fato importante a ser estudado é o estabelecimento de padrões de tolerância, para se evitar a introdução de níveis de inóculo capazes de resultar em epidemia com alta taxa de progresso da doença numa determinada área. A semente sendo a fonte de inóculo primária é o agente mais eficiente de

disseminação e sobrevivência do patógeno, podendo transportá-lo a longas distâncias, tanto interna como externamente. No campo, Xap apresenta rápida disseminação, uma semente infectada, em lotes de 10.000 foi suficiente para causar epidemia (Sutton & Wallen, 1970). Assim, os padrões de tolerância em relação à infecção em sementes devem ser estudados, pois dependem da interação patógeno, hospedeiro e ambiente. Para determinar padrões de tolerância, sementes com diferentes níveis de inóculo devem ser usadas e as taxas de transmissão e as curvas de progresso da doença no tempo e no espaço analisadas. O estado de Minas Gerais tem proposto os padrões de tolerância para produção e comercialização de sementes, para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro de 0,5 e 2%, para sementes básica e de primeira geração, respectivamente (dados não publicados).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: a) testar diferentes meios de cultura para detectar Xap em sementes de feijão naturalmente infectadas; b) determinar metodologia para detectar e quantificar células viáveis e não-viáveis de Xap em sementes de feijão, usando citômetro de fluxo em combinação com anticorpo policlonal e sondas fluorescentes e c) avaliar o progresso temporal e espacial da doença, usando sementes com diferentes níveis de inóculo, para auxiliar o estabelecimento de padrões de tolerância de Xap em sementes de feijão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Cerca de 154 espécies de bactérias são reconhecidas como capazes de causar doenças em plantas (ISPP, 2005; Agrios, 1997). As bactérias fitopatogênicas podem sobreviver em plantas hospedeiras como parasitas, na superfície das plantas como epífitas e em restos culturais ou no solo como saprófitas. Podem também estar associadas às sementes, tanto infectando como infestando-as, ou presentes em partes propagativas e órgãos vegetais infectados.

A disseminação de bactérias fitopatogênicas é feita principalmente pela água, insetos, animais, homens e sementes (Goto, 1992). As bactérias quando associadas às sementes podem causar danos e perdas irreparáveis em culturas de grande importância econômica. Para prevenir a disseminação do patógeno e a ocorrência da doença, as partes propagativas e as sementes devem estar livres do patógeno. Os métodos de detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e em materiais de propagação baseiam-se no plaqueamento em meios seletivos de cultura, em técnicas sorológicas, como ELISA e imunofluorescência (IF) e em técnicas de DNA (PCR) (Schaad, 1989).

2.1 Técnicas utilizadas para detectar bactérias em sementes

2.1.1 Plaqueamento em meios seletivos e semi-seletivos

O plaqueamento em meios de cultura tem sido usado rotineiramente para detectar e avaliar a viabilidade de bactérias. Este método permite isolar o patógeno, plaqueando as sementes ou os extratos de sementes em meios seletivos ou semi-seletivos (Chang et al., 1990; Chang et al., 1991; Randhawa & Schaad, 1984; Schaad & Donalson, 1980). Posteriormente, os microrganismos isolados são identificados por testes bioquímicos, sorológicos e/ou de patogenicidade. Este método, no entanto, é trabalhoso (Lange et al., 1993;

Plihon et al., 1995; Trujillo & Saettler, 1979) e para a identificação de cada patógeno há necessidade de infra-estrutura e de técnicos especializados (Stevens et al., 1997). Além disso, muitas vezes os resultados são difíceis de serem interpretados, devido ao efeito da concentração de células e a interferência de outros organismos presentes, ou à presença de substâncias inibidoras no extrato. Os meios seletivos ou semi-seletivos podem reduzir a interferência de saprófitas, mas podem também afetar o crescimento da bactéria de interesse (Chun & Alvarez, 1983). Além do mais, células dormentes, não cultiváveis ou danificadas não são detectadas. Apesar dessas desvantagens, o plaqueamento ainda é usado em muitos testes devido à sua simplicidade.

2.1.2 Sorologia

Vários métodos sorológicos são usados para identificar e detectar bactérias fitopatogênicas em sementes, desde os mais simples, como aglutinação em lâminas até os mais complexos como enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e imunofluorescência (IF).

2.1.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

O teste ELISA baseia-se na ocorrência do complexo antígeno-anticorpo por meio do desenvolvimento enzimático rápido de um produto colorido distinto. Este teste foi utilizado na detecção de Xap em sementes de feijão (Malin et al., 1985; Van Vuurde et al., 1983) e para folhas de repolho infectadas com *X. campestris* pv. *campestris* à concentração de 2×10^5 UFC/mL, por meio de anticorpos policlonais (Alvarez & Lou, 1985). A sensibilidade deste teste foi suficiente para detectar *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em tubérculos de batata à concentração de 10^6 UFC/mL, usando anticorpos monoclonais (De Boer et al., 1988). No entanto, melhorias adicionais na

sensibilidade do método foram obtidas, utilizando-se anticorpos com maior especificidade (Alvarez & Lou, 1985; Kishinevsky & Gurfel, 1980).

2.1.2.2 Imunofluorescência (IF)

Imunofluorescência é um método usado para detectar e confirmar a presença de bactérias e outros patógenos em sementes (Franken, 1992; Van Vuurde & Bovenkamp, 1995). Nesta técnica o anticorpo é conjugado com uma sonda fluorescente, geralmente isotiocianato de fluoresceína (FITC) a qual pode ser visualizada em lâminas, em microscópio de fluorescência devidamente equipado e apropriado. Células de Xap foram identificadas por esta técnica em sementes de feijão (Malin et al., 1983; Van Vuurde et al., 1983). O sucesso desse método, como em ELISA, depende da especificidade dos anticorpos os quais devem ser testados antes de serem usados e que, preferencialmente, não ocorram reações cruzadas com outras bactérias presentes na amostra. A sensibilidade do método permite a detecção de 10^3 UFC/mL (Taylor, 1978). Além disso, oferece ainda a possibilidade de estudar a morfologia das células em combinação com reações sorológicas. No entanto, essa técnica tem algumas limitações: 1) não fornece informações sobre a patogenicidade dos isolados; 2) depende da qualidade do anticorpo; 3) não discrimina entre células viáveis e não-viáveis; 4) o exame das lâminas deve ser feito por técnicos especializados.

2.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da PCR envolve a amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse, sendo um método de detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas rápido, sensível, preciso e específico (Belgrader et al., 1999; Fegan et al., 1998; Firrao & Locci, 1994; Lopes & Damann, 1997; Oh et al., 1999; Pan et al., 1998; Prosen et al., 1993; Rademaker & Janse, 1994; Rasmussen & Wulf, 1991; Verdier et al., 1998; Wang et al.,

1998). Essa técnica foi usada para a detecção de patógenos em seus hospedeiros e em sementes (Audy et al., 1996; Cajza et al., 1996; Cubero et al., 1999; Dreir et al., 1995; Henson & French, 1993; Manulis et al., 1998; Miyoshi et al., 1999; Santos et al., 1997; Toth et al., 1998, 1999), bem como para detectar células de interesse e cultiváveis, quando aplicado em combinação com BIO-PCR (Manulis et al., 1999; Schaad et al., 1995; Wang et al., 1999) e também, para detectar a presença de microrganismos patogênicos em amostras onde a concentração do patógeno é baixa, por exemplo, 10^3 células/mL (Zhang & Goodwin, 1997). Porém, a desvantagem dessa técnica, assim como de sorologia, é que não fornece informação sobre a viabilidade desses patógenos, quando amostras naturais são usadas; também não é possível a detecção de bactérias diretamente em extratos de sementes, devido à presença de substâncias inibidoras da PCR nestes extratos (Schaad et al., 1997). Essa técnica também não é quantitativa e é relativamente sensível à interferência de saprófitas (Van Vuurde et al., 1995).

2.1.4 Sondas fluorescentes

Atualmente, com o avanço nos estudos de patologia de plantas, novas técnicas foram desenvolvidas para a detecção e identificação de bactérias específicas, mesmo quando presentes em pequeno número ou em presença de outros patógenos.

Um método rápido, preciso e sensível para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos torna-se necessário e poderá ser alcançado, com o uso de sondas fluorescentes em combinação com o citômetro de fluxo.

Sonda fluorescente é um fluorocromo capaz de localizar uma região específica em uma amostra biológica ou de responder a um estímulo específico (Haugland, 1996).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sondas fluorescentes tem proporcionado o surgimento de novas técnicas para detectar e avaliar a

viabilidade de microrganismos. Estas sondas têm a habilidade de explorar diferentes propriedades da célula, tais como a atividade enzimática (Bunthof et al., 1999; Diaper & Edwards, 1994a,b; Endo et al., 1997; Kaneshiro et al., 1993; Ueckert et al., 1997), a permeabilidade da membrana citoplasmática (Magariños et al., 1997; Porter et al., 1997; Roth et al., 1997; Willians et al., 1998), o potencial da membrana citoplasmática (Kaprelyants & Kell, 1992; Langsrud & Sundheim, 1996; Mason et al., 1995), a atividade respiratória (Kaprelyants & Kell 1993a,b), o conteúdo relativo de DNA (Allman et al., 1992; Bernander et al., 1998; Sgorbati et al., 1996) e o pH gradiente (Breeuwer et al., 1996; Chitarra et al., 2000). Existe um grande número de sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos. As mais utilizadas estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Sondas fluorescentes mais usadas em combinação com o citômetro de fluxo para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos.

Atividade enzimática	Potencial de membrana	Ácido nucleico	Imunoreagente
FDA ¹	Rh 123	PI	FITC
cFDA	BOX	DAPI	
cF	DiBAC ₄ (3)	Sytox Green	
cFSE		EB	
Calcein AM		Syto 9	
ChemChrome B			
BCECF-AM			
DiOC ₆ (3)			

¹FDA- fluorescein diacetate; cFDA- 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate; cF- carboxyfluorescein; cFSE- 5-(and 6-) carboxyfluorescein succinimidyl ester; Calcein AM- calcein acetoxymethyl ester; BCECF-AM- 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester; DiOC₆(3)- 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; Rh 123- rhodamine 123; BOX- bis-oxonol; DiBAC₄(3)- bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol; PI- propidium iodide; DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole; EB- ethidium bromide; FITC- fluorescein isothiocyanate.

2.1.5 Citometria de fluxo

Citometria de fluxo é um processo em que, as características físicas e/ou químicas de partículas biológicas são mensuradas quando passam através de um feixe de laser, presente no citômetro de fluxo. É uma técnica que tem a habilidade de medir diversas variáveis em milhares de células, em poucos minutos. É capaz de associar as vantagens da microscopia com as análises químicas, tornando-a altamente sensível para rápida análise de células individuais (Muirhead et al., 1985).

A combinação do citômetro de fluxo com sondas fluorescentes foi aplicada em estudos de fisiologia celular (Ronot et al., 1986), na cinética do ciclo celular bacteriano à suscetibilidade a antibióticos (Steen et al., 1982), na quantificação de bactérias (McClelland & Pinder, 1994a,b; Page & Burns 1991; Pinder et al., 1990), na caracterização de esporos de fungos (Allman, 1992). Também tem sido empregada na distinção de células bacterianas viáveis e não-viáveis (mortas) (Chitarra et al., 2000; Diaper & Edwards, 1994a,b; Mason et al., 1995), na atividade enzimática de células marcadas com as sondas fluorescentes cFDA (carboxyfluorescein diacetate), Calcein AM (calcein acetoxymethyl ester) e BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester), bem como na caracterização do conteúdo de DNA presente nas células bacterianas (Allman et al., 1992), marcadas com as sondas PI (iodeto de propídio), EB (brometo de etídio) ou AO (acridine orange) (Brown et al., 1986).

A associação do citômetro de fluxo com sondas fluorescentes foi aplicada com sucesso, para determinar a viabilidade de microrganismos bem como, a rápida e específica detecção de bactérias. Essas aplicações foram comprovadas nas áreas de medicina, veterinária, ciência dos alimentos e microbiologia do meio ambiente (Bunthof et al., 1999; Diaper et al., 1992; Kusunoki et al., 1998; Li & Walker 1992; May et al., 1994; McClelland &

Pinder, 1994a,b; Pinder & McClelland, 1994; Porter et al., 1993; Porter et al., 1996).

Em fitopatologia, a viabilidade de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* foi avaliada, empregando-se 50% de células viáveis e 50% de células mortas. As células viáveis por possuírem atividade enzimática e membrana celular intacta foram marcadas com a sonda fluorescente Calcein AM, que, quando excitada a 488 nm, emite luz (fluoresce) no espectro verde (525 ± 15 nm). As células mortas, com membrana celular danificada, foram marcadas com a sonda fluorescente PI, a qual se une ao DNA e quando excitada (488 nm), emite luz no espectro vermelho (625 ± 15 nm). Sendo assim, foi possível separar e quantificar perfeitamente as células viáveis das mortas, devido à intensidade de fluorescência, sendo também possível separar as impurezas, ou seja, o background (Chitarra, 2001).

A combinação do citômetro de fluxo com anticorpos monoclonais ou policlonais também foi utilizada na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em cultura pura e em presença da bactéria saprofítica *Pseudomonas fluorescens* (Pf), no qual foi usado o anticorpo monoclonal conjugado com FITC (fluorescência no espectro verde). Como o anticorpo é específico para Xcc, as células foram detectadas e separadas das células de Pf por apresentarem elevado nível de intensidade de fluorescência no espectro verde e por não haver reação cruzada com Pf (Chitarra, 2001).

Os mais recentes citômetros de fluxo permitem medir simultaneamente três sondas fluorescentes diferentes, baseados no comprimento de onda por elas emitido (espectro verde, laranja e vermelho). A técnica fornece tanto informações quantitativas sobre o número total de células presentes na amostra como também a porcentagem de células viáveis, em um curto período de tempo. Oferece também, os benefícios de rapidez, sensibilidade e precisão, quando comparada com os métodos tradicionais e torna-se poderosa quando aplicada

juntamente com sondas fluorescentes. Por ser uma técnica relativamente nova, com grande potencial, deve ser explorada na fitopatologia onde os métodos de detecção e avaliação da viabilidade apresentam limitações.

2.2 Determinação de padrões de tolerância

O conceito de padrão de tolerância a um patógeno em sementes de determinada espécie vegetal pode ser assumido como sendo o nível de ocorrência do patógeno em um lote de sementes abaixo do qual, danos econômicos a curto, médio ou longo prazo são aceitáveis (Machado, 1994).

Alguns trabalhos foram realizados para auxiliar o estabelecimento dos padrões de tolerância para doenças fúngicas, como a antracnose do feijoeiro (Pinto et al., 2001; Talamini, 2003) e a ramulose do algodoeiro (Araújo, 2004). Entretanto, para doenças bacterianas poucos estudos têm sido realizados, destacando-se Carmo et al. (1996 a,b) com a pústula bacteriana do pimentão. Para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro não há relatos nas condições brasileiras.

Conhecer a disseminação de determinada doença é importante quando se quer estabelecer o nível de tolerância ao patógeno nas sementes, pois, quanto mais eficiente a sua dispersão, mais importante será a transmissão por sementes, assim, o nível de tolerância precisa tender a zero (Baker & Smith, 1966; Maffia et al., 1988) em alguns casos.

No campo, Xap apresenta rápida disseminação, sendo uma semente de feijão infectada em 10.000, suficiente para causar epidemia do crestamento bacteriano na cultura (Sutton & Wallen, 1970) e uma população mínima de 10^3 - 10^4 UFC/semente necessária para a transmissão da bactéria da semente para as plântulas no campo (Weller & Saettler, 1980).

