

**HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA**

**EPIDEMIOLOGIA DA MANCHA-BACTERIANA  
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) DO FEIJÃO-CAUPI**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732e  
2011

Lima, Hyanameyka Evangelista de, 1980-  
Epidemiologia da mancha-bacteriana  
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi /  
Hyanameyka Evangelista de Lima – Viçosa, MG, 2011.  
x, 91f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*.  
2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. –  
Epidemiologia  
3. *Vigna unguiculata* 4. Relação Patógeno hospedeiro-  
parasito. 5. Feijão- Doenças e pragas. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. Ed. 579.33

HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA

EPIDEMIOLOGIA DA MANCHA-BACTERIANA  
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) DO FEIJÃO-CAUPI

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 22 de Julho de 2011.

---

Dra. Kátia de Lima Nechet  
(Co-orientadora)

---

Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira  
(Co-orientador)

---

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

---

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro

---

Prof. José Rogério de Oliveira

(Orientador)

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

***Albert Einstein***

*À minha Família,*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força, coragem e pelas oportunidades que tem me proporcionado durante todo o decorrer da minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

A Embrapa Roraima por ter cedido espaço físico e estrutura para a execução do trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros para custeio das atividades de pesquisa.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pela amizade, atenção e incentivo.

Aos pesquisadores da Embrapa-CNPMA, Dra. Kátia de Lima Nechet e Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, pela oportunidade a mim concedida e pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela disposição em ajudar e pelas valiosas sugestões para aperfeiçoamento das análises e do manuscrito.

Ao professor José Eustáquio de Souza Carneiro e ao Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, pela participação na banca examinadora.

Aos funcionários da Embrapa Roraima, em especial ao Giovanni e aos pesquisadores Dr. Oscar Smiderle e ao Dr. Aloísio Vilarinho, pelo apoio, auxílio e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima.

Aos companheiros de Fitopatologia, Gisele, Jéssica, Roseli, Renata, Eleonora, Nadson, André, Daniel, Alexandre e Henrique pela agradável convivência, amizade e apoio.

Ao amigo Alexandre Alonso, pela amizade durante esses anos.

À minha prima e amiga Rhayssa, por todos os feriados e fins de semanas que me acompanhou na Embrapa.

Aos estagiários do curso de Agronomia da UERR, pela ajuda na condução dos experimentos de campo e na avaliação dos componentes de produção.

Aos meus pais, sempre presentes em minha vida.

A minha sobrinha Bruna, pela infinita disponibilidade em ajudar.

Aos meus familiares e a todos os amigos, em especial a Shéri, Leti, Cris, Gheysa, Graça e Marilene, que sempre torceram por mim.

E ao Renato, pela felicidade e apoio nos momentos ruins.

## **BIOGRAFIA**

HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA, filha de Ivo Pereira de Lima e Creuza Evangelista, nasceu em 07 de julho de 1980, na cidade de Boa Vista, Roraima.

Em março de 2000 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Roraima (UFRR), graduando-se em agosto de 2005.

Em maio de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua dissertação em fevereiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua tese em julho de 2011.

Em julho de 2008 foi contratada para trabalhar na Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima (ADERR).

Em fevereiro de 2009 passou a exercer o cargo de assessora especial da diretora presidente da ADERR e em abril do mesmo ano passou a exercer o cargo de gerente de inspeção e classificação de produtos agropecuários da ADERR.

Em abril de 2010 foi contratada como professora efetiva do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Roraima (UERR).

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	vii
ABSTRAT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Elaboração e validação de escalas diagramáticas para avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em cultivares com trifólios morfológicamente distintos.	
1. Introdução.....	09
2. Material e Métodos.....	11
3. Resultados e Discussão.....	12
4. Referências.....	18
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Aspectos epidemiológicos do patossistema: <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i> - feijão-caupi.	
1. Introdução.....	33
2. Material e Métodos.....	35
3. Resultados.....	41
4. Discussão.....	44
5. Referências.....	49
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Influência de diferentes estádios fenológicos do feijão-caupi na infecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i>	
1. Introdução.....	62
2. Material e Métodos.....	63
3. Resultados.....	69
4. Discussão.....	77
5. Referências.....	84
CONCLUSÕES GERAIS.....	97

## RESUMO

LIMA, Hyanameyka Evangelista de. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Epidemiologia da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi**. Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: Kátia de Lima Nechet, Bernardo de Almeida Halfeld Vieira e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A mancha-bacteriana do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (*Xav*), tem ocorrido no Brasil, mas não se dispõe de informações epidemiológicas sobre este patossistema. O objetivo deste trabalho foi conhecer alguns aspectos epidemiológicos relacionados a esta doença por meio de estudos em casa-de-vegetação e campo. Para avaliar a severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi foram elaboradas duas escalas diagramáticas, uma para cultivares com folíolos ovais e outra para folíolos lanceolados, utilizando-se as cultivares BRS Bragança e BRS Mazagão, respectivamente. As escalas diagramáticas propostas permitiram quantificar os sintomas da doença de forma acurada, precisa e reproduzível. Em casa-de-vegetação e campo foram instalados experimentos visando avaliar a severidade da doença em plantas da cv. BRS Bragança em função da concentração de inóculo de *Xav*. Houve aumento da severidade e desfolha com o incremento da concentração de inóculo. *Xav* foi detectada em sementes provenientes de plantas cultivadas em campo no meio semi-seletivo CCM independente da concentração de inóculo. O período de incubação da bactéria diminuiu com o aumento do período de molhamento foliar (PMF). Calculou-se a severidade corrigida com base na desfolha causada pela doença e observou-se aumento da severidade com o aumento do PMF. A mesma tendência foi obtida para a área abaixo da curva de progresso da doença e a taxa de progresso da doença. Plantas de soja (*Glycine max*) cv. BRS Tracajá, feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. Pérola e leiteira (*Euphorbia heterophylla*) não apresentaram sintomas da doença quando inoculadas com *Xav* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) por aspersão. Porém, plantas de feijão-comum apresentaram reação de hipersensibilidade (HR). Todas as

plantas apresentaram HR quando *Xav* foi infiltrada em seus tecidos com seringa, sendo observado escurecimento total do tecido em menos de 24 horas após a inoculação em plantas de *E. heterophylla*. Realizou-se também ensaio em casa-de-vegetação para avaliar a severidade da doença em função de quatro estádios fenológicos do feijão-caupi (plantas com folhas primárias - EFP; com 2 a 3 trifólios - ET; em florescimento - EF e em formação de vagens - EV) na época de infecção, bem como sua influência na desfolha, nos componentes de produção e na transmissibilidade da bactéria para as sementes. A doença causou desfolha em todas as plantas de feijão-caupi, independente do estágio fenológico da cultura e houve diferença significativa na área abaixo da curva de progresso relativa da doença (AACPRD) entre os estádios fenológicos, contribuindo para a redução de alguns componentes de produção, principalmente o de massa de grãos secos (MGS). Foi possível isolar *Xav* de sementes de feijão-caupi provenientes de plantas infectadas em qualquer estágio fenológico, sendo detectada maior quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes em lotes provenientes de plantas inoculadas com *Xav* no EV e ET. Posteriormente, dois experimentos de campo foram conduzidos em estações seguidas de cultivo, utilizando-se as cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7, que foram inoculadas com *Xav* no ET e no EF, a fim de avaliar os componentes de produção do feijão-caupi e a transmissibilidade da bactéria para as sementes. A severidade da doença foi maior em BRS Bragança do que em BRS Vita-7 e houve reduções de alguns componentes de produção, principalmente na MGS. Houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste *t* na AACPRD entre o ET e o EF em plantas BRS Bragança inoculadas com *Xav*. Foi possível isolar *Xav* em sementes provenientes das duas cultivares de feijão-caupi, independente do estágio fenológico em que foram inoculadas, sendo detectada maior quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> em sementes provenientes de plantas da cv. BRS Bragança inoculadas com *Xav* no ET.

## ABSTRACT

LIMA, Hyanameyka Evangelista de. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.  
**Epidemiology of cowpea bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*).**  
Advisor: José Rogério de Oliveira. Co-advisors: Kátia de Lima Nechet, Bernardo de Almeida Halfeld Vieira and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Bacterial blight of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Xav) have been occurred in Brazil, however, there is no available epidemiological information about this pathosystem. The objective of this study was to know some epidemiological aspects related to bacterial blight of cowpea through studies on greenhouse and field. To evaluate the severity of cowpea bacterial blight, two diagrammatic scales were prepared, one for cultivars with oval leaflets and another one to lanceolate leaflets, using the cultivars BRS Bragança and BRS Mazagão, respectively. The use of diagrammatic scales resulted in higher accuracy and precision of the estimatives performed, and the variance of the absolute errors in the assessment of disease presented values within acceptable limits. Greenhouse and field experiments were installed to evaluate the disease severity in BRS Bragança plants according to the inoculum concentrations of Xav. The severity and defoliation increased with increments of inoculum concentration. Xav was detected in seeds from plants grown in field using CCM medium independent of inoculum concentration. The bacteria incubation period decreased with the elevated leaf wetness period. We calculated the corrected severity of disease based on a combined measurement of severity and defoliation. The severity, the area under the disease progress curve and disease progress rate increased as the leaf wetness period elevated. Soybean (*Glycine max*) cv. BRS Tracajá, common bean (*Phaseolus vulgaris*) cv. Pérola and weed species (*Euphorbia heterophylla*) showed no disease symptoms when inoculated with Xav ( $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>) by spraying. However, common bean plants showed hypersensitivity reactions (HR). All plants presented HR when Xav was infiltrated with a syringe in their tissues, and total tissue necrosis was observed in plants of *E. heterophylla* at less than 24 hours after

inoculation. Other test was also conducted in greenhouse to assess the disease severity at different stages of development of cowpea plants (primary leaves - PL, 2 or 3 trifoliolate leaves – TL, with open flowers – OF, and with pod development - PD) on the time of infection, as well as its influence on defoliation, on components of production and on transmission of bacteria to the seeds. The disease caused defoliation in all cowpea plants, regardless of phenologic stage of the culture and there were significant differences in relative area under the disease progress curve (RAUDPC) among development stages, helping to reduce production of some components, especially of the mass of dry grains (MDG). It was possible to detect Xav in seeds of cowpea plants infected at any development stage and was detected higher amount of CFU.g<sup>-1</sup> seed in seeds samples from plants inoculated by Xav on PD stage and TL stage. Subsequently, two field experiments were conducted in two consecutive seasons, for assessing the disease severity, the components of cowpea production and the transmissibility of the bacteria to the seeds. The cultivars used were BRS Bragança and BRS Vita-7, which were inoculated by Xav when de plants were in TL stage and OF stage. The disease severity was higher in BRS Bragança than BRS Vita-7, and there were reductions in some components of production, mainly in MDG. There were differences ( $p \leq 0,05$ ) by *t* test in RAUDPC between TL stage and OF stage in plants BRS Bragança inoculated by Xav. It was possible to detect Xav in seeds of cowpea of two cowpea cultivars, regardless of development stage in which they were inoculated, being detected higher amount of CFU g<sup>-1</sup> seed in seeds samples from plants of cultivar BRS Bragança on TL stage inoculated by Xav.

