



LEIMI KOBAYASTI

**INOCULAÇÃO, TRANSMISSÃO E DETECÇÃO
POR BIO-PCR DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
phaseoli EM SEMENTES DE FEIJÃO**

LAVRAS – MG

2012

LEIMI KOBAYASTI

**INOCULAÇÃO, TRANSMISSÃO E DETECÇÃO POR BIO-PCR DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS - MG

2002

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Kobayasti, Leimi.

Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* em sementes de feijão /
Leimi Kobayasti. – Lavras : UFLA, 2012.
126 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2002.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Técnica de restrição hídrica. 3.
Sementes. 4. Infecção. 5. Pré-condicionamento. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.652932

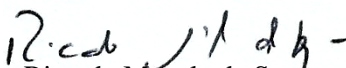
LEIMI KOBAYASTI

**INOCULAÇÃO, TRANSMISSÃO E DETECÇÃO POR BIO-PCR DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de abril de 2002.

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Dr. Antônio Carlos Maringoni | UNESP |
| Dra. Alessandra de Jesus Boari | UFLA |
| Dr. Edson Ampélio Pozza | UFLA |
| Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho | UFLA |


Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2002

Pode ser que um dia deixemos de nos falar...
Mas, enquanto houver amizade,
Faremos as pazes de novo

Pode ser que um dia o tempo passe...
Mas, se a amizade permanecer
Um do outro há de se lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...
Mas, se fomos amigos de verdade,
A amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos...
Mas, se ainda sobrar amizade,
Nascemos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe...
Mas, com a amizade, construiremos tudo de novamente,
Cada vez de forma diferente,
Sendo único e inesquecível cada momento
Que juntos viveremos e nos lembraremos pra sempre.

Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existem milagres
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.
(Albert Einstein)

Ao amor inocente de
Fernando e Patrick,
Meus sobrinhos,
DEDICO

À minha família,
Aos meus amigos,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudos;

Ao Professor Ricardo Magela de Souza, pela orientação, exemplo profissional e amizade;

Aos membros da banca examinadora, Professores Édila Vilela Resende Von Pinho, Alessandra de Jesus Boari, Antônio Carlos Maringoni, Edson Ampélio Pozza, pelas críticas e sugestões apresentadas;

Ao Laboratório de Tecnologia de Sementes, pela colaboração recebida;

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Milho e Sorgo), pelas sementes cedidas;

Aos Professores, funcionários e técnicos do Departamento de Fitopatologia, pelo apoio e incentivo;

À Ana Maria dos Santos Castro, pela amizade, companheirismo em todos os momentos e pela indispensável contribuição neste trabalho;

Ao amigo e colega, Vespasiano Paiva Neto, pela colaboração;

À minha família, por todo incentivo e presença;

Ao Arnaldo, pessoa especial que me transmitiu força, carinho e apoio em momentos cruciais desta etapa;

Aos amigos imprescindíveis, Cacilda Márcia, Oneida, Jane Perez, Gutemberg Barone, Alessandra Ishida, Alessandra Boari, Marlúcia, Andréia Quixabeira, Cláudia Labory, Gislaine de Oliveira, Érica, Juscélio, Juliana Campos e Juliana Barbosa, com os quais vivi muitos momentos de alegria e descontração, e me transmitiram carinho, força, apoio em todos os momentos;

A todos aqueles com os quais convivi durante minha permanência na cidade de Lavras, pois cada um proporcionou-me uma alegria especial neste lugar e de forma direta ou indireta, e contribuíram para a realização deste trabalho;

A Deus, pelo milagre da vida;

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O crestamento bacteriano (CB) do feijoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) assume importância econômica devido à sua ampla distribuição, difícil controle, e pela semente ser o principal meio de sobrevivência e disseminação do patógeno. Estudos de epidemias e de métodos de controle poderão ser conduzidos se houver disponibilidade de lotes de sementes uniformemente contaminadas com Xap e o seu poder germinativo for preservado. Assim, os objetivos do autor com este trabalho foi o de desenvolver uma técnica para inoculação artificial de sementes de feijão com Xap pelo uso da restrição hídrica do meio de cultura, mantendo-se o poder germinativo das sementes, e adaptar a técnica de Bio-PCR para detecção da bactéria a partir de extratos de sementes. Os resultados indicaram que a restrição hídrica do meio 523 pelo uso do manitol constituiu uma técnica viável para inoculação de Xap em sementes de feijão, pois se manteve a porcentagem de germinação; os períodos de exposição à bactéria, de 24 e 36 h durante a inoculação sob restrição hídrica, permitiram maior porcentagem de detecção e transmissão do patógeno. Maior porcentagem de sementes infectadas e maior porcentagem de transmissão de Xap para os cotilédones e folhas primárias foram observadas para a cultivar Carioca. A Bio-PCR modificada permitiu a amplificação do fragmento de DNA característico de Xap a partir de uma colônia com 72 h de incubação com repetibilidade. Foi possível detectar uma semente infectada em lotes de 10, 100, 500 e 1000 sementes consideradas sadias.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscan*. Técnica de restrição hídrica. Crestamento bacteriano. Pré-condicionamento de sementes.

ABSTRACT

The common bacterial blight (CBB) of the bean caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) assumes economical importance due to its wide distribution, difficult control, and because the seed is the pathogen's principal mean of survival and dissemination. Studies of epidemics and control methods may be conducted if lots of seeds uniformly contaminated with Xap are available and its germination power is preserved. Thus, the objectives of this work were to develop a technique for artificial inoculation of the bean seeds with Xap, using water restriction on the culture medium, maintaining the germination power of the seeds, and optimizing the Bio-PRC technique for the detection of bacteria from seed extracts. The results indicated that the water restriction of the medium 523 using mannitol constituted a viable technique for Xap inoculation in bean seeds, since it maintained germination percentage; the periods of exposure to the bacteria, of 24 and 36 hours during the inoculation under water restriction, allowed a larger percentage of detection and transmission of the pathogen. A larger percentage of infected seeds and larger percentage of Xap transmission to the cotyledons and primary leaves were observed for the Carioca cultivar. The modified Bio-PCR allowed the amplification of the DNA fragment characteristic of Xap from a colony with 72 hours of incubation with repeatability. It was possible to detect an infected seed in lots of 10, 100, 500 and 1000 seeds considered healthy.

Key words: *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Water restriction technique. Bean bacterial blight. Seed pre-conditioning.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Carioca, com desinfestação e sem desinfestação superficial, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica 71
- Figura 2 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Pérola, com desinfestação, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica 73
- Figura 3 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Pérola, sem desinfestação superficial, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica 74
- Figura 4 Determinação do grau de umidade de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA-2R, por diferentes períodos de exposição em meio sob restrição hídrica 81

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para avaliação da sensibilidade na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, a partir de colônias com diferentes períodos de incubação 110

- Figura 2 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Carioca 114
- Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Carioca 114
- Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Pérola 118
- Figura 5 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Pérola 119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Caracterização da qualidade inicial das sementes de feijão 56
- Tabela 2 Concentrações de PEG 6.000 e manitol no meio de cultura básico para a obtenção dos respectivos níveis de restrição hídrica 58
- Tabela 3 Germinação de sementes de feijão da cv. Carioca após pré-condicionamento em meio agarizado mais soluto sob diferentes níveis de restrição hídrica 68
- Tabela 4 Germinação de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, após pré-condicionamento em meio agarizado sob diferentes níveis de restrição hídrica 76
- Tabela 5 Determinação do grau de umidade de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA-2R (Xap), com 36 h de exposição, sementes com o meio de cultura 82
- Tabela 6 Detecção em meio semisseletivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em sementes de feijão inoculadas artificialmente 84
- Tabela 7 Transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em substrato estéril, a partir de sementes inoculadas artificialmente das cvs. Carioca e Pérola 89

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão cultivar Carioca submetidas à Bio-PCR 111

Tabela 2 Número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão cultivar pérola, submetidas à Bio-PCR 116

APÊNDICE A

Tabela 1 Resumo da análise de variância para sementes da cultivar Carioca submetida a diferentes níveis de restrição hídrica 125

Tabela 2 Resumo da análise de variância para sementes da cultivar Pérola submetida a diferentes níveis de restrição hídrica 125

Tabela 3 Resumo da análise de variância para isolados bacterianos submetidos a diferentes níveis de restrição hídrica 126

Tabela 4 Resumo da análise de variância da determinação do grau de umidade da cv. Carioca das sementes inoculadas artificialmente com Xap de 48 horas de crescimento em meios contendo manitol nos diferentes potenciais hídricos 126

Tabela 5 Resumo da análise de variância da determinação do grau de umidade da cv. Pérola, sementes inoculadas artificialmente com Xap de 48 horas de crescimento em meios contendo manitol nos diferentes potenciais hídricos 126

LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACOES???

| | |
|-------------------|---|
| A ₆₀₀ | Absorbância em comprimento de onda igual a 600 nm |
| CB | Crestamento bacteriano |
| cv. | Cultivar |
| EtBr | Brometo de Etídio |
| Fg | Fentograma |
| IF | Imunofluorescência |
| Kb | Kilobase |
| KCl | Cloreto de potássio |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| MM | Milimolar |
| MPa | Megapascal |
| NaOCl | Hipoclorito de sódio |
| ND | Não determinado |
| NGA | Nutriente-glicose-gar |
| Nmoles | Nanomoles |
| Pg | Picograma |
| Pb | Pares de bases |
| pH | Potencial de Hidrognio |
| Psp | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> |
| pv. | Patovar |
| TBE | Tris-borato EDTA |
| u.f.c. | Unidades Formadoras de Colônias |
| Xap | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------|--|
| DIA | <i>Dot Immunobinding Assay</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 Introdução Geral..... | 18 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 21 |
| 2.1 Considerações gerais..... | 21 |
| 2.2 Inoculação artificial de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes..... | 23 |
| 2.2.1 Utilização de solutos na germinação de sementes..... | 24 |
| 2.3 Transmissão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para sementes..... | 30 |
| 2.4 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes.... | 32 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |
| CAPÍTULO 2 Inoculação, transmissão e detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão..... | 49 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 51 |
| 1.1 Transmissão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para sementes..... | 53 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 55 |
| 2.1 Origem e caracterização das sementes utilizadas..... | 55 |
| 2.2 Obtenção e multiplicação do isolado de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> | 56 |
| 2.3 Preparo do meio de cultura básico..... | 57 |
| 2.4 Pré-condicionamento de sementes de feijão em meio agarizado sob restrição hídrica..... | 58 |
| 2.4.1 Ensaio I..... | 58 |
| 2.4.2 Ensaio II..... | 59 |
| 2.4.3 Germinação das sementes de feijão após o pré-condicionamento em meios agarizados sob restrição hídrica..... | 60 |
| 2.5 Seleção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , resistente a rifampicina 1000 ppm, a partir do isolado Xap/UFLA-2..... | 61 |
| 2.6 Crescimento bacteriano de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica..... | 62 |
| 2.7 Inoculação artificial de sementes de feijão com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meio de cultura sob restrição hídrica..... | 63 |
| 2.7.1 Inoculação artificial..... | 64 |
| 2.7.2 Determinação do grau de umidade das sementes inoculadas..... | 64 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.7.3 | Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijão inoculadas artificialmente por meio de plaqueamento em meio semi-seletivo | 65 |
| 2.7.4 | Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes inoculadas artificialmente sem posterior desinfestação externa | 65 |
| 2.7.5 | Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes inoculadas artificialmente com posterior desinfestação externa | 66 |
| 2.7.6 | Germinação das sementes de feijão inoculadas artificialmente e transmissão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação | 67 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 3.1 | Pré-condicionamento de sementes de feijão em meio agarizado sob restrição hídrica | 68 |
| 3.1.1 | Germinação das sementes de feijão após pré-condicionamento em meios agarizados sob restrição hídrica | 76 |
| 3.2 | Seleção de um mutante de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , resistente a rifampicina a 1000 ppm | 77 |
| 3.3 | Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meio agarizado sob diferentes níveis de restrição hídrica | 78 |
| 3.4 | Inoculação artificial de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , isolado UFLA-2R em sementes de feijão sob restrição hídrica | 80 |
| 3.4.1 | Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> UFLA-2R em sementes de feijão inoculadas artificialmente por meio de plaqueamento em meio semi-seletivo | 83 |
| 3.4.2 | Germinação de sementes de feijoeiro inoculadas artificialmente, e transmissão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para plântulas | 87 |
| 4 | CONCLUSÕES | 91 |
| | REFERÊNCIAS | 92 |
| | CAPÍTULO 3 Otimização da Bio-PCR para detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de extratos de sementes de feijão | 98 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 100 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 103 |
| 2.1 | Determinação da sensibilidade da técnica de Bio-PCR | 103 |
| 2.2 | Preparo das amostras de sementes de feijão, extração e detecção do patógeno | 104 |
| 2.3 | Teste da PCR | 105 |
| 2.4 | Eletoforese e fotodocumentação | 106 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 107 |
| 3.1 | Determinação da sensibilidade da técnica de Bio-PCR | 107 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 3.2 | Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de extratos de sementes de feijão | 111 |
| 4 | CONCLUSÕES | 122 |
| | REFERÊNCIAS | 123 |
| | APÊNDICES | 125 |

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é a principal fonte de proteína vegetal do povo brasileiro, seu maior consumidor mundial. Além disso, é boa fonte de calorias, vitaminas e minerais, como fósforo, potássio, cálcio e magnésio (SGARBIERI, 1987). O feijoeiro comum é cultivado em praticamente todo o território nacional, tendo como produtividade média apenas 500 kg/ha, embora seu potencial seja de 3000 a 3500 kg/ha. Entre as causas dessa baixa produtividade, as doenças de origem fúngica, bacteriana e virótica desempenham papel importante (SARTORATO, 2000).

Dentre os patógenos bacterianos, destaca-se *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) (VAUTERIN et al., 1995), agente etiológico do crestamento bacteriano (CB), o qual afeta a produção do feijoeiro em diferentes partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais. Perdas acima de 40% na produção são atribuíveis ao CB e têm sido relatadas nas Américas do Norte e Sul (WALLEN; JACKSON, 1975). No Brasil, a doença assume importância econômica, principalmente, no cultivo das "águas", sendo de ampla distribuição e de difícil controle pelo fato de os agentes etiológicos terem a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação (VALARINI; MENTEN, 1992a).

Experimentos desenvolvidos no Canadá demonstraram que uma semente infectada em um lote de 10.000 foi suficiente para resultar em epidemias da doença no campo (SUTTON; WALLEN, 1970). Estudos dessa natureza, bem como de métodos de controle dessa fitobacteriose, poderão ser regularmente conduzidos no Brasil se houver disponibilidade de lotes de sementes uniformemente contaminadas, existindo, portanto, a necessidade de desenvolver

uma técnica em que as sementes inoculadas artificialmente tenham um alto poder de germinação, mesmo após a inoculação. A técnica deve ser eficiente, prática e de fácil execução para estudos futuros relacionados à transmissão de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) pelas sementes e sua importância em epidemias, visando a obtenção de padrões de sanidade de sementes, bem como a determinação da sensibilidade de métodos para detecção de patógenos em sementes (VALARINI; MENTEN, 1991).

O desenvolvimento de cultivares resistentes e o uso de sementes livres do patógeno são os métodos mais eficientes de controle do CB. Entretanto, o sucesso desses programas depende da confiabilidade dos métodos empregados para a detecção do patógeno em feijoeiro (CAFATI; SAETTLER, 1980).

Análises para identificação e quantificação da bactéria em tecidos de feijoeiro pelo plaqueamento em meio seletivo e semisseletivo, uso de bacteriófagos, imunotécnicas e inoculação em hospedeiros são válidas, entretanto são laboriosos e não são suficientemente precisos para uso em rotina (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989). Diversos pesquisadores têm estudado técnicas moleculares para detecção de bactérias, como, por exemplo, as sondas de ácidos nucleicos e a reação da polimerase em cadeia (PCR). Os resultados têm sido animadores, principalmente com relação à PCR, uma vez que oferece várias vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de diagnose. Uma modificação dessa técnica, que combina o crescimento em meio de cultura e PCR, chamada de Bio-PCR, é rápida, versátil e altamente sensível, podendo detectar uma simples célula bacteriana em um complexo de misturas (HENSON; FRENCH, 1993). Essa nova técnica, ainda não adaptada para as nossas condições, em um futuro próximo, após a sua adaptação poderá ser uma ferramenta útil para detectar Xap a partir de lotes de sementes de feijoeiro.

Deste modo, o objetivo com este trabalho foi:

- a) Avaliar a influência de polietileno glicol e manitol no crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro* e na germinação de sementes de feijão;
- b) Desenvolver uma técnica para inoculação artificial de sementes de feijão, mantendo o poder germinativo das mesmas;
- c) Verificar a transmissão de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de sementes de feijão inoculadas artificialmente para as plantas;
- d) Adaptar a técnica de Bio-PCR para detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

O feijão é o alimento "típico" do brasileiro, sendo sua principal fonte de proteínas. Apesar de sua importância, a produção não tem acompanhado o consumo e nem a produtividade tem aumentado de modo significativo, estando longe da alcançada pelos produtos chamados de exportação (FEIJÃO..., 2000). O Brasil tem produzido, nos últimos anos, em torno de 2,2 a 2,5 milhões de toneladas em aproximadamente cinco milhões de hectares cultivados (AGRIVISION, 2000; ROSTON; PIZAN, 2000).

De acordo com Sartorato (2000), entre os fatores que contribuem para essa baixa produtividade, encontram-se as doenças que, em alguns casos, constituem fator limitante para a cultura. Segundo Maffia, Carmo e Katsurayama (1988), aproximadamente 108 fungos, 24 nematoides, 19 vírus e 17 bactérias são citados como patógenos do feijoeiro. Desses, uma minoria é bastante importante em condições brasileiras, destacando-se o *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose), *Uromyces phaseoli* (ferrugem), *Phaeoisariopsis griseola* (mancha angular), *Alternaria sp.* (mancha de Alternaria) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (crestamento bacteriano).

O crestamento bacteriano (CB) causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) (VAUTERIN et al., 1995) foi descrito no final do século passado, nos E.U.A., sendo constatado pela primeira vez no Brasil em 1938 e descrito por Robbs (1954). Existe um isolado conhecido como a variante fuscans, que apresenta sintomas semelhantes no campo e pode ser diferenciada apenas pelo cultivo dos microrganismos em meio de cultura no qual a mesma produz um pigmento marrom difusível (OLIVEIRA; SOUZA, 1997). Esta bactéria 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; MARINGONI; CARNEIRO, 1997).

Perdas na produção devido ao CB foram estimadas em cerca de 10 a 40% em cultivares suscetíveis (OPIO; TERI; ALLEN, 1992; SERRACIN et al., 1991; WALLEN; JACKSON, 1975). Nas condições brasileiras, não existem estimativas de perdas de produção causadas por essa doença, embora campos de produção de feijão bastante comprometidos já tenham sido observados (OLIVEIRA; SOUZA, 1997).

Vários métodos químicos e culturais têm sido empregados para o manejo da doença, incluindo a produção de sementes livres do patógeno e o desenvolvimento de cultivares resistentes, mas nenhum é completamente seguro e prático nos países onde a doença é particularmente severa (OPIO; TERI; ALLEN, 1993; SAETTLER, 1989). A procura de fontes de resistência em *P. vulgaris* tem levado à identificação da resistência parcial, a qual é usualmente encontrada como um fator herdado quantitativamente (BEEBE, 1989; COYNE; SCHUSTER, 1974; WEBSTER; TEMPLE; SHWARTZ, 1980). Vários autores têm relatado a existência de variação na patogenicidade dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), sendo esta demonstrada dentro e entre regiões geográficas (ÁVILA et al., 1998; SCHUSTER; COYNE; HOFF, 1973; VALLADARES-SANCHEZ; COYNE; SCHUSTER, 1979).

A bactéria sobrevive por longos períodos em sementes de feijoeiro (SCHUSTER; COYNE, 1977), restos de culturas infectadas (ARNAUD-SANTANA et al., 1991), ervas daninhas, além de várias outras plantas hospedeiras (BRADBURY, 1986). Dessa forma, entre as medidas de controle com resultados satisfatórios está a utilização de sementes com elevado padrão de sanidade, assegurando uma cultura inicialmente livre de doenças (BULISANI; ALMEIDA; BOSTON, 1987). Devido à ocorrência de epidemias em campo a

partir de sementes com baixa incidência da bactéria, torna-se importante contar com métodos eficientes e rápidos para detecção de Xap em lotes de sementes de feijão (VALARINI; MENTEN, 1992b), uma vez que a diagnose em campo, baseada nos sintomas visuais, apresenta limitações, principalmente pelo fato de o patógeno sobreviver em tecidos de plantas resistentes sem causar sintomas (CAFATI; SAETTLER, 1980). Existe ainda a possibilidade de isolados não patogênicos de a bactéria colonizarem plantas e restos de feijoeiros (GILBERTSON et al., 1989), complicando posteriormente a identificação de isolados patogênicos.

2.2 Inoculação artificial de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes

Várias metodologias têm sido estudadas para a inoculação artificial de Xap em sementes de feijoeiro. O emprego deste artifício na avaliação de testes de sanidade de sementes auxilia no desenvolvimento de métodos de controle e nos estudos de epidemias de fitobacterioses, os quais poderão ser mais regularmente conduzidos dependendo da disponibilidade de lotes de sementes uniformemente contaminadas. Pode ser útil, ainda, na verificação da localização do patógeno nas sementes e na determinação do seu efeito sobre a qualidade fisiológica da mesma, assegurando, assim, resultados experimentais mais próximos da realidade (VALARINI; MENTEN, 1991).

Dentre os métodos usados para a inoculação de fitobactérias em sementes, o mais freqüente tem sido a imersão das mesmas em suspensão bacteriana (GROTH; BRAUN, 1989), onde a associação da bactéria com a semente seja, provavelmente, somente externa (VALARINI; MENTEN, 1991). Por outro lado, há a preocupação de se padronizar em métodos de inoculação para finalidades específicas, mas que reflitam de modo mais próximo às

condições naturais no campo (AGGOUR; COYNE; VIDAVER, 1989), ou mesmo que se estabeleça uma associação mais próxima do natural (VALARINI; MENTEN, 1991).

Valarini e Menten (1991) obtiveram o nível de 100% de contaminação de sementes de feijão inoculadas artificialmente com Xap após um período de 36 h de contato bactéria-semente. Entretanto, esse tempo foi suficiente para reduzir significativamente o poder germinativo das mesmas.