Epidemias severas foram constatadas com a presença de 0,5% e 0,02% de sementes de feijão infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, na

França e nos EUA, respectivamente (Baker & Smith, 1966; Trigalett & Bidaud, 1978). Assim como, 0,03% de sementes de crucíferas infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, nos EUA (Schaad et al., 1980) e plântulas de pimentão com incidência de 1, 2, 4 e 8% de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em viveiro (Oliveira et al., 1990).

Apesar de sua importância, o nível tolerável de inóculo é difícil de ser determinado. Ele é influenciado por fatores como: a suscetibilidade do hospedeiro, a virulência do patógeno, seu potencial para dispersão secundária, outras fontes de inóculo, as condições ambientais, a localização geográfica, as práticas culturais adotadas, o valor econômico da cultura e a certificação das sementes (Gabrielson, 1988). Os padrões de tolerância são estabelecidos para doenças em condições de campo e para patógenos nos lotes de sementes destinados ao plantio (Machado, 1994).

A taxa de transmissão do inóculo da semente para a plântula (Oliveira et al., 2005) e a análise da curva de progresso da doença no tempo e no espaço (Machado & Pozza, 2005), a partir de sementes com diferentes níveis de inóculo podem auxiliar a determinação dos padrões de tolerância. A partir desta curva, modelos matemáticos podem ser ajustados, de forma a facilitar o entendimento do progresso de epidemias (Campbell & Madden, 1990) e obter informações sobre as interações do patógeno, hospedeiro e ambiente. Esse conhecimento pode ser empregado para avaliar estratégias de controle e prever níveis futuros de doenças (Bergamin Filho & Amorim, 1996).

Assim, o estabelecimento de padrões de tolerância poderá evitar a ocorrência de epidemias em áreas de interesse econômico.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. 4. ed. New York: Academic Press, 1997. 635 p.
- ALLMAN, R. Characterisation of fungal spores using flow cytometry. *Mycological Research*, New York, v. 96, n. 12, p. 1016-1018, Dec. 1992.
- ALLMAN, R.; HANN, A. C.; MANCHEE, R.; LLOYD, D. Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 73, n. 5, p. 438-444, Nov. 1992.
- ALVAREZ, A. M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, n. 12, p. 1082-1086, Dec. 1985.
- ARAÚJO, D. V. Níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e sua influência na epidemia da ramulose do algodoeiro. 2004. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 4, p. 361-366, Apr. 1996.
- BAKER, K. F, SMITH, S. H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 4, p. 311-334, 1966.
- BELGRADER, P.; BENETT, W.; HADLEY, D.; RICHARDS, J.; STRATTON, P.; MARIELLA, R.; MILANOVICH, F. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science Washington*, Washington, v. 284, n. 5413, p. 449-450, Apr. 1999.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

- BERNANDER, R.; STOKKE, T.; BOYE, E. Flow cytometry of bacterial cells: comparison between different flow cytometers and different DNA stains. *Cytometry*, New York, v. 31, n. 1, p. 29-36, Jan. 1998.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H. et al. *Manual de Fitopatologia*, São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 381-183.
- BREEUWER, P.; DROCOURT, J. L.; ROMBOUITS, F. M.; ABEE, T. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n. 1, p. 178-183, Jan. 1996.
- BROWN, S. C.; JULLIEN, M.; COUTOS THEVENOT, P.; MULLER, P.; RENAUDIN, J. P. Present developments of flow cytometry in plant biology. *Biology of the Cell*, Paris, v. 58, n. 2, p. 173-178, 1986.
- BUNTHOF, C. J.; VAN DEN BRAAK, S.; BREEUWER, P.; ROMBOUITS, F. M.; ABEE, T. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 8, p. 3681-3689, Aug. 1999.
- CAJZA, M.; REZLER, A.; POSPIESZNY, H. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Plant Protection Research*, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 45-51, 1996.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: John Wiley, 1990. 532 p.
- CARMO, M. G. F., KIMURA, O., MAFFIA, L. A., CARVALHO, A. O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 3, p. 336-341, set. 1996a.
- CARMO, M. G. F., KIMURA, O., MAFFIA, L. A., CARVALHO, A. O. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 1, p. 62-70, mar. 1996b.
- CHANG, C. J.; DONALDSON, R.; CROWLEY, R.; PINNOW, D. Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds using a highly

selective medium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 7., 1990, Budapest. Proceedings...Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. p. 533-539.

CHANG, C. J.; DONALDSON, D.; CROWLEY, M.; PINNOW, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 449-453, Apr. 1991.

CHITARRA, L. G. Fluorescence techniques to detect and to assess viability of plant pathogenic bacteria. 2001. 101 p. Thesis (Ph. D) - Wageningen University, Wageningen.

CHITARRA, L. G.; BREEUWER, P.; VAN DEN BULK, R. W.; ABEE, T. Rapid fluorescence assessment of intracellular pH as a viability indicator of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 88, n. 5, p. 809-816, May 2000.

CHUN, W. W. C.; ALVAREZ, A. M. A starch-methionine medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 632-635, June 1983.

CUBERO, J.; MARTINEZ, M. C.; LLOP, P.; LOPES, M. M. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 86, n. 4, p. 591-602, Apr. 1999.

De BOER, S. H.; WIECZOREK, A.; KUMMER, A. An ELISA test for bacterial ring rot with a new monoclonal antibody. *Plant Disease*, St. Paul, v. 72, n. 10, p. 874- 878, Oct. 1988.

DIAPER, J. P.; EDWARDS, C.; STEWART-TULL, D. E. S.; SUSSMAN, M. The detection of bacteria in aquatic environments by flow cytometry. The release of genetically modified microorganisms: REGEM 2: Proceedings of a symposium held under the auspices of the Federation of European Microbiological Societies, August 29-31, 1991. Nottingham, UK. 1992. p. 233-234.

DIAPER, J. P.; EDWARDS, C. Flow cytometric detection of viable bacteria in compost. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 213-220, July 1994a.

- DIAPER, J. P.; EDWARDS, C. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 221-228, Aug. 1994b.
- DRIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 4, p. 462-468, Apr. 1995.
- ENDO, H.; NAKAYAMA, J.; HAYASHI, T.; WATANABE, E. Application of flow cytometry for rapid determination of cell number of viable bacteria. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 63, n. 6, p. 1024-1029, Dec. 1997.
- FEGAN, M.; CROFT, B. J.; TEAKLE, D. S.; HAYWARD, A. C.; SMITH, G. R. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 495-504, Aug. 1998.
- FIRRAO, G.; LOCCI, R. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 2, p. 148-151, Feb. 1994.
- FRANKEN, A. A. J. M. Application of polyclonal antibodies for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 95-106, 1992.
- GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992. 342p.
- GRABIELSON, R. L. Fungi: inoculum thresholds of seed-borne pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 868-872, June 1988.
- HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 6. ed. Oregon: Molecular Probes, 1996. 679 p.
- HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo alto, v. 31, p. 81-109, 1993.
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR PLANT PATHOLOGY. **Names of plant pathogenic bacteria, 1864 -1995**. Disponível em: <http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp. Acesso em: 20 jul. 2005.

- KANESHIRO, E. S.; WYDER, M. A.; WU, Y. P.; CUSHION, M. T. Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 1-16, Jan. 1993.
- KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 72, n. 5, p. 410-422, May 1992.
- KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. Dormancy in stationary phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 10, p. 3187-3196, Oct. 1993a.
- KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. The use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualization of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 115-122, Mar. 1993b.
- KISHINEVSKY, B.; GURFEL, D. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological identification of different *Rhizobium* strains. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 49, n. 3, p. 517-526, 1980.
- KUSUNOKI, H.; KOBAYASHI, K.; KITA, T.; TAJIMA, T.; SUGII, S.; UEMURA, T. Analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype 0157:H7 by flow cytometry using monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 60, n. 12, p. 1315-1319, Dec. 1998.
- LANGHE, H.; BAVOUZET, J. M.; TAILLANDIER, P.; DELORME, C. Systematic error and comparison of four methods for assessing viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnology Techniques*, London, v. 7, n., p. 223-228, 1993.
- LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 81, n. 4, p. 411-418, Oct. 1996.
- LI, H.; WALKER, D. H. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. *Infection and Immunity*, Washington, v. 60, n. 5, p. 2031-2035, May 1992.

LOPES, S. A.; DAMANN, K. E. PCR detection of *X. albilineans* from vascular sap of cane. *Sugar Cane*, Glamorgan, v. 5, n. 1, p. 13-18, 1997.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Sementes qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV, 2005. p. 375-398.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; MAFFIA, A. M. C. Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógenos por sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. *Resumos...Campinas: Fundação Cargill*, 1988. p. 114-122.

MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L.; CID, A.; TORANZO, A. E. Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 24, n. 2, p. 122-126, Feb. 1997.

MALIN, E.; BELDEN, E. L.; ROTH, D. Evaluation of the radioimmunoassay, indirect enzyme linked immunosorbent assay, and dot blot assay for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, v. 7, n. 3, p. 217-222, Sept. 1985.

MALIN, E. M.; ROTH, D. A.; BELDEN, E. L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 645-647, June 1983.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; VALINSKY, L.; DROR, O.; KLEITMAN, F. Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* in gypsophila plants by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 85-91, Jan. 1998.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; VALINSKY, L.; DROR, O.; KLEITMAN, F.; FISCHER, G.; ANGARITA, A. Detection of plant pathogens in flowers by PCR technique. *Acta Horticulturae*, Amsterdam, n. 482, p. 117-121, 1999.

MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. 1993. 132p. Tese

(Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MASON, D. J.; LOPES-AMOROS, R.; ALLMAN, R.; STARK, J. M.; LLOYD, D. The ability of membrane potencial dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 78, n. 3, p. 309-315, Mar. 1995.

MAY, J. D.; BRANTON, S. L.; PRUETT, S. B.; AINSWORTH, A. J. Differentiation of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Avian Disease*, Kennett, v. 38, n. 3, p. 542-547, July/Sept. 1994.

McCLELLAND, R. G.; PINDER, A. C. Detection of low levels of specific *Salmonella* species by fluorescent antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 77, n. 4, p. 440-447, Apr. 1994a.

McCLELLAND, R. G.; PINDER, A. C. Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, n. 12, p. 4255-4262, 1994b.

MIYOSHI, T.; SAWADA, H.; TACHIBANA, Y.; MATSUDA, I. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by PCR using primers from the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, v. 64, n. 4, p. 249-254, 1999.

MUIRHEAD, K. A.; HORAN, P. K.; POSTE, G. Flow cytometry: Present and future. *Biotechnology*, New York, v. 3, n. 4, p. 337-356, 1985.

OH, C.; HEU, S.; CHOI, Y.; OH, C. S.; HEU, S. G.; CHOI, Y. C. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. *Plant Pathology Journal*, Seoul, v. 15, n. 1, p. 57-61, 1999.

OLIVEIRA, J. R.; MOURA, A. B.; SOUZA, R. M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Sementes qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV, 2005. p. 113-134.

- OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, R. M. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) controle de doenças causadas por bactérias. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas de grandes culturas. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 423-435.
- OLIVEIRA, L. A.; SUDO, A.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIDA, F. Estudos preliminares para determinação do índice de tolerância máxima de contaminação de sementes de pimentão com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 15, p. 153, ago. 1990. (Resumo).
- OPIO, A. F.; TERI, J. M.; ALLEN, D. J. Assessment of yield losses caused by common bacterial blight of beans in Uganda. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v. 35, p. 113-114, 1992.
- PAGE, S.; BURNS, R. G. Flow cytometry as a means of enumerating bacteria introduced into soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1025-1028, Nov. 1991.
- PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M.; DAMANN, K. E.; WEI, Q. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease*, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 285-290, Mar. 1998.
- PINDER, A. C.; MCCLELLAND, R. G. Rapid assay for pathogenic *Salmonella* organisms by immunofluorescence and flow cytometry. *Journal of Microscopy*, Oxford, v. 176, n. 1, p. 17-22, Oct. 1994.
- PINDER, A. C.; PURDY, P. W.; POULTER, S. A. G.; CLARK, D. C. Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure culture. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 69, n. 1, p. 92-100, Jan. 1990.
- PINTO, A. C. S.; POZZA, E. A.; TALAMINI, V.; MACHADO, J. C.; SALES, L. P.; GARCIA JÚNIOR, D.; SANTOS, D. M. Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 392-398, out/dez. 2001.
- PLIHON, F.; TAILLANDIER, P.; STREHAIANO, P. A direct and simple method for rapid counting viable chains of *Leuconostoc* in batch cultures. *Biotechnology Techniques*, London, v. 9, n. 6, p. 451-456, June 1995.

- PORTER, J.; EDWARDS, C.; MORGAN, A. W.; PICKUP, R. W. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 10, p. 3327-3333, Oct. 1993.
- PORTER, J.; DEERE, D.; PICKUP, R.; EDWARDS, C. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry*, New York, v. 23, n. 2, p. 91-96, Feb. 1996.
- PORTER, J.; PICKUP, R.; EDWARDS, C. Evaluation of flow cytometric methods for the detection and viability assessment of bacteria from soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 91-100, Jan. 1997.
- PROSEN, D.; HATZLOUKAS, E.; SCHAAD, N. W.; PANOPOULOS, N. J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n. 9, p. 965-970, Sept. 1993.
- RADEMAKER, J. L. W.; JANSE, J. D. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by nonradioactive hybridization, polymerase chain reaction, and restriction enzyme analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 1007-1018, Dec. 1994.
- RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 74, n. 3, p. 268-272, Mar. 1984.
- RASMUSSEN, O. F.; WULF, B. S. Detection of *P. s. pisi* using PCR. In: INTERNATIONAL WORKING GROUP ON PSEUDOMONAS SYRINGE PATHOVARS, 4., 1991, Florence. *Proceedings...Florence: Stamperia Granduciale*, 1991. p. 369-376.
- RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 300 p.
- RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. *Biology of the Cell*, Paris, v. 57, n. 1, p. 1-8, 1986.

- ROTH, B. L.; POOT, M.; YUE, S. T.; MILLARD, P. J. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with sytox green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 6, p. 2421-2431, June 1997.
- SANTOS, M. S.; CRUZ, L.; NORSEKOV, P.; RASMUSSEN, O. F. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 25, n. 3, p. 581-584, 1997.
- SARTORATO, A. Manejo integrado de doenças do feijoeiro comum. [online]. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/homepage/pesquisa/projetos/0409401.htm>>. Acesso em: 01 mar. 2000.
- SCHAAD, N. W. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Bacteria. Phytopathology*, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 872-875, 1988.
- SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETTER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. (Ed.). *Detection of bacteria in seed and other plating material*. St. Paul: APS Press, 1989, p. 9-16.
- SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringe* pv. *phaseolicola* in bean seed extract. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Feb. 1995.
- SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R.; HATZILOUKAS, E. BIO-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria. In: HUTCHINS, J. D.; REEVES, J. C. (Ed.). *Seed health testing progress towards the 21st century*. Cambridge, 1997. p. 159-164.
- SCHAAD, N. W.; DONALDSON, R. C. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in crucifer seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 8, n. 3, p. 383-391, 1980.
- SCHAAD, N. W.; SITTERLY, W. R.; HUMAYDAN, H. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Disease*, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 91-92, Jan. 1980.
- SGORBATI, S.; BARBESTI, S.; CITTERIO, S.; BESBETTI, G.; DE VECCHI, R. Characterization of number, DNA content, viability and cell size of bacteria

from natural environments using DAPI/PI dual staining and flow cytometry. *Minerva Biotecnologica*, Turin, v. 8, n. 1, p. 9-15, Mar. 1996.