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão-macáçar ou feijão-fradinho é uma das leguminosas mais adaptadas e nutritivas entre as espécies cultivadas. De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a produção mundial de feijão-caupi em 2008 foi de 3,7 milhões de toneladas, sendo o principal país produtor a Nigéria, que responde por 51% da produção. É uma das principais culturas alimentares no Oeste da África, sendo considerada como a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda do Norte e Nordeste do Brasil (Onwuliri & Obu, 2002; Freire Filho *et al.*, 2005). No Brasil, o feijão-caupi é explorado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, sendo o Estado da Paraíba o maior produtor do Nordeste (Santos *et al.*, 2009). O Pará, por sua vez, é o maior produtor da região Norte, com uma área plantada de 50 mil hectares e com produção de 35 mil toneladas em 2009, sendo cerca de 90% da produção consumida fora do Estado, especialmente no Nordeste brasileiro. Atualmente, a cultura encontra-se em expansão na região Centro-Oeste, sendo os estados do Mato Grosso e Pará exportadores de feijão-caupi para países africanos e asiáticos (Freire Filho *et al.*, 2008, Filgueiras *et al.*, 2009; SAGRI, 2010; Nechet & Halfeld-Vieira, 2011). A área colhida e a produção do feijão-caupi no estado do Mato Grosso, em 2010, foi da ordem de 42.662 ha e 40.049 t, respectivamente, sendo a produtividade média do estado de 939 kg.ha<sup>-1</sup>, acima da média das melhores produtividades obtidas no Estado do Pará (Filgueiras *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2010). Os pequenos agricultores encontram facilidades no cultivo da cultura, em virtude da sua pouca exigência em fertilidade de solo (Oliveira *et al.*, 1984). Em Roraima, a produtividade do feijão-caupi está em torno de 600 kg.ha<sup>-1</sup> (Menezes *et al.*, 2007), mas em condições experimentais, produtividades de grãos acima de 3.000 Kg.ha<sup>-1</sup> foram obtidas (Vilarinho *et al.*, 2009), mostrando a potencialidade da cultura na região.

Embora apresente boa qualidade nutricional, que supera as dos feijões comuns (*Phaseolus* spp.), a produtividade média do feijão-caupi tem apresentado declínios consideráveis, associados principalmente ao plantio em novas áreas que proporcionam mesoclimas menos propícios para a cultura, plantios predominantemente de subsistência, utilização de cultivares com potencial genético reduzido e a ocorrência de pragas e doenças, que limitam o desenvolvimento da cultura (Castro, 2000). Entre as doenças do feijão-caupi, a mancha-bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye, é considerada uma doença limitante para a sua produção em todas as regiões produtoras do mundo, as quais incluem a África, a Ásia e as Américas (Kishun, 1989; Ehlers & Hall, 1997). A doença torna-se economicamente importante em condições de clima quente e úmido, incluindo o trópico semi-árido e o trópico úmido (Verdier *et al.*, 1998). No Brasil, a mancha-bacteriana do feijão-caupi já foi relatada nos estados de Goiás, Bahia, Maranhão, Pará, Piauí, Ceará e Roraima (Santos *et al.*, 2000; Freire Filho *et al.*, 2005; Nechet *et al.*, 2009). Os sintomas são observados primeiramente pela formação de manchas foliares, pustiliformes, necróticas, angulares com centro amarronzado, envolvido frequentemente por um halo amarelado, de tecido encharcado de aspecto úmido (Freire Filho *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2007). Em certas condições o patógeno pode invadir o caule, de onde surgem cancrios bem característicos (fissuras longitudinais). Nas vagens, são observadas manchas irregulares de aspecto úmido, por onde o patógeno infecta as sementes (Freire Filho *et al.*, 2005). Rios & Watt (1980) verificando o perfil das doenças fúngicas e bacterianas do feijão-caupi no Brasil, observaram que a importância da mancha-bacteriana está fundamentalmente relacionada à região, à forma de cultivo e à época de plantio. Dados oriundos de outros países indicam que a mancha-bacteriana pode ocasionar epidemias severas (Moretti *et al.*, 2007) e causar significativa redução na produção (Ekpo, 1978; Okechukwu *et al.*, 2000) podendo atingir perdas de até 92% (Kishun, 1989). No entanto, não há dados precisos sobre o potencial de perdas ocasionado pela doença no Brasil (Freire Filho *et al.*, 2005).

A importância de *X. axonopodis* pv. *vignicola* como patógeno do feijão-caupi está relacionada, principalmente, à sua elevada agressividade, transmissibilidade pelas sementes (Wydra *et al.*, 2004), disseminação por insetos (Zandjanakou-Tachin *et al.*,

2007), bem como à sua capacidade de sobrevivência em restos culturais (Okechukwu & Ekpo, 2008). Além disso, hospedeiros alternativos podem constituir uma fonte de inóculo primário entre as estações de cultivo (Sikirou & Wydra, 2004).

Não existe um método eficiente para o controle da mancha-bacteriana do feijão-caupi, sendo recomendado o uso de cultivares resistentes, plantio em áreas livres do patógeno e uso de sementes saudáveis (Gitaitis, 1983; Freire; Wydra *et al.*, 2004; Sikirou & Wydra, 2004; Filho *et al.*, 2005). Estudos feitos no Brasil demonstram a existência de genótipos de feijão-caupi com resistência à mancha-bacteriana, com possibilidades de uso em programas de melhoramento genético e sendo uma opção para os produtores em locais onde a doença ocasione danos severos à cultura (Santos *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007). Entretanto, apesar da importância dessa doença para a cultura, estudos epidemiológicos sobre o patossistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* x feijão-caupi são escassos no Brasil. Nesse contexto, é importante determinar os aspectos básicos relacionados a este patossistema, o potencial de dano da doença na cultura e sua transmissibilidade para sementes, através de estudos epidemiológicos em condições de casa-de-vegetação e de campo.

## Referências

- BARBOSA, M. S., SANTOS, M. A. S., SANTANA, A.C. Análise socioeconômica e tecnológica da produção de feijão-caupi no município de Tracuateua, Nordeste Paraense. **Amazona Ci. & Desenvolvimento**, Belém, v.5, n. 10, 2010.
- CASTRO, N. R. **Caracterização fisiológica de *Cercospora cruenta* Sacc. e controle genético de Cercosporiose em caupi**. Recife: 2000. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.
- EHLERS, J. D. & HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Fields Crop Research**, v.53, p.187-204, 1997.
- EKPO, E. J. A. Effect of *Xanthomonas vignicola* on the yield of cowpea (*Vigna unguiculata*). **African Journal of Agricultural Sciences**, v.5, p.67-69, 1978.
- FILGUEIRAS, G. C., SANTOS, M. A. S., HOMMA, A. K. O., REBELLO, F. K., CRAVO, M. S. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., ALVES, J.M.A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. 1ed. BoaVista: Embrapa Roraima, 2009. v. 1, p. 19-58.
- FREIRE FILHO, F. R., ROCHA, M. M., RIBEIRO, V. Q., SITTOLIN, I. N. Avancos e perspectivas da cultura do feijão-caupi. In: ALBUQUERQUE, A. C. S. & SILVA, A. G. (Eds.) **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v.1, p.235-250.
- FREIRE FILHO, F. R., LIMA, J. A. A., RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.
- GITAITIS, R. D. Two resistant responses in cowpea induced by different strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **Plant Disease**, v. 67, p. 1025-1028, 1983.
- KISHUN, R. Appraisal of loss in yield of cowpea due to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **Indian Phytopathology**, v. 42, p. 241-246, 1989.
- MENEZES, A. C. S. G., ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., GALVÃO, A., MESSIAS, O. I., MELO, V. F. **Importância sócio-econômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima**. In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., ARAÚJO, W. F., MELO, V. F. **Workshop sobre a cultura do feijão-caupi, 2007**, Boa Vista. Documentos 04. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007.