De acordo com Marques et al. (1994), a melhor técnica de inoculação de sementes com Xap foi a pulverização da suspensão bacteriana em ráceros de vagens imaturas precedidas de ferimentos, com taxa de 90,4% de sementes contaminadas, seguida de pulverização em flores expandidas com 86,8% de sementes contaminadas.

As técnicas de inoculação artificiais apresentadas até o momento têm reduzido consideravelmente o poder germinativo das sementes (VALARINI; MENTEN, 1991). Entretanto, pesquisadores relataram a utilização em sementes, de soluções aquosas, de polietileno glicol e alguns tipos de sais, os quais proporcionaram ambientes osmóticos que restringiu a embebição das sementes, enquanto permitiu a difusão das soluções para o embrião, melhorando a germinação e a emergência de várias espécies de plantas (KHAN; PECK; SAMIMY, 1981).

2.2.1 Utilização de solutos na germinação de sementes

O crescente interesse em tratamentos que envolvam o início das atividades pré-germinativas levou ao desenvolvimento de várias técnicas que permitem controlar a hidratação e a germinação das sementes. Entre estas, destaca-se a técnica do condicionamento osmótico, relatada para semente de diferentes espécies (BRACCINI, 1996), também referida como 'priming'

(HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975) ou condicionamento fisiológico (VASQUEZ, 1995).

A técnica do condicionamento osmótico consiste em colocar as sementes em contato com um substrato, com o potencial hídrico ajustado para as sementes absorverem até um determinado nível, em que todos os processos preparatórios à germinação ocorram sem, contudo, ser atingida a fase de alongamento celular e, conseqüentemente, a da emissão da radícula (BRADFORD, 1986).

De acordo com Bradford (1986), uma semente seca em equilíbrio higroscópico, com uma atmosfera de 50% de umidade relativa, pode ter um potencial hídrico em torno de -100 MPa. Tal fato propicia uma ampla faixa de gradiente hídrico favorável à absorção de água pela semente, quando esta é colocada em água pura ($\psi = 0$) ou em substratos com potenciais hídricos maiores que -2,0 MPa.

Da mesma forma, se uma célula microbiana apresenta um potencial hídrico menor que o ambiente ao seu redor, a célula absorverá água até o equilíbrio se estabelecer. O processo inverso também é válido, e se esta condição persistir, resultará em perda de turgor, com posterior dessecação e morte da célula, a não ser que o microrganismo desenvolva mecanismos de osmoregulação ou estruturas de resistência, conferindo proteção à perda de água (COOK; PAPENDIK, 1978).

A osmoregulação ou o ajustamento osmótico é o fenômeno pelo qual as células ajustam-se à grandes mudanças no potencial osmótico do ambiente, por meio de uma regulação das quantidades de solutos osmoticamente compatíveis no seu interior (SALISBURY; ROSS, 1991). O acúmulo de solutos é encontrado em bactérias, fungos e animais, indicando que a maioria ou todos os organismos é capaz de ajustes osmóticos até certo ponto (THOMAS et al., 1995).

Com relação ao processo de germinação, este é influenciado por uma série de fatores internos à semente, como dormência, e externos, como temperatura, disponibilidade de água e de oxigênio (BEWLEY; BLACK, 1994). Certas condições favoráveis são necessárias para que ocorra a germinação e esta seja bem sucedida (POPINIGIS, 1977).

A semente seca, em estado quiescente, é caracterizada por possuir um baixo conteúdo de água e por ser quase inativa metabolicamente (MAYER; POLJAKOFF-MAYVER, 1989). A entrada de água na semente constitui a primeira etapa de uma série de eventos, como a ativação enzimática, degradação, translocação e consumo de material de reserva, que culmina com a retomada do crescimento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994). A velocidade de rehidratação da semente depende, entre outros fatores, da espécie, da permeabilidade do tegumento à água, da composição química da semente, da disponibilidade hídrica no estado líquido ou gasoso, da temperatura, da pressão hidrostática (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988), do grau de umidade inicial (HOBBS; OBENDORFF, 1972) e da qualidade fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988). A característica estrutural da semente também é fator importante, pois certas espécies de leguminosas, como *Vicia* sp. e *Phaseolus* sp., absorvem mais água pela micrópila do que pelo resto do tegumento (BEWLEY; BLACK, 1994).

Vários produtos já foram utilizados para o ajuste do potencial hídrico de substratos, envolvendo o estudo de condicionamento osmótico de sementes de diferentes espécies. Entre estes, citam-se sais como $MgSO_4$, $NaCl$, $MgCl_2$, K_3PO_4 , KH_2PO_4 , glicerol, manitol e polietileno glicol (PEG) (PILL, 1994).

O potencial hídrico de uma solução é designado de osmótico (ψ_s) e refere-se ao nível de energia da água em solução. Para soluções verdadeiras, como, por exemplo, de sais e manitol, o potencial osmótico da solução pode ser calculado pela fórmula de Van't Hoff (SALYSBURY; ROSS, 1991). Entretanto,

de acordo com Steuter, Mozafar e Goodin (1981), as forças matriciais são os principais componentes do potencial hídrico de meios de PEG. Uma equação empírica foi deduzida para calcular as relações entre temperatura, potencial hídrico e concentração de PEG 6000 (MICHEL; KAUFMANN, 1973). De acordo com estes autores, há efeito sinérgico no potencial hídrico de preparações de PEG na presença de outros solutos. Assim, o potencial hídrico de preparações de PEG em mistura com outros solutos, sais e manitol, por exemplo, é mais negativo do que a soma dos valores individuais de cada soluto.

Sais e manitol têm sido extensivamente utilizados como solutos osmóticos, mas ambos podem ser absorvidos pelas sementes, resultando em alteração do gradiente de potencial hídrico e efeitos tóxicos em alguns casos. Consequentemente, por ser de alto peso molecular, o PEG (6000 a 8000) é amplamente utilizado para controlar o potencial hídrico do meio externo em estudos envolvendo a germinação de sementes (BRADFORD, 1995).

Prisco e Oleary (1970) constataram que o PEG (Carbowax 1540) foi mais efetivo em inibir a emissão de radícula de sementes de feijoeiro quando comparado com soluções de NaCl, pois causou efeitos tóxicos. Del Giúdice (1996) evidenciou, em seus estudos, que preparações de PEG 6000 foram mais efetivas em inibir emissão de radículas de sementes de soja quando comparadas com soluções de manitol em potenciais osmóticos similares.

Carvalho (1999), utilizando BDA, pôde observar a emissão de radículas em sementes de feijoeiro; esta foi reduzida pela adição de manitol e de PEG 6000 e completamente inibida na restrição hídrica de -1 MPa. Com relação à germinação das sementes, o tempo de exposição de 168 horas sobre o BDA + PEG 6000, à restrição hídrica de -1 MPa, causou maiores prejuízos quando comparados com BDA + manitol, na mesma restrição hídrica e pelo mesmo período de tempo, embora este também tenha causado prejuízo à germinação das sementes.

Interesses específicos de alguns pesquisadores têm levado ao desenvolvimento de trabalhos relacionando respostas fúngicas e estresse hídrico induzidos em diferentes substratos (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996; COOK; PAPENDICK, 1972; GAO; SHAIN, 1995).

O ajuste do potencial hídrico de substratos agarizados em relação ao desenvolvimento de microrganismos normalmente é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como CaCl_2 (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996), KCl , sacarose ou mistura de sais (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996; GAO; SHAIN, 1995), ou pela adição de PEG (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996; BROWNELL; SCHNEIDER, 1985), que são mais utilizados em meios líquidos, pois o ágar não se solidifica em altas concentrações de PEG, como verificado por Brownell e Schneider (1985).

Mexal e Reid (1973) relataram que o PEG 4000 é um soluto apropriado para induzir estresse hídrico em fungos, pois embora possa ser absorvida em menor extensão, não é metabolizado como os açúcares e não é tóxico em altas concentrações, como os sais podem ser.

Gao e Shain (1995) monitoraram o crescimento micelial e a germinação de conídios de seis raças de *Cryphonectria parasitica* em meio contendo farinha de milho e ágar, osmoticamente ajustado com NaCl , KCl , sacarose, ou uma mistura de sais de $\text{NaCl-KCl-Na}_2\text{SO}_4$. Houve crescimento micelial sobre os meios contendo KCl ou sacarose em potenciais osmóticos acima de -2 MPa, porém, foi inibido no meio contendo sódio. Entretanto, a germinação conidial foi mais sensível quando comparada com o crescimento micelial sobre o meio com sódio; e os conídios foram mais tolerantes se comparados com o micélio nos potenciais osmóticos menores que -2 MPa, quando o meio foi ajustado com KCl ou sacarose. Conídios de todas as raças germinaram sobre os meios ajustados a -6 MPa.

Alam, Joyce e Wearing (1996) observaram que o diâmetro médio de colônias de *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*, crescidas em meio de cultura modificado pela adição de vários solutos osmóticos, foi estimulado na faixa de -0,36 MPa a -1 MPa, ao passo que, em valores mais negativos, o diâmetro médio de colônias diminuiu progressivamente. Segundo esses mesmos autores, o efeito estimulador no crescimento das colônias desses patógenos, nessa faixa de potencial osmótico, foi devido à absorção de solutos e a um melhor ajuste osmótico das células fúngicas, proporcionando maior turgor para a extensão celular.

Carvalho (1999), trabalhando no desenvolvimento de uma metodologia para inoculação artificial de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão, verificou o aumento da restrição hídrica do BDA com PEG 6000, o qual afetou negativamente o crescimento radial de colônias de *C. lindemuthianum*, enquanto, com manitol, este crescimento foi estimulado até a restrição hídrica de -0,8 MPa.

Este mesmo autor verificou, também, que o uso da restrição hídrica do BDA com manitol constitui uma técnica viável para aumentar a eficiência de inoculação do patógeno em sementes de feijoeiro, pois a associação do fungo com a semente aumenta com o período de exposição das sementes ao inóculo.

Pesquisadores têm buscado a erradicação de bactérias infectando as sementes pela introdução de antibióticos no seu interior. Isto pode ser feito com soluções aquosas, que permitem uma rápida embebição das sementes e a subsequente secagem das mesmas para armazenamento. Entretanto, essa prática vem causando redução na germinação e no vigor. Alternativamente, os antibióticos podem ser introduzidos nas sementes com solventes orgânicos, mas estes, ou falham na penetração dos tecidos embrionários ou danificam o embrião, provavelmente Devido ao rompimento da membrana celular (HALLOIN; MINTON; PETERSON, 1978).

Soluções aquosas com PEG proporcionam um ambiente osmótico que restringe a embebição das sementes e, ao mesmo tempo, permite a difusão da solução no embrião. Assim, Liang, Halloin e Saettler (1992) trabalharam com sementes de feijão, infestadas internamente ou não com Xap, utilizando PEG e glicerol como carregadores de antibióticos para redução do patógeno. O trabalho consistiu na imersão de sementes em soluções de PEG ou glicerol, bem como em soluções desses materiais contendo estreptomicina, tetraciclina e clorotetraciclina. A imersão em soluções de PEG 25% ou glicerol a 60% não diminuiu a germinação, enquanto o vigor da plântula foi levemente reduzido. As soluções de PEG foram mais efetivas que as de glicerol para a introdução dos antibióticos dentro das sementes. Entretanto, concentrações de tetraciclina e clorotetraciclina em soluções de PEG que efetivamente reduziram Xap foram fitotóxicas. Soluções de PEG com estreptomicina reduziram, mas não erradicaram a população interna da bactéria nas sementes naturalmente contaminadas e causaram poucos efeitos fitotóxicos.

2.3 Transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* para sementes

A semente constitui eficiente veículo de sobrevivência e disseminação de Xap a longas distâncias, servindo como fonte de inóculo inicial para introdução e desenvolvimento de epidemias sob condições de campo (SAETTLER; PERRY, 1972). Segundo Neegaard (1979), o patógeno pode sobreviver de 1 a 15 anos nas sementes de feijão.

No Brasil, Valarini (1990) detectou 0,7 a 0,1% de incidência de Xap em sementes da cv. Rio Tibagi armazenadas por três a quatro anos, respectivamente. Por outro lado, para avaliar a eficiência da semente de feijão como veículo de transmissão e disseminação do patógeno, estudos citados por Kimati (1980) mostraram que 0,5% de sementes infectadas em um lote foi suficiente para

desencadear epidemia no campo. Já Weller e Saettler (1980) demonstraram experimentalmente que uma população mínima de 10^3 a 10^4 u.f.c. de Xap na superfície das sementes foi suficiente para originar plantas doentes em campo.

Maringoni et al. (1993), trabalhando com as sementes das variedades IAPAR 14, IAPAR 16 e G.N. Nebraska #1 sel. 27, provenientes de vagens inoculadas com Xap, observaram menores porcentagens de sementes visualmente infectadas quando comparadas com as variedades Rio Negro e Carioca. Quanto à transmissão real de Xap pelas sementes, aferida por meio de plaqueamento da suspensão de maceração das sementes em meio nutriente ágar modificado, constatou-se que as variedades Rio Negro, Carioca, IAPAR 14, IAPAR 16 não diferiram significativamente entre si, mas diferiram de 'G.N. Nebraska #1 sel. 27', a qual apresentou menor porcentagem de sementes infectadas, evidenciando, com isso, que vagens de variedades mais resistentes também são colonizadas pela Xap e há infecção das sementes. Quanto ao nível de transmissão de Xap de vagens inoculadas para as sementes, verificou-se, para a variedade Carioca, 80,96%; e para 'G.N. Nebraska #1 sel. 27', 48,84%.

Valarini, Galvão e Oliveira (1996) verificaram a presença do inóculo de Xap, tanto interna quanto externamente às sementes, e esta foi eficientemente quantificada pelos métodos de inoculação em planta indicadora (36-80% de sementes infectadas em função da cultivar) e da semeadura em meio semi-seletivo ($2,5 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^6$ u.f.c./semente). Segundo esses autores, a taxa de transmissão via semente foi alta (16 a 50,8%) e a presença da bactéria na semente, até o nível de 10%, não afetou a emergência, porém níveis a partir de 10% proporcionaram incidência da doença no campo e acima de 25% afetaram significativamente a produção de grãos.

Torres e Maringoni (1997), em estudos sobre transmissão de Xap via sementes em 13 genótipos de feijoeiro, observaram a translocação da bactéria

para as sementes nos genótipos A-417, A-420, IAC-CARIOCA, PI 163.117, PI 175.829-ROXO e WISHBR-40.

Kobayasti (1998), após a inoculação de Xap em vagens e folhas de feijoeiro em casa-de-vegetação, recuperou a bactéria a partir de sementes sem desinfestação superficial na porcentagem de 23,33 a 100%.

2.4 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes

O desenvolvimento de métodos para detecção de Xap em sementes de feijão para análises de rotina constitui desafio particular para o fitopatologista, uma vez que a principal fonte de inóculo primário do CB é a semente infectada internamente ou infestada externamente (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

A inspeção no campo para a diagnose da doença com base nos sintomas visuais apresenta limitações, especialmente porque o patógeno pode sobreviver em tecidos de plantas resistentes sem causar sintomas. Essas inspeções também não detectam a doença sob certas condições ambientais ou quando as plantas estão infectadas com baixa densidade de inóculo (CAFATI; SAETTLER, 1980).

Diferentes métodos são utilizados para diagnose de Xap em sementes de feijão. Estes métodos variam desde a diluição e plaqueamento normal em meio com ágar e testes de crescimento até a complexidade das análises de imunoenzimas, imunofluorescência e bacteriófagos (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989), além dos métodos moleculares, sendo dada ênfase considerável para o desenvolvimento de técnicas que permitam obter resultados mais rápidos e com maior sensibilidade (IRWIN, 1987).

Métodos tradicionais para sanidade de sementes, como plaqueamento em ágar e testes de crescimento para cada semente ou plântula examinada individualmente, são desejáveis para detecção de patógenos com alto poder de

doenças, tais como os fungos e as bactérias. Entretanto, testes que envolvem 10.000 a 30.000 ou mais sementes requerem uma grande quantidade de materiais e espaço, além do consumo de tempo e custo, para serem empregados em rotina na análise sanitária (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

De acordo com Rodrigues Neto (1988) e Schaad (1982), geralmente são levadas em consideração três etapas importantes para obtenção de um método de detecção de patógenos em sementes: a extração do patógeno, a identificação da espécie e a determinação da sensibilidade do método. É notório acrescentar que a sensibilidade de alguns testes de sanidade de sementes decresce conforme aumenta a incidência de bactérias saprofíticas acima do nível normal de ocorrência (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

A extração de bactérias a partir do método de imersão de sementes em meio líquido pode ser afetada por bactérias contaminantes, as quais podem comprometer o isolamento do patógeno específico. Assim, a multiplicação de saprófitas durante a imersão das sementes pode ser minimizada pelo condicionamento a baixas temperaturas (6 °C) e o problema de bactérias contaminantes pode ser evitado por meio do uso de meio seletivo ou semisseletivo. O desenvolvimento de contaminantes é maior em métodos de extração de sementes imersas diretamente do que em amostras previamente desinfestadas superficialmente e trituradas úmidas. A imersão de sementes por longos períodos pode também interferir na recuperação de bactérias fortemente aeróbias, tais como *Xap*. Um menor tempo de incubação, como 2-3 h, favorece a recuperação de patógenos bacterianos, com um mínimo de interferência de espécies contaminantes (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

Velásquez e Trujillo (1984) compararam diferentes metodologias para detecção de *Xap* a partir de sementes de feijão: o uso de injeção em plântulas de uma alíquota do extrato proveniente de sementes imersas por 24 h, em meio contendo extrato de levedura; injeção em plântulas de suspensões bacterianas

provenientes de sementes incubadas em meio semisseletivo por 48 h, centrifugadas e suspensas em tampão salina; teste de Ouchterlony utilizando como antígeno o líquido proveniente de sementes imersas em meio enriquecido com extrato de levedura; e teste de Ouchterlony em combinação com meio semisseletivo. Os resultados demonstraram que o uso do meio semisseletivo combinado com imunodifusão em ágar apresentou 100% de detecção quando comparado com os outros métodos, superando em 23 % o método de injeção em plântulas e em 47% a técnica de serologia, quando não se usou o meio semisseletivo.

O método de plaqueamento em ágar utilizando meio seletivo apresenta algumas limitações para Xap: muitos meios seletivos não são suficientemente seletivos para detectar todos os isolados do patógeno; o procedimento do plaqueamento em ágar requer o conhecimento da morfologia da colônia em questão para seu reconhecimento sobre o ágar; consome tempo, requerendo incubação de 4-7 dias e posteriores testes confirmatórios de patogenicidade (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

A inoculação direta de plântulas de feijão tem sido utilizada como análise definitiva, sendo utilizada também para determinar a patogenicidade de colônias suspeitas a partir do método de plaqueamento. As desvantagens deste método residem no fato de ser moroso, laborioso, pouco sensível, além de requerer grande espaço para a propagação das plantas (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

O uso de bacteriófagos na detecção de bactérias em sementes normalmente apresenta falso negativo, o que resulta em uma falha frequente no método. Bacteriófagos são raramente específicos. Nem todos os isolados de uma espécie são sensíveis ao fago, sendo que vários pesquisadores têm observado 18 a 20% de resistência em espécies bacterianas para bacteriófagos específicos (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

A imunoanálise pode ser uma ferramenta de grande utilidade para diagnose de patógenos em feijão. Alguns autores têm trabalhado com os métodos serológicos, como Trujillo e Saettler (1979), que compararam a análise combinada de meio semisseletivo e teste de dupla difusão com o teste de patogenicidade padrão. De 175 amostras testadas, foram encontradas 61 reações positivas usando o teste padrão e 90 reações positivas utilizando o teste de dupla difusão e meio semisseletivo. Velásquez e Trujillo (1984), utilizando essa mesma técnica serológica em combinação com meio semi-seletivo, para detecção da presença interna de Xap em sementes de feijão, demonstraram que a técnica é confiável, permitindo detectar concentrações bacterianas de cerca de 10^7 u.f.c./mL.

Valarini e Menten (1992a) avaliaram a detecção de Xap em sementes de feijão, envolvendo a comparação de quatro técnicas de extração e dois métodos serológicos para a identificação do patógeno. A melhor técnica de extração foi da imersão de sementes inteiras em água destilada e esterilizada, por 18-24 horas, a 5-10 °C; em relação às técnicas serológicas, os resultados de microprecipitina em placas apresentaram maior sensibilidade, porém, menor especificidade que a dupla difusão em gel de ágar.

Valarini e Menten (1992b) observaram que a identificação de Xap pelo método de inoculação do extrato bruto de sementes inteiras em água destilada esterilizada a 5-10 °C por 18-24 horas, em folhas primárias de plântulas de feijão, por incisão com tesoura, foi o método mais adequado para detectar e quantificar o inóculo em amostras de sementes. Este método mostrou reprodutibilidade, alta especificidade, baixo custo e fácil execução, com sensibilidade de 0,1%, permitindo analisar cerca de 10 amostras/técnico/dia num prazo relativamente curto (8-10 dias).

A análise de imunofluorescência (IF) pode ser utilizada de forma direta e indireta. Wong (1991) comparou dois métodos de detecção de Xap, a partir de

sementes artificialmente inoculadas, utilizando microscopia de imunofluorescência indireta e análise de imunoabsorbância indireta ligada à enzima (ELISA) com um anticorpo monoclonal específico (Mab XP2). O sistema de IF foi mais sensível e confiável que o ELISA para detecção do patógeno.

Há limitações e restrições que devem ser levadas em consideração antes que os métodos serológicos possam ser padronizados e aceitos como testes de sanidade de sementes, uma vez que ainda não há nenhum procedimento de padronização para a produção de antissoro, havendo, conseqüentemente, diferenças na especificidade dos antissoros preparados contra as mesmas espécies (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989). A imun análise geralmente não distingue células bacterianas viáveis das não viáveis; assim, seu valor é limitado para previsão de incidência da doença na cultura a partir dos resultados dos testes de semente (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

Avanços recentes na biologia molecular estão sendo aplicados no desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico de patógenos em plantas. Desde o início dos anos 80, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas e usadas para diagnose e identificação de fitopatógenos, como as que foram utilizadas por Gilbertson, Rand e Hagedorn (1990) para detecção de Xap e por Schaad et al. (1989) para *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psp).