STEEN, H. B.; BOYE, E.; SKARSTAD, K.; BLOOM, B.; GODAL, T.; MUSTAFA, S. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry*, New York, v. 2, p. 249-257, 1982.

STEVENS, E. A.; BLAKEMORE, E. J. A.; REEVES, J. C.; Development of a PCR-based test to detect and identify *Pyrenophora* ssp. In: HUTCHINS, J. D.; REEVES, J. C. (Ed.). *Seed health testing progress towards the 21st century*. Cambridge, 1997. p. 139-145.

SUTTON, M. D.; WALLEN, V. R. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* on bean in Southwestern Ontario, 1961-1968. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 48, n. 7, p. 1329-1334, 1970.

TALAMINI, V. *Progresso especial e temporal da antracnose a partir de diferentes níveis de inóculo inicial em sementes de feijoeiro*. 2003. 144p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TAYLOR, J. D. Detection of seed-borne bacteria. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEED PATHOLOGY, 16., 1978. Report...1978. p. 28-29.

TOTH, I. K.; HYMAN, L. J.; TAYLOR, R.; BIRCH, P. R. J. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 85, n. 2, p. 327-336, Feb. 1998.

TOTH, I. K.; HYMAN, L. J.; WOOD, J. R. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 87, n. 1, p. 158-166, Jan. 1999.

TRIGALET, A.; BIDAUD, P. Some aspects of epidemiology of bean halo blight. Station of Pathologie Vegetale et Phytopathologie. In: INTERNACIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Anger. *Proceeding...* Anger, 1978. p. 895-902.

- TRUJILLO, G.; 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*, London, v. 4, n. 1, p. 35-41, 1979.
- UECKERT, J. E.; VON-CARON, G. N.; BOS, A. P.; STEEG, P. F. Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 25, n. 4, p. 295-299, Apr. 1997.
- VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; BIRNBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 11, n. 3, 547-559, 1983.
- VAN VUURDE, J. W. L.; BOVENKAMP, G. W. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 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, 1995. p. 30-40.
- VAN VUURDE, J. W. L.; KASTELEIN, P.; VAN DER WOLF, J. M. Immunofluorescence colony-staining (IFC) as a concept for bacterial and ecological research. *EPP0 Bulletin*, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 157-162, 1995.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.
- VERDIER, V.; MOSQUERA, G.; ASSIGBETSE, K. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, St. Paul, v. 82, n. 1, p. 79-83, Jan. 1998.
- WALLEN, V. R.; JACKSON, H. R. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, n. 9, p. 942-948, Sept. 1975.
- WANG, Z.; YIN, Y.; CHENG, P.; WANG, Z. K.; YIN, Y. P.; CHENG, P. PCR (polymerase chain reaction) assay for identification and detection of sugarcane leaf scald (*Xanthomonas albilineans*). *Journal of Southwest Agricultural University*, v. 20, n. 4, p. 328-333, 1998.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathology*, Oxford, v. 48, n. 2, p. 245-252, Apr. 1999.

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, v. 70, n. 2, p. 148-152, Feb. 1980.

WILLIAMS, S. C.; HONG, Y.; DANAVALL, D. C. A.; HOWARD-JONES, M. H.; GIBSON, D.; FRISCHER, M. E.; VERITY, P. G. Distinguish between living and nonliving bacteria: evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 225-236, May 1998.

ZHANG, S.; GOODWIN, P. H. Rapid and sensitive detection of *Xanthomonas fragariae* by simple alkaline DNA extraction and the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 145, n. 5/6, p. 267-270, June 1997.

CAPÍTULO 2

DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* EM MEIO DE CULTURA SEMI SELETIVO

1 RESUMO

TEBALDI, Nilvanira Donizete. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em meio de cultura semi-seletivo. In:_____. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum. 2005, Cap.2, p.27-47. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foram utilizadas sementes de feijão naturalmente contaminadas, em meio de cultura semi-seletivo XCP1 e MT e não seletivo 523. Concentrações de inóculo variando de 0 a 10^7 UFC/mL foram inoculados nas folhas primária do feijoeiro para avaliar a concentração mínima em causar sintomas típicos do crestamento bacteriano comum. O meio de cultura semi-seletivo XCP1 foi mais eficiente na quantificação e detecção de Xap em extratos de sementes inteiras de feijão. A concentração mínima de inóculo a partir de 10^4 UFC/mL foi suficiente para causar sintomas visíveis do crestamento bacteriano comum em plântulas de feijoeiro.

*Comitê de orientação: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

2 ABSTRACT

TEBALDI, Nilvanira Donizete. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on semi-selective medium. In:_____. **Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and epidemiological aspects of bacterial blight.** 2005, Cap.2, p.27-47. Thesis (Ph.D in Phytopathology). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

To detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in naturally contaminated bean seeds the semi-selective medium XCP1 and MT and non-selective medium 523 were used. Inoculum concentrations between 0 and 10^7 CFU/mL were inoculated in the first leaves of bean plants to evaluate the minimum concentration causing infection. The semi-selective medium XCP1 was more efficient in the quantification and detection of Xap in whole seed extracts. The minimum inoculum concentration from 10^4 CFU/mL was enough to cause viable symptoms of disease in the bean plants.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Adviser); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* (Xap) pode sobreviver nas sementes em estado hipobiótico, por períodos de até 15 anos (Neergaard, 1979), podendo estar localizada tanto interna como externamente (Schuster & Coyne, 1974). As sementes merecem especial atenção, com relação à disseminação, pois transportam o patógeno a longas distâncias e são importantes fontes primárias de inóculo no campo (Neergaard, 1979). Os testes de detecção de Xap em sementes devem ser práticos, para assegurar a sanidade dos lotes a serem comercializados, evitando-se a ocorrência de epidemias.

Assim, inúmeras técnicas foram desenvolvidas e adaptadas com a finalidade de detectar a presença de Xap em sementes de feijão, como o uso de bacteriófagos, testes sorológicos como ELISA, microscopia de imunofluorescência, imunodifusão em agar e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Audy et al., 1996; Malin et al., 1983; Maringoni et al., 1994; Sheppard, 1983; Van Vuurde et al., 1983; Velásquez & Trujillo, 1984).

No entanto, métodos mais comuns como o plaqueamento dos extratos de sementes ou a deposição direta das mesmas, em meio de cultura semi-seletivo têm sido usados rotineiramente para detectar e avaliar a viabilidade de bactérias (Chang et al., 1990; Chang et al., 1991; Randhawa & Schaad, 1984; Schaad & Donalson, 1980). Diferentes meios semi-seletivos têm sido desenvolvidos para a detecção de Xap, como YSSM-XP, M-SSM e MXP (Claflin et al., 1987; Dhanvantari & Brown, 1993; Magabala & Saettler, 1992), proporcionando assim o melhor crescimento da bactéria. Posteriormente, os organismos isolados são identificados por testes bioquímicos, sorológicos e/ou de patogenicidade, como a inoculação dos extratos das sementes em plantas indicadoras.

Os meios seletivos ou semi-seletivos podem reduzir a interferência de saprófitas, mas podem também afetar o crescimento da bactéria de interesse (Chun & Alvarez, 1983). Além do mais, células dormentes, não cultiváveis ou danificadas não são detectadas. Apesar dessas desvantagens, o plaqueamento ainda é usado em muitos testes devido à sua simplicidade e praticidade. Porém, o emprego de meios de cultura não seletivos tem dificultado o isolamento de Xap de sementes de feijão, uma vez que inúmeras bactérias saprófitas podem ser veiculadas pelas sementes (Maringoni, 1993).

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: a) estabelecer a concentração mínima de inóculo para causar sintomas típicos do crestamento bacteriano comum em plântulas de feijoeiro; b) testar diferentes meios de cultura semi-seletivos para a detecção de Xap em sementes de feijão, utilizando-se 2 métodos de extração.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de sementes de feijão

Foram utilizadas sementes de feijão das cultivares Carioca e Perola, sadias e Roxo, Valente e Vermelho, naturalmente contaminadas com Xap.

4.2 Concentração mínima de inóculo necessária para causar sintomas em plantas indicadoras

Para estabelecer a concentração mínima de inóculo necessária para visualizar os sintomas típicos do crestamento bacteriano comum (CBC) foram utilizadas suspensões da cultura bacteriana, em concentrações de 0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL, inoculadas por incisão com tesoura nas folhas primárias do feijoeiro, das cultivares Carioca e Perola, aos 10 dias após a emergência.

Foram utilizadas 4 repetições de 3 plantas/vaso de 3,0L, inoculando-se as 2 folhas primárias (2 cortes laterais) (Rava, 1984) para cada concentração. O substrato constou de solo, areia e esterco, fumigado com brometo de metila, na proporção de 3:1:1, respectivamente.

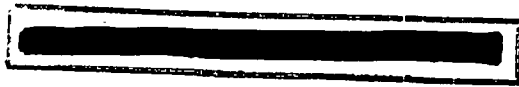
Foram realizadas 4 avaliações da severidade da doença, iniciando-se a primeira aos 7 dias após a inoculação, usando uma escala de notas, modificada por Pereira (1999) (Tabela 1).

Para ponderar a severidade foi aplicado o índice de McKinney (1923).

$$ID (\%) = \sum ((f.v)/(n.x)) \cdot 100$$

Em que:

ID = Índice de doença; f = Número de plantas com determinada nota; v = Nota observada; n = Número total de plantas avaliadas; x = Grau máximo de infecção.



O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 repetições, sendo a média de 1 repetição composta de 3 plantas. As variáveis significativas, no teste F da análise de variância foram submetidas ao ajuste de modelos de regressão não linear, para a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) obtida com base na severidade (AACPS) (Campbell & Madden, 1990).

TABELA 1. Escala de notas para avaliação da severidade do crestamento bacteriano comum nas folhas primárias do feijoeiro, inoculadas por incisão com tesoura.

Notas	Severidade da doença
0	Ausência dos sintomas;
1	Clorose descontínua ao redor da incisão;
2	Clorose contínua ao redor da incisão;
3	Início da necrose das incisões;
4	Início de murcha nos bordos da incisão;
5	Clorose evoluindo para outras partes da folha, necrose e murcha mais acentuada nas bordas das incisões;
6	Necrose severa e seca de tecidos próximos à incisão.

4.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em extratos de sementes de feijão

4.3.1 Métodos de Extração

Para a detecção de Xap nas sementes foram utilizados 2 métodos de extração: I) Imersão das sementes inteiras em água filtrada (60 mL, para cada 100 sementes) por 18 horas a 5°C (Valarini, 1990) e II) Imersão de sementes moídas em água filtrada por 2 horas à temperatura ambiente.

A utilização de 100 sementes foi devido à sua quantidade restrita.

4.3.2 Plaqueamento em meio de cultura

Para a detecção de Xap foram usados 2 meios de cultura semi-seletivos e um meio não seletivo, de rotina:

- **XCP1:** 10g de peptona, 10g de brometo de potássio, 0,25g de cloreto de cálcio, 15g de ágar, 10g de amido solúvel, 0,15 mL de cristal violeta, 1 L de água destilada, adicionando-se após autoclavagem, 50mg/L cefalexina, 10mg/L fluorouracil, 0,4mg/L tobramicina, 10mL de tween 80 e 50mg/L ciclohexamina;
- **MT** (Goszczyńska & Serfontein, 1998): 0,25g de cloreto de cálcio, 10g de peptona, 15g de ágar, 0,5g de tirosina, 10g de leite em pó, 1 L de água destilada, adicionando-se após autoclavagem, 10mL de tween 80, 80 mg/L de cefalexina, 200mg/L de ciclohexamina e 10 mg/L de vancomicina;
- **MEIO 523** (Kado & Heskett, 1970): 10g de sacarose, 8g de caseína hidrolizada, 4g de extrato de levedura, 2g de K_2HPO_4 , 0,3g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15g de agar e 1 L de água destilada.

As sementes das cvs. Carioca, Roxo, Valente e Vermelho foram utilizadas para cada método de extração, com 4 subamostras, em seguida realizada a diluição em série (10^{-1} a 10^{-4}) em água filtrada esterilizada e plaqueados 100 μ l da suspensão em meio de cultura, constando de 4 placas/diluição. As placas foram incubadas a 28°C por 4 dias, em seguida contado o número de UFC/mL.

O delineamento experimental inteiramente ao acaso foi utilizado. Para análise estatística os dados obtidos em UFC/mL foram transformados em log x para a análise de normalidade dos dados. As variáveis significativas, no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste Tukey ($P < 0,05$).

Os extratos das sementes foram inoculados nas folhas primárias do feijoeiro, como descrito no item 2.2 e os sintomas observados.

4.4 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes inteiras de feijão em meio de cultura

Para a detecção de Xap em sementes de feijão foram utilizadas sementes inteiras, sobre o meio de cultura semi-seletivo XCP1.

Para tanto, foram usadas sementes sem e com desinfestação superficial com hipoclorito de sódio, para as cvs. Roxo, Valente e Vermelho, constando de 8 repetições de 25 sementes em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. O teste foi avaliado 5 dias após sua instalação.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso e os dados analisados em esquema fatorial 2x3 (2 métodos x 3 cultivares). Os dados obtidos em porcentagem de incidência de sementes infectadas com Xap foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$, para a análise de normalidade dos dados. As variáveis significativas, no teste F da análise de variância foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.5 Teste de germinação

Para verificar a germinação das sementes foi realizado o teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), exceto que 4 repetições de 50 sementes foram utilizadas, em rolos de papel umidecidos, levados ao germinador à temperatura de 25°C. A primeira contagem foi feita a partir do 5º dia e o resultado expresso em % de germinação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração mínima de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* necessária para causar sintomas em plantas indicadoras

A doença iniciou com a concentração de inóculo 10^1 UFC/mL, para cv. Carioca (Figura 1). No entanto, o aumento da AACPS começou a ser observada a partir da concentração de inóculo 10^4 UFC/mL e foi máximo a 10^6 UFC/mL, para as cvs. Carioca e Perola. As quais apresentaram equações de regressão não linear, cv. Carioca ($y = 32,84x^2 - 87,70x + 27,60$ e $R^2 = 90,49\%$) e cv. Perola ($y = 19,94x^2 - 43,25x + 9,72$ e $R^2 = 82,46\%$). A AACPS foi maior para a cv. Carioca, pois esta é mais suscetível a Xap, em relação à cv. Perola.

Assim, a concentração mínima de inóculo a partir de 10^4 UFC/mL foi suficiente para causar sintomas do CBC em plântulas de feijoeiro.

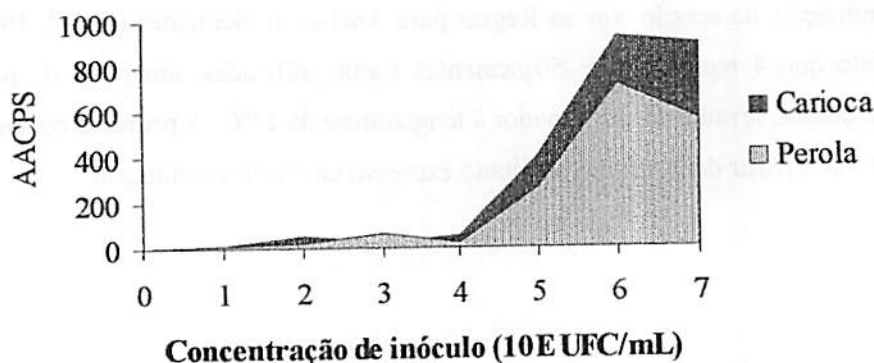


FIGURA 1. Área Abaixo da Curva do Progresso da Severidade (AACPS) do crestamento bacteriano em diferentes concentrações da suspensão bacteriana (0 a 10^7 UFC/mL), inoculadas nas folhas primárias do feijoeiro, cultivares Carioca e Perola. Lavras – MG, 2005.