- MORETTI, C., MONDJANA, A. M., ZAZZERINI, A., BUONAURO, R. Occurrence of leaf spot on cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in Mozambique. **Plant Pathology**, v. 56, p. 347, 2007.
- NECHET, K. L. & HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.2, p.104-109, 2011.
- NECHET, K. L., HALFELD-VIEIRA, B. A., BOARI, A. J., NASCIMENTO, J. F. Doenças. In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., ALVES, J. M. A (Eds.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. 1ed. BoaVista: Embrapa Roraima, 2009. v. 1, p. 245-270.
- OKECHUKWU, R. U & EKPO, E. J. A. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in infested soil, cowpea seed and cowpea debris. **Tropical Agricultural Research Extension**, v.11, p.45-48, 2008.
- OKECHUKWU, R. U., EKPO, E. J. A., FLORINI, D. A. Yield depression in cowpea cultivars infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in Sudan savanna of Nigeria. **Tropical Agricultural Research Extension**, v.3, p.98-101, 2000.
- OLIVEIRA, F. J., SANTOS, J. H. R., ALVES, J. F., PAIVA, J. B., ASSUNÇÃO, M. V. Perdas de peso em sementes de cultivares de caupi, atacadas pelo caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.47-52, 1984.
- RIOS, G. P. & WATT, E. E. Identificación de fuentes de resistência a las principales enfermedades de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Fitopatologia**, v. 15, n. 1, p. 24, 1980.
- ONWULIRI, A. V. & OBU, A. J. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in northern Nigéria. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 1-7, 2002.
- SAGRI - **SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA**. 2010. Disponível em: <<http://www.sagri.pa.gov.br/node/351>>. Acesso em: 05 jul. 2011.
- SANTOS, A. A., BARRETO, P. D., QUINDERÉ, M. A. W. Identificação de fontes de resistência à *Xanthomonas vignicola*, agente causal da mancha-bacteriana do caupi. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical/Embrapa Meio-Norte, n.28, Boletim de Pesquisa, 2000. 12p.

- SANTOS, J. F., GRANGEIRO, J. I. T., BRITO, C. H., SANTOS, M. C. C. A. Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microregião cariri paraibano. **Engenharia Ambiental**, v.6, n.1, p.214-222, 2009.
- SIKIROU, R. & WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis stenocarpa* as a potential new host. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.939-947, 2004.
- SINGH, B. B., EHLERS, J. D., SHARMA, B., FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A., TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., KORMAWA, P. M., TAMO. (Eds.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.22-40.
- SOUZA, G. R., HALFELD-VIEIRA, B. A., NECHET, K. L. Resistência de genótipos de feijão-caupi à *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá-PR. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras-MG: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.32, suplemento p. S115, 2007.
- VERDIER, V., ASSIGBÉTSÉ, K., KHATRI-CHHETRI, G., WYDRA, K., RUDOLPH, K., GEIGER, J. P. Molecular characterization of the incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.595-602, 1998.
- VILARINHO, A. A., LOPES, A. M., FREIRE FILHO, F. R., GONÇALVES, J. R. P., ALVES, J. M. A., MARINHO, J. T. S., VIERA Jr, J. R. V., CAVALCANTE, E. S. Melhoramento. In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., ALVES, J. M. A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2009. p.105-130.
- ZANDJANAKOU-TACHIN, M., FANOU, A., LE GALL, P., WYDRA, K. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *X. axonopodis* pv. *vignicola* causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.159-169, 2007.
- WYDRA, K., KHATRI-CHHETRI, G., MAVRIDIS, A., SIKIROU, R. A diagnostic medium for semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.991-1001, 2004.

## **CAPÍTULO 1**

### **ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ESCALAS DIAGRAMÁTICAS PARA AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA-BACTERIANA DO FEIJÃO- CAUPI EM CULTIVARES COM TRIFÓLIOS MORFOLOGICAMENTE DISTINTOS.**

## **Elaboração e validação de escalas diagramáticas para avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em cultivares com trifólios morfológicamente distintos**

### **Resumo**

O objetivo desse trabalho foi desenvolver duas escalas diagramáticas para quantificar a severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, em cultivares de feijão-caupi de trifólios com folíolos ovais e lanceolados. Para a elaboração das escalas diagramáticas, trifólios sintomáticos foram coletados no campo e o padrão de distribuição das lesões e a severidade real da doença foram determinados utilizando o software ASSESS 2.0. A escala foi construída considerando a severidade mínima e máxima encontrada e os níveis intermediários de severidade foram estabelecidos de acordo com a lei do estímulo de Weber-Fechner. Os níveis propostos foram: 0,05; 0,25; 1,00; 3,40; 9,70; e 17,70% para trifólios com folíolos ovais e 0,10; 0,35; 1,10; 3,50; 9,30; e 19,10% para trifólios com folíolos lanceolados. As escalas foram validadas por meio de análises de regressão linear da severidade estimada e severidade real com e sem o uso das escalas propostas, para os 12 avaliadores sem experiência em quantificar essa doença, que estimaram a severidade de 50 trifólios com diferentes níveis de severidade da mancha-bacteriana. Para isso, avaliou-se a acurácia, a precisão e a reprodutibilidade dos avaliadores. Com a utilização das escalas diagramáticas, obtiveram-se níveis satisfatórios de acurácia, precisão e reprodutibilidade. Assim, as escalas propostas tornam-se uma ferramenta fácil e de rápida utilização, que podem ser adotadas para auxiliar na avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi.

**Palavras-chaves:** *Vigna unguiculata*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, epidemiologia, quantificação, fitopatometria.

## 1. Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão-macáçar ou feijão-fradinho é uma das leguminosas mais adaptadas e nutritivas entre as espécies cultivadas. É uma das principais fontes de proteína para a nutrição humana, principalmente para as populações de baixa renda (Freire Filho *et al.*, 2005; Verdier *et al.*, 1998). No Brasil, o feijão-caupi é explorado principalmente nas regiões Nordeste e Norte do país. No entanto, a cultura está conquistando espaço na região Centro-Oeste, em razão do desenvolvimento de cultivares com características que favorecem o cultivo mecanizado (Nechet & Halfeld-Vieira, 2011; Filgueiras *et al.*, 2009). Os agricultores encontram facilidades no cultivo desta leguminosa, em virtude da sua produtividade e pouca exigência em fertilidade de solo (Oliveira *et al.*, 1984).

A mancha-bacteriana do feijão-caupi, que tem como agente causal *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye, é uma importante doença do feijão-caupi em muitas áreas onde é cultivado (Gitaitis, 1983; Khatri-Chhetri *et al.*, 2003). Os sintomas são observados primeiramente pela formação de manchas foliares, pustiliformes, necróticas, angulares com centro amarronzado, envolvido frequentemente por halo amarelado, de tecido encharcado de aspecto úmido (Vakili, 1975; Moretti *et al.*, 2007; Freire Filho *et al.*, 2005). Em certas condições, cancos bem característicos nas hastes das plantas e manchas irregulares de aspecto úmido nas vagens podem ser observados (Freire Filho *et al.*, 2005). A bactéria infecta sementes reduzindo de 15-67% a emergência e aumentando a mortalidade de plantas em até 81%, podendo ocorrer redução significativa na produção (Ekpo, 1978; Okechukwu *et al.*, 2000), chegando a atingir índices próximos a 92%, dependendo da cultivar e do estágio fenológico em que a planta for infectada (Kishun, 1989).

Não existe método eficiente para o controle da mancha-bacteriana do feijão-caupi, sendo recomendado o uso de variedades resistentes (Okechukwu & Ekpo, 2004), plantio em áreas livres do patógeno e uso de sementes sadias (Freire Filho *et al.*, 2005; Wydra *et al.*, 2004; Sikirou & Wydra, 2004). Entretanto, até o momento, foram realizados poucos estudos epidemiológicos da mancha-bacteriana. A forma mais

adequada de avaliar a severidade de doenças como manchas foliares é pela quantificação da porcentagem de tecido foliar doente em relação à área foliar total (Amorim, 1995). A elaboração e a validação de escala diagramática para avaliar a severidade da mancha-bacteriana, constitui ferramenta necessária para compreender a doença sob a influência de fatores ambientais, bem como os níveis de resistência do hospedeiro. Além disso, a utilização de escalas pode reduzir a subjetividade das estimativas de severidade entre os avaliadores, melhorando a acurácia e a precisão das avaliações (Martins *et al.*, 2004).

As características de uma boa escala envolvem a facilidade de uso, ter resultados reproduzíveis, aplicabilidade sob ampla extensão de condições, possuir intervalos que representem todos os estádios de desenvolvimento da doença e que permita uma avaliação imediata (Berger, 1980). Assim, na construção de uma escala diagramática, alguns aspectos importantes devem ser considerados, tais como: os limites superior e inferior da escala devem corresponder, respectivamente, à máxima e mínima intensidade da doença observada no campo; os sintomas representados devem ser os mais próximos possíveis dos observados em plantas; e na determinação dos níveis intermediários da escala devem ser consideradas as limitações de acuidade do olho humano. Estas são definidas pela lei de estímulos-resposta de Weber-Fechner, na qual a acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (Horsfall & Barrat, 1945). As escalas diagramáticas devem ser validadas antes de serem propostas como um método padrão de quantificação de doenças (Martins *et al.*, 2004).

Atualmente, não existe escala diagramática para auxiliar na avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi. Tendo em vista, as diferenças morfológicas de trifólios de diferentes cultivares de feijão-caupi, surge a necessidade de elaboração de escalas diagramáticas, para cultivares com trifólios de folíolos ovais e para cultivares com trifólios de folíolos lanceolados. Assim, a proposta desse trabalho foi elaborar e validar duas escalas diagramáticas para a quantificação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em plantas com trifólios de folíolos ovais e de folíolos lanceolados.

## 2. Material e Métodos

Para a elaboração das escalas diagramáticas, duas parcelas de feijão-caupi foram instaladas, em dois anos consecutivos (2009 e 2010) em área de Latossolo Amarelo, textura arenosa e topografia plana, no campo experimental da Embrapa Roraima, no município de Boa Vista, no Estado de Roraima, Brasil (02°45'27"N, 60°43'52"W, 090 m de altitude). Cada parcela foi constituída de uma cultivar distinta, tendo-se utilizado os genótipos BRS Bragança e BRS Mazagão, que apresentavam trifólios de folíolo oval e trifólios de folíolo lanceolado, respectivamente. Cada parcela foi constituída por oito linhas de 5 m de comprimento, espaçadas de 0,75 m entre linhas. As plantas foram inoculadas no estádio de 2-3 trifólios e no início da floração com um isolado de *Xav*, na concentração de  $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, até o ponto de escorrimento, com pulverizador costal manual.