Gilbertson et al. (1989) utilizaram, como sondas, DNA plasmidial total e fragmentos de DNA plasmidial de Xap clonados para detectar Xap. Sondas de fragmento de DNA plasmidial de 3,4 kb foram mais específicas para ambos os patógenos quando comparadas com as de DNA plasmidial total. O limite de detecção destas sondas foi de 10^3 u.f.c. de patógenos retirados de folhas de feijão e de restos de plantas. Entretanto, há limitações para a sensibilidade de sondas

de hibridização, particularmente quando há excesso de DNA ou RNA heterólogo presente com uma baixa quantidade de moléculas alvo (AUDY et al., 1994).

A amplificação enzimática, direcionada por *primers* de DNA, ou seja, a reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método *in vitro* que permite a amplificação exponencial de uma seqüência nucleotídica em poucas horas (BATISTA, 1993) e tem sido utilizado por diversos pesquisadores na detecção e no diagnóstico de algumas bactérias. Trata-se de um método simples, em que são necessários três passos essenciais: desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento dos *primers* à seqüência complementar de cada fita simples de DNA desnaturado e extensão dos *primers* pela DNA polimerase ao longo de ambas as fitas em oposição, com conseqüente duplicação da quantidade da seqüência do DNA almejado. A especificidade do método deriva dos *primers* (oligonucleotídeos sintéticos), os quais definem o final de cada seqüência alvo a ser amplificada (HENSON; FRENCH, 1993).

Audy et al. (1994) descreveram o método de PCR para detecção de Xap e da sua variante *fuscans*, a partir de lesões em folhas de feijão, utilizando *primers* ricos em G+C, desenhados a partir de seqüências selecionadas do fragmento do DNA plasmidial de 3,4 kb (p7) de Xap. O par de *primers* derivado de p7X4 especificamente direcionava a amplificação de um fragmento de 730 pb de DNA de 27 isolados de Xap patogênicos e um fragmento adicional de 550 pb para DNA da variante *fuscans*.

Audy et al. (1996) desenvolveram um método baseado na PCR para detecção de Xap e Psp a partir de sementes de feijoeiro. O método consistiu da extração do DNA bacteriano a partir de sementes contaminadas tanto externa como internamente, seguida da utilização de dois *primers* de oligonucleotídeos ricos em G+C originados da região do grupo do gene *tox* de Psp. Os *primers* HB14 (Psp) e X4 (Xap) amplificaram segmentos de DNA bacteriano a partir de extratos de sementes de feijão branco contaminadas. Extratos de DNA

bacteriano proveniente de sementes de feijão colorido interferiram na amplificação pela PCR, exceto quando se adicionava polivinilpirrolidona no tampão de extração. Com esse método foi possível detectar uma semente infectada em 10.000 sementes.

A técnica de RAPD-PCR foi utilizada por Birch et al. (1997) para diferenciar isolados de Xap, por meio da extração do DNA. O *primer* utilizado foi OP-G11, que permitiu a amplificação da banda de 820 pb para todos os isolados de Xap da variante *fuscans*, enquanto, para Xap (não *fuscans*), houve a amplificação de produtos de vários tamanhos.

Toth et al. (1998) desenvolveram um método baseado na PCR para detecção de Xap (variante *fuscans*) a partir de plantas e utilizaram os *primers* Xf1 e Xf2, em seqüências conservadas que permitiam a amplificação de segmento de DNA de 450 pb de todos os isolados testados. Um mínimo de 10 células de Xap (equivalente a 100 fg de DNA) foi detectado *in vitro*. O método consistiu de extração de DNA de culturas puras, de discos de folhas de feijão inoculadas com Xap e de DNA de bactérias saprófitas. Este método pode detectar Xap em folhas de feijão 10 dias antes de ocorrerem sintomas visíveis. Em contraste, nenhum produto amplificado foi obtido a partir dos isolados de Xap (não *fuscans*) ou de outros materiais de DNA testados.

A Bio-PCR, um método que combina amplificações biológica e enzimática, foi relatado por Schaad et al. (1995). Este método foi descrito para detecção de Psp em extrato de sementes de feijão, em que foram feitas as análises das células bacterianas primeiramente obtidas em meio seletivo, seguidas de lavagens das placas, produzindo uma suspensão e amplificação do segmento da região do gene *tox*. A vantagem da técnica de Bio-PCR sobre a técnica de PCR inclui a eliminação de falsos positivos, resultantes da presença de células mortas que possam estar associadas às sementes, e eliminação de

falso negativo devido aos inibidores potenciais da PCR presentes em extratos de sementes, aumentando, assim, a sensibilidade da detecção.

Manulis et al. (1998) compararam a Bio-PCR e PCR modificadas com a PCR clássica para detectar a presença de *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* em plantas de *Gypsophila paniculata* utilizando *primers* específicos para *E. herbicola*, formadora de galhas. A bactéria pode ser detectada pela PCR modificada e pela Bio-PCR em plantas sem sintomas 7 dias após a inoculação, sendo estas mais sensíveis que a PCR clássica.

Wang et al. (1999) compararam a eficiência e a confiabilidade da PCR clássica e da Bio-PCR com isolamento em meio semi-seletivo M-XAM para o patógeno da escaldadura da folha da cana-de-açúcar, *Xanthomonas albilineans*. O meio semisseletivo e a Bio-PCR foram consistentemente mais sensíveis que *dot immunobinding assay* (DIA), ELISA ou a PCR clássica. A PCR clássica detecta 2×10^4 u.f.c./mL⁻¹, enquanto a Bio-PCR é 100 vezes mais sensível. O meio requer sete dias para identificação, enquanto a Bio-PCR requer somente quatro dias e tem a vantagem de não requerer testes de patogenicidade para confirmação das identidades das colônias.

REFERÊNCIAS

- AGGOUR, A. R.; COYNE, D. P.; VIDAVER, A. K. Comparison of leaf and pod disease reactions of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated by different methods with strains of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. **Euphytica**, Wageningen, v. 43, n. 1/2, p. 143-152, June 1989.
- AGRIVISION. **Ficha técnica:** feijão. Disponível em: <http://www.consulcoop.com/Agr_Produtos_Feijao.htm>. Acesso em: 1 mar. 2000.
- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 36, n. 3, p. 383-388, May 1996.
- ARNAUD-SANTANA, E. et al. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) debris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 9, p. 952-953, Sept. 1991.
- AUDY, P. et al. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1185-1192, Oct. 1994.
- _____. Rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 2, p. 361-366, 1996.
- ÁVILA, Z. R. de et al. Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 18-22, mar. 1998.
- BATISTA, M. F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 165-196, 1993.
- BEEBE, S. Quantitative genetics in *Phaseolus vulgaris*: the example of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: BEEBE, S. (Ed.). **Current topics in breeding of common bean**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989. p. 213-230. (Working Document, 47).

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 381-383.

BIRCH, P. R. J. et al. RAPD PCR based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 809-814, Dec. 1997.

BRACCINI, A. de L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria.** Farnham House: CAB International, 1986. 332 p.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, Oct. 1986.

_____. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination.** New York: M. Dekker, 1995. p. 351-396.

BROWNELL, K. H.; SCHENEIDER, R. W. Roles of matric and osmotic components of water potential and their interaction with temperature in the growth of *Fusarium oxysporum* in synthetic media and soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 1, p. 53-57, Jan. 1985.

BULISANI, E. A.; ALMEIDA, L. D.; BOSTON, A. J. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. In: BULISANI, E. A. (Coord.). **Feijão: fatores de produção e qualidade.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 29-88.

CAFATI, C. R.; SAETTLER, A. W. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 657-679, 1980.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletrotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CARVALHO, N. M. de; NAGAKAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.

COOK, J. R.; PAPENDICK, R. I. Influence of water potential of soils and 3555 plant on roost disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 349-374, 1972.

_____. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 5, p. 559-564, Oct. 1978.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Inheritance and linkage relations of reaction to *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Dowson (common blight), stage of plant development and plant habit in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 23, n. 2, p. 195-204, Mar. 1974.

DEL GIÚDICE, M. P. **Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

FEIJÃO: características, produtores. Disponível em:
<<http://207.201.142.229/agrov/vegetais/graos/feijao.htm>>. Acesso em: 1 mar. 2000.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the Chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 25, n. 6, p. 1024-1029, June 1995.

GILBERTSON, R. L. et al. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 518-525, May 1989.

GILBERTSON, R. L.; RAND, R. E.; HAGEDORN, D. J. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in beans debris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 322-327, Apr. 1990.

GROTH, D. E.; BRAUN, E. J. Survival, seed transmission, and epiphytic development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the North-Central United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 4, p. 326-330, Apr. 1989.

HALLOIN, J. M.; MINTON, E. B.; PETERSON, H. D. Fungicide application to cotton seed using methylene chloride carrier. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 5, p. 909-910, Sept./Oct. 1978.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 3, p. 881-888, Mar. 1975.

HOBBS, P. R.; OBENDORF, R. L. Interaction of initial seed moisture and imbibitional temperature on germination and productivity of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 664-667, Sept./Oct. 1972.

IRWIN, J. A. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 15, p. 755-763, 1987.

KHAN, A. A.; PECK, N. H.; SAMIMY, C. Seed osmoconditioning: physiological and biochemical changes. **Israel Journal of Botany**, Tel Aviv, v. 29, n. 1/4, p. 133-144, 1981.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, p. 297-318.

KOBAYASTI, L. **Avaliação de genótipos de 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, 1998.

LIANG, L. Z.; HALLOIN, J. M.; SAETTLER, A. W. Use of polyethylene glycol and glycerol as carriers of antibiotics for reduction of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy beans seeds. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 9, p. 875-879, Sept. 1992.

MAFFIA, L. A.; CARMO, M. G. F.; KATSURAYAMA, Y. Epidemiologia e controle de principais doenças do feijoeiro. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 3., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 103-126.

MANULIS, S. et al. Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* in gypsophila plantas by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 85-91, Jan. 1998.

MARINGONI, A. C. et al. Reação foliar e da vagem de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 412-415, set. 1993.

MARQUES, A. S. dos A. et al. Avaliação de métodos de inoculação na produção de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* para fins experimentais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 178-182, Jun. 1994.

MAYER, A. M.; POL-JAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Oxford: Pergamon, 1989. 270 p.

MEXAL, J.; REID, C. P. P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, n. 9, p. 1579-1588, Sept. 1973.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6.000. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 5, p. 914-916, May 1973.

NEERGAARD, G. E. **Seed pathology**. London: MaxMillan, 1979. v. 1, 839 p.

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

OPIO, A. F.; TERI, J. M.; ALLEN, D. J. Assesment 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.

_____. Studies on seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in common beans in Uganda. **African Crop Science Journal**, Dhaka, v. 1, n. 1, p. 59-67, 1993.

PILL, W. G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1994. p. 319-359.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.

PRISCO, J. T.; OLEARY, J. W. Osmotic and 'toxic:' effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, San José, v. 20, n. 2, p. 177-184, 1970.

ROBBS, C. F. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. **Agronomia**, Monterrey, v. 12, p. 231-233, 1954.

RODRIGUES NETO, J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 123-139.

ROSTON, A. J.; PIZAN, N. R. **Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/tecnologias/culturas/feijao.html>>. Acesso em: 1 mar. 2000.

SAETTLER, A. W. Common bacterial blight. In: SHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORALES, M. A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989. p. 261-283.

SAETTLER, A. W.; PERRY, S. K. Seed-transmitted bacterial diseases in Michigan Navy (Pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 56, n. 5, p. 378-381, May 1972.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682 p.

SARTORATO, A. **Manejo integrado de doenças do feijoeiro comum**.

Disponível em:

<<http://www.cnpaf.embrapa.br/homepage/pesquisa/projetos/04094061.htm>>.

Acesso em: 1 mar. 2000.

SCHAAD, N. W. Detection of seedborne bacterial pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, p. 885-890, 1982.

SCHAAD, N. W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Feb. 1995.

_____. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by DNA hybridization probe. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 7, p. 903-907, Sept. 1989.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in the tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, p. 117-130, Jun. 1977.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P.; HOFF, B. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, n. 1, p. 74-75, Jan. 1973.

SERRACIN, J. et al. Daños causados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su efecto en el rendimiento del frijol común (Habichuela, *Phaseolus vulgaris*). **The Journal Agriculture of the University of Puerto Rico**, Rio das Piedras, v. 75, n. 4, p. 353-361, Oct. 1991.

SGARBIERI, V. C. Composição e valor nutritivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BULISANI, E. (Coord.). **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 257-326.

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**. Saint Paul: APS, 1989. p. 17-62.

STEUTER, A. A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J. R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, n. 1, p. 64-67, Jan. 1981.

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

THOMAS, J. C. et al. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 801-806, July 1995.

TORRES, J. P.; MARINGONI, A. C. Reação foliar de genótipos de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão via sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 546-549, dez. 1997.

TOTH, I. K. et al. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant materials and its differentiation from *X.c.pv. phaseoli*.

Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 85, n. 2, p. 327-336, Aug. 1998.

TRUJILLO, G.; SAETTLER, A. W. A combined semi-selective medium and serology test for detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 4, p. 35-41, 1979.

VALARINI, P. J. **Métodos para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 1990. 167 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1990.

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. 1, p. 227-231, jan. 1991.

_____. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 171-180, 1992a.

_____. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por serologia. **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 17, n. 1, p. 91-106, 1992b.

VALLADARES-SANCHEZ, N. E.; COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Differential reactions of leaves and pods of *Phaseolus* germplasm to strains to *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from crosses of susceptible germplasm. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, p. 648-654, 1979.

VASQUEZ, G. H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja**: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento. 1995. 138 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 45, p. 472-489, 1995.

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

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

WEBSTER, D. M.; TEMPLE, S. R.; SHWARTZ, H. F Selection for resistance to *Xanthomonas phaseoli* in dry beans. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 519-522, 1980.

WELLER, D. M.; SAETTLER, A. W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 2, p. 148-152, Feb. 1980.

WANG, Z. K. et al. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 48, n. 2, p. 245-252, Apr. 1999.

WONG, G. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 1, p. 124-129, Jan. 1991.

CAPÍTULO 2 Inoculação, transmissão e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão

RESUMO

O objetivo do autor com este trabalho foi desenvolver uma técnica para inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) pelo uso da restrição hídrica do meio de cultura, mantendo-se o poder germinativo das sementes. Foram utilizadas as sementes das cultivares Carioca e Pérola, o meio de cultura 523 e o manitol como soluto. Estudou-se a influência dos diferentes potenciais hídricos, obtidos por diferentes concentrações de manitol, sobre o crescimento *in vitro* de Xap e a germinação das sementes. Estudou-se também o efeito dos diferentes períodos de exposição das sementes ao inóculo sobre a porcentagem germinação, bem como a porcentagem de detecção de Xap nas sementes e sua transmissão para os cotilédones e folhas primárias. Os resultados indicaram que a restrição hídrica no meio 523 pelo uso do manitol, constituiu uma técnica viável para aumentar a eficiência do processo de inoculação de Xap em sementes de feijão; sementes inoculadas com Xap por meio da restrição hídrica pelo uso do meio 523 + manitol apresentaram alta porcentagem de germinação; os períodos de exposição ao inóculo de 24 e 36 horas durante a inoculação sob restrição hídrica permitiram maior porcentagem de detecção do patógeno; os períodos de exposição ao inóculo de 24, 36 e 48 horas durante a inoculação sob restrição hídrica permitiram maior porcentagem de transmissão do patógeno; a transmissão do patógeno para os cotilédones e folhas primárias a partir de sementes inoculadas variou de 6 a 41 % para a cv. Carioca e de 0 a 71 % para a cv. Pérola.

Palavras – chave: *Phaseolus vulgaris*. Técnica de restrição hídrica. Infecção de sementes. Pré-condicionamento de sementes. Crestamento bacteriano comum.

ABSTRACT

The objective of this work was developing a technique for artificial inoculation of bean seeds with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) using water restriction in the culture medium, maintaining the seed's germination power. Seeds from the cultivars Carioca and Pérola, the culture medium 523 and mannitol, as a solute, were used. The influence of different water potential, obtained with different mannitol concentrations, was studied on Xap *in vitro* growth and seed germination. The effect on the germination percentage of the different exposure periods of the seeds to the inoculum, as well as the percentage of Xap detection on the seeds and its transmission to the cotyledons and primary leaves, were also studied. The results indicated that the water restriction on the medium 523 using mannitol, constituted a viable technique to increase the efficiency of Xap inoculation process in bean seeds; seeds inoculated with Xap using water restriction on the medium 523 + mannitol presented high germination percentage; the exposure periods to the inoculum of 24 and 36 hours during inoculation under water restriction allowed a larger percentage of pathogen transmission; the transmission of the pathogen to the cotyledons and primary leaves from inoculated seeds varied from 6 to 41% for the Carioca cv. And from 0 to 71% for the Pérola cv.

Key words: *Phaseolus vulgaris*. Water restriction technique. Seeds infection. Seeds pre-conditioning. Bean bacterial blight.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças bacterianas que atacam a cultura do feijoeiro, o crestamento bacteriano (CB) causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) assume importância econômica no Brasil, principalmente no cultivo das "águas", sendo de ampla distribuição, de difícil controle e ter a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação (VALARINI; MENTEN, 1992).

O uso de sementes livres do patógeno é um dos métodos mais eficientes de controle do CB. Entretanto, o sucesso deste, depende da confiabilidade dos testes empregados para a detecção do patógeno nas sementes (CAFATI; SAETTLER, 1980).

Estudos de epidemia e de métodos de controle de fitobacterioses podem ser regularmente conduzidos se houver disponibilidade de lotes de sementes uniformemente contaminadas, e para isso, há necessidade de uma técnica que permita a inoculação artificial de sementes e tenha um alto poder de germinação, mesmo após a inoculação. Esta deve ser eficiente, prática e de fácil execução para permitir estudos futuros relacionados às epidemias e à transmissão de Xap, visando a obtenção de padrões de sanidade de sementes, bem como a determinação da sensibilidade de métodos para sua detecção (VALARINI; MENTEN, 1991).

As técnicas de inoculação artificial apresentadas até o momento têm reduzido consideravelmente o poder germinativo das sementes (VALARINI; MENTEN, 1991) e o condicionamento osmótico pode ser utilizado como uma ferramenta para auxiliar neste processo. Essa técnica consiste em imergir as sementes em soluções aquosas de polietileno glicol (PEG) e alguns tipos de sais ($MgSO_4$, NaCl, $MgCl_2$, K_3PO_4 , KH_2PO_4 , glicerol, manitol (PILL, 1994)), os quais proporcionam um ambiente osmótico que restringe a embebição das sementes, enquanto permite a difusão das soluções para o embrião, melhorando

a germinação e a emergência de diferentes espécies de plantas (KHAN; PECK; SAMIMY, 1981).

Prisco e Oleary (1970) constataram que o PEG (Carbowax 1540) foi mais efetivo em inibir a emissão de radícula de sementes de feijoeiro quando comparados com soluções de NaCl, pois este causou efeitos tóxicos. Del Giúdice (1996) evidenciou em seus estudos, que o uso de preparações de PEG 6000, foi mais efetivo em inibir emissão de radículas de sementes de soja quando comparados com soluções de manitol, em potenciais osmóticos similares.

Carvalho (1999), utilizando BDA, observou a emissão de radículas em sementes de feijoeiro, e esta foi reduzida tanto pela adição de manitol quanto de PEG 6000 e, completamente inibida na restrição hídrica de -1 MPa. Com relação à germinação das sementes, o tempo de exposição de 168 horas sobre o BDA + PEG 6000, à restrição hídrica de -1 MPa, causou maiores prejuízos comparados com BDA + manitol, na mesma restrição hídrica e pelo mesmo período de tempo, embora, este também, tenha causado prejuízo à germinação das sementes.

O ajuste do potencial hídrico de substratos agarizados, em relação ao desenvolvimento de microrganismos, normalmente, é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como CaCl_2 (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996); KCl, sacarose ou mistura de sais (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996; GAO; SHAIN, 1995), ou pela adição de PEG (ALAM; JOYCE; WEARING, 1996; BROWNELL; SCHNEIDER, 1985).

Mexal e Reid (1973) relataram que o PEG 4000 é um soluto apropriado para induzir estresse hídrico em fungos, pois embora possa ser absorvida em menor extensão, não é metabolizado como os açúcares e não é tóxico em altas concentrações, como os sais podem ser.

Carvalho (1999), trabalhando no desenvolvimento de uma metodologia para inoculação artificial de *C. lindemuthianum* em sementes de feijão, verificou o aumento da restrição hídrica do BDA com PEG 6000, este afeta negativamente o crescimento radial deste fungo, enquanto o manitol estimula o crescimento até a restrição hídrica de -0,8 MPa. O mesmo autor verificou que o uso da restrição hídrica em BDA + manitol constitui-se uma técnica viável para aumentar a eficiência de inoculação do patógeno em sementes de feijoeiro.

Entre outros efeitos, com o processo de condicionamento osmótico das sementes foram observados: aumento da velocidade e/ou porcentagem de germinação em sementes (FU et al., 1983; HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975); maior sincronização do processo de germinação entre sementes de mesmo lote (HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975; KHAN; PECK; SAMIMY, 1981); aumento da velocidade de emergência das plântulas (HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975; KHAN; PECK; SAMIMY, 1981); e aumento de vigor (KHAN et al., 1978).

Nenhum estudo envolvendo o uso de restrição hídrica para inoculação artificial de bactérias fitopatogênicas em sementes foi encontrado na literatura.

1.1 Transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* para sementes

O crestamento bacteriano pode acarretar perdas consideráveis em função da cultivar utilizada e das condições climáticas prevalecentes, podendo reduzir a produção do feijoeiro de 20 a 38% (WALLEN; GALWAY, 1977). Sabendo que Xap pode ser transmitido pelas sementes, e esta pode ser um eficiente veículo de disseminação, estudos citados por Kimati (1980), mostraram que 0,5% de sementes infectadas em um lote foi suficiente para desencadear epidemia no campo. Já Weller e Saettler (1980) demonstraram experimentalmente que uma

população mínima de 10^3 a 10^4 u.f.c. de Xap na superfície das sementes foi suficiente para originar plantas doentes em campo.

Maringoni et al. (1993) observaram que as sementes de variedades resistentes também são colonizadas pela Xap, e quanto à transmissão real de Xap pelas sementes, aferida pelo plaqueamento da suspensão de maceração das sementes em meio nutriente ágar modificado, as variedades Rio Negro, Carioca, IAPAR 14, IAPAR 16 não diferiram significativamente entre si, mas diferiram de 'G.N. Nebraska #1 sel. 27'. Quanto ao nível de transmissão de Xap de vagens inoculadas para as sementes, verificou-se para a variedade Carioca, 80,96%, e para 'G.N. Nebraska #1 sel. 27', 48,84%.