5.2 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em extratos de sementes de feijão

As colônias de Xap foram facilmente distinguidas e identificadas, após 6 dias da instalação do teste. Em meio semi-seletivo XCP1 apresentaram cor amarela, mucóide, na forma convexa e circundada por halos devido à hidrólise do amido (Figura 2A). Em meio MT, cor amarela, na forma circular não-fluorescente, com 2 zoneamentos: um grande e claro devido à hidrólise de caseína e o outro, pequeno e branco devido à lipólise do Tween 80 (Figura 2B) (Goszczyńska & Serfontein, 1998). No meio 523 foram observadas colônias amarelas e convexas (Kado & Heskett, 1970), porém de tamanho maior do que nos meios semi-seletivos (Figura 2C), devido a ausência de antibióticos e fungicidas, no meio.

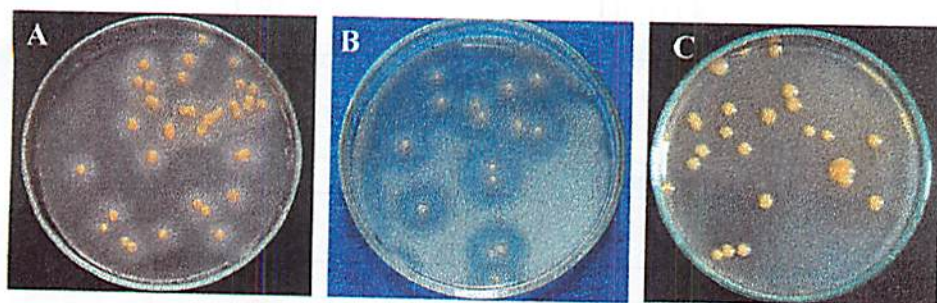


FIGURA 2. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em extratos de sementes de feijão naturalmente infectadas, 6 dias após a instalação do teste. A e B) meios de cultura semi-seletivos XCP1 e MT, respectivamente; C) meio de cultura não seletivo 523. Lavras – MG, 2005.

Para a quantificação de Xap em extratos de sementes de feijão (Tabela 2) houve diferença significativa entre os meios XCP1, MT e meio 523, nos quais os

meios semi-seletivos MT e XCP1 recuperaram de $1,00 \times 10^6$ a $1,47 \times 10^6$ UFC/mL e o meio 523, não seletivo, $1,20 \times 10^5$ UFC/mL.

Para os métodos de extração da bactéria houve diferença significativa entre as sementes inteiras ($1,64 \times 10^5$ UFC/mL) e moídas ($2,81 \times 10^6$ UFC/mL), no qual, para as sementes moídas foi possível recuperar 10 vezes mais UFC/mL, quando comparado com as sementes inteiras.

Na quantificação de UFC/mL houve diferença significativa entre as cvs. Roxo ($7,70 \times 10^5$ UFC/mL), Valente ($1,76 \times 10^6$ UFC/mL) e Vermelho ($2,15 \times 10^4$ UFC/mL) naturalmente contaminadas com Xap, porém, a bactéria não foi detectada na cv. Carioca (sadia).

TABELA 2. Quantificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão usando três meios de cultura, dois métodos de extração e quatro cultivares. Lavras – MG, 2005.

Meios de cultura	UFC/mL
XCP1	$1,47 \times 10^6$ a
MT	$1,00 \times 10^6$ b
MEIO 523	$1,20 \times 10^5$ c
Métodos de extração (sementes)	
Moídas	$2,81 \times 10^6$ a
Inteiras	$1,64 \times 10^5$ b
Cultivares	
Carioca	0 d
Roxo	$7,70 \times 10^5$ b
Valente	$1,76 \times 10^6$ a
Vermelho	$2,15 \times 10^4$ c
CV (%)*	7,17

*Dados transformados em log x.

Médias seguidas por mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

O meio semi-seletivo XPC1 é mais fácil de ser preparado e de fácil visualização das colônias formadas, quando comparado com o meio MT, no qual

é utilizado leite em pó, que deve ser muito bem homogeneizado, antes de vertê-lo nas placas, devido à formação de partículas. O menor número de UFC/mL quantificado no meio 523 foi devido à presença de microrganismos saprófitas competidores com a Xap. O meio MT é mais indicado quando se quer detectar e distinguir simultaneamente Xap e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Goszczyńska & Serfontein, 1998). Outros meios de cultura foram utilizados, como o meio NAS, que permitiu detectar concentrações de Xap variando de $2,5 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^6$ UFC/mL em sementes inoculadas artificialmente (Valarini et al., 1996).

A trituração das sementes permitiu extrair 10 vezes mais UFC/mL de Xap, quando comparado com as sementes inteiras. Resultados semelhantes também foram obtidos por Maringoni (1993), onde foi possível recuperar 10^2 vezes mais UFC/mL em relação à maceração. No entanto, procedimentos recentes têm sugerido o uso de sementes inteiras para a detecção de patógeno em sementes, pois o uso de sementes trituradas é mais trabalhoso, por ser difícil de pipetar o extrato, devido à presença de substâncias remanescentes.

Para a detecção de Xap em sementes em testes de rotina, recomendou à extração por imersão de sementes inteiras em água, incubadas em geladeira por 18-24 horas e identificação por meio da inoculação em plantas indicadoras, por incisão com tesoura (Valarini, 1990; Ito et al., 1997).

Os extratos das sementes naturalmente contaminadas inoculados em feijoeiro produziram sintomas do CBC em todas as subamostras analisadas.

Portanto, a utilização de sementes inteiras imersas em água, incubadas em geladeira por 18 horas é a mais indicada para a detecção de Xap em sementes naturalmente contaminadas e o meio semi-seletivo XCP1 foi mais eficiente e indicado para teste de rotina em laboratório, uma vez que não interferiu no crescimento da bactéria, inibiu o crescimento de microrganismos saprófitas, apresentou relativamente baixo custo e é de fácil preparo, auxiliando

os testes de sanidade, na emissão de certificados de sementes livres de Xap, evitando a ocorrência de epidemias.

5.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes inteiras, em meio de cultura semi-seletivo

Na detecção de Xap usando sementes inteiras em meio de cultura semi-seletivo XCP1 não houve diferença significativa entre as sementes com e sem desinfestação (Tabela 3).

Foi possível detectar a incidência de 16% e 0,5% das sementes infectadas com Xap, nas cvs. Roxo e Vermelho, respectivamente, após a desinfestação superficial. No entanto, Xap não foi detectada, na cv. Valente com e sem desinfestação e também na cv. Vermelho, sem desinfestação. Para a cv. Roxo foi detectado 9% das sementes infestadas com Xap, sem a desinfestação. Assim, o inóculo pode estar localizado tanto interno como externamente nas sementes.

TABELA 3. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes inteiras de feijão, com e sem desinfestação, em meio de cultura semi-seletivo XCP1, em porcentagem de incidência. Lavras – MG, 2005.

Desinfestação das sementes	Detecção (%)	
Com	5,50 a	
Sem	3,00 a	
	Incidência (%)	
Cultivares	Com desinfestação	Sem desinfestação
Roxo	16,00 a	9,00 a
Vermelho	0,50 b	0,00 b
Valente	0,00 b	0,00 b
CV (%)*	5,07	

*Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

Médias seguidas por mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho foi importante desinfestação das sementes, pois este processo reduziu o aparecimento de microrganismos saprófitas, facilitando a detecção e o crescimento de Xap no meio de cultura.

No entanto, outros trabalhos relataram a maior porcentagem de detecção de Xap em sementes sem desinfestação superficial (Valarini et al., 1996), variando de 30 a 89,83%, do que em sementes desinfestadas, de 2,95 a 54,90% (Kobayashi, 1998).

Em sementes certificadas produzidas no estado de São Paulo, no cultivo das secas e das águas de 1988 foram observados índices variáveis de infecção de 0,1 a 1,1% (Valarini, 1990), nos quais, os laudos de inspeção de campo mostraram baixa incidência ou ausência de bacteriose.

As inspeções de campo não são suficientes para assegurar que determinados lotes de sementes estejam livres do patógeno, pois, nem sempre a planta doente apresenta sintomas. Sendo as sementes potencialmente portadoras de bactérias devem ser submetidas a teste de sanidade em laboratório (Valarini, 1990).

5.4 Teste de germinação

A germinação das sementes não contaminadas foi de 96%, 93,50% e 92,50%, para as cvs. Carioca 2003, Carioca 2002 e Perola, respectivamente (Tabela 4). Para as sementes naturalmente contaminadas a germinação variou de 100%, 88,50% e 87%, para as cvs. Roxo, Vermelho e Valente, respectivamente.

Houve redução da germinação das sementes, para as cultivares Valente e Vermelho, talvez devido à presença de Xap, mas isto não ocorreu para a cv. Roxo. Resultados semelhantes foram observados por Maringoni et al. (1995), onde as cultivares avaliadas apresentaram razoáveis índices de germinação. Em sementes de brócolis infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 4, p. 361-366, Apr. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília, 1992. 365 p.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: John Wiley, 1990. 532 p.
- CHANG, C. J.; DONALDSON, R.; CROWLEY, R.; PINNOW, D. Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds using a highly selective medium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 7., 1990, Budapest. *Proceedings....* Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. p. 533-539.
- CHANG, C. J.; DONALDSON, D.; CROWLEY, M.; PINNOW, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 449-453, Apr. 1991.
- CHUN, W. W. C.; ALVAREZ, A. M. A starch-methionine medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 632-635, June 1983.
- CLAFLIN, L. E.; VIDAVER, A. K.; SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, n. 5, 730-734, May 1987.
- DHANVANTARI, B. N.; BROWN, R. J. YSSM-XP medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Canadian Journal Plant Pathology*, Ottawa, v. 15, n. 3, p. 168-174, Sept. 1993.
- GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J. J. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv.

phaseoli. **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 65-72, Mar. 1998.

ITO, M. F.; VALARINI, P. J.; PATRÍCIO, F. R. A.; SUGIMORI, M. H. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e fungos em sementes de feijão produzidas no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 118-121, Abr./Jun. 1997.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979-6, June 1970.

KOBAYASTI, L. Avaliação de genótipos e feijão quanto a reação foliar e de vagens a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, e transmissão da bactéria por sementes. 1998. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MABAGALA, R. B.; SAETTLER, A. W. An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 443-476, May 1992.

MALIN, E. M.; ROTH, D. A.; BELDEN, E. L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, n. 6, p. 645-647, June 1983.

MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. 1993. 132 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 20, n. 3/4, p. 164-167, Jul./Dez. 1994.

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, Nov. 1923.

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

PEREIRA, J. L. A. Virulência e variabilidade genômica de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. 1999. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St Paul, v. 74, n. 3, p. 268-272, Mar. 1984.

RAVA, C.A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 4, p. 445-448, Abr. 1984.

SCHAAD, N. W.; DONALDSON, R. C. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in crucifer seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 8, n. 3, p. 383-391, 1980.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 12, p. 199-221, 1974.

SHEPPARD, J. W. Detection of seed-borne bacterial blights of bean. *Seed Science Technology*, Zurich, v. 11, n. 3, p. 561-567, 1983.

TEBALDI, N. D. Inoculação, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolos. 1999. 64 p. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

VALARINI, P. J. Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. 1990. 167 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

VALARINI, P. J.; GALVÃO, J. A. H.; OLIVEIRA, D. A. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: importância do inóculo da semente na epidemiologia do crestamento bacteriano comum do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 2, p. 261-267, Jun. 1996.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 17, n. 3/4, p. 227-231, Jul./Dez. 1991.

VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; BIRNBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potencial routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 11, n. 3, p. 547-559, 1983.

VELÁSQUEZ, N. C.; TRUJILLO, G. Comparacion de metologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) com la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. **Agronomia Tropical**, Maracaibo, v. 34, n. 1-3, p. 29-41, Ene./Jun. 1984.

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, v. 70, n. 2, 148-152, Feb. 1980.

conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and the number of positive cells was counted.

For direct viable staining cells were immobilized on glass surfaces, which were coated with 20 μL of a poly-L-lysine solution (0.1 mg mL^{-1} , 100.000 MW) by incubating slides for 10 min at room temperature. Subsequently, glasses were dried with paper and 5 μl of stained cells were added and covered with a 18 mm square slip and observed under fluorescence microscopy (Leitz, Laborlux D).

Stained cells were visualized by excitation with blue light (495 nm), using a 100x objective magnification, 10x ocular magnification. Photomicrographs were taken with a digital camera (Leica DFC 320, Software Leica IM500).

4.8 Cytometry flow analysis

Flow cytometry was performed with a Coulter EPICS XL-MCL flow cytometer (Beckman-Coulter Electronics, Epics XL MCL) equipped with a 15 mW Argon ion laser at 488 nm. A band pass filter of 530 nm (515 to 545 nm) was used to collect the green fluorescence (FL1), a band pass filter of 585 nm (564 to 606 nm) was used to collect the red fluorescence (FL3).

In the seed extract, the cells were separated from background on the basis of their side and forward scatter characteristics. Green fluorescence emission (FL1 906 Volts, FL3 917 V) was measured with antibody labeling with Alexa 488.

For direct viable staining, green fluorescence emission (FL1) was measured for cFDA (FL1 815, FL3 1075 V) and Syto 9 (FL1 625, FL3 797 V) and red fluorescence emission (FL3) for PI. For combined immunostaining and DVC staining with PI was measured FL1 at 900 V and FL3 at 938 V.

The density of labeled cells present in each sample was calculated based on the number of events, and volume (μL) analyzed per second.

4.9 Sorting of the seed extract

The 100 times diluted, naturally-infected and supposed pathogen free seed extracts, were incubated with 100-times diluted Alexa 488-conjugated antibodies, supplemented with 25 times diluted pre-immune serum at room temperature for 20 minutes in the dark. Cells were sorted by a flow cytometer (Beckman Coulter, Epics Altra) based on the green fluorescence of the cells at 530 nm. Cell suspensions were counted by flow cytometry, and 10 μL were analyzed by PCR and 50 μL were plated on medium 523.

4.10 Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR was used to detect the bacteria in seed extract, on colonies grown after dilution plating and in sample fluid after FCM sorting.

PCR assays were performed in a 50 μL reaction mixture containing: 5 μL DNA, 1 X reaction buffer (Life Technologies), 1 unit *Taq* DNA polymerase, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each primer X4c (5'-GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGC-3') and X4e (5'-CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG-3'), 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each dCTP, dGTP, dATP and dTTP, 0.75 mmol l^{-1} MgCl_2 (Toth et al., 1998).

PCR amplification was performed in a thermocycler (Perkin Elmer, Applied Biosystems 9600, Norwalk, USA) under the following conditions: 37 cycles at 94 °C for 30s, 65 °C for 30s and 72 °C for 1 min, with a final extension of 72 °C for 10 min. Amplified DNA fragments (15 μL) were electrophoresed through a 1% agarose gel and visualized staining with ethidium bromide (7 μL).

5 RESULTS AND DISCUSSION

5.1 Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by immuno-flow cytometry, dilution plating and immunofluorescence in artificially contaminated bean seeds

Figure 1 shows cell densities, as estimated by IF, dilution plating and immuno-FCM. A linear relation was found between the concentrations of Xap added to the seed extracts, and the number of cells counted by IF, immuno-FCM and dilution plating. The dynamic range for dilution plating and IF was between $10^3 - 10^6$ CFU/mL, and for immuno-FCM between $10^4 - 10^6$ CFU/mL. In IF, the number of cells detected was slightly higher than those of dilution plating and immuno-FCM, but lines followed the same slope.