Coletas aleatórias de 150 trifólios de cada cultivar foram realizadas a partir do aparecimento dos primeiros sintomas da doença e continuaram à medida que os sintomas da doença progrediam. Dos trifólios coletados foram obtidas imagens, por meio de fotografia digital, as quais foram transferidas para um microcomputador para determinar o percentual de área necrosada (severidade real) com o auxílio do programa ASSESS 2.0 (Lamari, 2008). A partir das severidades mínima e máxima encontrada nos trifólios analisados, obedecendo a lei de acuidade visual de Weber-Fechner (Horsfall & Barrat, 1945) e seguindo uma escala logarítmica, estabeleceram-se quatro níveis intermediários da doença para compor a escala diagramática. Após o estabelecimento dos níveis de severidade da escala, um trifólio padrão de área conhecida, de cada cultivar, foi utilizado para representar os seis níveis de severidade da escala, de maneira a reproduzir os sintomas observados nas folhas em campo, estabelecendo assim, a escala diagramática. Essas imagens foram inseridas em *slides* individuais no Microsoft® Power Point® 2000 (Microsoft Corporation, 1999) para a visualização e quantificação pelos avaliadores.

Para a validação da escala diagramática foram utilizados 12 avaliadores, a maioria com experiência na quantificação de doenças com uso de escalas, mas todos inexperientes na quantificação da mancha-bacteriana do feijão-caupi. Os avaliadores analisaram 50 imagens de trifólios de folíolos ovais e 50 imagens de trifólios de folíolos

lanceolados, contendo diferentes graus de severidade sem o uso das escalas propostas (primeira etapa). Na segunda etapa, os avaliadores analisaram as mesmas 50 imagens de trifólios de folíolos ovais e as 50 imagens de trifólios de folíolos lanceolados para estimar a severidade com o uso das escalas diagramáticas propostas, recebendo uma cópia colorida impressa das duas escalas diagramáticas.

A partir dos dados de cada avaliador, tanto para a validação da escala diagramática para feijão-caupi com trifólios de folíolos ovais quanto para a escala com trifólios de folíolos lanceolados, determinaram-se a acurácia e a precisão por meio de regressão linear simples entre a severidade real (variável independente quantificada no programa ASSESS) e a severidade estimada (variável dependente), sem e com o uso da escala. A precisão foi avaliada por meio do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão e pela variância dos erros (severidade estimada menos a real). A acurácia das estimativas foi determinada pelo teste  $t$  aplicada ao intercepto da regressão linear ( $a$ ), para verificar se foi significativamente diferente de 0, e ao coeficiente angular da reta ( $b$ ), para testar se foi significativamente diferente de 1, ao nível de 5% de probabilidade. A reprodutibilidade das avaliações foi determinada pelos valores de  $R^2$  da regressão linear entre as severidades estimadas pelos diferentes avaliadores combinados aos pares como proposto por Nutter & Schultz (1995). As regressões entre a severidade real e a estimada para cada avaliador, bem como entre os avaliadores foram realizadas com o programa MINITAB versão 14.

### **3. Resultados e Discussão**

Foi observado que o valor máximo de severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi de 17,70% para a cultivar com trifólios de folíolos ovais (BRS Bragança) e de 19,10%, para a cultivar com trifólios de folíolos lanceolados (BRS Mazagão). As escalas diagramáticas foram propostas com seis níveis de severidade, 0,05; 0,25; 1,00; 3,40; 9,70; 17,70% e 0,10; 0,35; 1,10; 3,50; 9,30; 19,10%, para cultivares com trifólios de folíolos ovais e para trifólios com folíolos lanceolados, respectivamente, seguindo a lei do estímulo de Weber-Fechner (Diaz *et al.*, 2001; Halfeld-Vieira & Nchet, 2006; Soares *et al.*, 2009; Capucho *et al.*, 2010; Celoto & Papa, 2010), e podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.

Quando se utilizou a escala diagramática para trifólios de folíolos ovais e para trifólios de folíolos lanceolados, os valores estimados de severidade pelos 12 avaliadores ficaram próximos dos valores de severidade real (Figuras 3 e 4).

Valores de intercepto (*a*) significativamente diferentes de 0 indicam a presença de desvios constantes, enquanto valores de coeficiente angular da reta (*b*) que desviam significativamente de 1 indicam a presença de desvios sistemáticos (Nutter *et al.*, 1993). Na validação da escala diagramática para trifólios de folíolos ovais, os valores do intercepto (*a*) relacionados a 25% dos avaliadores (avaliadores 4, 9 e 10), quando não utilizaram a escala, não diferiram de zero ( $P > 0,05$ ). Na validação da escala diagramática para cultivar com trifólios de folíolos lanceolados, para 75% dos avaliadores (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 12) as estimativas do intercepto (*a*) não diferiu de zero quando não utilizaram a escala. Com o uso das escalas diagramáticas, os valores do intercepto (*a*) não diferiram de zero ( $P > 0,05$ ) para 50% dos avaliadores (avaliadores 1, 2, 5, 7, 8, e 10), e para 100% dos avaliadores, com a escala de trifólios de folíolos ovais e lanceolados, respectivamente, indicando que metade dos avaliadores não apresentou desvios constantes com o uso da primeira escala (Tabela 1) e que nenhum dos avaliadores apresentou desvios constantes com o uso da segunda escala (Tabela 2). O coeficiente angular da reta (*b*) não diferiu de 1 ( $P > 0,05$ ) para 41,66% dos avaliadores (avaliadores 2, 3, 7, 8 e 12), quando não utilizaram a escala de trifólios de folíolos ovais, e para 25% dos avaliadores (avaliadores 1, 4 e 8), quando não utilizaram a escala de trifólios de folíolos lanceolados. Porém, com o uso das escalas, não houve diferença do coeficiente angular da reta (*b*) para 58,33% dos avaliadores, indicando que a maioria dos avaliadores não apresentou desvios sistemáticos, pois houve uma melhora para os avaliadores 1, 2, 4, 5, 8, 11 e 12 com o uso da escala de trifólios de folíolos ovais (Tabela 1) e para os avaliadores 1, 3, 5, 7, 10, 11 e 12 com o uso da escala de trifólios de folíolos lanceolados (Tabela 2).

A precisão também é um fator a ser considerado na validação de uma escala diagramática e é definida como a exatidão de uma operação onde há rigor ou refinamento na medida (Bergamin Filho & Amorim, 1996). Ela pode ser avaliada por meio do coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ), que deve ser próximo de 100%, bem como pela variação dos erros. Com o uso das escalas, houve aumento da precisão

para todos os avaliadores (Tabelas 1 e 2), pois os níveis de precisão das estimativas visuais da mancha-bacteriana do feijão-caupi apresentaram valores de  $R^2$  superior a 88%, considerado alto para este tipo de avaliação (Bergamin Filho & Amorim, 1996).

Os valores de  $R^2$  ficaram entre 88 e 99,1 com média de 95,3 com o uso da escala de trifólios de folíolos ovais e entre 88,7 e 99,7 com média de 95,8 com a escala de trifólios de folíolos lanceolados, assemelhando-se aos verificados em outros estudos de validação de escalas (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006; Sussel *et al.*, 2009; Celoto & Papa, 2010; Capucho *et al.*, 2010). A precisão das estimativas sem o uso das escalas foi baixa, pois os valores de  $R^2$  variaram de 16,7 a 63,7 com média de 41,8 (Tabela 1) sem a escala de trifólios de folíolos ovais e de 10,5 a 29,9 com média de 20,72 (Tabela 2) sem a escala de trifólios de folíolos lanceolados, indicando que, com o uso das escalas diagramáticas houve maior precisão das estimativas.

Observou-se que sem a utilização das escalas diagramáticas, cerca de 75% dos avaliadores, apresentaram maiores desvios nos erros. Sem a escala de trifólios de folíolos ovais, 16,7% dos avaliadores (avaliadores 1 e 2) chegaram a apresentar erros ultrapassando 23%, enquanto 58,3% dos avaliadores (avaliadores 3, 4, 6, 7, 8, 9, e 11) apresentaram erros superiores a 10% e inferiores a 23% (Figura 5). Sem a escala de trifólios de folíolos lanceolados, 16,7% dos avaliadores (avaliadores 1 e 8) chegaram a apresentar erros ultrapassando 18%, e 58,3% dos avaliadores (2, 4, 5, 6, 7, 11 e 12) apresentaram erros superiores a 10% e inferiores a 18% (Figura 6). Os demais avaliadores, mesmo sem o uso das escalas, apresentaram erros inferiores a 10% (avaliadores 5, 10 e 12 sem a escala de trifólios de folíolos ovais e avaliadores 3, 9 e 10 sem a escala de trifólios de folíolos lanceolados), sendo assim, considerados como bons avaliadores (Nutter & Schultz, 1995). No entanto, com a utilização das escalas diagramáticas, houve redução dos erros absolutos para as estimativas, em relação à distribuição dos erros das estimativas obtidas sem o uso das escalas. A maioria dos erros absolutos foi inferior a 5% quando os avaliadores utilizaram as escalas para estimar a severidade da doença (Figuras 5 e 6), exceto o avaliador 1 referente a escala de trifólios de folíolo lanceolado, que teve no máximo 8% de erro absoluto (Figura 6). De acordo com Nutter & Worawitlikit (1989), para que um avaliador possa ser considerado excelente, o erro de suas estimativas deve estar dentro de um intervalo de  $\pm 5\%$  do valor

real, e bom quando não ultrapassa a  $\pm 10\%$ . Nesse sentido, todos os avaliadores que utilizaram a escala de trifólios de folíolos ovais e a maioria dos avaliadores (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) que utilizaram a escala de trifólios de folíolos lanceolados foram considerados excelentes na avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi, pois a média dos erros absolutos permaneceu no intervalo de +5 a -5%. O avaliador 1 referente à escala de folíolo lanceolado, foi considerado bom, pois a média dos erros absolutos permaneceu no intervalo de +10 a -10%.