Valarini, Galvão e Oliveira (1996) relataram a taxa de transmissão de Xap via semente, esta foi alta (16 a 50,8%) em função de a cultivar. A presença da bactéria na semente até o nível de 10%, não afetou a emergência, porém níveis a partir de 10% proporcionaram incidência da doença no campo e acima de 25% afetaram significativamente a produção de grãos.

Kobayasti (1998), após a inoculação de Xap em vagens e folhas de feijoeiro em casa de vegetação recuperou a bactéria a partir de sementes sem desinfestação superficial na porcentagem de 23,33 a 100% dependendo do genótipo avaliado.

Dessa forma, com este trabalho objetivou-se desenvolver uma técnica para inoculação artificial de sementes com Xap, por meio da restrição hídrica, mantendo-se o poder germinativo das mesmas, detectar a presença de Xap nas sementes inoculadas por meio semi-seletivo e verificar a germinação e a transmissão de Xap a partir de sementes inoculadas artificialmente para as plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período compreendido entre os meses de junho de 2000 a fevereiro de 2002.

Diversas etapas foram necessárias para o desenvolvimento da técnica de inoculação artificial de Xap em sementes de feijão. Tais etapas consistiram da obtenção de sementes de feijão, obtenção e multiplicação do isolado de Xap a ser utilizado, preparação do meio de cultura básico, pré-condicionamento das sementes, seleção de um mutante resistente a rifampicina, crescimento bacteriano em relação à restrição hídrica do substrato agarizado, uso da restrição hídrica no processo de inoculação de Xap em sementes de feijão, determinação do grau de umidade das sementes inoculadas, localização do inóculo nas sementes, germinação das sementes e transmissão de Xap em condições de casa-de-vegetação.

2.1 Origem e caracterização das sementes utilizadas

Foram utilizadas amostras de sementes básicas dos cultivares Carioca e Pérola, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo), as quais foram armazenadas em câmara fria e seca (10 °C e 50% UR) no Departamento de Fitopatologia da UFLA até realização dos experimentos.

De acordo com testes padrões, recomendados e descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e International Seed Testing

Association - ISTA (1976), as sementes utilizadas apresentavam as características indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização da qualidade inicial das sementes de feijão

| Cultivar | Pureza (%) | Germinação (%) | Sementes infestadas (%) | Grau de Umidade (%) |
|----------|------------|----------------|-------------------------|---------------------|
| Carioca | 99,8 | 87 | 0,5 | 8,7 |
| Pérola | 99,8 | 91 | Zero | 10,9 |

2.2 Obtenção e multiplicação do isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Foi utilizado o isolado Xap/UFLA-2 de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, variante *fuscans*, obtido a partir de folhas de feijoeiro por Ávila et al. (1998) e preservado em folhas de feijoeiro (cv. Carioca) herborizado.

O reisolamento das folhas herborizadas foi feito em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubação por 48 h a 28 °C. Em seguida, o isolado foi repicado para tubos de ensaio contendo meio sólido 523.

Para confirmação da patogenicidade foi feita a inoculação artificial em plântulas de feijoeiro com aproximadamente 10 dias de idade, empregando-se a técnica de incisão das folhas primárias (RAVA, 1984) com tesoura previamente mergulhada na suspensão bacteriana na concentração de 5×10^7 u.f.c./mL ($A_{600} = 0,14$). Foram realizados dois cortes perpendiculares à nervura central, sem atingi-la, distanciados dois cm um do outro, em apenas uma das metades do folíolo. As plântulas inoculadas foram mantidas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação. Após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado das lesões, pelo

método anteriormente citado, e repicado para tubos de ensaio contendo meio sólido 523. O isolado foi preservado durante o decorrer do experimento em plantas de feijão e em folhas herborizadas.

2.3 Preparo do meio de cultura básico

O meio de cultura básico utilizado foi o meio sólido 523, pH 6,9, cujo potencial de restrição hídrica é -0,546 MPa (Megapascal).

Para a obtenção dos tratamentos de restrição hídrica do referido meio, foram utilizadas preparações de polietileno glicol (PEG 6.000) em água e soluções de manitol. Para efeito de cálculo, foram considerados, inicialmente a temperatura de 28 °C e os potenciais hídricos de -0,65, -0,75, -0,85, -0,95 e -1,05 MPa. As concentrações necessárias para a obtenção das preparações de PEG em cada potencial hídrico foram obtidas pela equação de Michel e Kaufmann (1973):

$$\Psi = - (1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) C T + (8,39 \times 10^{-7})C^2T,$$

onde:

Ψ = Potencial osmótico (bars)

C = Concentração (g de PEG/kg de água)

T = Temperatura (°C)

As concentrações necessárias para a obtenção das soluções de manitol, nos mesmos potenciais hídricos e temperatura acima citados, foram obtidos por meio da utilização do software SPPM[®] (MICHEL; RADCLIFFE, 1995).

Tabela 2 Concentrações de PEG 6.000 e manitol no meio de cultura básico para a obtenção dos respectivos níveis de restrição hídrica

| Solutos (28 °C) | Restrição hídrica do meio de cultura básico (MPa*) | | | | |
|-----------------|--|--------|--------|--------|--------|
| | -0.65 | -0.75 | -0.85 | -0.95 | -1.05 |
| PEG 6.000 | 85,47** | 126,52 | 158,51 | 185,65 | 209,64 |
| Manitol | 45,90** | 52,70 | 59,40 | 66,10 | 72,7 |

*Megapascal **Gramas do soluto por Litro de água

Para cada potencial, foram acrescentados os devidos solutos completando-se o volume para 1 litro com água destilada. Para o tratamento testemunha, foi utilizado meio puro, ou seja, sem os solutos.

2.4 Pré-condicionamento de sementes de feijão em meio agarizado sob restrição hídrica

Para o pré-condicionamento de sementes de feijão em meio agarizado sob restrição hídrica, foram necessários dividi-las em etapas: Ensaio I, Ensaio II e germinação das sementes de feijão após o pré-condicionamento em meios agarizados sob restrição hídrica.

2.4.1 Ensaio I

Neste primeiro ensaio, os tratamentos consistiram na exposição de sementes de feijoeiro da cv. Carioca, desinfestadas e não desinfestadas, em substratos constituídos por quatro níveis de restrição hídrica do meio 523 (-0,65, -0,75, -0,85, -0,95 MPa), pelo uso de PEG 6.000 e Manitol, e a testemunha adicional, meio 523 sem os solutos, totalizando nove tratamentos.

A assepsia superficial das sementes consistiu na imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% durante 1 minuto e posterior

lavagem por 3 vezes, em água destilada e esterilizada e secagem em câmara de fluxo laminar.

Neste ensaio, foram utilizadas como parcelas, 4 placas de Petri de 15 cm de diâmetro para cada tratamento, com quatro repetições. Cada placa continha 40 mL de substrato e 25 sementes eqüidistantes entre si. As parcelas foram distribuídas ao acaso em uma incubadora do tipo B.O.D., onde permaneceram por 168 horas à temperatura de 28 °C e escuro contínuo.

As sementes que emitiram radículas, durante este processo, foram descartadas. As sementes restantes, que não emitiram radículas, após o período de 168 h de pré-condicionamento, foram lavadas por 3 vezes em água destilada e esterilizada e secas sobre papel de filtro esterilizado a 25 ± 2 °C por 3 dias, sendo em seguida, submetidas ao teste de germinação. O teste de germinação foi feito no sistema de rolos de papel germiteste (papel-toalha) umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura constante de 28 °C ± 2 . Todas as sementes foram colocadas para germinar em rolos contendo 50 sementes cada.

As avaliações consistiram no número total de sementes germinadas em cada tratamento após 168 horas e transformadas em porcentagem. Considerou-se como germinadas as sementes com emissão da radícula (comprimento $\geq 0,1$ cm).

2.4.2 Ensaio II

Neste segundo ensaio, os tratamentos consistiram na em exposição, por diferentes períodos de tempo, sementes de feijoeiro dos cultivares Carioca e Pérola, desinfestadas e não desinfestadas, em substratos constituídos por cinco níveis de restrição hídrica do meio 523 (-0,65, -0,75, -0,85, -0,95 e -1,05 MPa)

pelo uso de manitol, mais um tratamento adicional, a testemunha sem os solutos, totalizando seis tratamentos. As sementes de feijoeiro foram tratadas com vitavax + thiram, utilizando-se a dosagem recomendada, de acordo com o manual de defensivos agrícolas, para diminuir contaminação com fungos de armazenamento.

A desinfestação foi feita conforme item 2.4.1.

Foram utilizadas como parcelas 4 placas de Petri de 15 cm de diâmetro para cada tratamento com quatro repetições. Cada placa continha 40 mL de substrato e 25 sementes equidistantes entre si. As parcelas foram distribuídas ao acaso em uma incubadora do tipo B.O.D., onde permaneceram por 168 horas à temperatura de 28 °C e escuro contínuo.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial $6 \times 2 \times 5 + 1$ (tempo x sementes com e sem desinfestação x 5 níveis de restrição hídrica) e um tratamento adicional (testemunha sem soluto). As avaliações consistiram no número total de sementes não germinadas em cada tratamento, após 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas de pré-condicionamento, considerando-se como germinadas as sementes com sinais visíveis de emissão da radícula (comprimento $\geq 0,1$ cm). As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se sistema estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 1992).

2.4.3 Germinação das sementes de feijão após o pré-condicionamento em meios agarizados sob restrição hídrica

As sementes dos tratamentos referentes ao Ensaio II, que não emitiram radículas, após o período de 168 h de pré-condicionamento, foram lavadas por 3

vezes em água destilada e esterilizada, secas sobre papel de filtro esterilizado à 25 ± 2 °C por 3 dias; em seguida, submetidas ao teste de germinação.

O teste de germinação foi feito no sistema de rolos de papel germiteste (papel-toalha) umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura constante de $28 \text{ °C} \pm 2$. Os rolos de papel para germinação continham 50 sementes cada.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial $6 \times 2 \times 5 + 1$ (tempo x sementes com e sem desinfestação x 5 níveis de restrição hídrica) e um tratamento adicional (testemunha sem soluto). As avaliações consistiram no número total de sementes germinadas em cada tratamento após 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas, considerando-se como germinadas as sementes com emissão da radícula (comprimento $\geq 0,1$ cm). As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se sistema estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1992).

2.5 Seleção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, resistente a rifampicina 1000 ppm, a partir do isolado Xap/UFLA-2

Para os ensaios a serem realizados posteriormente, foi selecionado um isolado resistente a rifampicina 1000 ppm a partir do isolado Xap/UFLA-2, o qual foi cultivado em placas de Petri contendo meio 523 + 1 ppm de rifampicina em B.O.D. a 28 °C por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias resistentes a 1 ppm de rifampicina foram repicadas para placas de Petri contendo meio 523 + 10 ppm de rifampicina e incubadas na mesma condição anterior. Novamente, as colônias resistentes foram repicadas para placas de Petri, agora com 100 ppm de rifampicina. As colônias formadas nesta concentração foram repicadas para tubos contendo meio inclinado 523 e, a seguir, inoculadas em

plântulas de feijão conforme item 2.2. Aproximadamente dez dias após, com o surgimento dos sintomas, fez-se o reisolamento, por meio da técnica de estrias paralelas, em placas de Petri contendo meio 523 + 100 ppm de rifampicina e, sendo estas, incubadas. As colônias desenvolvidas foram repicadas para placas de Petri contendo meio 523 + 1000 ppm de rifampicina. Após o período de incubação, as colônias do patógeno, resistentes a 1000 ppm de rifampicina, foram repicadas para tubos e em seguida, inoculadas novamente em plântulas de feijão. Com o aparecimento dos sintomas fez-se o reisolamento em meio 523 + 1000 ppm de rifampicina, e as colônias resistentes mantidas em folhas herborizadas, em plântulas de feijão e repicadas periodicamente em meio 523 + 1000 ppm de rifampicina.

2.6 Crescimento bacteriano de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica

Para o estudo do crescimento bacteriano em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica, foram utilizados quatro isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, Xap/UFLA-2R e Xp-7 (*fuscans*), Xap UFLA-1 e UNB (não *fuscans*).

Os isolados foram inicialmente cultivados em meio líquido 523 por 24 h e em seguida foi feita a diluição em série (10^{-1} a 10^{-7}) em solução salina 0,85%, sendo plaqueadas somente as diluições de 10^{-4} a 10^{-7} . Foram utilizadas quatro placas de Petri, de 9 cm de diâmetro para cada diluição, sendo 16 placas/tratamento, contendo cada uma 20 mL do substrato. Em cada placa, foram adicionados 100 μ l de suspensão bacteriana e espalhados com alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram distribuídas ao acaso em uma incubadora, do tipo B.O.D., a 28 °C por 72 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, sendo cinco níveis de restrição hídrica do meio 523 + manitol (-

0,65, -0,75, -0,85, -0,95, -1,05 MPa) e a testemunha, meio 523 sem o soluto, cujo potencial é de 0,546 MPa.. As avaliações foram feitas por meio da contagem do número de colônias/placa, na diluição 10^{-5} , observando-se a coloração, o tamanho e o formato das colônias bem como o escurecimento típico do meio para os isolados Xap. As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) e os dados foram transformados para $\log_{10}(y)$.

2.7 Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em meio de cultura sob restrição hídrica

Para a inoculação artificial com Xap, foram utilizadas sementes de feijoeiro dos cultivares Carioca e Pérola. As sementes foram divididas em dois lotes, em um dos lotes foi feita desinfestação superficial por imersão em NaOCl a 2% por 1 minuto e posterior lavagem em água destilada esterilizadas por 3 vezes, seguida de secagem em câmara de fluxo laminar.

De acordo com os resultados obtidos nos itens 2.4.2 e 2.4.3, foi utilizado o melhor tratamento de pré-condicionamento das sementes de feijão e de crescimento do isolado Xap/UFLA-2R. Assim, para a cultivar Carioca, foi utilizado o meio 523 + manitol -0.85 MPa e, para a cultivar Pérola, o Meio 523 + manitol -1,05 MPa.

A avaliação consistiu na determinação do grau de umidade das sementes inoculadas, na germinação das sementes após o tratamento, em substrato estéril, na transmissão do patógeno para as plântulas e na detecção da bactéria em meio semisseletivo.

2.7.1 Inoculação artificial

Para a inoculação artificial, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio 523, acrescido ou não de manitol. Em seguida, com auxílio de uma alça de Drigalski foram espalhados sobre o meio, 100 µL da suspensão bacteriana do isolado Xap/UFLA-2R na concentração de 5×10^7 u.f.c./mL. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Após a incubação, procedeu-se a inoculação em condições assépticas, colocando-se 50 sementes desinfestadas/placa, seguindo-se de agitação manual por 30 segundos. Cada tratamento constituiu-se de 8 placas, sendo que para a cultivar Carioca, foi utilizado o meio 523 + manitol -0,85 MPa e para a cultivar Pérola, o meio 523 + manitol -1,05 MPa. Como testemunhas foram utilizados os meios 523 com e sem crescimento bacteriano e o meio NGA (Nutriente-Glicose-Ágar) (VALARINI; MENTEN, 1991) com a bactéria. As sementes permaneceram em contato com o inóculo por 24, 36, 48, 72 e 96 horas, em B.O.D., a 28 ° C. Vencidos os períodos de exposição, as amostras de sementes foram colocadas para secar em placas de Petri, de 15 cm de diâmetro, sobre três folhas de papel de filtro, a 25 ± 2 °C, por três dias. Findo o período, as sementes foram armazenadas em sacos de papel craft. As sementes secas de cada repetição e tratamento foram amostrados ao acaso para a avaliação dos efeitos dos tratamentos e mantidas à temperatura de 20 °C até a realização de todos os ensaios.

2.7.2 Determinação do grau de umidade das sementes inoculadas

Para a determinação do grau de umidade foram utilizadas as sementes inoculadas artificialmente nos meios 523 + manitol, conforme item 2.7.1.

Depois de vencidos os períodos de exposição das sementes à bactéria (24, 36, 48, 72, 96 horas), amostras foram coletadas aleatoriamente, em 4 placas de cada repetição, 4 sub-amostras de aproximadamente 6 g de sementes (peso úmido), totalizando 24 g de sementes/repetição/tratamento.

As sementes secas de cada repetição e tratamento foram amostrados ao acaso para a avaliação dos efeitos dos tratamentos. O método de Determinação do Grau de Umidade utilizado foi o da estufa, a 105 ± 3 °C, como prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

2.7.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão inoculadas artificialmente por meio de plaqueamento em meio semi-seletivo

Para a detecção de Xap/UFLA-2R em sementes de feijão inoculadas artificialmente, foram utilizadas 200 sementes de cada tratamento, divididas em dois lotes de 100 sementes cada. No primeiro lote, as sementes foram utilizadas sem desinfestação externa permitindo a detecção do patógeno localizado tanto internamente quanto externamente. No segundo lote, foi feita a desinfestação superficial permitindo a detecção apenas do patógeno localizado internamente.

2.7.4 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes inoculadas artificialmente sem posterior desinfestação externa

Em condições assépticas, as sementes inoculadas artificialmente foram colocadas, uma a uma, em tubos de ensaio contendo um mL de água destilada

esterilizada e incubadas por 18-24 horas em geladeira a 5 °C. Após este período, foram submetidas a banho de ultrassom por 10 minutos. Cada tubo foi agitado, individualmente, em vortex e, em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, o extrato foi transferido para placas contendo meio EPGA (extrato de levedura, peptona, glicose e amido) + rifampicina 100 ppm.

2.7.5 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes inoculadas artificialmente com posterior desinfestação externa

Em condições assépticas, as sementes foram desinfestadas em solução de NaOCl 2% por um minuto e lavadas uma vez com água destilada esterilizada. Em seguida, foram submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos, com água destilada esterilizada e lavada por mais duas vezes com água destilada esterilizada. As sementes foram colocadas para secar sobre papel de filtro esterilizado em câmara de fluxo laminar. Em seguida, com auxílio de um bisturi, foram feitos dois cortes no tegumento de cada semente, as quais foram colocadas, individualmente, em tubos de ensaio contendo um mL de água destilada esterilizada e incubadas por 18-24 horas em geladeira a 5 °C. Posteriormente, após a agitação de cada tubo em vortex e com o auxílio de uma alça de platina, a suspensão foi transferida para placas contendo meio EPGA + rifampicina 100 ppm.

Para cada semente foi utilizada uma placa, dividida em 6 subsetores. Para a testemunha foi utilizado uma placa com o isolado puro de Xap/UFLA-2R. Todas as placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas. Para avaliação, foi verificada a presença ou ausência de colônias típicas do patógeno, seguido do teste de hidrólise de amido (STARR, 1983 citado por MARINGONI et al., 1993) nas 100 placas. Os dados foram transformados em porcentagem. Não foi possível o ajuste estatístico para os dados deste experimento.

2.7.6 Germinação das sementes de feijão inoculadas artificialmente e transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

Para avaliação do poder germinativo das sementes inoculadas artificialmente, foram utilizadas 100 sementes de cada tratamento, divididas em 4 repetições de 25 sementes. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor contendo substrato estéril Bioplant. As avaliações consistiram na observação da germinação e do número de plântulas anormais, como prescrito pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem.

A transmissão de Xap, das sementes para as plântulas, foi observada por meio de sintomas característicos nos cotilédones e folhas primárias, sendo confirmadas por meio do teste de exsudação em gotas. Esta avaliação consistiu da presença ou ausência do patógeno no teste de exsudação em 100 plântulas, os quais foram transformadas em porcentagem.

Para a avaliação da germinação, plântulas anormais e transmissão, o ensaio foi repetido duas vezes.

A temperatura da casa de vegetação durante o período de realização deste experimento variou de 25 a 28 °C enquanto a umidade relativa, de 70 a 90%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pré-condicionamento de sementes de feijão em meio agarizado sob restrição hídrica

Ensaio I

Os resultados da germinação do pré-condicionamento de sementes de feijão que foram submetidos à restrição hídrica referentes ao Ensaio I estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Germinação de sementes de feijão da cv. Carioca após pré-condicionamento em meio agarizado mais soluto sob diferentes níveis de restrição hídrica

| Potenciais (MPa) | Meio 523 + manitol | | Meio 523 + PEG 6000 | |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Com desinfestação | Sem desinfestação | Com desinfestação | Sem desinfestação |
| -0,65 | 14.25 | 2.00 | 10.20 | 2.50 |
| -0,75 | 21.00 | 4.00 | 27.00 | 2.75 |
| -0,85 | 28.75 | 13.75 | 1.00 | 2.50 |
| -0,95 | 46.25 | 13 | 0.75 | 1.50 |
| Meio 523 | 1.00 | 3.75 | 0 | 0 |

*Porcentagem de sementes germinadas em relação ao total de sementes, submetidas ao pré-condicionamento = 400.

Verificou-se em todos os potenciais dos substratos agarizados contendo PEG 6000, que as sementes ficavam submersas no meio e se deterioravam. Este fato impediu a respiração das sementes acelerando o processo de deterioração. Além disso, algumas sementes foram tomadas por fungos de armazenamento, devido, provavelmente, a alta umidade do meio e ao longo período de exposição. Para as sementes restantes dos tratamentos contendo PEG 6000 e para as quais

foram feitos os testes de germinação no sistema rolo de papel, verificou-se que estas não germinavam, simplesmente apodreciam ou apresentavam a presença de bactérias saprofitas e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Desta forma, descartou-se a possibilidade do uso de PEG 6000 adicionado ao meio 523.

Embora PEG 6000 seja considerado um ótimo agente osmótico, uma vez que é material inerte e não fitotóxico (MEXAL et al., 1975), ele apresenta alto peso molecular, não é absorvido e suas soluções podem apresentar alta viscosidade que somada à baixa difusão de O₂, podem comprometer a disponibilidade de oxigênio para as sementes, durante o processo germinativo (HASEGAWA et al., 1984; SHARMA, 1973). Além disso, apresenta incompatibilidade com o ágar, ou seja, grande quantidade de PEG em meio contendo ágar, não ocorre solidificação (MEXAL; REID, 1973).