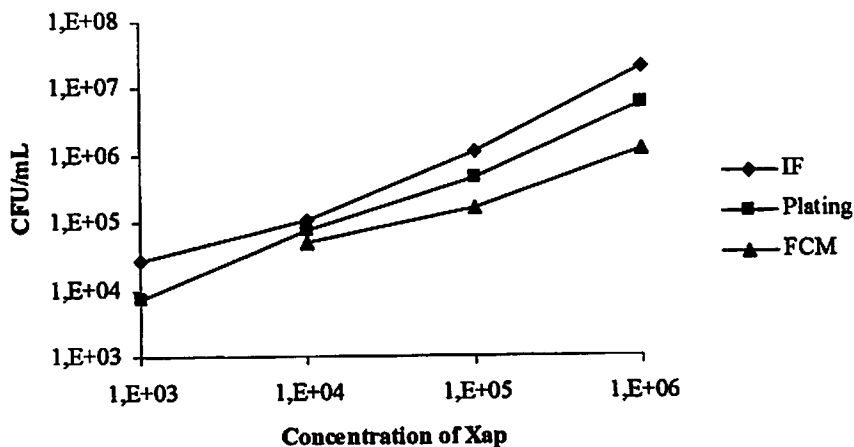


FIGURE 1. Detection of different concentrations of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in artificially contaminated seed extracts by immunofluorescence microscopy (IF), flow cytometry (FCM) and dilution plating.

The detection level of FCM for artificially contaminated bean seed extracts was 10^4 CFU/mL, if seed extracts were diluted at least 10 times (Figure 2). In undiluted seed extracts, the high background decreased detection levels (results not shown). FCM analysis could only detect Xap in bean seed extracts after addition of pre-immune serum, which blocked non-specific reactions of antibodies and reduced the background.

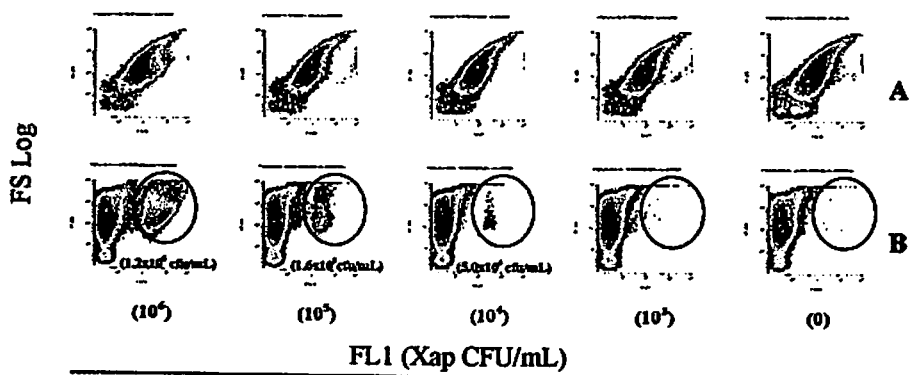


FIGURE 2. Immuno-FCM density plots of different concentrations (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 CFU/mL) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in a 10 fold diluted artificially contaminated seed extract. A) No pre-immune serum added. B) Pre-immune serum added as blocking agent. The green fluorescent particles are indicated with a circle. Between brackets, the number of green fluorescent particles is given. FL1 = green fluorescence, FS = forward scattering.

The detection limits of immuno-FCM in ten-fold diluted artificially contaminated bean seed extracts was between 10^3 - 10^4 CFU/mL. Similar results have been found for *Salmonella typhimurium* in eggs (10^3 CFU/mL) (McClelland & Pinder, 1994) and in milk ($\leq 10^4$ mL) (Gunasekera et al., 2000).

5.2 Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in naturally infected seed

Three supposed pathogen free bean seed lots (Carioca, Nuria and Perola) and three bean seed lots naturally infected with Xap (Roxo, Valente, Vermelho) were analysed in four independent experiments with different subsamples by dilution plating on a semi selective medium (XCP1), IF and immuno-FCM.

Immuno-FCM detected Xap in all four subsamples at a density of $10^5 - 10^6$ CFU/mL (Figure 3). IF detected Xap in all four subsamples except in Vermelho on the fourth sampling day; densities varied between $10^5 - 10^6$ CFU/mL for Roxo, $10^3 - 10^7$ CFU/mL for Valente and $0 - 10^5$ CFU/mL for Vermelho. Xap was detected by dilution plating in all subsamples except Valente (sample 3) and Vermelho (sample 2 and 4). The number of CFU/mL determined by dilution plating in Roxo varied between $10^3 - 10^6$ CFU/mL, for Valente between 0 and 10^6 CFU/mL and for Vermelho between 0 and 10^4 CFU/mL.

From three supposed healthy seed lots only in the cv. Carioca, Xap was detected by dilution plating in a density of 1×10^2 CFU/mL (Figure 4). In the cultivars Carioca, Perola and Nuria densities found in IF and immuno-FCM were at level of ca. 10^5 CFU/mL.

In naturally infected seed lots, Xap was detected in most subsamples with immuno-FCM, IF and dilution plating. The absence of CFU on the semi-selective media in some subsample of Valente and Vermelho may be explained by the presence of non-culturable cells, which may be dead or in a viable but non culturable (VBNC) state

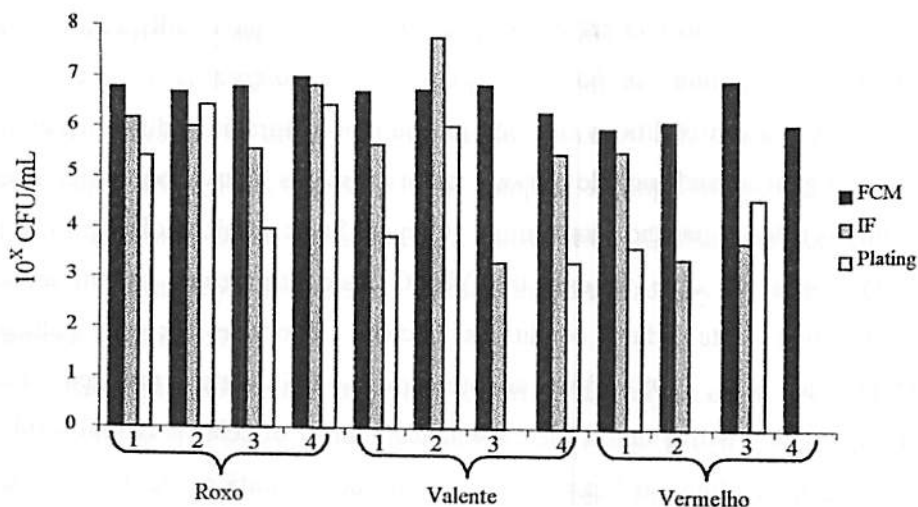


FIGURE 3. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (10^x CFU/mL) in naturally infected seed lots in the cultivars Roxo, Valente and Vermelho, by flow cytometry (FCM), immunofluorescence microscopy (IF) and dilution plating. Four different subsamples of the seed lots were independently tested. Results shown were corrected for sample dilution.

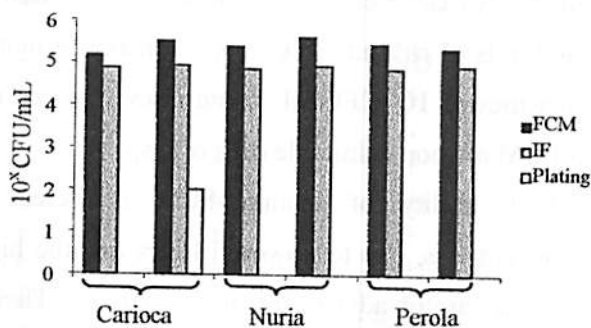


FIGURE 4. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (10^x CFU/mL) in supposed healthy seed lots in the cultivars Carioca, Nuria and Perola, by flow cytometry (FCM), immunofluorescence microscopy (IF) and (dilution) plating in two repetitions. Results shown are corrected for sample dilution.

detected directly in the sampled sorting fluid, indicating that PCR inhibiting compounds were largely removed. Dilution plating showed that not only Xap, but also other bacteria had been sorted.

5.4 Immunostaining and direct viable staining

Immuno-FCM (Figure 5) could distinguish two clusters in 100% of viable cells, a cluster of green fluorescent particles (A) and a small cluster of red/green fluorescent particles (B). In 80% of live cells, cluster B containing red/green particles increased. In 50% and 20% of live cells, a third cluster (C) of red particles appeared with a low level of green fluorescence (A). In 0% of live cells, only red cells in cluster C was observed.

Ultra violet (UV) microscopy distinguished green cells, red cells and red cells surrounded by a green fluorescent cell wall (Figure 6).

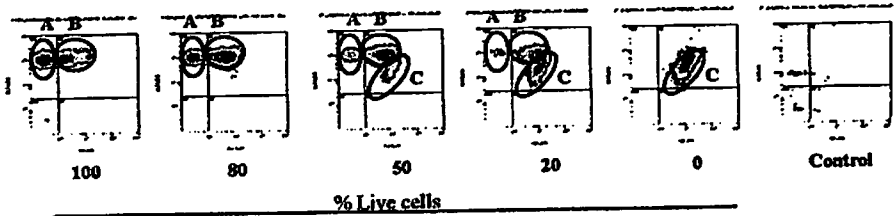


FIGURE 5. Flow cytometry density plots of green fluorescent and red fluorescent particles, after staining different percentages of live and dead cells of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* with antibodies conjugated with Alexa 488 (green fluorescence) and propidium iodide (red fluorescence). A) Cluster of green fluorescent particles. B) Cluster of green and red fluorescent particles. C) Cluster of red fluorescent particles. Control, cells in PBS.

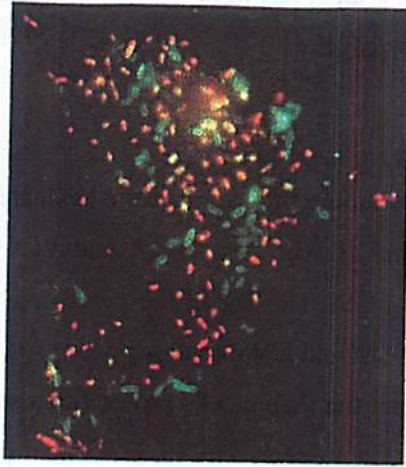
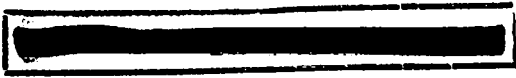


FIGURE 6. Mixture of 50% of live and dead cells simultaneously stained with antibodies conjugated with Alexa 488, and with propidium iodide. Live cells are green, dead cells are green/red and red.

The discrepancy in cell densities estimated by IF and immuno-FCM may be explained by the higher sensitivity of the immuno-FCM. A weak fluorescence caused by low numbers of molecules of fluorochrome (e.g. <1000 FITC molecules per particle) is detected already by the flow cytometer. Cross-reactions or non-specific bindings will easily result in false-positive reactions in FCM (Clarke & Pinder, 1998; Ferrari et al., 2000). Therefore, antibodies with a high specificity are required in FCM. It is well-known that polyclonal rabbit antiserum against plant pathogenic bacteria often cross-react with saprophytic bacteria (Franken et al., 1992). To improve specificity, monoclonal antibodies as selected by Ferrari et al. (2000) are preferred.

The combination of immuno-FCM and DVC techniques was evaluated, to distinguish live and dead cells of Xap in pure culture. This method could be more reliable when compare with the immunofluorescence using antibody labeling with FITC. However, the combination staining method for specific



detection of Xap in seed extracts has to be carried out in the future to improve the assessment of bacteria viability.

5.5 Direct viable staining

Two direct viable staining procedures were evaluated based on the use of different fluorescent probes. In the first cFDA and PI were used, and in the second Syto 9 and PI. Samples varying in the percentage of viable cells were stained and analyzed by FCM and UV microscopy.

In the FCM analysis the viable cells (green fluorescence) were identified by FL1 and the dead (red fluorescence) by FL3. A linear correlation ($R^2 \geq 0,97$) was found between the ratios of live and dead cells, and the percentage of green and red fluorescent particles enumerated by FCM, both after staining with cFDA/PI and Syto 9/PI (Figure 7). The distribution of red fluorescence intensity increases according to the rise of the dead cell percentage, whereas green fluorescence intensity decreased.

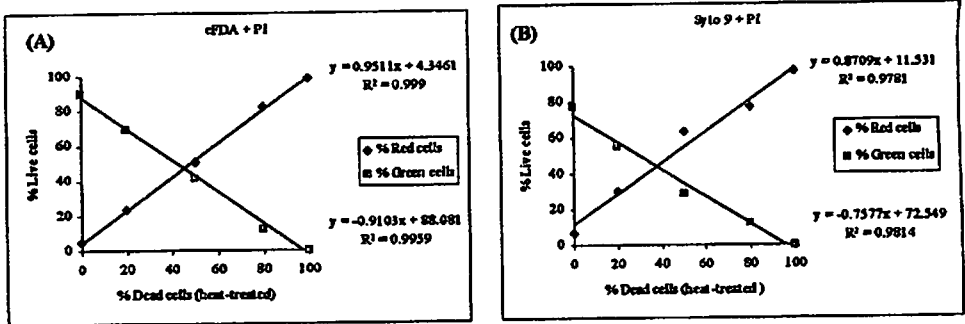


FIGURE 7. Linear relation between ratios of live and dead (heat-treated) cells for pure culture of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, and the number of fluorescent particles after double staining with cFDA and PI (A) or and Syto 9 and PI (B) as estimated by flow cytometry.

Ultra violet microscopy (Figure 8) showed that with both double staining procedures in samples with 100% of live cells most cells were green and only a few were red. In 50% of live cells, ca. 50% of the cells were green and 50% were red. In 0% of live cells, all cells were red.

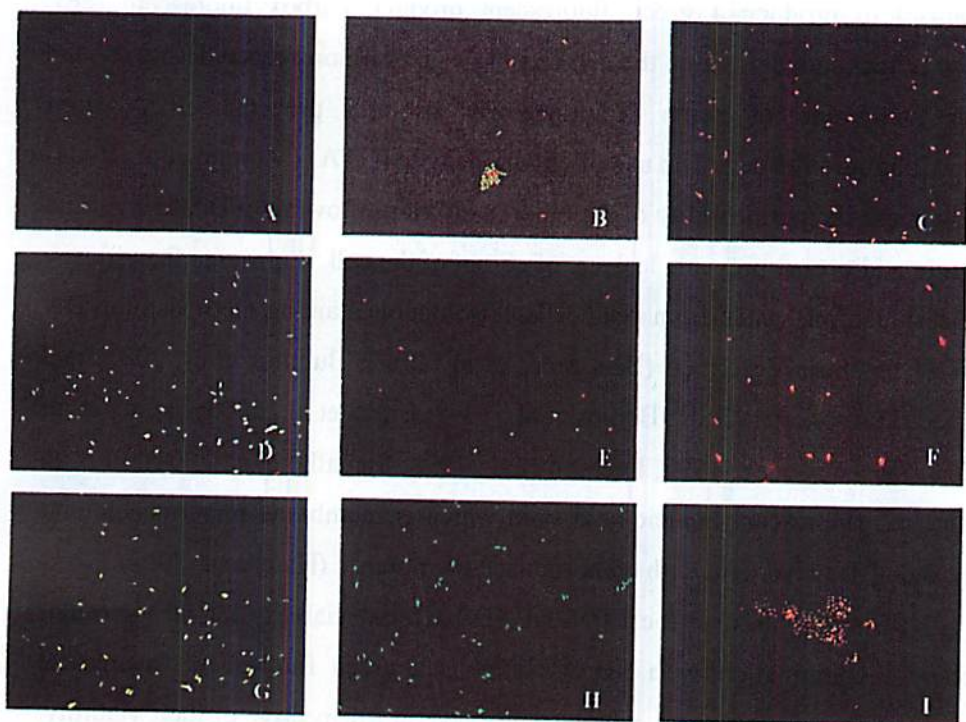


FIGURE 8. Photomicrographs of the mixture of viable and dead cells of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* stained with cFDA, Syto 9 and PI. Viable cells are stained green with cFDA or Syto 9, and dead cells are stained red with PI. The suspension contains 100% (A, D), 50% (B, E) and 0% (C, F) of live cells double staining with cFDA/PI and Syto/PI, respectively. Live cells only stained with cFDA (G) and Syto 9 (H). Dead cells only stained with PI (I). Cells were visualized by UV microscopy using blue light for excitation.