Com o uso da escala diagramática de trifólios de folíolos ovais, metade dos avaliadores (1, 2, 5, 7, 8 e 10) apresentou tendência em subestimar a severidade da doença, e os demais avaliadores (3, 4, 6, 9, 11 e 12) apresentaram tendência em superestimar esta severidade (Tabela 1). Esse fato pode ser confirmado ao se observar que para seis dos avaliadores predominaram erros com sinais positivos e para os outros seis, erros com sinais negativos (Figura 5). Com o uso da escala de trifólios de folíolos lanceolados houve tendência em subestimar a severidade da doença (Tabela 2), pois para todos os avaliadores predominaram erros com sinais negativos (Figura 6). Outros estudos de validação de escalas diagramáticas indicam que a tendência em superestimar valores é mais frequente (Sherwood *et al.*, 1983; Newton & Hackett, 1994; Parker *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 2001; Leite & Amorim, 2002, Capucho *et al.*, 2010). Em alguns casos, como o da mancha parda da mandioca, da cercosporiose da alface e da mancha-de-cercospora em melancia, ocorreram a subestimativa dos níveis de severidade das doenças (Michereff *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2004; Halfeld-Vieira & Nechet, 2006).

As soluções para corrigir tanto a superestimativa quanto a subestimativa dos níveis de severidade das doenças variam de acordo com a magnitude do erro, podendo ser corrigida com o treinamento dos avaliadores (Nutter & Schultz, 1995). Entretanto, a superestimativa, bem como a subestimativa dos níveis de severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi com o uso das escalas foi baixa, e tais escalas podem ser recomendadas para a avaliação da severidade da doença, não sendo necessário o treinamento dos avaliadores. Isto provavelmente se deve ao fato do nível máximo de severidade da doença em cultivares de folíolos ovais e de folíolos lanceolados ser inferior a 17,63 e 19,09%, respectivamente, o que torna mais fácil a avaliação com o uso dessas escalas. BRS Bragança apresentou-se mais suscetível à doença do que BRS

Mazagão. Entretanto, o nível máximo de severidade obtido em BRS Bragança foi inferior ao obtido em BRS Mazagão devido à desfolha causada pela doença.

Com o uso da escala diagramática de trifólios de folíolos ovais, metade dos avaliadores não apresentou desvios constantes, e com o uso da escala de trifólios de folíolos lanceolados, nenhum dos avaliadores apresentou desvios constantes. Entretanto, a maioria dos avaliadores não apresentou erros sistemáticos com o uso das duas escalas, o que não representa problema, pois avaliações realizadas com menor acurácia do que precisão não apresenta sérios problemas, dado que os desvios normalmente seguem o mesmo padrão (Gomes *et al.*, 2004). Segundo Stonehouse (1994), a presença de certo nível de erro absoluto nas mensurações pode ser compensada pela rapidez e padronização quando se utiliza a escala diagramática.

Os avaliadores relataram sentir maior dificuldade de estimar a severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi, sem o uso da escala, em trifólio com folíolos lanceolados, do que em trifólios com folíolos ovais (Figuras 3 e 4). Isto se deve ao fato da qualidade da estimativa da doença poder ser influenciada pela complexidade amostral como o tamanho, a forma, a cor e o número de lesões da unidade amostral, conforme relatado por Kranz (1988).

Além da acurácia e da precisão, outro indicador da eficiência da escala diagramática desenvolvida é a reprodutibilidade das estimativas entre os avaliadores (Berger, 1980). Diferentes avaliadores, quando utilizam a mesma escala para a avaliação do mesmo material vegetal devem estimar os mesmos valores de severidade (Nutter & Schultz, 1995). A reprodutibilidade, que é a repetibilidade das estimativas, pode ser estimada pela correlação das severidades estimadas pelos avaliadores aos pares. Quando o coeficiente de correlação na comparação de dois avaliadores aproxima-se de 100%, as estimativas dos avaliadores se repetem (Belasque *et al.*, 2005; Leite & Amorim, 2002). Sem o uso da escala diagramática de trifólios de folíolos ovais, os coeficientes de determinação foram superiores a 70% em apenas 9% dos casos e inferiores a 70% em 91% dos casos das comparações entre avaliadores. Com o uso da escala proposta, foi observado que em nenhum caso o coeficiente de determinação foi inferior a 80%, sendo superiores a 90% em 83,3% dos casos (Tabela 3). Na análise da reprodutibilidade dos avaliadores sem o uso da escala de trifólios de folíolos

lanceolados, observou-se que os coeficientes de determinação foram superiores a 70% em apenas 7,57% dos casos e inferiores a 70% em 92,43% dos casos das comparações entre avaliadores. Com o uso da escala de trifólios de folíolos lanceolados foi observado que em nenhum caso o coeficiente de determinação foi inferior a 80% das comparações entre avaliadores, sendo que 85,85% dos casos os coeficientes de determinação foram superiores a 90% (Tabela 4). Tais resultados indicam que as estimativas realizadas com as escalas diagramáticas são reproduzíveis. Resultados similares foram obtidos por Capucho *et al.* (2010) com o uso da escala diagramática da mancha-branca do milho.

Portanto, os resultados mostram que as escalas propostas para a avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi, tanto para cultivares de trifólios com folíolos ovais, quanto para cultivares de trifólios com folíolos lanceolados, foram de fácil utilização. Desta forma, essas escalas podem ser consideradas como valiosas ferramentas para a pesquisa, como em estudos epidemiológicos, proporcionando informações mais adequadas para esse patossistema.

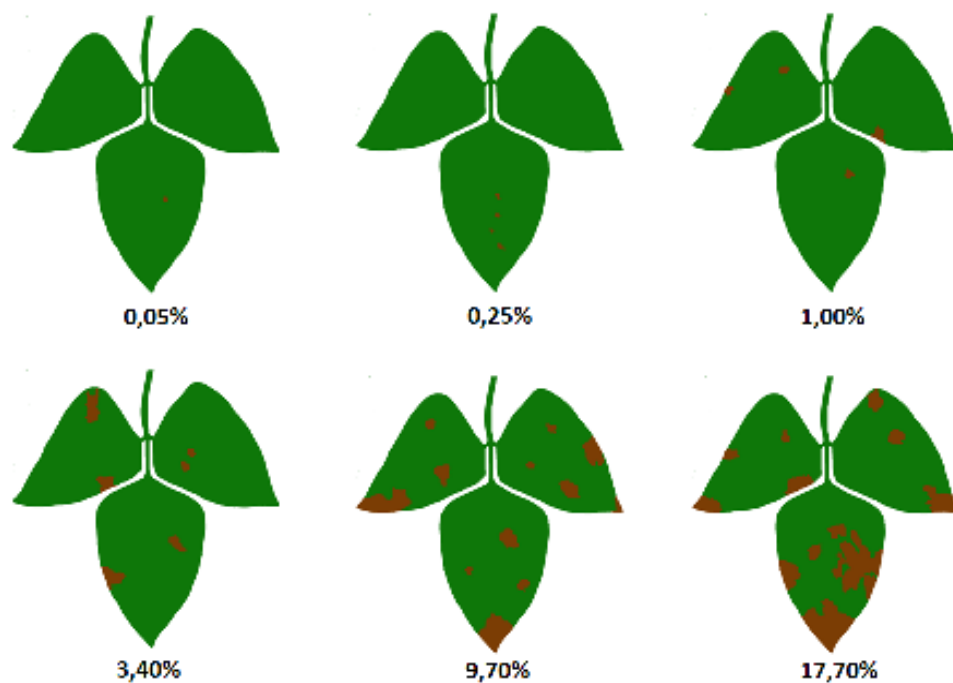
#### 4. Referências

- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATHI, H., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo, SP: Ceres, 1995. p. 647-71.
- BERGAMIM FILHO, A. & AMORIM, L (Eds.). **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico**. São Paulo, Ceres, 1996.
- BELASQUE, J., BASSANEZI, R. B., SPÓSITO, M. B., RIBEIRO, L. M., JESUS JÚNIOR, W. C., AMORIM, L. Escalas diagramáticas para a avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 387-93, 2005.
- BERGER, R. D. Measuring Disease Intensity. In: TENG, P. S. & KRUPA, S. V. (Eds.). **Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry**. St. Paul: University of Minnesota, 1980. p. 28-31.
- CAPUCHO, A. S., ZAMBOLIM, L., DUARTE, H. S. S., PARREIRA, D. F., FERREIRA, P. A., LANZA, F. E., COSTA, R. V., CASELA, C. R., COTA, L. V. Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. **Crop Protection**, v.29, p. 1015-20, 2010.
- CELOTO, M. I. B. & PAPA, M. E. S. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha alvo em folhas de acerola. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p. 258-262, 2010.
- DIAZ, C. G., BASSANEZI, R. B., FILHO, A. B. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopatologica**, v.27, p. 35-39, 2001.
- EKPO, E. J. A. Effect of *Xanthomonas vignicola* on the yield of cowpea (*Vigna unguiculata*). **African Journal of Agricultural Sciences**, v.5, p. 67-69, 1978.
- FILGUEIRAS, G. C., SANTOS, M. A. S., HOMMA, A. K. O., REBELLO, F. K., CRAVO, M. S. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A. A., ALVES, J. M. A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. 1ed. BoaVista: Embrapa Roraima, 2009. v. 1, p. 19-58.
- FREIRE FILHO, F. R., LIMA, J. A. A., RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