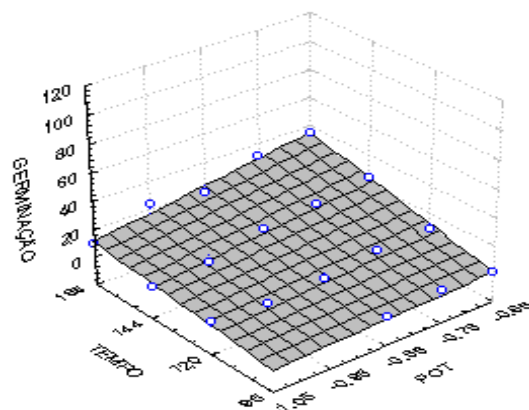
Nos tratamentos com meio 523 + manitol, houve uma grande proliferação de *Bacillus* sp. nas placas durante o período de incubação sob restrição hídrica e posteriormente, nos testes de germinação, houve grande esporulação dos fungos de armazenamento impedindo a avaliação. Desta maneira, decidiu-se pelo tratamento de sementes com os fungicidas Vitavax + Thiram, para evitar contaminação destes fungos.

Ensaio II

Neste ensaio, trabalhou-se com duas cultivares de sementes de feijão, Carioca e Pérola, sem e com desinfestação superficial em hipoclorito de sódio (NaOCl) sendo as sementes tratadas com fungicidas. Os potenciais utilizados pela adição do manitol foram: -0,65, -0,75, -0,85, -0,95, -1,05 MPa e a testemunha adicional sem o soluto, Meio 523.

Os resultados de a cultivar Carioca estão representada na Fig. 1A e 1 B, os quais estão relacionando os tratamentos sementes com e sem desinfestação e período de exposição das sementes com o substrato.

SEMENTES COM DESINFESTAÇÃO

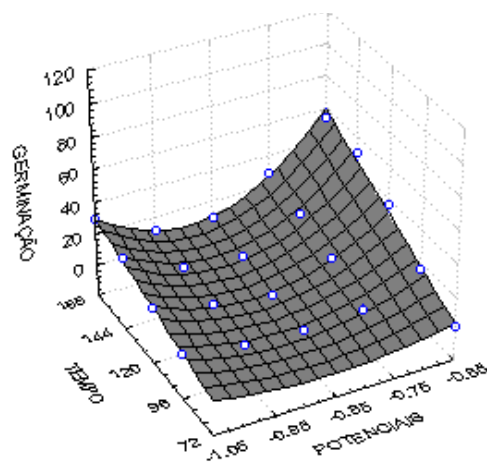


1A

$$Z:=-72.650369-45.551343*X+0.866066*Y+0.620952*X*Y$$

R2=91,89%

SEMENTES SEM DESINFESTAÇÃO



1B

$$Z:=-292.919374-601.762445*X+5.887122*Y+12.742547*X*Y-325.169807*X^2+7.063431*X^2*Y$$

$$R2=97.2\%$$

Figura 1 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Carioca, com desinfestação e sem desinfestação superficial, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica

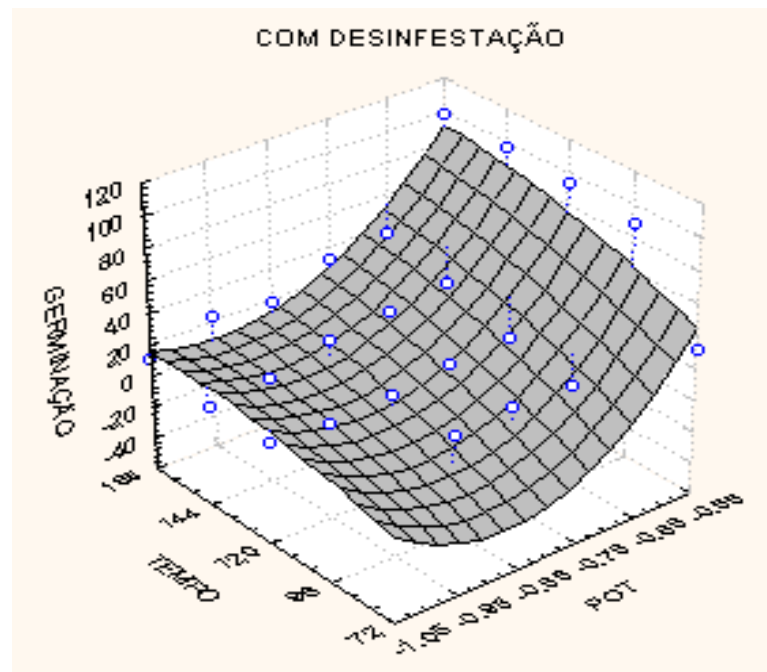
Para as sementes desinfestadas de a cultivar Carioca (Fig. 1A), tratamentos com menores potenciais hídricos, como -0,95 e -1,05 MPa, o processo de germinação iniciou-se após 120 h, enquanto potenciais de -0,85, -0,75 e -0,65 MPa, iniciou-se a partir de 96 horas. Após o período de 168 horas, as sementes apresentaram um total de germinação variando entre 19 e 40%.

No tratamento de sementes sem desinfestação (Fig. 1B), os potenciais de -0,75, -0,85, -0,95 e -1,05 Mpa, iniciaram o processo germinativo a partir de 120 horas, exceto -0,65 MPa, que se iniciou a partir de 72 horas. Após o período de 168 horas, a porcentagem de germinação variou entre 15 e 60%.

Em função da menor germinação e do tempo, optou-se pelo tratamento que apresentou melhor desempenho, ou seja, sementes desinfestadas no potencial -0,85 MPa para a cultivar Carioca.

Nesta fase, é importante observar o comportamento das sementes sobre os substratos contendo a restrição hídrica, pois há necessidade que ocorra baixa ou nenhuma germinação, uma vez que estas serão utilizadas posteriormente para plantio para serem novamente avaliadas com relação à inoculação, germinação e transmissão. O mesmo equivale para a cultivar Pérola no pré-condicionamento.

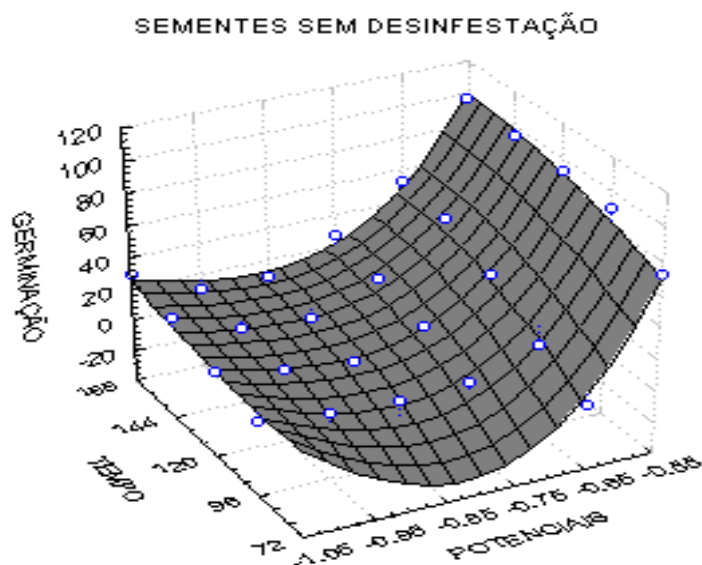
Para a cv. Pérola, observando os efeitos do potencial hídrico do substrato agarizado para as sementes e o período de exposição das mesmas com o substrato os tratamentos com e sem desinfestação apresentaram comportamentos semelhantes onde potenciais mais negativos tenderam a diminuir a germinação das sementes de feijão. O potencial -1,05 MPa foi o que mais inibiu a germinação (Figura 2 e 3).



$$Z := 556.783396 + 1579.406566 * X + 0.163276 * Y - 3.211771 * X * Y + 944.074618 * X^2 - 0.003163 * Y^2 - 2.313611 * X^2 * Y$$

R2=81.91%

Figura 2 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Pérola, com desinfestação, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica



$$Z=1836.224955+5659.555306*X-10.809635*Y+4829.286664*X^2+0.038253*Y^2-34.115332*X*Y+1025.480766*X^3-23.040939*X^2*Y+0.118923*X*Y^2+0.080529*X^2*Y^2$$

R2=97.66%

Figura 3 Gráfico relacionando germinação, tempo e potenciais no pré-condicionamento de sementes de feijão da cv. Pérola, sem desinfestação superficial, utilizando manitol nos substratos agarizados com diferentes níveis de restrição hídrica

Para a cultivar Pérola, onde as sementes foram desinfestadas (Fig. 2), o processo de germinação iniciou-se a partir de 72 horas e culminando com 100% de germinação das sementes na exposição de maior potencial, ou seja, -0,55 MPa, considerado como testemunha. No potencial de -1,05 MPa a germinação iniciou-se a partir de 120 horas, e obtivemos cerca de 19% de germinação. No tratamento de sementes, onde não houve desinfestação (Fig. 3), o processo foi semelhante, ou seja, menor o potencial, menor a germinação.

Para esta cultivar, apesar do comportamento semelhante ocorrido no período de pré-condicionamento, a menor porcentagem de germinação se deu no tratamento com desinfestação.

O início da emissão de radícula pela semente, no tratamento testemunha, meio 523 sem manitol, ocorreu após 48 horas de exposição das sementes, e após 168 h, quase todas se apresentaram germinadas para ambas as cultivares e tratamentos sem e com desinfestação. Assim, para a cv. Pérola, em função destes ensaios, selecionou-se então o tratamento com desinfestação e cujo potencial é - 1,05 MPa para os trabalhos posteriores.

A porcentagem acumulada de germinação das sementes de feijão em função do período de exposição destas ao meio 523 (com e sem manitol) concorda com Bradford (1995), em que sementes individuais necessitam de diferentes tempos de embebição para a emissão de radículas. Pode se observar que a maioria das sementes germinou entre o período de 72 e 120 horas de exposição das mesmas, já o tempo mínimo necessário para que ocorra a emissão de radículas de sementes de feijão expostas ao meio 523 (testemunha) à temperatura de 28 °C, foi a partir de 48 horas.

De maneira geral foi observado que a germinação das sementes de feijão diminuiu ao longo do período de exposição, à medida que o potencial hídrico do substrato foi reduzido, tanto para sementes desinfestadas como não desinfestadas. De acordo com alguns autores, a velocidade de absorção de água pelas sementes diminui à medida que o potencial hídrico, do meio externo, se torna mais negativo, aumentando conseqüentemente o período necessário para que ocorra a emissão da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994; BRADFORD, 1986). Este fato, também foi observado por Prisco e Oleary (1970) em estudos envolvendo o controle da hidratação de sementes de feijoeiro.

3.1.1 Germinação das sementes de feijão após pré-condicionamento em meios agarizados sob restrição hídrica

Após o pré-condicionamento, as sementes foram avaliadas com relação à germinação no sistema rolo de papel.

Para as sementes da cv. Carioca, as maiores porcentagens de germinação foram obtidas após o pré-condicionamento em Meio 523 + Manitol -1,05 MPa, com 87 % (Tabela 4) para sementes sem desinfestação. Em meio 523 + Manitol -0,85 MPa com 90,5 % (Tabela 4) para sementes desinfestadas superficialmente. A porcentagem de germinação após pré-condicionamento em Meio 523 sem o soluto, usado como testemunha, foi de 1,75 % para sementes não desinfestadas e 3,25 % para sementes desinfestadas.

Tabela 4 Germinação de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, após pré-condicionamento em meio agarizado sob diferentes níveis de restrição hídrica

| Tratam. | CARIOCA | | PÉROLA | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Com Desinfestação | Sem Desinfestação | Com Desinfestação | Sem desinfestação |
| | %* | % | % | % |
| Testemunha | 3,25 | 1,75 | 2,30 | 15,00 |
| -0,65 MPa | 45,30 | 53,50 | 93,00 | 63,50 |
| -0,75 MPa | 71,75 | 61,75 | 90,80 | 69,75 |
| -0,85 MPa | 90,50 | 76,25 | 82,00 | 73,25 |
| -0,95 MPa | 88,50 | 68,50 | 93,30 | 52,50 |
| -1,05 MPa | 70,25 | 87,00 | 96,00 | 90,25 |

*(Porcentagem em relação ao número total de sementes = 400)

Para os demais tratamentos, a porcentagem de germinação variou de 53,5 % em meio 523 + Manitol -0,65 MPa a 76,25% em meio 523 + Manitol -

0,85 MPa para sementes sem desinfestação externa (Tabela 4). Para sementes desinfestadas, variou de 45,3 a 88,5 % de sementes germinadas.

Para a cultivar Pérola, as maiores porcentagens de germinação foram obtidas após pré-condicionamento em Meio 523 + Manitol -1,05 MPa com 96,00 e 90,25 %, respectivamente para sementes desinfestadas e não desinfestadas superficialmente. Em meio 523, a porcentagem de germinação foi muito baixa, 2,3% e 15%, respectivamente para sementes desinfestadas e não desinfestadas. Essa baixa germinação, verificada também para a cultivar Carioca, ocorreu porque a maioria das sementes germinou durante o pré-condicionamento, pois a este tratamento não foi acrescentado o soluto manitol, responsável pelo potencial de restrição hídrica. Carvalho (1999) verificou que o pré-condicionamento de sementes de feijoeiro da cv. Carioca em BDA + Manitol por 168 horas propiciou, em média 95 % de germinação, sendo que a restrição hídrica no potencial de -0,85 MPa foi 99 %.

3.2 Seleção de um mutante de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, resistente a rifampicina a 1000 ppm

Após sucessivas repicagens do isolado Xap UFLA-2 em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) contendo concentrações crescentes do antibiótico rifampicina, foi selecionado o isolado Xap UFLA-2R, resistente a 1000 ppm do antibiótico. Inoculação artificial do isolado em folhas de feijoeiro, da cultivar Carioca, produziu sintoma típico do crestamento bacteriano, confirmando a sua patogenicidade.

3.3 Crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em meio agarizado sob diferentes níveis de restrição hídrica

Em relação ao crescimento dos diferentes isolados nos substratos com restrição hídrica, observou-se que foi significativo para a interação das variáveis: isolados e potenciais osmóticos. Os isolados se diferenciaram individualmente no crescimento, sendo que UFLA-2R comportou-se com o segundo melhor crescimento.

Para todos os isolados e em todos os tratamentos foram observadas colônias amarelas, lisas e mucoides, conforme é característico da espécie (ROMEIRO, 1995).

Em relação ao tamanho visual da colônia, pode-se observar uma relação entre o potencial hídrico e diâmetro da colônia, ou seja, à medida que se diminuiu o potencial hídrico, o diâmetro das colônias também diminuiu. Provavelmente Xap teve o tamanho da colônia reduzida devido ao potencial hídrico do meio e a alta concentração de manitol, uma vez que este patógeno não utiliza manitol como fonte de carbono (HALFELD-VIEIRA, 1999).

Outros pesquisadores relatam o comportamento de patógenos fúngicos com relação ao crescimento destes, não sendo encontrada literatura sobre este assunto, para patógenos bacterianos. Carvalho (1999) relata que para *Colletotrichum lindemuthianum*, a adição de manitol ao meio BDA favorece o aumento do diâmetro médio das colônias até o potencial -0,8 MPa, onde após este nível, tende para o declínio. Isto ocorre provavelmente porque o manitol é facilmente metabolizado pelo patógeno. Meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 e -2,0 MPa também estimularam o crescimento micelial dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum*, enquanto meios de cultura com potenciais osmóticos mais negativos que -2,0 MPa reduziram o crescimento

micelial desses fungos (ADEBAYO; HARRIS, 1971; GAO; SHAIN, 1995; SUBBARAO; MICHAILIDES; MORGAN, 1993; WEARING; BURGESS, 1979).

Por outro lado, Coutinho (2000), verificou que para os principais fungos associados às sementes de arroz e feijoeiro, o crescimento micelial não foi afetado pelas condições de restrição hídrica do meio BDA, pela adição dos solutos NaCl, KCl e manitol em potenciais osmóticos entre -0,4 e -0,9 MPa. Machado (2002) relatou que a restrição hídrica em meio BDA, induzida pelos solutos manitol e NaCl, reduziu de modo geral, a frutificação dos fungos *Fusarium spp.*, *Botryodiplodia theobromae*, *Colletrotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nos potenciais mais negativos que -0,8 MPa.

Alguns isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* produzem um pigmento escuro difusível no meio de cultura, semelhante a melanina (BASU; WALLEN, 1967) que caracterizam essa variante como *fuscans*. Esse pigmento pode ser observado no meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), 48 horas após a repicagem da bactéria. Entretanto, nos tratamentos com restrição hídrica, quase não foi possível observar o escurecimento do meio, sendo que em potenciais mais negativos, como -1,05 MPa, o escurecimento não foi observado até 96 horas após a repicagem. Pode ser que a produção desse pigmento tenha sido retardada ou inibida pela alta concentração de manitol ou pelo efeito da restrição hídrica, ou ainda o pigmento pode ter sido produzido e a alteração do meio por esses fatores, mascarou o efeito de escurecimento. Basu e Wallen (1967) relataram que em meios básicos suplementados com açúcar-álcool, o pigmento foi produzido nos valores de pH entre 5,8 a 8,7, embora no pH 7,0 ou abaixo desse valor, o escurecimento do meio não tenha sido tão intenso como nos níveis superiores. Basu (1974) relata que alta concentração de glicose em meios de cultura causa a inibição do desenvolvimento do pigmento devido ao efeito

repressivo da glicose sobre a síntese ou a secreção da enzima do tipo tirosinase bem como auto-oxidação de substratos.

Para o crescimento bacteriano, optou-se pelo potencial -0,85 MPa, pois este foi o potencial escolhido do ensaio em que as sementes pré-condicionadas apresentou melhor germinação para a cultivar Carioca. Para a cv. Pérola, o meio agarizado que se apresentou com melhor resultado em relação à restrição hídrica, foi -1,05 MPa. Assim, optou-se pelo uso do meio 523 nos referidos potenciais dentro de cada cultivar, para prosseguir com os experimentos.

Com relação ao patógeno, os resultados obtidos permitem concluir que a técnica de restrição hídrica pelo uso de manitol poderá ser usada para a inoculação artificial de sementes de feijão. Entre os isolados testados, Xap/UFLA-2R foi selecionado para a inoculação artificial, pois além de não ter seu crescimento afetado pelo uso da restrição hídrica, apresenta alta virulência quando inoculado em folhas e vagens de feijoeiro (ÁVILA et al., 1998; HALFELD-VIEIRA; SOUZA, 2000; KOBAYASTI; SOUZA; SANTOS, 1999).

3.4 Inoculação artificial de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, isolado UFLA-2R em sementes de feijão sob restrição hídrica

Neste ensaio, avaliou-se a inoculação artificial das sementes por meio da determinação do grau de umidade, da detecção de bactérias em meio semisseletivo, da germinação de sementes inoculadas artificialmente em substrato estéril e da transmissão do patógeno para as plântulas.

Os resultados referentes ao grau de umidade das sementes de feijão, cvs. Carioca e Pérola, inoculadas com o isolado Xap/UFLA-2R, após 48 horas de cultivo, por diferentes períodos de exposição (24, 36, 48, 72 e 96 h) estão apresentados na Figura 4.

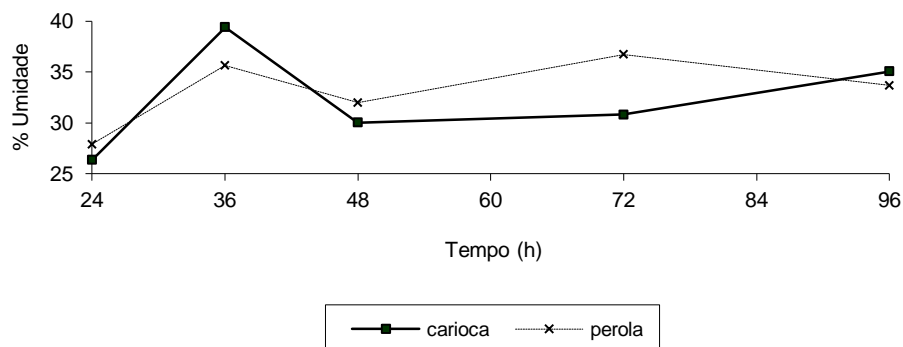


Figura 4 Determinação do grau de umidade de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA-2R, por diferentes períodos de exposição em meio sob restrição hídrica

O grau de umidade atingido pelas sementes nos diferentes tratamentos variou significativamente em função do tempo de contato bactéria-semente. Para a cv. Carioca, meio contendo manitol com o tempo de 24 h foi o que apresentou menor porcentagem de umidade, seguido do tratamento com 48 e 72 h. Para a cv, Pérola, os meios modificados com 24 h, seguido de 48 e 96 h de contato bactéria-semente, foram os que apresentaram menores porcentagens de umidade, 27,89, 31,99 e 33,67 %, respectivamente. O período de contato de 36 horas foi o que apresentou maior porcentagem de umidade para ambas as cultivares.

O grau de umidade atingido pelas sementes nos diferentes tratamentos, meios 523 -0,85 e -1,05 MPa, 523 sem bactéria, NGA e 523 sem restrição hídrica, considerados como testemunhas, diferiram significativamente entre si para as cultivares Carioca e Pérola (Tabela 5).

Tabela 5 Determinação do grau de umidade de sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA-2R (Xap), com 36 h de exposição, sementes com o meio de cultura

| Tratamentos | Médias** | |
|---------------------------------|----------|---------|
| | Carioca | Pérola |
| Meio 523 com restrição hídrica* | 32.35a | 33.19a |
| Meio 523 sem Xap | 37.62b | 35.77ab |
| Meio NGA*** | 39.37b | 38.93bc |
| Meio 523 sem restrição hídrica | 43.49c | 41.67c |

* -0,85 MPa para a cv. Carioca, -1,05 Mpa para cv. Pérola. **Médias seguidas de mesma letra são significativamente iguais entre si ao nível de 1% para o Teste de Tukey. *** Meio Nutriente-Glicose-Ágar

A porcentagem de umidade das sementes expostas ao meio 523 sem restrição hídrica diferenciou estatisticamente dos demais tratamentos apresentando-se maiores tanto para cv. Carioca quanto Pérola. E as sementes expostas aos meios sem Xap e NGA se apresentaram estatisticamente iguais entre si, com relação à umidade. Para as sementes contidas nos meios contendo restrição hídrica, se apresentaram com menores porcentagens de umidade.

A umidade da semente é um fator que deve ser levado em consideração, pois pode condicionar a viabilidade e a ação de uma bactéria por ocasião do processo de inoculação. Os tratamentos testemunhas, meios 523 com Xap e NGA, utilizando o período de 36 h de contato bactéria-semente, apresentavam a umidade próxima desse valor mantendo, portanto, a germinação em quiescência. Em todos os tratamentos contendo manitol, observados durante a condução desse ensaio, não se obteve a germinação das sementes, ou mesmo emissão da radícula nos períodos compreendidos entre 24 e 96 horas, provavelmente devido à restrição hídrica do substrato, que reduziu a absorção de água pelas sementes, não permitindo que estas atingissem o valor mínimo de umidade exigido para a emissão de radículas.