DVC staining methods based on cFDA for detection of viable cells by FCM and fluorescence microscopy has already been reported for different bacterial species (Ben Amor et al., 2002; Foster et al., 2002; Hoefel et al., 2003a-b; Jacobsen et al., 1997; Porter et al., 1995). cFDA is an esterified fluorogenic substrate assessing the esterase activity of bacteria and in this way evaluate the viability of the cells. cFDA is cleaved by intracellular enzymes (esterase) to produce a green fluorescent product, carboxyfluorescein (cF), which is accumulated within the cell causing a green fluorescence. However, the outer membrane of some Gram-negative bacteria prevents cFDA from permeating into the cell. The use of glutaraldehyde (GTA) (Morono et al., 2004) can increase the permeability of the outer membrane allowing cFDA to enter the cells. In addition, it prevents leakage of cF out of the cell, improving the efficacy of discriminating viable from dead cells. Also double staining methods of cFDA and PI has been described (Ben Amor et al., 2002; Bunthof et al. 2001) and Syto 9/PI (Auty et al. 2001; Boulos et al., 1999; Braga et al., 2003; Hoefel et al. 2003b; Jacobsen et al., 1997; Lebaron et al., 1998; Ramalho et al. 2001). PI is an orange/red fluorescent nucleic acid stain which is membrane impermeable and only stains dead bacteria with compromised membranes (Haugland, 2002).

PI is also used in the LIVE/DEAD bacterial viability kit of Molecular probes in combination with Syto9. Syto9 is a green fluorescent, membrane permeable nucleic acid stain, which stains bacteria irrespective of their viability. PI and Syto 9 have been used for the direct enumeration of physiologically active bacteria in drinking water (Boulos et al., 1999; Ramalho et al., 2001) and also in other fields of bacteriological research (Auty et al., 2001, Couto & Hogg, 1999; Ericsson et al., 2000, Lebaron et al., 1998).

Samples need to be measured immediately after staining cells with Syto 9/PI, to avoid an increase of dead red fluorescent cells. In particular the Syto9 was toxic to Xap. The number of non-staining cells decreased from $1,7 \times 10^7$

CFU/mL to 1×10^6 CFU/mL after staining with Syto 9/PI plated in medium 523 (data not shown). Similar results also have been found in some coliform strains (Boulos et al., 1999) and in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* labeled with cFDA (Chitarra, 2001).

Studies on DVC methods should preferably be done with liquid media rather than solid agar media. The bacterial suspensions from liquid growth medium contain a higher percentage of more culturable cells than plate medium. Possibly, cells were stressed on agar plates or died from limited nutrients and the build-up of toxic products (Clarke & Pinder, 1998).

DVC double staining method with cFDA/PI and Syto 9/PI can be successfully used to discriminate live and dead Xap cells in pure culture, including cells in a VBNC state, by using FCM and fluorescence microscopy.

6 CONCLUSIONS

Immuno-FCM is a promising technique for detection of Xap in bean seed extracts. The entire immuno-FCM procedure can be completed in 30 minutes. This is faster than IF and certainly faster than dilution plating, which requires several days to allow growth of the cells.

The immuno-FCM further allows analysis of samples and quantification of cells at about the same level of detection as IF, without the need for visual observations, which can be tiresome and less objective.

The detection limits of immuno-FCM in 10-fold diluted artificially contaminated bean seed extracts was between $10^3 - 10^4$ CFU/mL.

Blocking of non-specific reactions by adding pre-immune serum to bean seed extracts was essential for detection of Xap by immuno-FCM.

After FCM-sorting, the bacteria could be detected in the seed extracts by PCR.

Immunostaining combined with PI allowed to detect viable Xap cells specifically.

FCM analysis and DVC double staining can be successfully used to detect viable and non-viable Xap cells.

7 REFERENCES

- ALVAREZ, A. M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, n. 2, p. 1082-1086, Feb. 1985.
- AMSTERDAM BIOSCIENCES. Protein G Sepharose 4 fast. In: *Antibody purification handbook*, Life Science News 12. 2002.
- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 4, p. 361-366, Apr. 1996.
- AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; GILBERTSON, R. L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, n. 10, p. 1185-1192, Oct. 1994.
- AUTY, M. A. E.; GARDINER, G. E.; MCBREARTY, S. J.; O'SULLIVAN, E. O.; MULVIHILL, D. M.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G. F.; STATION, C.; ROSS, R. P. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 1, p. 420-425, Jan. 2001.
- BEN AMOR, K.; BREEUWER, P.; VERBAARSCHOT, P.; ROMBOUTS, F. M.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; ABEE, T. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, n. 1, p. 5209-5216, Jan. 2002.
- BOULOS, L.; PRÉVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J.; DESJARDINS, R. Live/dead[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 77-86, July 1999.
- BRAGA, P. C.; BOVIO, C.; CULICI, M.; SASSO, M. D. Flow cytometric assessment of susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and

rokitamycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 1, p. 408-412, Jan. 2003.

BUNTHOF, C. J.; BLOEMEN, K.; BREEUWER, P.; ROMBOUITS, F. M.; ABEE, T. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2326-2335, 2001.

CHITARRA, L. G. Fluorescence techniques to detect and to assess viability of plant pathogenic bacteria. 2001. 101 p. Thesis (Ph. D.) - Wageningen University, Wageningen.

CLARKE, R. G.; PINDER, A. C. Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 577-584, Apr. 1998.

COUTO, J. A.; HOGG, T. Evaluation of a commercial fluorochromic system for the rapid detection and estimation of wine lactic acid bacteria by DEFT. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 23-26, Jan. 1999.

DE BOER, S. H.; WIECZOREK, A.; KUMMER, A. An ELISA test for bacterial ring rot with a new monoclonal antibody. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 10, p. 874-878, Oct. 1988.

DIAPER, J. P.; EDWARDS, C. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 221-228, Feb. 1994.

ERICSSON, M.; HANSTORP, D.; HAGBERG, P.; ENGER, J.; NYSTRÖM. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 19, p. 5551-5555, Oct. 2000.

FERRARI, B. C.; VESEY, G.; DAVIS, K. A.; GAUCI, M.; VEAL, D. A novel two-color flow cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples. **Cytometry**, New York, v. 41, n. 3, p. 216-222, Nov. 2000.

FORSTER, S.; SNAPE, J. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; PORTER, J. Simultaneous fluorescent gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4772-4779, Oct. 2002.

FRANKEN, A. A. L. M.; ZILVERENTANT, J. F.; BOONEKAMP, P. M.; SCHOTS, A. Specificity of polyclonal and monoclonal antibodies for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Netherlands Journal Plant Pathology**, Washington, v. 98, n. 2, p. 81-94, 1992.

GHEZZI, J. I.; STECK, T. R. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 203-208, Nov. 1999.

GREY, B. E.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 3866-3872, Sept. 2001.

GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J. J. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 65-72, Mar. 1998.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1228-1232, Mar. 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; SOUZA, R. M.; FIGUEIRA, A.; BOARI, A. J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 737-740, Out./Dez. 2001.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. St. Paul: APS Press. 1994. 73 p.

HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research products**. 9. ed. Oregon: Eugene Molecular Probes, 2002. 966 p.

HOEFEL, D.; GROOBY, W. L.; MONIS, P. T.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 379-388, Mar. 2003a.

HOEFEL, D.; GROOBY, W. L.; MONIS, P. T.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques, *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 585-597, Dec. 2003b.

HORNBAEK, T.; DYNESSEN, J.; JAKOBSEN, M. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 215, n. 2, p. 261-265, Oct. 2002.

JACOBSEN, C. N.; RASMUSSEN, J.; JAKOBSEN, M. Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 35-43, Jan. 1997.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

LEABARON, P.; PARTHUISOT, N.; CATALA, P. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, n. 5, p. 1725-1730, May 1998.

MALIN, E. M.; ROTH, D. A.; BELDEN, E. L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 645-647, June 1983.

McCLELLAND, R. G.; PINDER, A. C. Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, n. 12, p. 4255-4262, Dec. 1994.

McDOUGALD, D.; RICE, S. A.; WEICHART, D.; KJELLEBERG, S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 25, n. 1, n. 2, p. 1-9, Jan. 1998.

MKANDAWIRE, A. B. C.; MABAGALA, R. B.; GUZMÁN, P.; GEPST, P.; GILBERTSON, R. L. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*, St. Paul, v. 94, n. 6, p. 593-603, June 2004.

MORONO, Y.; TAKANO, S.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y.; UNNO, H.; HORI, K. Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 379-383, Mar. 2004.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan Press, 1979. v. 1, 839 p.

PORTER, J.; DIAPER, J.; EDWARDS, C.; PICKUP, R. Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2783-2786, July 1995.

RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TELXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral water. **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 97-103, Mar. 2001.

RECHINGER, K. B.; SIEGUMFELDT, H. Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 53-60, May 2002.

SAETTLER, A. W.; PERRY, S. K. Seed transmitted bacterial diseases in Michigan navy beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 56, n. 5, p. 378-381, May 1972.

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. p. 17-29.

TOTH, I. K.; HYMAN, L. J.; TAYLOR, R.; BIRCH, P. R. J. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 327-336, Aug. 1998.

VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; BIRNBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 11, n. 3, p. 547-559, 1983.

CAPÍTULO 4

PROGRESSO TEMPORAL E ESPACIAL DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM A PARTIR DE SEMENTES DE FEIJÃO COM DIFERENTES NÍVEIS DE INÓCULO

1 RESUMO

TEBALDI, Nilvanira Donizete. Progresso temporal e espacial do crestamento bacteriano comum a partir de sementes de feijão com diferentes níveis de inóculo. In:_____. *Detecção de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum*. 2005, Cap.4, p.76-102. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O progresso temporal e espacial do crestamento bacteriano comum (CBC) foram analisados pelas curvas de progresso da doença, área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI), taxa de progresso da doença, correlação da doença com as variáveis climáticas e análise espacial da epidemia. Foram utilizadas sementes natural e artificialmente contaminadas com *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* (Xap) em diferentes níveis de inóculo (0, 0,3 1,0 3,0 e 9,0%). Os ensaios foram realizados na época da seca (maio 2003) e das águas (outubro e novembro 2003). Para os ensaios realizados na época da seca não houve progresso temporal e espacial da epidemia, provavelmente devido às condições ambientais desfavoráveis. As maiores curvas do progresso da doença e AACPI foram observadas para as sementes com 9% de inóculo, no plantio das águas. As maiores taxas do progresso da doença foram obtidas para as sementes com 3 e 9% de inóculo. Houve correlação da incidência da doença com a precipitação e umidade relativa, para os níveis de inóculo 1, 3 e 9%, no ensaio de novembro. Não houve disseminação do patógeno para as plantas adjacentes e surgimento de novas plantas doentes na época das águas. Os diferentes níveis de inóculo não interferiram na disseminação do CBC, nas condições avaliadas, embora tenha ocorrido transmissibilidade da semente para a planta.

*Comitê de orientação: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

2 ABSTRACT

TEBALDI, Nilvanira Donizete. Temporal and spatial progress of bacterial blight using bean seeds with different inoculum level. In:____. **Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in beans seeds and epidemiological aspects of bacterial blight in bean seeds.** 2005, Cap.4, p.76-102. Thesis (PhD in Phytopathology). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The temporal and spatial progress of bacterial blight were analyze by the bacterial blight progress curves, the area under disease progress curve (AUDPC), the disease rates, correlation between disease incidence with the climatic variables and epidemic spatial analysis. Seeds naturally and artificially contaminated with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* were used at different inoculum levels (0, 0,3 1,0 3,0 and 9,0%). The experiments were carried out in the field, in May, October and November 2003. There was no temporal and spatial progress of the epidemic in May, likely due to the unfavorable environmental conditions. The largest disease progress curve and AUDPC were observed for the seeds at 9% of inoculum, in October and November. The largest disease progress rates were obtained for seeds at 3 and 9% inoculum level. There was a correlation between disease incidence and precipitation and relative humidity at 1, 3 and 9% inoculum levels, in November. There was no pathogen dissemination for the adjacent plants in October and November. The different inoculum levels did not interfere in the bacterial blight dissemination, in the conditions assessed, although, the transmission of the disease from seeds to plants had occurred.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Adviser); Edson Ampélio Pozza - UFLA; José da Cruz Machado - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum (CBC), cujo agente etiológico é *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Vauterin et al., 1995) (*X. campestris* pv. *phaseoli*) apresenta importância no Brasil (Rava & Sartorato, 1994), devido à sua ampla distribuição, à capacidade de reduzir significativamente a produção e às dificuldades de controle.

Nas condições brasileiras, não há estimativas de perdas na produção causadas pelo CBC, mas, campos de produção comprometidos foram observados (Oliveira & Souza, 1997) nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e na região Centro-Oeste, principalmente na safra das águas (Bianchini et al., 1997). Nos EUA foram estimadas perdas na produção de 10 a 40% em cultivares suscetíveis (Opio et al., 1992; Wallen & Jackson 1975). A doença ocorre em regiões de temperaturas elevadas de 28 a 32 °C e umidade relativa >90% (Saettler, 1991).

Para o controle desta bacteriose é necessário utilizar variedades resistentes, rotação de cultura, utilização de sementes sadias obtidas de campos de produção de sementes certificadas e a análise da sanidade de sementes em laboratório (Schaad, 1988).

O uso de sementes sadias ou com níveis toleráveis de contaminação assume especial importância para o controle de fitobactérias, devido ao baixo custo, segurança e simplicidade para os produtores. De modo geral, essa prática deve diminuir drasticamente o inóculo inicial, proporcionando menor progresso da doença e redução nas perdas, e/ou deve vir acompanhada de outras medidas que promovam a redução da taxa de progresso (Berger, 1977).

A semente constitui a fonte de inóculo primário, sendo o agente mais eficiente de disseminação e sobrevivência do patógeno, podendo transportá-lo a longas distâncias, tanto interno como externamente (Neergaard, 1979).

No campo, Xap apresenta rápida disseminação, segundo Sutton & Wallen (1970) uma semente de feijão infectada em 10.000 foi suficiente para causar epidemia de crestamento bacteriano na cultura e uma população mínima de 10^3 – 10^4 UFC/semente foi necessária para a obtenção de plantas doentes no campo (Weller & Saettler, 1980). Epidemias severas foram constatadas com a presença de 0,5% e 0,02% de sementes infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, na França e nos EUA (Trigalett & Bidaud, 1978; Baker & Smith, 1966). Assim como, 0,03% de sementes infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, nos EUA (Schaad et al., 1980) e plântulas de pimentão com incidência de 1, 2, 4 e 8% de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em viveiro (Oliveira et al., 1990).

Conhecer a disseminação de determinada doença é importante quando se quer estabelecer o nível de tolerância ao patógeno nas sementes, pois, quanto mais eficiente a sua dispersão, mais importante será a transmissão por sementes, assim, o nível de tolerância precisa tender a zero (Baker & Smith, 1966; Maffia et al., 1988).