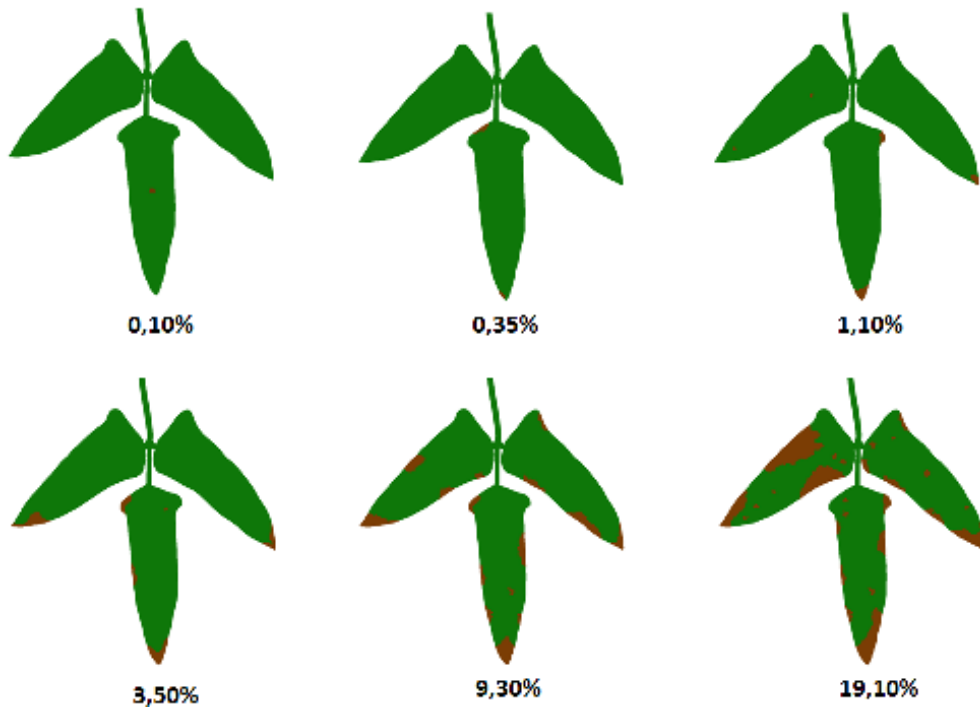
- GITAITIS, R.D. Two resistant responses in cowpea induced by different strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **Plant Disease**, v.67, n.9, p.1025-1028, 1983.
- GOMES, A. M. A., MICHEREFF, S. J., MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. 38-42, 2004.
- HALFELD-VIEIRA, B. & NECHET, K. L. Elaboração e validação de escala diagramática para a avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 46-50, 2006.
- HORSFALL, J. G. & BARRAT, R. W. An improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology**, v.35, p. 655, 1945.
- KHATRI-CHHETRI, G. B., WYDRA, K., RUDOLPH, K. Metabolic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agent of cowpea bacterial blight and pustule. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p. 851-860, 2003.
- KISHUN, R. Appraisal of loss in yield of cowpea due to *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*, causal agent of cowpea bacterial blight and pustule. **Indian Phytopathology**, v.42, p. 241-246, 1989.
- KRANZ, J. Measuring plant disease. In: KRANZ, J. & ROTEM, L. (Eds.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag. 1998.
- LAMARI, L. ASSESS 2.0. Image analysis software for disease quantification. Saint Paul: APS Press, 2008. 125p.
- LEITE, R. M. V. B. C. & AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para Mancha de Alternaria em girassol. **Summa Phytopathologica**, v.28, p. 14-19, 2002.
- MARTINS, M. C., GUERZONI, R. A., CÂMARA, G. M. S., MATTIAZZI, P., LOURENÇO, A. S., AMORIM, L. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 179-84, 2004.
- MICHEREFF, S. J., MAFFIA, L. A., NORONHA, M. A. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p. 612-619, 2000.

- MICHEREFF, S. J., PEDROSA, R. A., NORONHA, M. A., MARTINS, R. B., SILVA, F. V. Escala diagramática e tamanho de amostras para avaliação da severidade da mancha parda da mandioca (*Cercosporidium henningsii*). **Agrotropica**, v.10, p. 143-8, 1998.
- MORETTI, C., MONDJANA, A. M., ZAZZERINI, A., BUONAURO, R. Occurrence of leaf spot on cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in Mozambique. **Plant Pathology**, v.56, p. 347, 2007.
- NECHET, K. L. & HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.2, p.104-109, 2011.
- NEWTON, A. C. & HACKETT, C. A. Subjective components of mildew assessment on spring barley. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, p. 395-412, 1994.
- NUTTER, F. W., GLEASON, M. L., JENCO, J. H., CHRISTINAS, N. C. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, v.83, p. 806-812, 1993.
- NUTTER, F. W. & WORAWITLIKIT, O. Severity. Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. **Phytopathology**, v.79, p. 111-135, 1989.
- NUTTER, F. W. & SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.17, p. 174-84, 1995.
- OKECHUKWU, R. U. & EKPO, E. J. A. Sources of resistance to cowpea bacterial blight disease in Nigeria. **Journal Phytopathology**, v.152, p. 345-351, 2004.
- OKECHUKWU, R. U., EKPO, E. J. A., FLORINI, D. A. Yield depression in cowpea cultivars infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in Sudan savanna of Nigeria. **Tropical Agricultural Research Extension**, v.3, p. 98-101, 2000.
- OLIVEIRA, F. J., SANTOS, J. H. R., ALVES, J. F., PAIVA, J. B., ASSUNÇÃO, M. V. Perdas de peso em sementes de cultivares de caupi, atacadas pelo caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.9, n.1, p. 47-52, 1984.
- PARKER, S. R., SHAW, M. W., ROYLE, D. J. The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. **Plant Pathology**, v.43, p. 856-65, 1995.

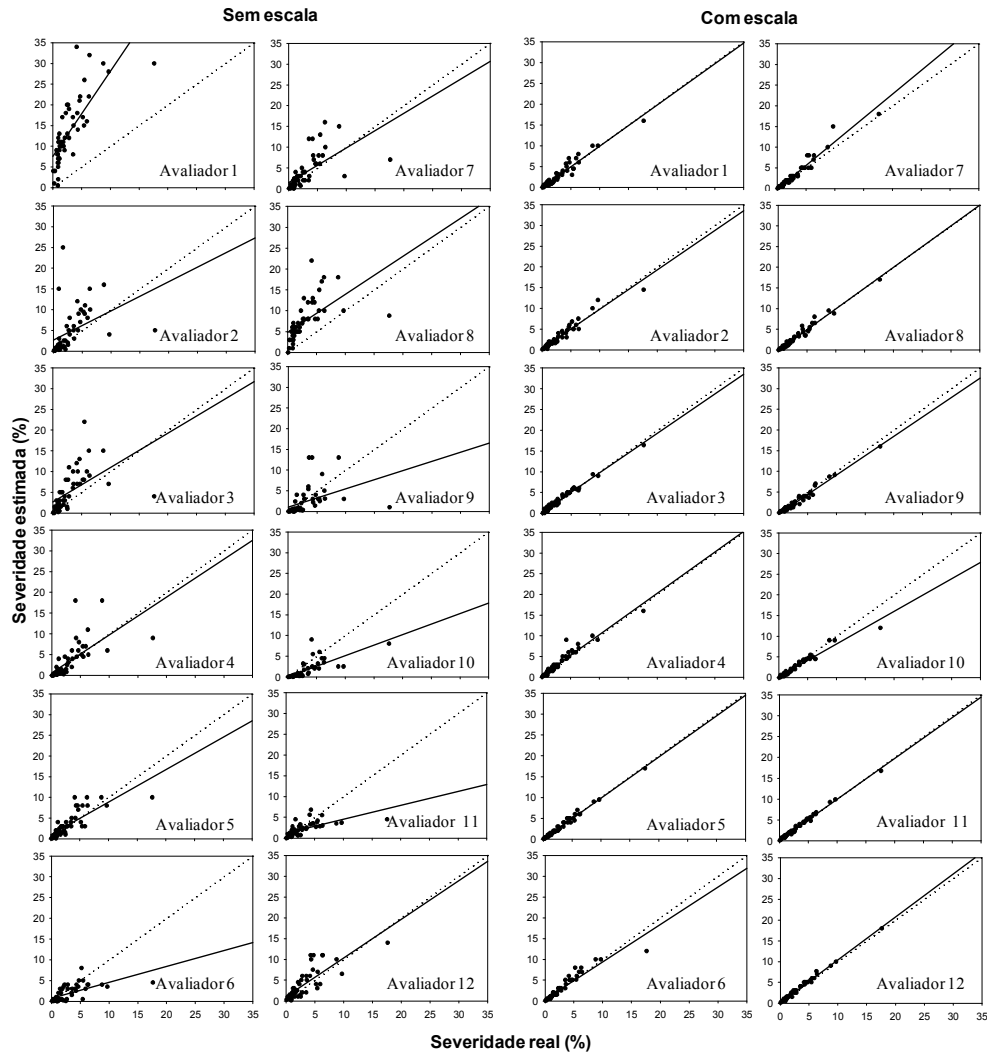
- SHERWOOD, R. T., BERG, C.C., HOOVER, M.R., ZEIDERS, K. E. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchard grass. **Phytopathology**, v.73, p. 173-177, 1983.
- SIKIROU, R. & WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis stenocarpa* as a potential new host. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p. 939-947, 2004.
- SOARES, M. R., GODOY, C. V., OLIVEIRA, M. C. N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p. 333-338, 2009.
- STONEHOUSE, J. Assessment of Andean bean diseases using visual keys. **Plant Pathology**, v.43, p. 519-527, 1994.
- SUSSEL, A. A. B., POZZA, E. A., CASTRO, H. A. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade do mofo cinzento em mamoneira. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p. 187-191, 2009.
- VAKILI, N. G., KAISER, W.J., PEREZ, J.E., CORTES-MONLLOR, A. Bacterial blight of beans caused by two *Xanthomonas* pathogenic types from Puerto Rico. **Phytopathology**, v.65, p. 401-403, 1975.
- VERDIER, V., ASSIGBÉTSÉ, K., KHATRI-CHHETRI, G., WYDRA, K., RUDOLPH, K., GEIGER, J. P. Molecular characterization of incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 595-602, 1998.
- WYDRA, K., KHATRI-CHHETRI, G., MAVRIDIS, A., SIKIROU, R. A diagnostic medium for semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p. 991-1001, 2004.