No ensaio de pré-condicionamento (item 3.1, ensaio II), a testemunha meio 523 sem manitol, apresentou quase 100% de germinação até 72 horas. O grau de umidade destas sementes com 36 horas de contato semente/meio de cultura foi de 43,49 e 1,67 % para Carioca e Pérola, respectivamente (Tabela 5), explicando o motivo desta alta germinação. Para os tratamentos com restrição hídrica, não foi observada germinação nos períodos compreendidos entre 24 e 96 horas, não alcançando, portanto, a porcentagem ideal de umidade para que ocorresse o processo total para a emissão de radículas no pré-condicionamento.

De acordo com Bradford (1986, 1995), a germinação da semente ocorre quando esta atinge um valor crítico de umidade (platô) alcançado em função do potencial hídrico do ambiente e do período de hidratação das sementes. Shioga (1990) relata que sementes de feijoeiro necessitam de um mínimo de 48 a 50 % de umidade para a germinação. De maneira geral, observou-se que as menores porcentagens de umidade foram encontradas nos meio contendo manitol, como já era esperado. Meios considerados testemunhas, 523 sem e com Xap e NGA apresentaram resultados variados, porém com maiores porcentagens de umidade quando comparados com os tratamentos de restrição hídrica.

3.4.1 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA-2R em sementes de feijão inoculadas artificialmente por meio de plaqueamento em meio semi-seletivo

Neste ensaio, foram utilizadas sementes inoculadas artificialmente sem e com desinfestação para verificar a presença do patógeno tanto externa quanto internamente.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, pode-se concluir que os diferentes tratamentos permitiram tanto a contaminação externa quanto interna de Xap nas sementes de feijão. Para a cultivar Carioca, a porcentagem de

detecção do patógeno, nas sementes não submetidas a desinfestação artificial após a inoculação, foi de 100%. Entretanto, para a cultivar Pérola, esse índice variou de 76 a 100%.

Tabela 6 Detecção em meio semisseletivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em sementes de feijão inoculadas artificialmente

| Tratamentos | CARIOCA* | | PÉROLA* | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Sem desinfestação (%) | Com desinfestação (%) | Sem desinfestação (%) | Com desinfestação (%) |
| Meio 523 sem Xap 36 h | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Meio 523 36 h | 100 | 79 | 99 | 58 |
| Meio NGA*** 36 h | 100 | 74 | 76 | 37 |
| Meio 523 modif. 24 h | 100 | 92 | 100 | 61 |
| Meio 523 modif. 36 h | 100 | 98 | 92 | 51 |
| Meio 523 modif. 48 h | 100 | 50 | 0** | 28 |
| Meio 523 modif. 72 h | 46** | 88 | 6** | 11 |
| Meio 5623 modif. 96 h | 0** | 77 | 6** | 63 |

Para a cultivar Carioca foi utilizado o Meio 523 -0,85 MPa e para Pérola, 523 -1,05 MPa. **Contaminação com *Aspergillus* e *Penicillium*. *** Meio Nutriente-Glicose-Ágar

Para sementes sem desinfestação superficial, todos os tratamentos permitiram a detecção do patógeno em todas as sementes, independente da restrição hídrica, meio de cultura ou tempo de exposição. Entretanto, para a cv. Carioca, deve-se observar que para 72 e 96 horas de exposição, ocorreu uma intensa contaminação com os fungos de armazenamento, *Aspergillus* e *Penicillium*, que impediram uma avaliação precisa. Para a cultivar Pérola, foi verificado um índice de contaminação acima de 92% para as sementes mantidas em meio 523, independente da restrição hídrica e de 76% para o meio NGA, até

36 horas de exposição. Para os demais tratamentos houve também contaminação com os fungos de armazenamento, impedindo uma avaliação precisa.

Para a cultivar Carioca, sementes inoculadas artificialmente em meio 523 -0,85 MPa com 36 horas de exposição, apresentou 98% de infecção interna. Nos meios NGA e 523 sem restrição hídrica, a porcentagem foi respectivamente 74 e 79% para 36 horas de exposição. Contrariando as expectativas, um maior tempo de exposição das sementes à bactéria não trouxe maior índice de infecção interna, apesar de que no tratamento meio 523 + Manitol -0,85 MPa por 96 horas, a porcentagem de infecção foi de 77%.

Para a cultivar Pérola, as maiores porcentagens de infecção interna foram obtidas nos tratamentos meio 523 + Manitol -1,05 MPa de 96 e 24 horas de exposição, respectivamente 63 e 61%, e as menores para 48 e 72 horas de exposição, 11 e 28%. Conforme observado também para a cultivar Carioca o maior tempo de exposição não proporcionou maior porcentagem de infecção.

De maneira geral, pode-se verificar que as sementes da cv. Carioca, apresentaram maior taxa de contaminação pela bactéria, tanto externa como internamente, em relação à cv. Pérola. A presença de Xap internamente às sementes em ambas as cultivares, considerando-se uma recuperação do patógeno em até 98% na cv. Carioca e 61% na cv. Pérola indica que a infecção varia em função da suscetibilidade da cultivar uma vez que Carioca é considerada suscetível e Pérola, moderadamente resistente. Valarini, Galvão e Oliveira (1996) demonstraram que a taxa de transmissão, considerada alta, variou de 16 a 50,8%, em função da suscetibilidade da cultivar empregada, EMGOPA 201-Ouro e IAC Carioca. Maringoni et al. (1993), trabalhando com sementes inoculadas a partir de vagens e aferidas por meio semi-seletivo, constataram taxas de infecção de 80,96%, para a variedade suscetível Carioca e de 48,84%, para 'G.N. Nebraska #1 sel. 27', variedade considerada resistente. As taxas de infecção aqui relatadas podem ser consideradas altas, uma vez que 0,5 % de

sementes portadoras do patógeno pode iniciar uma epidemia em campo (KIMATI, 1980).

Para o tratamento Meio NGA 36 horas, verificou-se 100 e 76% de infestação e para infecção, 74 e 37%, respectivamente para as cultivares Carioca e Pérola. Estes resultados diferem dos encontrados por Valarini e Menten (1991), onde utilizando o Meio NGA, Xap com 48 h de crescimento e contato da semente/bactéria por 36 horas, conseguiram 100% de infestação e infecção.

Segundo Weller e Saettler (1980), sementes externamente infestadas com Xap podem ser fontes de inóculo primário, sendo que níveis mínimos de inóculo, como 10^3 a 10^4 bactérias por sementes, foram transferidos das sementes para as plântulas. Por outro lado, populações bacterianas detectadas nas amostras de sementes variaram consideravelmente, sugerindo que o patógeno não foi igualmente distribuído entre as sementes permanecendo concentrado em pequenas áreas da sua superfície, o que pode ter ocorrido neste ensaio em função da variação da porcentagem de detecção.

A semente é o principal e mais eficiente meio de disseminação e sobrevivência da bactéria, e sabendo-se que os agentes causadores do CB podem se localizar tanto interna como externamente (KOBAYASTI, 1998; VALARINI; GALVÃO; OLIVEIRA, 1996; WELLER; SAETTLER, 1980), a inoculação artificial de sementes de feijão pode ser útil para estudos relacionados à localização do patógeno nas sementes, na determinação do seu efeito sobre a qualidade fisiológica destas e no preparo de amostras com incidências conhecidas do patógeno para trabalhos epidemiológicos.

3.4.2 Germinação de sementes de feijoeiro inoculadas artificialmente, e transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* para plântulas

Para os resultados referentes à germinação das sementes inoculadas artificialmente, não houve diferenças significativas nos ensaios I e II para as cultivares Carioca e Pérola. Em ambos os ensaios verificaram-se maior porcentagem de germinação para os tratamentos em que as sementes permaneceram por até 48 horas em contato com o patógeno, independente do potencial hídrico ou da presença do patógeno. Assim, os maiores índices de germinação foram obtidos nos meios NGA, 523, 523 -0,85 MPa e 523 -1,05 MPa por 24 e 36 horas. Foi verificado também que a porcentagem de germinação da cultivar Pérola foi ligeiramente superior à da cultivar Carioca.

Para a cultivar Carioca e Pérola, no Ensaio I, não houve diferença significativa para porcentagem de plântulas anormais, ou seja, sem cotilédones ou deformados, folhas deformadas e sem gema apical. No Ensaio 2, as sementes não inoculadas (meio 523 sem bactéria) se apresentou com comportamento diferentes das sementes inoculadas no meio 523 -0,85 MPa, meio 523 com bactéria e o meio NGA, para ambas as cultivares, apresentando uma menor porcentagem de plântulas anormais.

De maneira geral, nos tratamentos em que as sementes permaneceram por mais tempo em contato com o substrato agarizado, 72 e 96 h, houve maior índice de contaminação com os fungos de armazenamento, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., tanto nas placas durante o período de inoculação quanto no período de secagem das sementes antes do plantio. Dessa forma, supõe-se que o menor índice de germinação e a maior porcentagem de plantas anormais nestes tratamentos, sejam devidos não só a presença de Xap, mas também a incidência de fungos. Alguns autores relatam que a presença de fungos em condições alta

umidade das sementes pode ocasionar rápida perda de viabilidade das mesmas (AGARWALL; SINCLAIR, 1987; BEWLEY; BLACK, 1994).

Com relação aos outros tratamentos, o patógeno pode ter influenciado na germinação de plântulas anormais ou mesmo na não germinação das sementes. Entretanto, vale ressaltar que a porcentagem de germinação na qualidade inicial dos lotes de sementes foi de 87% para a cv. Carioca e 91% para cv. Pérola (Tabela 1, item 2.1), índices em média, menores que os obtidos após o tratamento.

Para o tratamento meio NGA 36 h, foram obtidos os índices de 92 e 96% de germinação para a cv. Carioca. Para a cv. Pérola foram obtidos índices de 98 e 99%, índices esses maiores que os encontrados por Valarini e Menten (1991), que utilizando o mesmo tipo de inoculação, obtiveram 78,21% de germinação a partir de uma mistura de sementes de feijoeiro dos cultivares Vagem Roxa, IPA 74-19 e HF 456-63-1.

Vieira e Sartorato (1984) relataram que sementes de feijoeiro, portadoras de Xap, quando são colocadas para germinar, podem ter o meristema apical das plântulas destruído, acarretando-lhes a morte ou então dando origem a plantas doentes, as quais produzirão poucas vagens. Também Weller e Saettler (1980) relataram que sementes severamente atacadas por esse patógeno, apresentaram taxas reduzidas de germinação e produziram plântulas deformadas. Através de inoculação artificial de Xap em sementes, Valarini e Menten (1990) observaram em testes de laboratório, que esse patógeno provocou redução significativa no poder germinativo das sementes.

Os resultados referentes à taxa de transmissão de Xap das sementes inoculadas artificialmente para plântulas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em substrato estéril, a partir de sementes inoculadas artificialmente das cvs. Carioca e Pérola

| ENSAIO I | | | | |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Tratamentos | CARIOCA | | PÉROLA | |
| | % de cotilédones com sintomas | % de folhas primárias com sintomas | % de cotilédones com sintomas | % de folhas primárias com sintomas |
| Meio 523 sem Xap | 9 | 8 | 0 | 1 |
| Meio 523 36 h | 18 | 12 | 6 | 12 |
| Meio NGA* 36 h | 8 | 22 | 0 | 4 |
| Meio 523 modif. 24 h | 6 | 56 | 4 | 0 |
| Meio 523 modif. 36 h | 10 | 68 | 2 | 2 |
| Meio 523 modif. 48 h | 7 | 19 | 9 | 1 |
| Meio 523 modif. 72 h | 22 | 0 | 9 | 4 |
| Meio 523 modif. 96 h | 20 | 21 | 20 | 8 |

| ENSAIO II | | | | |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Tratamentos | CARIOCA | | PÉROLA | |
| | % de cotilédones com sintomas | % de folhas primárias com sintomas | % de cotilédones com sintomas | % de folhas primárias com sintomas |
| Meio 523 sem Xap | 7 | 0 | 1 | 0 |
| Meio 523 36 h | 17 | 0 | 2 | 0 |
| Meio NGA 36 h | 23 | 0 | 15 | 0 |
| Meio 523 modif. 24 h | 17 | 0 | 9 | 0 |
| Meio 523 modif. 36 h | 13 | 0 | 12 | 0 |
| Meio 523 modif. 48 h | 31 | 0 | 25 | 0 |
| Meio 523 modif. 72 h | 8 | 0 | 71 | 0 |
| Meio 523 modif. 96 h | 41 | 0 | 15 | 0 |

*Meio Nutriente-Glicose-Ágar

No Ensaio I, foram observados sintomas do patógeno nos cotilédones e folhas primárias, enquanto que no Ensaio II, as folhas primárias não exibiram sintomas até o período de avaliação. Este fato pode estar relacionado à baixa temperatura do ambiente, ocasionada por uma frente fria que ocorreu logo após a germinação das plantas, pois as condições favoráveis ao crestamento bacteriano são alta temperatura e alta umidade (SUTTON; WALLEN, 1970).

A cultivar Carioca apresentou maior porcentagem tanto de cotilédones quanto de folhas primárias sintomáticas do que a cultivar Pérola. A porcentagem de cotilédones com sintomas variou de 6 a 41% para a cv. Carioca e de 2 a 20%

para Pérola, enquanto a porcentagem de folhas primárias sintomáticas variou de 8 a 68% para 'Carioca', e de 1 a 12 % para 'Pérola'. A porcentagem de cotilédones com sintomas foi maior nos tratamentos em que a exposição ao patógeno foi maior, ou seja, meio 523 -0,85 MPa por 96 e 72 h. Pode-se supor que o maior período de exposição da semente ao inóculo permitiu que o inóculo se concentrasse no tecido cotiledonar das sementes. Contudo, vale ressaltar, que em todos os tratamentos, houve a transmissão do patógeno das sementes para os cotilédones. Em relação às folhas primárias, foi verificada maior porcentagem de sintomas nos tratamentos meio 523 -0,85 MPa por 36 e 24 horas para a cultivar Carioca, para a cv. Pérola, as maiores porcentagens foram verificadas nos meios 523 por 36 h e 523 -1.05 MPa por 96 horas.

Nos tratamentos em que não foi feita a inoculação artificial (meio 523 sem Xap) verificou-se uma porcentagem de 9 e 7%, e 0 e 1% de cotilédones com sintomas, e de 8 e 1% de folhas com sintomas, respectivamente, para as cvs., Carioca e Pérola. Estes sintomas podem ser resultados de infecção natural nos lotes de sementes utilizados ou consequência de disseminação a partir do inóculo primário resultante das sementes inoculadas artificialmente. Como a confirmação dos sintomas foi feita pelo teste de exsudação em gotas, não se pode confirmar a origem desses sintomas. Entretanto, no processo de detecção de Xap, utilizando-se os meios 523 e 523 + rifampicina, o tratamento meio 523 sem Xap, não apresentou nenhuma colônia do patógeno.

Valarini, Galvão e Oliveira (1996) observaram que a contaminação de sementes com Xap até o nível de 10% não afetaram a emergência em campo, porém, níveis a partir de 10% proporcionaram incidência de doença no campo acima de 25% e afetaram significativamente a produção de grãos de feijão (cv. EMGOPA 201-Ouro).

4 CONCLUSÕES

Dentro das condições em que este trabalho foi realizado, permite-se concluir que:

- a) A restrição hídrica do meio 523, pelo uso do manitol, constituiu uma técnica viável para aumentar a eficiência do processo de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão;
- b) Sementes inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, por meio da restrição hídrica, pelo uso do meio 523 + Manitol, apresentaram alta porcentagem de germinação;
- c) Os períodos de exposição ao inóculo de 24 e 36 horas, durante a inoculação sob restrição hídrica, permitiram maior porcentagem de detecção do patógeno;
- d) Os períodos de exposição ao inóculo de 24, 36 e 48 horas, durante a inoculação sob restrição hídrica, permitiram maior porcentagem de transmissão do patógeno;
- e) A transmissão do patógeno, para os cotilédones e folhas primárias a partir de sementes inoculadas, variou de 6 a 41% para a cv. Carioca e de 0 a 71% para a cv. Pérola.

REFERÊNCIAS

ADEBAYO, A. A.; HARRIS, R. F. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric potential. **Soil Science America Proceedings**, Madison, v. 35, n. 3, p. 465-469, May/June 1971.

AGGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC, 1987. v. 2, 168 p.

ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 36, n. 3, p. 383-388, May 1996.

ÁVILA, Z. R. de et al. Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 18-22, mar. 1998.

BASU, P. K. Glucose inhibition of the characteristic melanoid pigment of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 2203- 2206, 1974.

BASU, P. K.; WALLEN, V. R. Factors affecting virulence and pigment production of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 45, p. 2367-2374, 1967.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, Oct. 1986.

_____. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. p. 351-396.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

BROWNELL, K. H.; SCHENEIDER, R. W. Roles of matric and osmotic components of water potential and their interaction with temperature in the growth of *Fusarium oxysporum* in synthetic media and soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 1, p. 53-57, Jan. 1985.

CAFATI, C. R.; SAETTLER, A. W. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 657-679, 1980.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

COUTINHO, W. M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oriza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

DEL GIÚDICE, M. P. **Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

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.

FU, J. R. et al. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds with PEG to improve vigor and some biological activities. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 16, p. 197-212, 1988.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of osmotic potential on virulent and hypovirulent strains of the Chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 25, n. 6, p. 1024-1029, June 1995.

HALFELD-VIEIRA, B. de A. **Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans***. 1999. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; SOUZA, R. M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 94-102, dez. 2000. Edição especial.

HASEGAWA, P. M. et al. Cellular mechanism of tolerance to water stress. **Hortscience**, Saint Joseph, v. 19, n. 3, p. 371-377, 1984.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 3, p. 881-888, Mar. 1975.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 4, n. 1, p. 152-155, 1976.

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

KHAN, A. A. et al. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 83, p. 267-278, 1978.

KHAN, A. A.; PECK, N. H.; SAMIMY, C. Seed osmoconditioning: physiological and biochemical changes. **Israel Journal of Botany**, Tel Aviv, v. 29, n. 1/4, p. 133-144, 1981.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, p. 297-318.

KOBAYASTI, L. **Avaliação de genótipos de 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, 1998.

KOBAYASTI, L.; SOUZA, R. M. de; SANTOS, J. B. dos. Avaliação de cultivares e linhagens de feijoeiro quanto à reação foliar e de vagens à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 40-47, jan./mar. 1999.

MACHADO, A. Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

MARINGONI, A. C. et al. Reação foliar e da vagem de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 412-415, set. 1993.

MEXAL, J. et al. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant water relations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 55, n. 1, p. 20-24, Jan. 1975.

MEXAL, J.; REID, C. P. P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, n. 9, p. 1579-1588, Sept. 1973.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6.000. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 5, p. 914-916, May 1973.

MICHELL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1/2, p. 126-130, Jan./Feb. 1995.

PILL, W. G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1994. p. 319-359.

PRISCO, J. T.; OLEARY, J. W. Osmotic and 'toxic' effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, San José, v. 20, n. 2, p. 177-184, 1970.

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

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 283 p.

SHARMA, M. L. Simulation of drough and its effect on germination of five pasure species. **Agronomy Journal**, Madison, v. 71, n. 6, p. 982-987, 1973.

SHIOGA, P. S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1990. 106 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1990.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS technical report SAS/STAT software: changes and enhancement release 607**. Cary, 1992. Software.

SUBBARAO, K. V.; MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 833, n. 12, p. 1454-1459, Dec. 1993.

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

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. 1, p. 227-231, Jan. 1991.

_____. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 171-180, 1992.

VIEIRA, R. F.; SARTORATO, A. **Recomendações técnicas para produção de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) de alta qualidade**. Goiânia: EMBRAPA/CNPAP, 1984. 46 p. (Circular Técnica, 10).

WALLEN, V. R.; GALWAY, D. A. Bacterial blight of field bean: disease progress, yield loss, and cross canopy development in principal cultivars in Ontario. **Canadian Plant Disease Survey**, Ottawa, v. 57, n. 3/4, p. 61-64, July/Dec. 1977.

WEARING, A. H.; BURGESS, L. W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* 'graminearum'. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 11, p. 661-667, 1979.

WELLER, D. M.; SAETTLER, A. W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 2, p. 148-152, Feb. 1980.

CAPÍTULO 3 Otimização da Bio-PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de extratos de sementes de feijão

RESUMO

O objetivo com este trabalho foi adaptar a técnica de Bio-PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em sementes de feijão das cultivares Carioca e Pérola. Inicialmente foi feita a determinação da sensibilidade da técnica, partindo-se de diluições de uma suspensão bacteriana pura. Placas contendo 1, 3 e 10 colônias de Xap com 48, 72, 96 e 120 horas de incubação foram diluídas em 1 e 3 mL de água destilada esterilizada, sendo a suspensão submetida à PCR. Para a detecção do patógeno, utilizaram-se extratos contendo uma semente contaminada em lotes de 10, 100, 500 e 1000 sementes, mantidos por 24 h a 5 °C, seguindo-se de plaqueamento em meio 523 e incubação a 28 °C, por 72 h. Foi feita a contagem de colônias típicas de Xap por placa, a lavagem com 1 ou 3 ml de água, sendo a suspensão obtida submetida à PCR. A técnica permitiu a amplificação do fragmento de 730 pb, típico de Xap, a partir de uma colônia com 72, 96 e 120 h de incubação, mesmo na presença de microrganismos saprófitas. Foi possível, também, detectar uma semente contaminada em lotes de 10, 100, 500 e 1.000 sementes de feijão consideradas sadias. Por esta técnica, a diagnose de um lote de sementes de feijão pode ser realizada em aproximadamente quatro dias.

Palavras – chave: *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Crestamento bacteriano comum. Diagnose. Bactéria.