Apesar de sua importância, o nível tolerável de inóculo é difícil de ser determinado. Ele é influenciado por fatores como: a suscetibilidade do hospedeiro, a virulência do patógeno, seu potencial para dispersão secundária, outras fontes de inóculo, as condições ambientais, a localização geográfica, as práticas culturais adotadas, o valor econômico da cultura e a certificação das sementes (Gabrielson, 1988). Os padrões de tolerância são estabelecidos para doenças em condições de campo e para patógenos nos lotes de sementes destinados ao plantio (Machado, 1994).

A taxa de transmissão do inóculo da semente para a plântula (Oliveira et al., 2005) e a análise da curva de progresso da doença no tempo e no espaço (Machado & Pozza, 2005), a partir de sementes com diferentes níveis de inóculo, podem auxiliar a determinação dos padrões de tolerância. A partir desta curva, modelos matemáticos podem ser ajustados, de forma a facilitar o entendimento do progresso de epidemias (Campbell & Madden, 1990), e obter informações sobre as interações do patógeno, hospedeiro e ambiente. Esse conhecimento pode ser empregado para avaliar estratégias de controle e prever níveis futuros de doenças (Bergamin Filho & Amorim, 1996). O estado de Minas Gerais tem proposto os padrões de tolerância para produção e comercialização de sementes, para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro de 0,5 e 2%, para sementes básica e de primeira geração, respectivamente (dados não publicados).

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram estabelecer padrões de tolerância para Xap em sementes de feijão pelo: a) estudo da curva de progresso do crestamento bacteriano comum, AACPI e da taxa de progresso temporal da doença, usando sementes com diferentes níveis de inóculo; b) correlacionar a incidência da doença com as variáveis climáticas e com progresso da doença no campo e c) analisar o progresso espacial da epidemia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área experimental

Os experimentos foram instalados na área experimental do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras à altitude de 918 metros, latitude sul de 21°14', longitude oeste de 45°00' em latossolo Roxo. O cultivo na época das secas foi realizado em maio e conduzido até agosto de 2003. Os cultivos na época das águas foram realizados em outubro e novembro de 2003 e conduzidos até janeiro e fevereiro de 2004.

4.2 Preparo da área experimental

De acordo com o resultado da análise química do solo, foi realizada a adubação no sulco de plantio, na proporção de 500 kg/ha da mistura 04-14-08, e de cobertura, com 700 kg/ha da mistura 20-05-20, aos 25 dias após a semeadura.

As irrigações por aspersão foram realizadas somente no plantio das secas (40 mm semanalmente, divididos em três vezes). Para o controle de pragas foi aplicado o inseticida Decis 25 CE (6 mL/ 20 L de água). Para o controle de plantas daninhas foram realizadas capinas manuais.

4.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições. Cada parcela de 31,5 m² foi constituída de 9 linhas, com 7 metros de comprimento, sendo considerada como área útil as 7 linhas centrais de 6 metros. Sementes da cultivar Carioca foram semeadas no espaçamento de 0,5 m entre linhas, mantendo-se o estande de 12 plantas por metro linear. O experimento foi protegido por três linhas de milho (bordadura).

Os seguintes tratamentos foram utilizados: testemunha (sementes não inoculadas), 0,3% de sementes inoculadas (1 semente semeada no centro da parcela), 1%, 3% e 9% de sementes inoculadas com um isolado de Xap resistente à rifampicina, semeadas ao acaso nas parcelas, para os ensaios de maio e outubro de 2003. Estas mesmas plantas provenientes de sementes artificialmente inoculadas foram inoculadas 2 vezes por aspersão, com uma suspensão bacteriana de 10^8 UFC/mL aos 15 e 25 dias após a semeadura, em outubro. Para o ensaio de novembro de 2003 foram semeadas 4 sementes naturalmente contaminadas com Xap por cova, para os diferentes níveis de inóculo, deixando apenas 1 planta com sintomas de crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

As avaliações da incidência e da severidade foram realizadas semanalmente, após a emergência das plantas e estenderam-se até o final do ciclo do feijoeiro. Para a avaliação da severidade foi utilizada a escala diagramática desenvolvida e validada por Diaz et al. (2001).

4.4 Inoculação das sementes

Para a inoculação artificial das sementes foi utilizado meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) sob restrição hídrica + 59,4 g de manitol (potencial osmótico -0,85 Mpa). A suspensão bacteriana foi cultivada por 48h a 28° C. Em seguida foram colocadas 50 sementes por placa de Petri, as quais permaneceram em contato com o inóculo por 36 horas a 28° C (Kobayasti, 2002).

4.5 Análise do progresso temporal da doença

A análise do progresso temporal foi realizada de acordo com a área abaixo da curva do progresso do crestamento bacteriano (AACPD), obtida com base na incidência (AACPI), de acordo com Campbell & Madden (1990).

As avaliações foram realizadas para os tratamentos 0, 0,3, 1, 3 e 9% de sementes inoculadas ou naturalmente infectadas. Os tratamentos foram comparados utilizando-se a AACPI do crestamento bacteriano comum.

Para melhor visualizar o progresso ou a curva de progresso da doença, foi plotado o valor de incidência ao longo do tempo.

4.6 Taxa de progresso do crestamento bacteriano

Para obter a taxa de progresso da doença foi ajustado o modelo de regressão linear aos dados de incidência, nos ensaios de outubro e novembro de 2003.

4.7 Análise espacial da doença

Para a análise espacial da doença foi utilizado o tratamento 0,3% de sementes inoculadas, semeada no centro da parcela, constituindo fonte tipo ponto (Campbell & Madden, 1990) e confeccionados mapas da distribuição espacial da doença, para os diferentes níveis de inóculo.

4.8 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos foram obtidos da estação meteorológica da Universidade Federal de Lavras, localizada à 500 metros da área experimental, no período de maio a dezembro de 2003.

A incidência do crestamento bacteriano comum do feijoeiro foi correlacionada com as médias de temperatura máxima, média e mínima, umidade relativa e precipitação acumulada, pelo método de Pearson, obtidas aos quinze, dez e cinco dias anteriores às avaliações.

4.9 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas nos programas SAS (Statistical Analysis System for Windows, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) e SISVAR (Ferreira, 2000). As variáveis significativas, no teste F da análise de variância, foram submetidas ao teste Scott Knott ($P < 0,05$) quando qualitativas e ao ajuste de modelos de regressão linear quando quantitativos. Também foi analisada a normalidade dos resíduos, dos dados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro

A ocorrência da transmissibilidade do patógeno das sementes artificialmente inoculadas para as plantas foi assegurada em testes preliminares realizados em casa de vegetação, nos quais as plantas apresentaram sintomas de crestamento bacteriano comum (dados não demonstrados). Neste ensaio foram mantidas condições favoráveis de temperatura ($>30^{\circ}\text{C}$), umidade elevada ($>90\%$) e maior período de molhamento foliar, quando comparado com as condições de campo.

No experimento de campo a emergência das plantas não foi afetada pela presença da bactéria, para os diferentes níveis de inóculo na semente, tanto para as sementes artificialmente, quanto para as naturalmente contaminadas com Xap.

No cultivo das secas (maio 2003), as plantas provenientes de sementes inoculadas não apresentaram sintomas da doença, provavelmente devido ao ambiente desfavorável, com temperaturas máxima, média e mínima de 25, 18 e 12°C , respectivamente, umidade relativa de 70% e precipitação 9 mm. A doença ocorre em regiões de temperaturas elevadas de 28 a 32°C e umidade relativa $>90\%$ (Saettler, 1991).

A AACPI foi maior, quanto maior a porcentagem de sementes infectadas com a bactéria (Figura 1), nos diferentes níveis de inóculo de 0, 0,3, 1,0, 3,0 e 9,0%, para os ensaios de outubro e novembro de 2003.

Durante a realização do ensaio de outubro, como as plantas provenientes de sementes inoculadas não apresentavam sintomas do CBC, foram realizadas 2 inoculações com uma suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL) aos 15 e 25 dias após

a semeadura, nestas plantas. Assim, no experimento de outubro foi observada maior taxa de progresso ($r = 7,31$) da AACPI, quando comparado com o ensaio de novembro ($r = 2,75$) (Figura 1), nos diferentes níveis de inóculo, sendo que, no ensaio de novembro foram utilizadas sementes naturalmente contaminadas com Xap. Tais fatos justificam as diferenças das taxas obtidas nos dois ensaios.

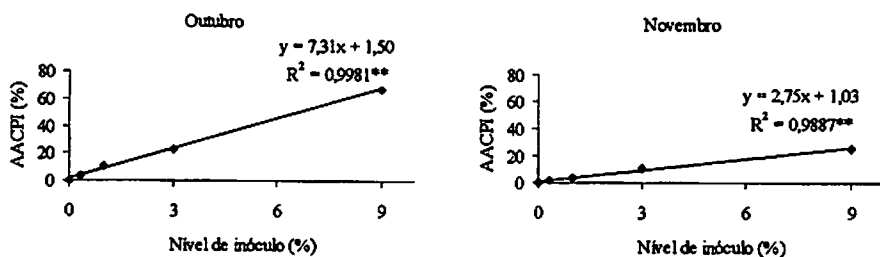


FIGURA 1. Equação de regressão para a área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) em função dos diferentes níveis de inóculo inicial (0, 0,3, 1,0, 3,0 e 9,0%) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, em outubro e novembro de 2003. Lavras - MG, 2005.

5.2 Curva do progresso do crestamento bacteriano comum

As curvas do progresso da incidência do crestamento bacteriano comum em função dos dias após a semeadura (DAS) foram plotadas, para os ensaios realizados em outubro e novembro (Figura 2). Nos níveis de inóculo de 0,3 e 1,0% a incidência permaneceu próxima de zero, para ambos. A partir de 3% houve maior inclinação da reta e em 9% obteve-se maiores incidências, chegando à incidência máxima (y_{max}) da doença de 8,8% e 2,7% aos 39 e 41 dias após a semeadura, em outubro e novembro, respectivamente.

Houve aumento da incidência da doença, de acordo com o aumento do nível de infecção das sementes. Resultados semelhantes foram obtidos, havendo

aumento significativo da incidência da doença no campo, a partir de sementes inoculadas com o nível de inóculo acima de 5%, em ensaios realizados em Jaguariúna, SP (Valarini et al., 1996).

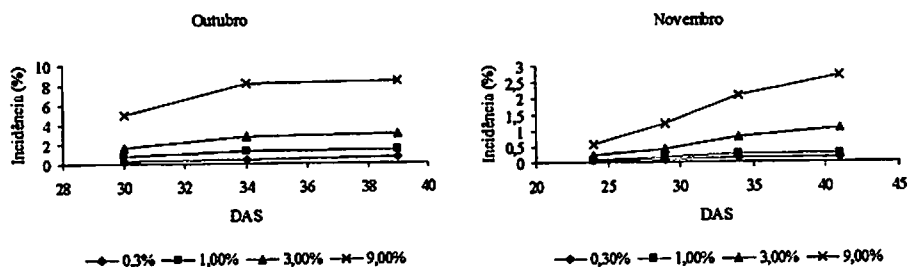


FIGURA 2. Curvas de progresso da incidência do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em função dos dias após a semeadura (DAS), com diferentes níveis de inóculo 0,3, 1,0 3,0 e 9,0% nas sementes, em outubro e novembro de 2003. Lavras - MG, 2005.

A avaliação da severidade foi realizada somente uma vez durante a condução dos experimentos, pois não houve aumento da área foliar lesionada, que variou de 0,97 a 3,3%, para os ensaios de outubro e de novembro, de acordo com a escola diagramática desenvolvida por Diaz et al. (2001).

Em ensaios realizados na Argentina na primavera de 1997 e 1998, o nível de severidade de 5,5% aos 85 DAP foi obtido, em plantas inoculadas 3 vezes com Xap. Porém, no verão de 1998 as condições climáticas favoreceram o progresso da doença, com temperatura ao redor de 28° C, tendo uma severidade de 7,5% aos 55 DAP (Diaz, 2000).

Em ensaios realizados em São Manuel, SP, na safra da seca de 1990, à temperatura de 30° C e elevada precipitação (50 mm) foi observada maior severidade da doença nos folíolos do feijoeiro, com a porcentagem da área foliar

infectada variando de 5 a 8%, aos 20 e 30 dias após a emergência das plantas. No entanto, nas safras das águas em 1988 e 1989, a baixa precipitação (15 e 5 mm) no início do desenvolvimento das plantas, resultou em baixa severidade da doença (Maringoni, 1993). Comprovando dessa maneira que as condições de umidade relativa, relacionadas com a precipitação e temperatura são essenciais para o progresso da doença.

5.3 Taxa de progresso do cretamento bacteriano comum

As maiores taxas de progresso da doença foram obtidas para os tratamentos com 3,0 e 9,0% de nível de inóculo em outubro (0,15 e 0,36) (Figura 3) (Tabela 1) e 9,0% em novembro (0,12) (Figura 4).

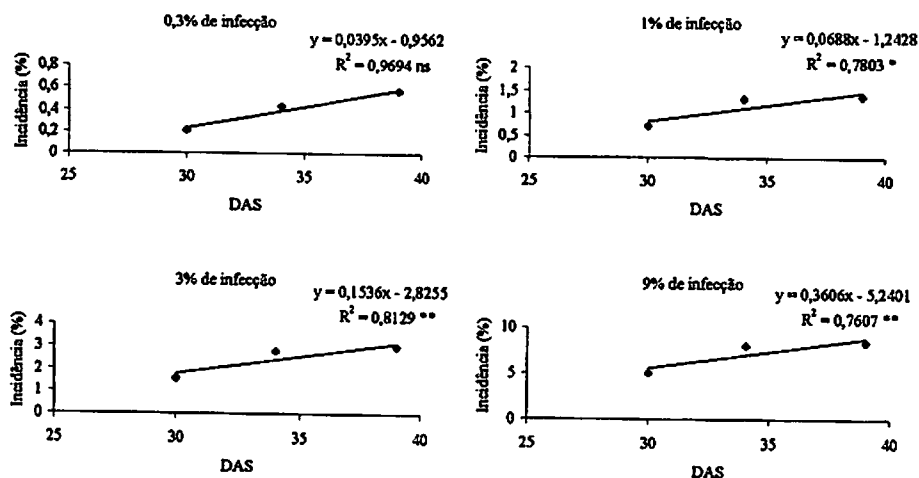


FIGURA 3. Dados reais (♦) e reta estimada pelo modelo linear (-) da incidência em outubro, em função dos dias após a semeadura (DAS), para os diferentes níveis de inóculo. ^{ns} (não significativo), significativo * (P<0,05) e ** (P<0,01). Lavras – MG, 2005.