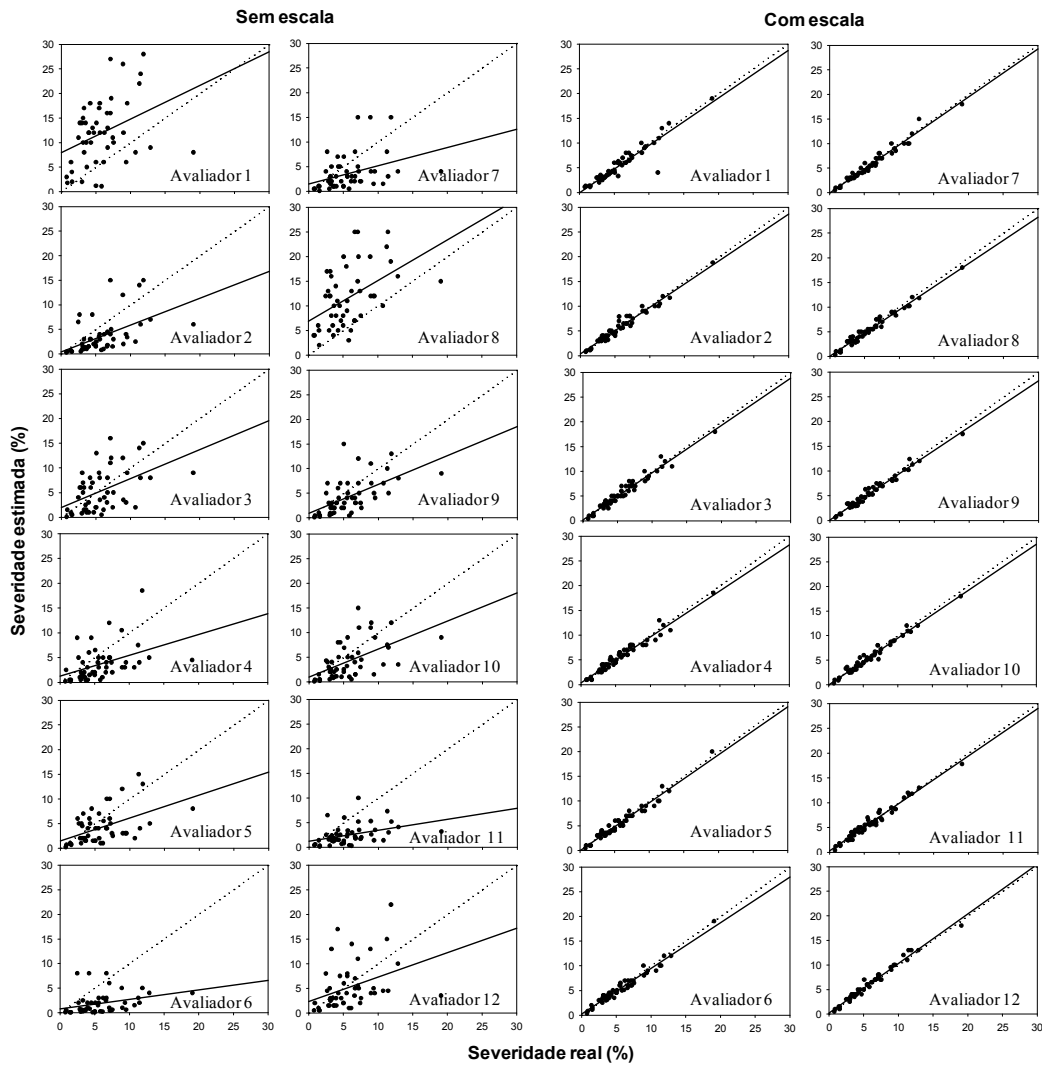
**Figura 1** - Escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar BRS Bragança com trifólio de folíolos ovais. Valores estão em porcentagem (%) de área foliar com sintomas da doença.



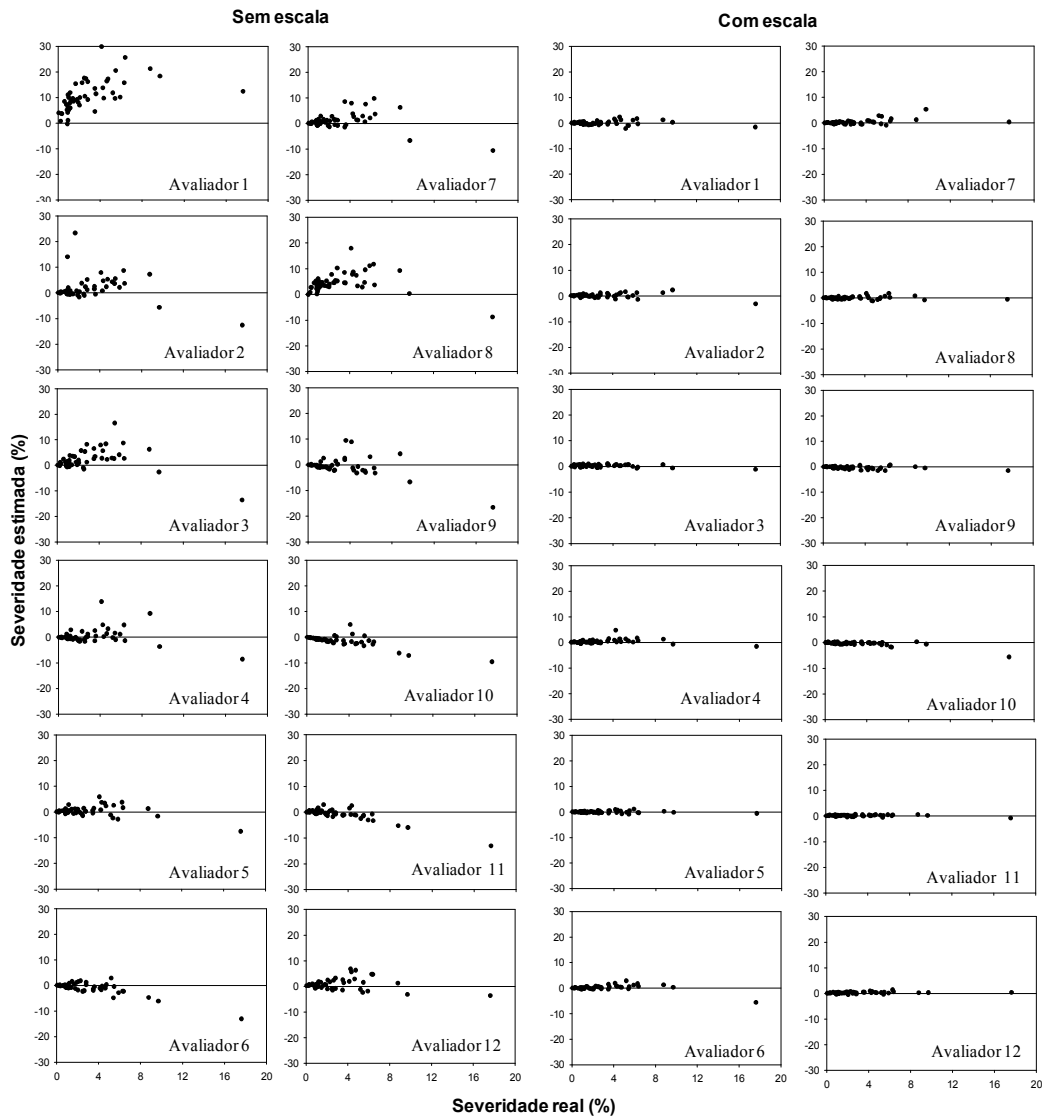
**Figura 2** - Escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar BRS Mazagão com trifólio de folíolos lanceolados. Valores estão em porcentagem (%) de área foliar com sintomas da doença.



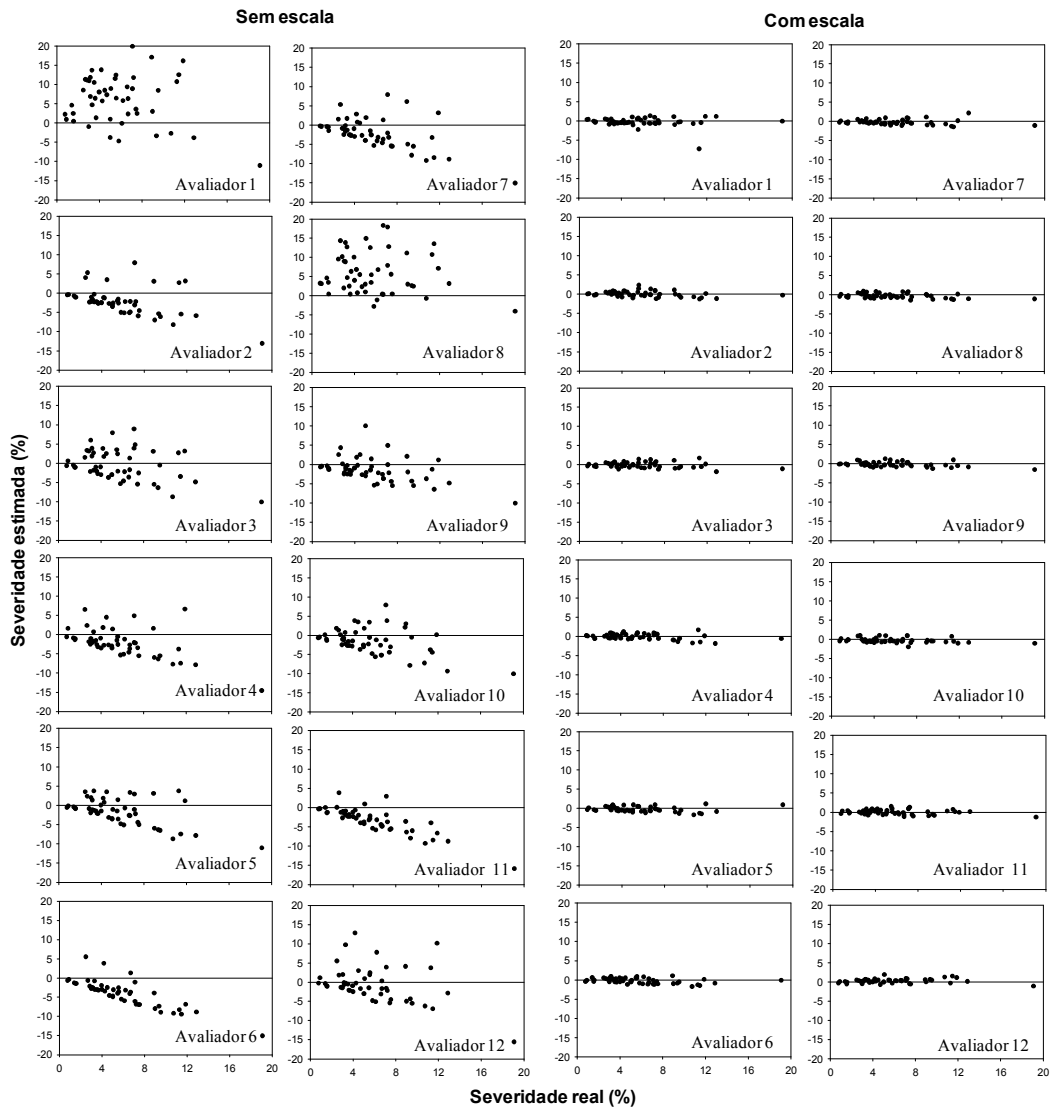
**Figura 3-** Severidade estimada sem e com a utilização da escala diagramática elaborada (pontos cheios), e linha de regressão obtida entre a severidade real e estimada (linha cheia) da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de fíololos ovais, para os 12 avaliadores. A linha pontilhada representa a situação ideal com as estimativas idênticas à real.