ABSTRACT

The objective of this work was improving the Bio-PCR technique for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) in bean seeds of the cultivars Carioca and Pérola. Initially was done the determination of the technique's sensibility, using dilutions of a pure bacterial suspension. Plates containing 1, 3 and 10 Xap colonies with 48, 72, 96 and 120 hours of incubation were diluted in 1 and 3 mL of sterilized distilled water, and the suspension was submitted to the PCR. For the detection of the pathogen, extracts containing one contaminated seed in lots of 10, 100, 500 and 1000 seeds, maintained for 24 hours at 5° C, was used, followed by plating in medium 523 and incubation at 28° C, for 72 hours. The counting of typical colonies of Xap was done per plate, washing with 1 or 3 mL of water, and the obtained suspension was submitted to PCR. The technique permitted the amplification of the 730 pb fragment, typical of Xap, from a colony with 72, 96 and 120 hours of incubation, even in the presence of saprophyte microorganisms. It was also possible to detect a contaminated seed in lots of 10, 100, 500 and 1000 bean seeds considered healthy. The diagnosis of a lot of bean seeds may be done in approximately four days, using this technique.

Key words: *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Common bacterial blight. Diagnosis. Bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Sementes de feijão contaminadas internamente e/ou externamente por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) (VAUTERIN et al., 1995) constituem um meio ideal de sobrevivência, ou seja, a bactéria pode permanecer viável em seu interior por até 15 anos (BASU; WALLEN, 1966; SCHUSTER; SAYRE, 1967), tornando-se um meio eficiente de disseminação do patógeno a longas distâncias, podendo ocasionar a sua introdução em áreas onde a enfermidade não existe (WATSON, 1970) ou servir como fonte de inóculo inicial para o progresso de epidemias sob condições de campo (NEERGAARD, 1979).

O uso de sementes livres do patógeno é um dos métodos mais eficientes de controle do crestamento bacteriano, porém é dependente da confiabilidade dos métodos empregados para a sua detecção. O desenvolvimento de métodos para detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em sementes de feijão para análise de rotina é um desafio particular para o fitopatologista. Análises para identificação e quantificação da bactéria em sementes de feijão pelo plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo, uso de bacteriófagos, imunoanálises e inoculação em hospedeiros são válidas, porém são laboriosas e não são suficientemente precisas. Além disso, a análise de 10.000, 30.000 ou mais sementes requer uma grande quantidade de materiais e espaço, além de consumir tempo e dinheiro, para ser empregada como teste de rotina em sanidade de sementes (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

Avanços recentes na biologia molecular estão sendo aplicados no desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos para a diagnose e identificação de patógenos em plantas e sementes. Gilbertson et al. (1989) utilizaram sondas de DNA para detectar Xap em folhas de feijão e restos de plantas, sendo que o limite de detecção foi de 10^3 u.f.c. Entretanto, a

sensibilidade de sondas de hibridização foi limitada quando houve um excesso de DNA ou RNA heterólogo presente com baixa quantidade de moléculas alvos (AUDY et al., 1994).

Outros pesquisadores têm utilizado a técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (PCR), para detecção e diagnóstico de algumas fitobactérias. É um método *in vitro*, altamente específico, que permite a amplificação exponencial de uma sequência nucleotídica em poucas horas (BATISTA, 1993).

Audy et al. (1994) descreveram o método de PCR para detecção de Xap a partir de lesões em folhas de feijão, utilizando *primers* ricos em G+C, desenhados a partir do DNA plasmidial de 3,4 kb (p7) de Xap. O par de *primers* p7X4 permite a amplificação específica de um fragmento de 730 pb de DNA de 27 isolados de Xap patogênicos e um fragmento adicional de 550 pb para isolados *fuscans*.

Audy et al. (1996) desenvolveram um método baseado na PCR para detecção de Xap e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psp) a partir da extração de DNA dos patógenos em sementes de feijoeiro contaminadas. Os *primers* HB14 (Psp) e X4 (Xap) permitiram amplificação de segmentos de DNA bacteriano a partir de extratos de sementes de feijão branco, enquanto as análises provenientes de sementes de feijão colorido só foram viáveis quando se adicionou polivinilpirrolidona no tampão de extração. Este teste permitiu a detecção de uma semente infectada em 10.000 sementes.

A Bio-PCR, um método que combina amplificações biológica e enzimática, foi desenvolvida por Schaad et al. (1995). Neste método, extratos das sementes foram plaqueados e incubados em meio seletivo para detecção de Psp em sementes de feijão. Em seguida, as colônias foram lavadas para obtenção da suspensão, que foi utilizado sem a prévia extração de DNA para amplificação do fragmento do gene *tox*.

Segundo Schaad et al. (1995), a vantagem da técnica de Bio-PCR sobre a técnica de PCR inclui a eliminação de falsos positivos, resultantes da presença de células mortas que possam estar associadas às sementes; eliminação de falso negativo devido aos inibidores potenciais da PCR presentes em extratos de sementes; a amplificação biológica dos organismos alvos antes da amplificação enzimática pela PCR, o que aumenta a sensibilidade da detecção em lotes de sementes com baixos níveis de Xap, pois utiliza um volume maior da amostra (100 µl do plaqueamento em meio de ágar contra os 5 µl utilizados em PCR padrão). A técnica de bio-PCR oferece, ainda, maior rapidez sobre o plaqueamento tradicional, pois em aproximadamente quatro dias os resultados podem ser concluídos e não precisam ser confirmados por testes de patogenicidade como ocorre nas técnicas de plaqueamento, que demoram cerca de 7 a 10 dias. As desvantagens da Bio-PCR incluem a dificuldade de células fisiologicamente enfraquecidas ou injuriadas de se multiplicarem nos meios de cultura, resultando em falsos negativos, e possíveis erros na previsão da doença no campo devido à alta sensibilidade (SCHAAD; BONDE; HATZILOUKAS, 1997).

Esta técnica ainda não está adaptada para as nossas condições, mas poderá, em um futuro próximo, ser uma ferramenta útil para detectar Xap a partir de sementes de feijão, o que ajudaria na acurácia e na eficiência da diagnose do crestamento bacteriano e no estabelecimento de um padrão de tolerância para programas de certificação de sementes. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, adaptar a técnica de Bio-PCR para detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a adaptação a técnica de Bio-PCR na detecção de Xap em sementes de feijão, foram seguidas as seguintes etapas: determinação da sensibilidade da técnica, preparo das amostras de sementes de feijão e detecção do patógeno.

2.1 Determinação da sensibilidade da técnica de Bio-PCR

Para a determinação da sensibilidade da técnica de Bio-PCR, foi preparada uma suspensão bacteriana do isolado Xap/UFLA-2R, variante *fuscans*, na concentração de 5×10^7 u.f.c./mL e diluições em série de 10^{-1} a 10^{-8} . Em seguida, com auxílio de uma alça de Drigalski, foram plaqueados 100 μ L das diluições 10^{-5} a 10^{-8} em meio 523 (KADO; HESKET, 1970), sendo utilizadas quatro placas para cada diluição. A incubação foi feita em B.O.D. a 28 °C, por 48, 72, 96 e 120 horas. Após os períodos pré-determinados, contou-se o número de colônias puras do isolado por placa.

As placas contendo uma, três e dez colônias de Xap foram lavadas com 1 e 3 mL de água destilada esterilizada e, em seguida, a suspensão bacteriana foi transferida para tubos de microcentrífuga (1,5 mL), armazenada em geladeira e posteriormente submetida à PCR. Como controles, foram utilizadas suspensão bacteriana de Xap/UFLA-2R na concentração de 5×10^7 u.f.c./mL e água ultra-pura. Este ensaio foi repetido quatro vezes.

2.2 Preparo das amostras de sementes de feijão, extração e detecção do patógeno

Para a extração e detecção do patógeno a partir de extratos de sementes, foram utilizados lotes contendo sementes inoculadas artificialmente com Xap por meio da restrição hídrica (item 2.7.1, Cap. 2) e sementes consideradas saudáveis.

Sementes básicas de feijão das cvs. Carioca e Pérola, consideradas livres do patógeno, foram desinfestadas superficialmente com NaOCL 2% por 1 minuto e secas em câmara de fluxo laminar. Para cada lote de 10, 100, 500 e 1000 semente de feijão foi introduzida uma semente inoculada artificialmente. Estas sementes foram imersas em erlenmeyers contendo 10, 50, 240 e 450 mL de água destilada esterilizada, respectivamente, e incubadas a 5-10 °C, por 24 horas.

A seguir, foram retiradas três alíquotas de 0,5 mL de cada tratamento, feitas três diluições em série de 10^{-1} a 10^{-5} e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, realizou-se o plaqueamento de 100 μ L das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em meio 523 e meio 523 + rifampicina 100 ppm. Duas placas de cada meio para cada diluição foram utilizadas, totalizando seis placas por repetição. As placas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C, por 72 h. Para a avaliação, fez-se a contagem das colônias de Xap e de microrganismos contaminantes. As placas de cada tratamento, com o menor número de colônias, foram lavadas com 1 ou 3 mL de água destilada e esterilizada; a suspensão foi transferida para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e armazenada em geladeira a 5 °C. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 5 μ L para aplicação da PCR.

2.3 Teste da PCR

Para a amplificação do fragmento de DNA específico de Xap, utilizou-se uma mistura constituída de 8 µL de tampão 10 X para PCR (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0), 1 µL de dNTP's (10 mM); 1 µL de cada *primer* X4c (5'-GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGG-3') e X4e (5'-CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG-3') (AUDY et al., 1994); 1 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µl); 5 µL da suspensão bacteriana e 33 µL de água ultra-pura.

Como controles foram utilizados, como fontes de DNA, uma suspensão bacteriana de Xap/UFLA-2R na concentração de 5 x 10⁷ u.f.c./mL, água ultra-pura e suspensão de bactérias saprófitas originadas dos extratos das sementes de feijão.

Para adaptar a técnica, as suspensões bacterianas foram rapidamente homogeneizadas; em seguida, 5 µL de cada amostra foram transferidos para os tubos de reação da PCR. Os componentes do PCR foram misturados cuidadosamente com a própria ponteira da micropipeta e não foi feita a rápida centrifugação, como de costume, para não haver a sedimentação das células bacterianas.

Após o preparo, os tubos de microcentrífugas foram colocados no termociclador (PTC-100TM *Programmable Thermae Controller, MJ Rsearch, Inc.*), programado para as seguintes etapas: 94 °C/2 min., 25 ciclos de 94 °C/1 min., 58 °C/1 min., 72 °C/2 min. e extensão final a 72 °C/8 min. (SCHAAD et al., 1995), modificado.

2.4 Eletroforese e fotodocumentação

Ao final da reação, 20 μL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,9%, preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x, e submetidos, em seguida, à eletroforese. Foi utilizado, como marcador de bases, o *Kilobase DNA Marker* (Pharmacia Biotech) para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. Ao final da eletroforese, o gel foi submerso em solução corante de brometo de etídio (10 mg/mL) por 15 min. e, em seguida, fotodocumentado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da sensibilidade da técnica de Bio-PCR

Testes preliminares

O protocolo utilizado para a realização deste experimento foi o relatado por Schaad et al. (1995) como PCR padrão para Psp, com pequenas modificações: a abstenção do passo 'hot start' e uso de apenas 25 ciclos. Estas modificações permitiram a detecção de uma única colônia bacteriana originada teoricamente de 1 u.f.c., diluída em 1 mL e/ou 3 mL de água destilada e esterilizada, concordando com Henson e French (1993) que a PCR possui alta sensibilidade. O protocolo padrão relatado por Schaad et al. (1995) utilizava o seguinte perfil: uma incubação inicial de 2 min. a 94 °C, um 'hot start' manual a 80 °C, 25-30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 58 °C e 2 min. a 72 °C e uma extensão final de 8 min. a 72 °C com apenas um turno. Estes mesmos autores recomendaram, para a técnica de Bio-PCR, o protocolo que utiliza dois turnos de PCR, também chamado de *Double-nested* PCR ou *Nested-PCR*, em que são usados, no primeiro turno, *primers* externos, e no segundo, *primers* internos, com 25-30 ciclos cada turno.

Neste trabalho, em nenhuma das amostras analisadas foi possível detectar o produto de amplificação de 550 pb, referente à variante *fuscans*, relatado por Audy et al. (1994), concordando com Halfeld-Vieira et al. (2001), que também não o detectaram entre 22 isolados analisados. Verificou-se ainda que 20 µL foi a quantidade ideal para a visualização do produto da Bio-PCR, pois as bandas eletroforéticas referentes a 5 µL, comumente utilizados, apresentaram-se quase imperceptíveis.

Audy et al. (1996) verificaram que as amostras de DNA extraídas a partir de Psp devem ser analisadas imediatamente após a extração do DNA, pois quando armazenadas por até 4 h ou mantidas a -20 °C, a eficiência da amplificação é reduzida. Entretanto, as amostras das suspensões bacterianas utilizadas durante a realização deste trabalho mantiveram-se viáveis para a produção do fragmento de DNA quando armazenadas a 5 °C por pelo menos até 64 dias.

Determinação da sensibilidade

Quando culturas puras de Xap com diferentes períodos de incubação foram utilizadas como fonte de DNA para a Bio-PCR, observou-se que não houve repetibilidade para a amplificação do fragmento de DNA de 730 pb para uma colônia de Xap de 48 h de incubação suspensa em 1 ou 3 mL de água destilada esterilizada. Porém, quando foi utilizada uma colônia de Xap de 72, 96 ou 120 horas de incubação, suspensa em 1 ou 3 mL de água destilada esterilizada, verificou-se a constante amplificação do fragmento de DNA. A detecção de 10 colônias de Xap em 1 e 3 mL foi possível em todos os períodos de incubação. Em relação às colônias de 48 h de incubação, a não repetibilidade dos resultados da Bio-PCR pode estar associada à variação no número de células bacterianas nas amostras, o que, conseqüentemente, determinou o tamanho das colônias formadas. Provavelmente, o tamanho da colônia bacteriana a partir de 72 h produziu uma quantidade de células suficiente para sua constante detecção pela Bio-PCR. As colônias de 48 h se apresentavam com tamanho médio de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, enquanto as de 72, 96 e 120 h se apresentavam com diâmetro médio de 2 a 3, 4 a 5 e 5 a 6 mm, respectivamente.

Schaad et al. (1995) observaram que o limite de detecção para células diluídas em série foi de 1.200 células para o PCR padrão e 1 a 2 colônias para o

Nested-PCR. As colônias bacterianas de Psp utilizadas tinham de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro quando incubadas por 45 horas.

Prosen et al. (1993) observaram que o limite de detecção para culturas puras de Psp a partir de DNA extraído foi de aproximadamente 10^4 u.f.c./mL. Este limite foi aperfeiçoado quando foi utilizada a *Southern Hybridization* para detectar o produto da PCR, alcançando 10 u.f.c./mL da suspensão da cultura pura do patógeno.

Gilbertson et al. (1989) detectaram 10 pg de DNA de Xap (aproximadamente 10^3 u.f.c.) pelo teste de hibridização *dot blot* utilizando DNA marcado radioativamente. Entretanto, Audy et al. (1994) conseguiram detectar 100 fg de DNA de Xap (aproximadamente 10 u.f.c.) após a análise de 35 ciclos de PCR usando os *primers* derivados de P7x4. A diminuição desse limite para 10 fg de DNA (aproximadamente 1 u.f.c.) foi obtida quando utilizaram-se duas sucessivas ampliações de 20 e 35 ciclos.

Foi verificado que a partir de 3 colônias de Xap, diluídas em 1 mL de água destilada e esterilizada, a intensidade das bandas referentes à amplificação do fragmento de 730 pb aumentou com a idade das colônias (Figura 1).

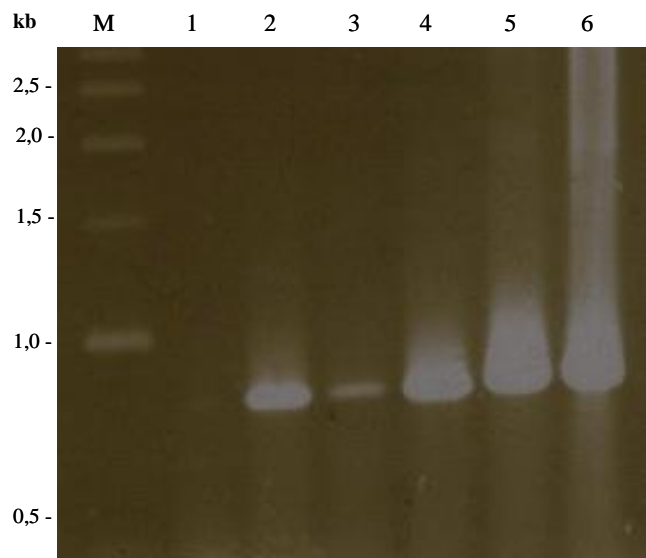


Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para avaliação da sensibilidade na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, a partir de colônias com diferentes períodos de incubação

Nota: M = marcador de DNA (Pharmacia Biotech); 1 = Água ultra pura 2 = Xap 5×10^7 u.f.c./mL; 3 = Xap 48 h; 4 = Xap = 72 h; 5 = Xap 96 h; 6 = Xap 120 h

Para colônias com 48 horas de incubação (Fig. 1, coluna 3), a banda produzida apresentou-se com baixa intensidade; porém, para os demais períodos, 72, 96 e 120 horas (Fig. 1, colunas 4, 5 e 6), as bandas referentes à amplificação do fragmento de 730 pb foram gradualmente e respectivamente mais intensas, não gerando dúvidas para a sua visualização.

Dessa forma, para a detecção de Xap, sugere-se um período de incubação das colônias igual ou superior a 72 horas, o que garante uma diagnose segura, uma vez que se trata de amplificação do DNA do referido patógeno por meio de *primers* específicos. Além disso, a produção de colônias em meio de cultura resulta da presença de células viáveis no extrato.

3.2 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de extratos de sementes de feijão

Na detecção de Xap pelo método de Bio-PCR, foram avaliados extratos a partir de lotes contendo uma semente infectada em subamostras de 10, 100, 500 e 1000 sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, consideradas sadias. Todas as subamostras avaliadas apresentaram colônias típicas de Xap pelo plaqueamento dos extratos em Meio 523.

Em relação às sementes da cultivar Carioca, constatou-se a amplificação do segmento de DNA de 730 pb a partir da suspensão bacteriana proveniente de uma colônia característica de Xap (C16, C52, C80, Tabela 1, Fig.2), mesmo quando na presença de 4 colônias de bactérias contaminantes (C1, Tabela 1) ou de colônias de *Bacillus* e fungos (C27, C28, C41, C51, C53, C70, C71, Tabela 1, Figuras 1 e 2). Foi possível, também, detectar a presença do segmento amplificado a partir de suspensões contendo até 123 colônias características de Xap (C23, Tabela 1, Fig.3).

Tabela 1 Número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão cultivar Carioca submetidas à Bio-PCR

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| C8 | 1/10 ^a | 10 ⁻⁵ | 3/0 | 1 | + |
| C10 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 5/0 | 1 | + |
| C11 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 2/0 | 1 | + |
| C12 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 3/0 | 1 | + |
| C24 | 1/10 | 10 ⁻⁴ | 43/0 | 3 | + |
| C14 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 2/1 F* | 1 | + |
| C15 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 3/0 | 1 | + |
| C16 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 1/0 | 1 | + |
| C17 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 15/1 F | 1 | + |
| C18 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 10/0 | 1 | + |

“Tabela 1, continuação”

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| C20 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 17/2B** | 1 | + |
| C23 | 1/100 | 10 ⁻³ | 123/0 | 3 | + |
| C25 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 3/1 | 1 | + |
| C27 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 1/1+B | 1 | + |
| C28 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 1/1 F | 1 | + |
| C29 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 1/2 | 1 | + |
| C31 | 1/500 | 10 ⁻³ | 13/8 | 1 | + |
| C32 | 1/500 | 10 ⁻³ | 5/4 | 1 | + |
| C34 | 1/500 | 10 ⁻³ | 16/4 | 1 | + |
| C35 | 1/500 | 10 ⁻³ | 18/0 | 1 | + |
| C36 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 11/3 | 1 | + |
| C37 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 4/4 | 1 | + |
| C38 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 5/0 | 1 | + |
| C39 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 5/2 | 1 | + |
| C40 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 3/3 | 1 | + |
| C41 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 1/1 F+ B | 1 | + |
| C5 | 1/10 ^b | 10 ⁻⁵ | 6/4 | 1 | + |
| C6 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 5/1 | 1 | + |
| C3 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 6/0 | 1 | + |
| C4 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 5/0 | 1 | + |
| C1 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 1/4 | 1 | + |
| C2 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 7/0 | 1 | + |
| C43 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 21/0 | 1 | + |
| C44 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 14/0 | 1 | + |
| C45 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 14/F + B | 1 | + |
| C46 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 14/F + B | 3 | + |
| C47 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 6/F + B | 1 | + |
| C48 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 2/2 + F | 1 | + |
| C50 | 1/10 ^C | 10 ⁻³ | 2/B | 1 | + |
| C51 | 1/10 | 10 ⁻³ | 1/B | 1 | + |
| C52 | 1/10 | 10 ⁻³ | 1/0 | 1 | + |
| C53 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 1/B | 1 | + |
| C54 | 1/10 ^d | 10 ⁻⁵ | 3/0 | 1 | + |
| C55 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 2/17 | 1 | + |
| C58 | 1/10 | 10 ⁻⁴ | 19/0 | 1 | + |
| C59 | 1/10 | 10 ⁻⁴ | 11/0 | 1 | + |
| C62 | 1/100 | 10 ⁻³ | 8/1 F | 1 | + |
| C63 | 1/100 | 10 ⁻³ | 13/4 F | 1 | + |
| C64 | 1/100 | 10 ⁻³ | 15/15 + B | 1 | + |
| C65 | 1/100 | 10 ⁻³ | 3/B | 1 | + |

“Tabela 1, conclusão”

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| C66 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 1/0 | 1 | - |
| C68 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 1/2 | 1 | + |
| C70 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 1/4 + F | 1 | + |
| C71 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 3/6 +MF | 1 | + |
| C72 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 3/0 | 1 | + |
| C74 | 1/500 | 10 ⁻³ | 4/B | 1 | + |
| C75 | 1/500 | 10 ⁻³ | 12/B | 1 | + |
| C76 | 1/500 | 10 ⁻³ | 14/F + B | 1 | + |
| C78 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 3/1 | 1 | + |
| C79 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | ½ | 1 | + |
| C80 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 1/0 | 1 | + |
| C82 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 1/3 | 1 | + |
| C81 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 3/12 | 1 | + |
| C83 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 4/7 | 1 | + |
| C84 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 13/13 | 3 | + |
| C85 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 15/11 | 1 | + |

*F = fungos; **B = *Bacillus* spp.; + = presença de banda; - ausência de banda.

a Semente inoculada por Xap em meio 523 -0,85 MPa por 36 h de exposição

b Semente inoculada por Xap em meio 523 -0,85 MPa por 24 h de exposição

c Semente inoculada por Xap em meio NGA por 36 h de exposição

d Semente inoculada por Xap em meio 523 por 36 h de exposição

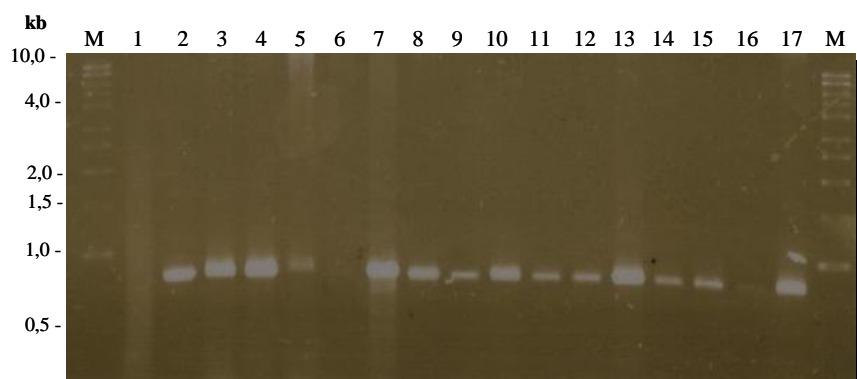


Figura 2 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Carioca

Nota: M = DNA Marker (Pharmacia Biotech); 1 = Água; 2 = Xap 5×10^7 u.f.c./ml; 3 = C43; 4 = C44; 5 = C45; 6 = C46; 7 = C47; 8 = C48; 9 = C 8; 10 = C10; 11 = C11; 12 = C12; 13 = C24; 14 = C14, 15 = C15, 16 = C16, 17 = C17.