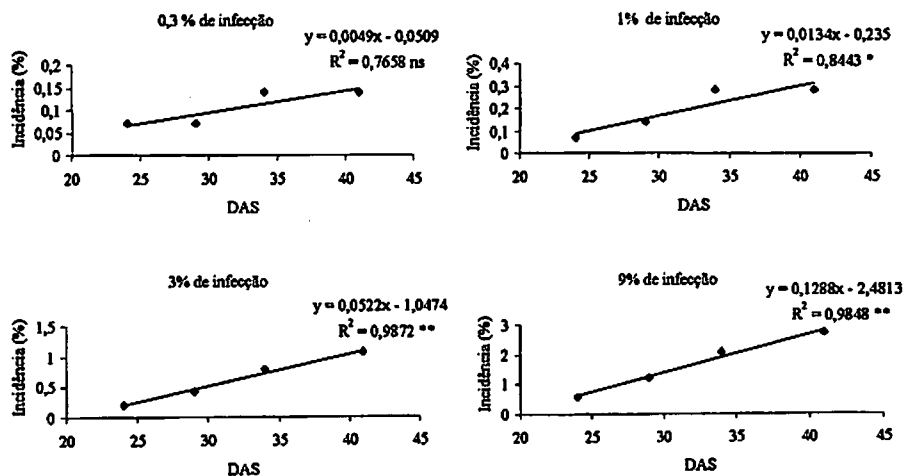


FIGURA 4. Dados reais (♦) e reta estimada pelo modelo linear (-) da incidência em novembro, em função dos dias após a semeadura (DAS), para os diferentes níveis de inóculo. ns (não significativo), significativo * ($P < 0,05$) e ** ($P < 0,01$). Lavras - MG, 2005.

TABELA 1. Taxa de progresso do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, para os diferentes níveis de inóculo em outubro e novembro de 2003. Lavras - MG, 2005.

Níveis de inóculo (%)	Taxa de progresso (r)	
	Outubro	Novembro
0,3	0,0395	0,0049
1,0	0,0688	0,0134
3,0	0,1536	0,0522
9,0	0,3606	0,1288

Em outros trabalhos, também foram obtidas taxas de progresso da incidência semelhantes, com valores variando de 0,12 a 0,25 e taxas da severidade de 0,12 a 0,19, para a cv. Carioca, em ensaios realizados em 1988, 1989 e 1990, em São Manuel, SP (Maringoni, 1993).

5.4 Correlação entre a incidência da doença e as variáveis climáticas

No cultivo das secas (maio), devido às condições ambientais desfavoráveis não houve incidência da doença. As temperaturas máxima, média e mínima foram de 25, 17 e 11° C, respectivamente, umidade relativa média de 70% e precipitação acumulada de 9 mm (Figura 5A). Para o ensaio realizado em outubro, não houve correlação significativa entre as variáveis ambientais e a incidência da doença, obtida aos quinze, dez e cinco dias anteriores às avaliações, assim, o progresso da doença não foi influenciado pelas condições ambientais.

Porém, para o ensaio realizado em novembro houve correlação negativa entre a incidência do CBC, a precipitação e umidade relativa obtida aos quinze dias anteriores a avaliação, para os níveis de inóculo 1, 3 e 9% (Tabela 2). A precipitação acumulada de 160 mm e a umidade relativa >80% ocorreram no final do mês de novembro estendendo-se até o 6º dia do mês de dezembro (Figura 5B), favorecendo à incidência da doença, neste período. No entanto, não houve correlação significativa entre a incidência da doença e a temperatura.

TABELA 2. Coeficiente de correlação entre a incidência do crestamento bacteriano comum e as variáveis climáticas, nos diferentes níveis de inóculo, para o plantio das águas (novembro de 2003). Lavras – MG, 2005.

Variáveis ambientais*	Níveis de inóculo nas sementes (%)		
	1	3	9
Pp (15)	- 0,99*	- 0,95*	- 0,98*
UR (15)	- 0,94*	- 0,89 ns	- 0,97*

Pp e UR (15) = precipitação e umidade relativa obtida aos 15 dias anterior à avaliação.

* significativo ($P < 0,05$); ns = não significativo.

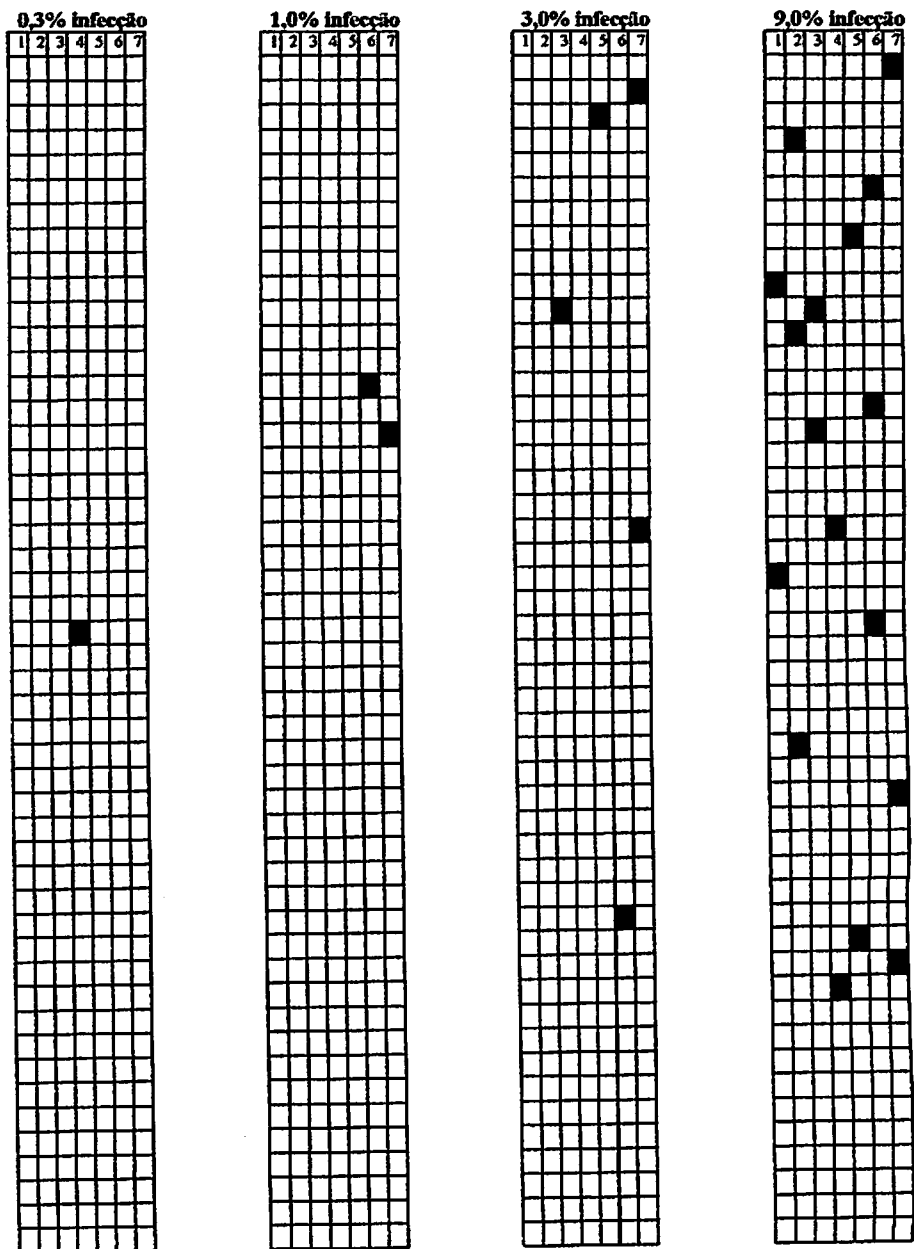


FIGURA 6. Mapas de distribuição espacial do crestamento bacteriano do feijoeiro (novembro de 2003). Cada quadro negro representa uma planta com sintoma da doença, proveniente de sementes naturalmente contaminadas, para níveis de inóculo 0,3, 1,0, 3,0 e 9,0%, aos 51 dias após a semeadura.

Normalmente sementes livres de Xap são semeadas, mas o CBC ocorre em locais onde não é feita a rotação de cultura, pois, a bactéria sobrevive nos restos vegetais, por pelo menos um ano (Schuster & Coyne, 1974). A presença dos restos vegetais infectados com Xap, como fonte de inóculo primário, foi mais importante no progresso da epidemia e na redução da produção, do que os solos infestados e as sementes infectadas, em ensaios realizados na Etiópia em 1997 e 1998 (Fininsa & Tefera, 2001).

Sementes com nível de inóculo de 0,5% (Wallen & Sutton, 1965) ou a população de 10^3 - 10^4 UFC/sementes (Weller & Saettler, 1980) foram suficientes para dar início à epidemia do CBC em variedades suscetíveis. Mas, o progresso da epidemia depende, além da população do patógeno, das condições ambientais e da suscetibilidade do hospedeiro (Maringoni, 1993).

O nível zero, de tolerância para Xap em sementes de feijão foi proposto pela COPASEM (Comitê de Patologia de Sementes), em 1995 (Nasser, 2002) e também para *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de pimentão (Carmo et al., 1996). Os EUA e o Canadá estabeleceram a análise sanitária de sementes de feijão, visando detectar Xap em lotes comerciais, além da inspeção em campos de produção, onde adotaram o nível zero de Xap nas sementes, para que estas sejam comercializadas (Copeland et al., 1975; Sheppard, 1983).

Embora não tenha ocorrido disseminação da doença, é importante salientar o nível de inóculo presente nas sementes, para o estabelecimento de padrões de tolerância com base em dados experimentais. De acordo com os ensaios realizados em Lavras para o cultivo das secas, os mais altos níveis de inóculo (9%) não influenciaram na disseminação do patógeno, sendo assim, sementes com esses níveis de inóculo poderiam ser utilizadas no plantio das secas, em Lavras. No entanto, estes resultados não podem ser aplicados para outras regiões onde o clima é diferente, nos quais são necessários outros ensaios, para o mais seguro estabelecimento de padrões de tolerância.

Para o cultivo das águas deve-se atentar pela presença do inóculo nas sementes, os quais com níveis de 3 e 9% de infecção apresentaram incidência do CBC, entretanto, não houve disseminação. As plantas podem não apresentar sintomas, mas a doença pode ser disseminada no campo antes do seu aparecimento (Weller & Saettler, 1980) e haverá progresso da epidemia se as condições ambientais forem favoráveis e se o hospedeiro for suscetível (Maringoni, 1993). Sendo assim, sementes com estes níveis de inóculo devem ser evitadas no plantio das águas. Outros estudos devem ser conduzidos para avaliar a interferência de Xap na produção do feijão.

Nas condições climáticas do estado de São Paulo é difícil obter sementes isentas de bactéria, devido ao uso de cultivares com baixa resistência à Xap. Isto seria possível, se as sementes fossem produzidas em regiões nas quais, o clima não favorecesse o progresso da doença, permitindo obter sementes com alto padrão sanitário (Maringoni et al., 1995). Outro ponto importante é a utilização sucessiva de sementes infectadas com Xap, principalmente por produtores que as utilizam em plantios subseqüentes, levando ao acúmulo progressivo da bactéria nas sementes produzidas (Maringoni et al., 1995). No estado de Minas Gerais a taxa de utilização de sementes é de apenas 12% (Anuário..., 2005), este índice é muito baixo, o que pode levar ao uso de sementes infectas nos plantios seguintes.

De acordo com os resultados obtidos, a região de Lavras seria um local adequado para produzir sementes de feijão com baixa incidência de Xap, para serem utilizadas nos estados de São Paulo e Paraná, uma vez que, as condições climáticas não são favoráveis para o progresso da doença, principalmente nos cultivos das secas. Assim, determinados lotes com incidência do CBC poderiam ser aproveitados, em uma época ou em uma região menos favorável ao progresso da doença.

6 CONCLUSÕES

Para o ensaio realizado na época da seca não houve progresso temporal e espacial da epidemia, devido às condições ambientais desfavoráveis.

As maiores curvas do progresso da doença e AACPI foram observadas para as sementes com 9% de inóculo, para os ensaios da época das águas. As maiores taxas do progresso da doença foram obtidas para as sementes com 3 e 9% do nível de inóculo.

Houve correlação da incidência da doença com a precipitação e umidade relativa, 15 dias anterior à avaliação, para os níveis de inóculo 1, 3 e 9%, no ensaio de novembro.

Não houve disseminação do patógeno para as plantas adjacentes com o aparecimento de novas plantas doentes. Somente as plantas provenientes de sementes artificialmente inoculadas ou naturalmente infectadas apresentaram sintomas do CBC, não havendo aumento da área foliar lesionada.

Os diferentes níveis de inóculo não interferiram na disseminação do CBC, para as condições de Lavras, embora tenha ocorrido transmissibilidade da semente para a planta.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ABRASEM. Pelotas: Associação Brasileira de Sementes e Mudanças, 2005. 89 p.

BAKER, K. F.; SMITH, S. H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 4, p. 311-334, 1966.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

BERGER, R. D. Application of epidemiological principles to achieve plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 15, p. 165-183, 1977.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H. et al. *Manual de fitopatologia*, São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 381-183.


CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: John Wiley, 1990. 532 p.

CARMO, M. G. F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 3, p. 336-341, Set. 1996.

COPELAND, L. O.; ADAMS, N. W.; BELL, D. C. An improved seed program for maintaining disease-free seed of field beans (*Phaseolus vulgaris*). *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 3, n. 3/4, p. 719-724, 1975.

DIAZ, C. G. Avaliação de danos causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 2000. 76 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

DIAZ, C. G.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A. Desenvolvimento e validação e uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*



em feijociro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 35-39, Jan./Mar. 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4,0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...**São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FININSA, C.; TEFERA, T. Effect of primary inoculum sources of bean common bacterial blight on early epidemics, seed yield and quality aspects. **International Journal Pest Management**, London, v. 47, n. 3, p. 221-225, July/Sept. 2001.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

GRABIELSON, R. L. Fungi: inoculum thresholds of seed-borne pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 868-872, 1988.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 155-177, 1990.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 126 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. (Dados não publicados).

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 375-398.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; MAFFIA, A. M. C. Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógenos por sementes. In:

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. Resumos...Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 114-122.

MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. 1993. 132 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, R.; KUROZAWA, C. Presença da *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 449-457, Set. 1995.

NASSER, L. C. B. Sanidade de sementes com referência à melhoria de qualidade na produção de sementes básicas no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. Resumos e palestras...Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. 198 p.

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

OLIVEIRA, J. R.; MOURA, A. B.; SOUZA, R. M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 113-134.

OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, R. M. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) controle de doenças causadas por bactérias. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas de grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 423-435.

OLIVEIRA, L. A.; SUDO, A.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R. L. D. AKIDA, F. Estudos preliminares para determinação do índice de tolerância máxima de contaminação de sementes de pimentão com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 153, Ago. 1990. (Resumo).

OPIO, A. F.; TERI, J. M.; ALLEN, D. J. Assessment of yield losses caused by common bacterial blight of beans in Uganda. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 35, p. 113-114, 1992.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 300 p.

SAETTLER, A. W. Common bacterial blight. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p. 28-29.

SCHAAD, N. W. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. **Bacteria. Phytopatology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 872-875, June 1988.

SCHAAD, N. W.; SITTERLY, W. R.; HUMAYDAN, H. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 91-92, Jan. 1980.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 199-221, 1974.

SHEPPARD, J. W. Historical perspectives of the disease-free seed, control and management of bacterial blights of beans in Canada. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 11, n. 3, p. 885-891, 1983.

SUTTON, M. D.; WALLEN, V. R. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* on bean in Southwestern Ontario, 1961-1968. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 48, n. 7, p. 1329-1334, 1970.

TRIGALET, A.; BIDAUD, P. Some aspects of epidemiology of bean halo blight. Station of Pathologie Vegetale et Phytopatologie. In: **INTERNACIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA**, 4., 1978, Anger. **Proceeding...Anger**, 1978. p. 895-902.

VALARINI, P. J.; GALVÃO, J. A. H.; OLIVEIRA, D. A. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* importância do inóculo da semente na epidemiologia do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 261-267, Jun. 1996.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

WALLEN, V. R.; JACKSON, H. R. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, n. 9, p. 942-948, Sept. 1975.

WALLEN, V. R.; SUTTON, M. D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh on field in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 437-446, 1965.

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, v. 70, n. 2, p. 148-152, Feb. 1980.