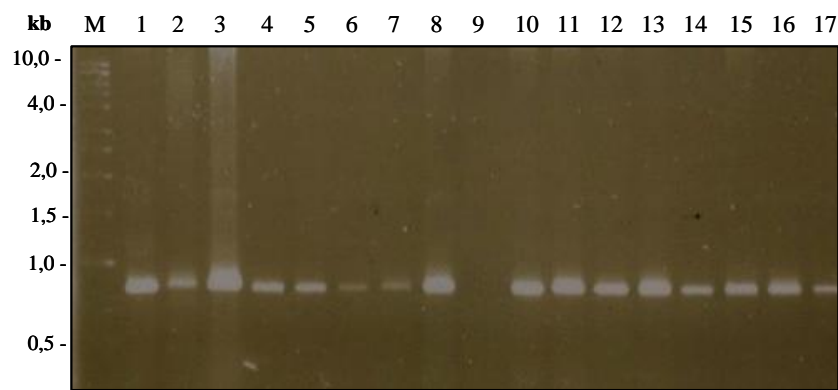


Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Carioca

Nota: M = DNA Marker (Pharmacia Biotech); 1 = C18; 2 = C20; 3 = C23; 4 = C25; 5 = C27; 6 = C28; 7 = C29; 8 = C31; 9 = C32; 10 = C34; 11 = C35; 12 = C36; 13 = C37; 14 = C38, 15 = C39, 16 = C40, 17 = C41.

As amostras C45 e C46 (Tabela 1, Fig. 2) são provenientes do mesmo número de colônias com características de Xap; entretanto, na amostra C45 foi produzida uma banda mais intensa provavelmente devido às colônias terem sido ressuspensas em 1mL de água destilada esterilizada, e a amostra C46, em 3 mL.

Para as sementes da cv. Carioca, todas as amostras apresentaram resultados positivos para a detecção de Xap pela técnica de Bio-PCR, mesmo na presença de outras bactérias, incluindo *Bacillus* spp. e fungos, até quando em menor número de colônias por placa (C55, C64, C70, C81 e C83, Tabela 1), independente da forma como a semente foi inoculada artificialmente, ou seja, em meio 523 -0,85 MPa por 24 e 36 horas de exposição ou meio NGA. Exceção foi verificada para a amostra C66 (Tabela 1), que não produziu banda; provavelmente esta colônia não era de Xap e sim alguma bactéria saprofítica com morfologia de colônia semelhante.

A utilização de extratos de sementes diluídos em série permitiu a detecção de uma (diluição 10^{-5} , Tabela 1, Fig. 2) até 123 colônias de Xap (diluição 10^{-3} , Tabela 1, Fig. 3). Segundo Schaad et al. (1995), este tipo de recurso pode ser usado em lotes de sementes com níveis relativamente baixos de bactérias contaminantes, podendo as colônias suspeitas do patógeno ser facilmente removida e analisada pela Bio-PCR ou outro método de identificação. Estes mesmos autores recomendam que os extratos de lotes de sementes sejam diluídos até 10^{-2} para reduzir o número de contaminantes e permitir o desenvolvimento de colônias do patógeno.

Com a técnica de Bio-PCR também foi possível determinar a presença de Xap em quase todas as subamostras de sementes da cv. Pérola, independente da forma como as sementes foram inoculadas, embora a presença de contaminantes no meio de cultura em que foram depositados os extratos tenha dificultado a identificação do patógeno (Tabela 2).

Tabela 2 Número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão cultivar pérola, submetidas à Bio-PCR

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| P22 | 1/10 ^a | 10 ⁻⁵ | 34/1 F | 1 | + |
| P23 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 32/0 | 1 | + |
| P25 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 44/4 F | 1 | + |
| P28 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 10/4 +12 F | 1 | + |
| P29 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 3/1 F | 1 | + |
| P30 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 10/1 F | 3 | + |
| P31 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 8/5 F | 1 | + |
| P32 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 5/1 + 1 F | 1 | + |
| P33 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 5/0 | 1 | + |
| P34 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 3/1F | 1 | + |
| P35 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 1/0 | 1 | + |
| P37 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 5/0 | 1 | + |
| P38 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 13/1 B | 1 | + |
| P39 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 14/0 | 1 | + |
| P40 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 20/1 F + B | 1 | + |
| P41 | 1/500 | 10 ⁻⁴ | 19/0 | 1 | + |
| P42 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 2/1 | 1 | + |
| P43 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 1/2 F | 1 | + |
| P44 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 2/3 F | 1 | + |
| P46 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 16/0 | 1 | + |
| P48 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 17/1 | 1 | + |
| P18 | 1/10 ^b | 10 ⁻⁵ | 16/0 | 1 | + |
| P19 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 14/1 | 1 | + |
| P20 | 1/10 | 10 ⁻⁴ | 100/5 Ff | 3 | + |
| P21 | 1/10 | 10 ⁻⁴ | 62/4 F | 3 | + |
| P14 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 1/0 | 1 | + |
| P6 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 2/16 | 3 | + |
| P8 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 1/26 | 1 | + |
| P7 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 2/2 | 1 | + |
| P16 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 4/0 | 1 | + |
| P9 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 1/5 | 1 | + |
| P10 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 21/ND | 3 | + |
| P11 | 1/500 | 10 ⁻³ | 17/ND | 1 | + |
| P12 | 1/500 | 10 ⁻³ | 12/10 | 1 | + |
| P13 | 1/500 | 10 ⁻³ | 9/19 | 3 | + |
| P1 | 1/1000 | 10 ⁻⁵ | 1/3 | 1 | - |
| P2 | 1/1000 | 10 ⁻⁵ | 8/36 | 3 | + |
| P3 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 20/ND | 3 | + |

“Tabela 2, continuação”

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| P4 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 14/ND | 3 | + |
| P5 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 32/ND | 3 | + |
| P76 | 1/10 ^c | 10 ⁻³ | ½ + 1 B | 1 | + |
| P77 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 1/3 | 1 | + |
| P78 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 1/1 B | 1 | + |
| P79 | 1/100 | 10 ⁻³ | ½ | 1 | + |
| P80 | 1/100 | 10 ⁻³ | 4/1 B | 1 | + |
| P81 | 1/100 | 10 ⁻³ | 1/3 | 1 | + |
| P82 | 1/100 | 10 ⁻³ | 2/1 | 1 | + |
| P70 | 1/10 ^d | 10 ⁻⁵ | 5/ND | 3 | - |
| P71 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 7/B | 1 | + |
| P72 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 6/B | 1 | + |
| P73 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 1/1 + F + B | 1 | + |
| P74 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 4/0 | 1 | + |
| P75 | 1/10 | 10 ⁻⁵ | 4/ND | 1 | - |
| P62 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 1/B | 1 | + |
| P63 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 3/0 | 1 | + |
| P64 | 1/100 | 10 ⁻⁵ | 5/0 | 1 | + |
| P65 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 18/B | 1 | + |
| P66 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 18/B | 3 | + |
| P67 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 37/0 | 1 | + |
| P68 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 43/1 + F | 3 | + |
| P69 | 1/100 | 10 ⁻⁴ | 51/B | 3 | + |
| P56 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 1/B | 1 | + |
| P57 | 1/500 | 10 ⁻⁵ | 1/4 + B | 1 | + |
| P58 | 1/500 | 10 ⁻³ | 22/1 + F + B | 1 | + |
| P59 | 1/500 | 10 ⁻³ | 21/B | 1 | + |
| P60 | 1/500 | 10 ⁻³ | 12/B | 1 | + |
| P61 | 1/500 | 10 ⁻³ | 2/B | 1 | + |
| P49 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 1/2 | 1 | + |
| P50 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 1/1 B | 1 | - |
| P51 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 1/2 B | 1 | - |
| P52 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 7/1 B | 1 | + |
| P53 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 3/1 B | 1 | + |
| P54 | 1/1000 | 10 ⁻⁴ | 13/1 B | 1 | + |

“Tabela 2, conclusão”

| Código de referência | Semente inoculada/sadias | Diluição do extrato | Nº de colônias típicas de Xap/contaminantes | Diluição de colônias (mL) | Bio-PCR |
|----------------------|--------------------------------|---------------------|---|---------------------------|---------|
| P55 | 1/1000 | 10 ⁻³ | 16/B | 3 | - |
| Sap6 | Colônias de bactérias | | 6 | 1 | - |
| Sap3 | saprófitas a partir dos | | 3 | 1 | - |
| Sap | extratos de sementes de feijão | | ND | 3 | - |

*F = fungos; **B = *Bacillus* spp.; + = presença de banda; - ausência de banda

ND = Número de colônias não determinadas

a Semente inoculada por Xap em meio 523 -1,05 MPa por 24 h de exposição

b Semente inoculada por Xap em meio 523 por 36 h de exposição

c Semente inoculada por Xap em meio NGA por 36 h de exposição

d Semente inoculada por Xap em meio 523 -1,05 MPa com 36 h de exposição

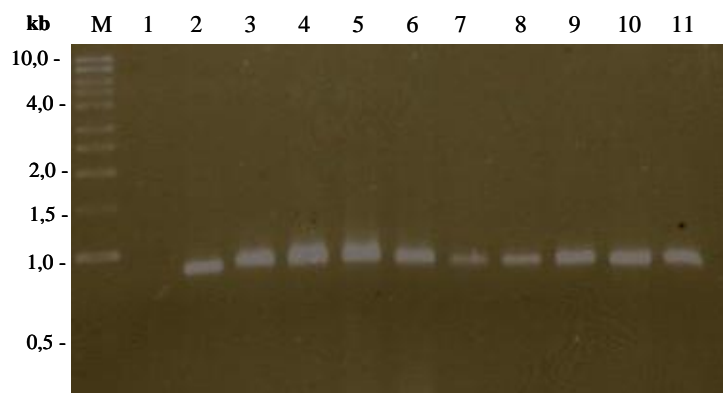


Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Pérola

Nota: M = DNA Marker (Pharmacia Biotech); 1 = água ultra pura; 2 = Xap 5 x 10⁷; 3 = P22; 4 = P23; 5 = P25; 6 = P28; 7 = P29; 8 = P30; 9 = P31; 10 = P32; 11 = P33.

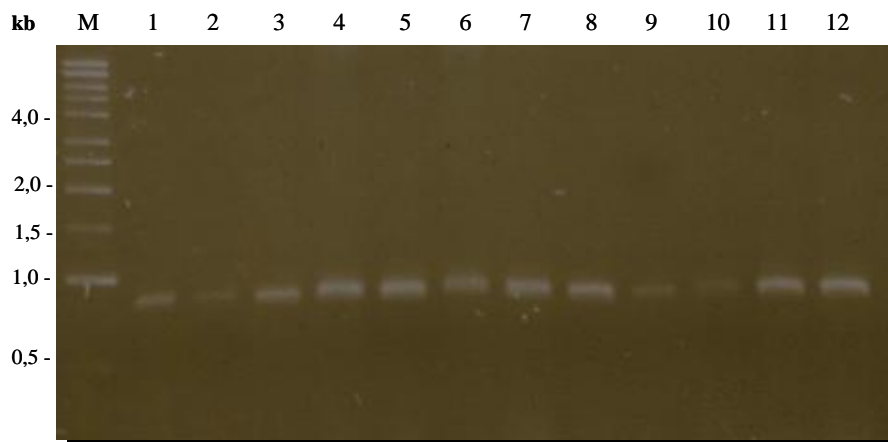


Figura 5 Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Pérola

Nota: M = DNA Marker (Pharmacia Biotech); 1 = P34; 2 = P35; 3 = P37; 4 = P38; 5 = P39; 6 = P40; 7 = P41, 8 = P42; 9 = P43; 10 = P44; 11 = P46; 12 = P48.

De acordo com as Figuras 4 e 5, todas as amostras que continham de uma (Fig. 5, colunas 2 e 9) a 44 colônias de Xap (Fig. 4, coluna 5) apresentaram a amplificação do segmento de DNA, independente da presença de fungos e/ou *Bacillus* spp. na amostra.

De maneira geral, nas subamostras da cv. Pérola, a presença de uma colônia típica de Xap pura (Tabela 2, Fig. 5, coluna 2) ou em mistura com fungos e/ou *Bacillus* spp. (Tabela 2, P43, P14, P8, P9, P76, P77, P78, P79, P81, P73, P62, P56, P57, P49) até 100 colônias (Tabela 2, P20) permitiu a amplificação do segmento característico de Xap. As amostras P10 e P11 (Tabela 2) apresentaram amplificação do segmento apesar do número de contaminantes não determinados.

Na amostra P1 (Tabela 2), não foi observada a banda característica de 730 pb; provavelmente a colônia detectada não era Xap, apesar de apresentar morfologia semelhante. Com relação às amostras P70, P75, P50, P51 e P55 (Tabela 2), verifica-se que o número de colônias com características de Xap era relativamente pequeno em relação à quantidade de contaminantes. Este fato sugere que o excesso de microrganismos contaminantes pode interferir nos resultados, concordando com Wang et al. (1999). Entretanto, vale ressaltar que a detecção de Xap em meio semi-seletivo e a transmissão do patógeno para os cotilédones e folhas primárias de plantas de feijão foi menor para a cv. Pérola do que para a cv. Carioca (Capítulo 2). De acordo com Schaad et al. (1995), utilizando Bio-PCR e a adição de Psp nos extratos de sementes de feijão, foi possível detectar de 1 a 2 colônias de Psp entre 97, 108 e 118 u.f.c. de saprófitas, mas não em uma amostra contendo 122 u.f.c. Também em amostras contendo um número esperado de uma u.f.c de Psp, porém sem nenhuma colônia visível na placa, foi possível detectá-la entre 85, 105 e 106 u.f.c. de saprófitas, mas não entre 115 u.f.c.

Amostras contendo somente bactérias contaminantes, que se desenvolveram no meio de cultura a partir dos extratos de sementes, apresentaram resultados negativos para amplificação do segmento de DNA (Tabela 2).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o método da Bio-PCR permitiu a detecção de uma semente contaminada com Xap em extratos de sementes plaqueados em meio de cultura a partir de lotes contendo 10, 100, 500 e 1000 sementes. Audy et al. (1996) amplificaram fragmentos discretos de DNA pelo uso de sementes brancas contaminadas com Psp e Xap simultaneamente, em lotes contendo uma semente infectada em 10, 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000. As análises foram feitas imediatamente após o processamento das

amostras e permitiram detectar fragmentos resultantes da PCR, críticos para os lotes maiores (1.000 a 10.000 sementes).

Schaad et al. (1995) relataram que o limite de detecção foi de 3×10^3 u.f.c. para amostras de 3000 sementes imersas em tampão e plaqueadas sobre meio King B. Isto significa que sementes contaminadas devem conter mais que 3×10^3 u.f.c., pois a eficiência da extração não é 100%. Extratos de sementes contendo populações de patógenos abaixo deste nível podem não ser detectados.

Prosen et al. (1993) relataram a detecção de Psp em extratos de sementes de feijão contendo uma semente inoculada artificialmente em 2.000 consideradas sadias. A partir da extração do DNA de seis lotes testados, dois lotes apresentaram ampliações negativas, sendo possível que a semente infectada adicionada a esses lotes apresentasse baixa população do patógeno. Estes mesmos autores relataram que o limite de detecção para esses extratos foi de 10-20 u.f.c./mL e que a possibilidade de epífitas presentes até concentrações $\geq 10^4$ u.f.c./mL não interferiu na detecção, mesmo quando o patógeno estava presente em concentrações ≤ 30 u.f.c./mL.

4 CONCLUSÕES

- a) A técnica de Bio-PCR modificada permite a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de extratos de sementes.
- b) O tempo de incubação dos extratos de sementes em meio de cultura, para detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, é de 72 a 120 horas.
- c) A técnica de Bio-PCR permite a detecção de até uma colônia de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.
- d) Pela técnica de Bio-PCR, é possível detectar uma semente inoculada em lotes de 10, 100, 500 e 1.000 sementes de feijão dos cultivares Carioca e Pérola, considerada sadias.

REFERÊNCIAS

AUDY, P. et al. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1185-1192, Oct. 1994.

_____. Rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 2, p. 361-366, 1996.

BATISTA, M. F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 165-196, 1993.

BASU, P. K.; WALLEN, V. R. Influence of temperature on the viability, virulence and physiologic characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* *in vivo* and *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 44, n. 9, p. 1239-1245, Sept. 1966.

GILBERTSON, R. L. et al. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 518-525, May 1989.

HALFELD-VIEIRA, B. H. et al. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 737-740, out./dez. 2001.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

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

NEERGAARD, G. E. **Seed pathology**. London: MaxMillan, 1979. v. 1, 839 p.

PROSEN, D. et al. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 965-970, Sept. 1993.

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**. London: CAB International, 1997. p. 159-164.

SCHAAD, N. W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Feb. 1995.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other *Leguminosae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 1064-1066, 1967.

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**. Saint Paul: APS, 1989. p. 17-62.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 45, p. 472-489, 1995.

WANG, Z. K. et al. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 48, n. 2, p. 245-252, Apr. 1999.

WATSON, D. R. W. Bean common blight and fuscous blight in New Zeland. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, n. 12, p. 1068-1072, Dec. 1970.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas referentes ao capítulo 2

Tabela 1 Resumo da análise de variância para sementes da cultivar Carioca submetida a diferentes níveis de restrição hídrica

| Fontes de variação | G.L. | Q.M. | F | Pr > F |
|------------------------|------|---------|--------|--------|
| Tratamentos | 1 | 2.08832 | 21.25 | 0.0001 |
| Substrato | 5 | 28.9356 | 294.50 | 0.0001 |
| Trat. X Subst. | 5 | 0.6335 | 6.45 | 0.0001 |
| Erro a | 180 | 0.0982 | | |
| Tempo | 4 | 5.8737 | 111.25 | 0.0001 |
| Trat. X Tempo | 4 | 0.3647 | 6.91 | 0.0001 |
| Subst. X tempo | 16 | 0.1583 | 3.00 | 0.0001 |
| Trat. X subst. X tempo | 13 | 0.0662 | 1.25 | 0.2376 |
| Erro | 555 | 0.0527 | | |
| Total corrigido | 783 | | | |

$R^2 = 0.859248$

C.V. = 48.40915

Dados transformados para $\text{ARCSEN}(\text{RAIZ}(X/100))$

Tabela 2 Resumo da análise de variância para sementes da cultivar Pérola submetida a diferentes níveis de restrição hídrica

| Fontes de variação | G.L. | Q.M. | F | Pr > F |
|------------------------|------|-----------|--------|--------|
| Tratamentos | 1 | 0.97956 | 19.98 | 0.0001 |
| Substrato | 5 | 15.89337 | 324.18 | 0.0001 |
| Trat. X Subst. | 5 | 0.70573 | 14.39 | 0.0001 |
| Erro a | 180 | 0.049026 | | |
| Tempo | 4 | 7.55316 | 139.80 | 0.0001 |
| Trat. X Tempo | 4 | 0.04040 | 0.75 | 0.5600 |
| Subst. X tempo | 10 | 0.041667 | 0.77 | 0.6566 |
| Trat. X subst. X tempo | 2 | 0.00480 | 0.09 | 0.9149 |
| Erro | 300 | 0.05402 | | |
| Total corrigido | 511 | 132.91252 | | |

$R^2 = 0.878052$

C.V. = 55.96316

Dados transformados para $\text{ARCSEN}(\text{RAIZ}(X/100))$

Tabela 3 Resumo da análise de variância para isolados bacterianos submetidos a diferentes níveis de restrição hídrica

| F.V. | G.L. | Q.M. | FC | Pr > Fc |
|----------------------|------|----------|---------|---------|
| Substratos | 5 | 0.029432 | 3.384 | 0.0084 |
| Isolados | 3 | 4.582364 | 526.801 | 0.0000 |
| Substrato Isolado | x 15 | 0.029292 | 3.367 | 0.0003 |

CV (%) = 5.20

Média geral: 1.7924150

Tabela 4 Resumo da análise de variância da determinação do grau de umidade da cv. Carioca das sementes inoculadas artificialmente com Xap de 48 horas de crescimento em meios contendo manitol nos diferentes potenciais hídricos

| F.V. | G.L. | Q.M. | Fc | Pr > Fc |
|------------|------|---------|---------|---------|
| Tratamento | 7 | 99.9607 | 35.92** | 0.0000 |
| Resíduo | 16 | 2.7828 | | |

MEDIA GERAL = 35.2746

C. V. = 4.73

Tabela 5 Resumo da análise de variância da determinação do grau de umidade da cv. Pérola, sementes inoculadas artificialmente com Xap de 48 horas de crescimento em meios contendo manitol nos diferentes potenciais hídricos

| F.V. | G.L. | Q.M. | Fc | Pr > Fc |
|------------|------|---------|---------|---------|
| Tratamento | 7 | 53.4343 | 16.73** | 0.0000 |
| Resíduo | 16 | 3.1940 | | |

MEDIA GERAL = 35.2892

C. V. = 5.06