**Figura 4-** Severidade estimada sem e com a utilização da escala diagramática elaborada (pontos cheios), e linha de regressão obtida entre a severidade real e estimada (linha cheia) da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos lanceolados, para os 12 avaliadores. A linha pontilhada representa a situação ideal com as estimativas idênticas à real.



**Figura 5-** Erros (severidade estimada menos a real) para os 12 avaliadores sem e com a utilização da escala diagramática elaborada para quantificação da severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos ovais.



**Figura 6-** Erros (severidade estimada menos a real) para os 12 avaliadores sem e com a utilização da escala diagramática elaborada para quantificação da severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos lanceolados.

**Tabela 1** - Estimativas dos parâmetros de interseção (*a*), dos coeficientes angulares (*b*) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das equações de regressão linear calculadas entre a severidade real e estimadas da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos ovais, realizada por 12 avaliadores, com e sem a utilização da escala diagramática.

Avaliadores	Sem escala			Com escala		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$R^2$	<i>a</i>	<i>b</i>	$R^2$
1	7,56 *	2,06 *	58,6	0,04	0,99	93,5
2	2,69 *	0,70	16,8	0,23	0,95	92,9
3	2,68 *	0,83	28,3	0,32 *	0,95 *	97,7
4	0,66	0,91 *	45,5	0,36 *	0,99	92,7
5	0,99 *	0,78 *	62,7	0,02	0,99	98,4
6	0,74 *	0,38 *	39,6	0,45 *	0,89 *	88,0
7	1,51 *	0,83	38,7	-0,12	1,15 *	94,0
8	4,85 *	0,91	34,5	-0,11	1,00	96,8
9	1,04	0,44 *	16,7	-0,23 *	0,94 *	97,3
10	0,07	0,50 *	54,8	0,19	0,79 *	94,5
11	1,15 *	0,34 *	41,4	0,19 *	0,98	99,1
12	1,03 *	0,93	63,7	0,14 *	1,03	99,0
Média	2,08	0,80	41,8	0,12	0,97	95,3

\* situações onde o valor da interseção da reta (*a*) ou o coeficiente angular (*b*) foi diferente de “0” e “1”, respectivamente, pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2** - Estimativas dos parâmetros de interseção (*a*), dos coeficientes angulares (*b*) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das equações de regressão linear calculadas entre a severidade real e estimadas da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos lanceolados, realizada por 12 avaliadores, com e sem a utilização da escala diagramática.

Avaliadores	Sem escala			Com escala		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$R^2$	<i>a</i>	<i>b</i>	$R^2$
1	7,98 *	0,68	13,4	-0,06	0,96	88,7
2	0,42	0,55 *	27,4	0,37	0,94 *	95,8
3	1,99	0,58 *	23,6	0,17	0,96	95,7
4	1,23	0,42	18,5	0,36	0,93 *	95,3
5	1,51	0,46 *	24,0	-0,07	0,97	96,1
6	0,75	0,19 *	10,5	0,20	0,93 *	96,2
7	1,52	0,37 *	13,5	-0,12	0,98	96,5
8	6,90 *	0,82	22,9	0,08	0,94 *	97,1
9	0,92	0,59 *	34,8	0,13	0,94 *	97,2
10	0,95	0,57 *	29,9	-0,07	0,96	97,1
11	1,20 *	0,22 *	16,2	0,24	0,96	96,7
12	2,36	0,49 *	13,9	0,20	1,07	97,7
Média	2,31	0,50	20,72	0,12	0,96	95,8

\* situações onde o valor da interseção da reta (*a*) ou o coeficiente angular (*b*) foi diferente de “0” e “1”, respectivamente, pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 3** - Reprodutibilidade das estimativas da severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos ovais, representada pela frequência dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de equações de regressão linear simples relacionando as estimativas entre avaliadores, com e sem o uso da escala proposta.

Valor de $R^2$	Frequência (%)*	
	Sem escala	Com escala
<0,70	91,0	0
0,70 - 0,79	9,0	0
0,80 - 0,89	0	16,7
0,90 - 1,00	0	83,3

\* calculada considerando o número de ocorrências do intervalo em relação ao total de 66 combinações possíveis entre os 12 avaliadores em cada avaliação da severidade da doença.

**Tabela 4** - Reprodutibilidade das estimativas da mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*) do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para cultivar com trifólio de folíolos lanceolados, representada pela frequência dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de equações de regressão linear simples relacionando as estimativas entre avaliadores, com e sem o uso da escala proposta.

Valor de $R^2$	Frequência (%)*	
	Sem escala	Com escala
<0,70	92,43	0
0,70 - 0,79	7,57	0
0,80 - 0,89	0	15,15
0,90 - 1,00	0	85,85

\* calculada considerando o número de ocorrências do intervalo em relação ao total de 66 combinações possíveis entre os 12 avaliadores em cada avaliação da severidade da doença.

## **CAPÍTULO 2**

### **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO PATOSSISTEMA: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* - FEIJÃO-CAUPI**

## **Aspectos epidemiológicos do patossistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* - feijão-caupi.**

### **Resumo**

Os objetivos deste trabalho foram verificar o efeito da concentração de inóculo e do período de molhamento foliar no patossistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (*Xav*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e selecionar plantas indicadoras para testes de diagnose de *Xav*. Em casa-de-vegetação e campo, plantas da cv. BRS Bragança no estágio fenológico de três trifólios foram inoculadas com diferentes concentrações de inóculo ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de *Xav*, e apresentaram diferença na severidade final, sendo esta maior com o incremento da concentração de inóculo. Com os dados de severidade e desfolha avaliados semanalmente em campo, calculou-se a severidade corrigida, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e determinou-se a taxa de progresso da doença (TPD). Após a colheita e debulha das vagens, as sementes foram submetidas à métodos de detecção de bactérias, utilizando o meio semi-seletivo CCM, para determinar a transmissibilidade. Houve desfolha precoce em todas as plantas infectadas por *Xav* e aumento da severidade corrigida, AACPD e TPD com a elevação da concentração de inóculo. *Xav* foi detectada independente da concentração de inóculo utilizada. Plantas de feijão-caupi também foram inoculadas com *Xav* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e submetidas aos períodos de molhamento foliar (PMF) de 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas após a inoculação, em casa-de-vegetação. O período de incubação variou de 4,0 a 5,4 dias e foi maior em plantas com 0h de PMF. Houve desfolha em todas as plantas infectadas por *Xav*, e aumento da severidade corrigida, da AACPD e da TPD com a elevação da duração do PMF. Plantas de soja (*Glycine max*), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e da planta daninha leiteira (*Euphorbia heterophylla*) foram inoculadas com *Xav* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>), por aspersão e por infiltração com auxílio de seringa, 12 dias após a semeadura. Não houve sintomas da doença em soja e leiteira inoculadas por aspersão, mas em feijão-comum, observaram-se reações de hipersensibilidade (HR). Quando *Xav* foi infiltrada com seringa, observou-se presença de HR em menos de 24 h após a inoculação em *E. heterophylla* e três dias após a inoculação em soja e feijão-comum.

**Palavras-chaves:** *Vigna unguiculata*, mancha-bacteriana, concentração de inóculo, período de molhamento foliar, gama de hospedeiros, transmissibilidade.

## 1. Introdução

A cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) tem grande importância econômica para o Norte e o Nordeste do Brasil, sendo considerada a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda (Freire Filho *et al.*, 2005). Uma das principais doenças que incide no feijão-caupi é a mancha-bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (*Xav*) (Gitaitis, 1983; Kishun, 1989; Khatri-Chhetri *et al.*, 2003; Okechukwu & Ekpo, 2004). No Brasil, o patógeno foi relatado causando doença em feijão-caupi nos estados de Goiás, Bahia, Maranhão, Pará, Piauí, Ceará e Roraima (Santos *et al.*, 2000; Freire Filho *et al.*, 2005; Nechet *et al.*, 2009). No Ceará, a mancha-bacteriana ocorreu de forma epidêmica e com grande severidade, afetando 100% das plantas de cultivares suscetíveis, e reduzindo drasticamente a produção de grãos (Santos *et al.*, 2000). Há relatos de que *Xav* sobrevive no solo, restos de cultura, sementes e hospedeiros alternativos (Schuster & Coyne, 1975; Sikirou & Wydra, 2004; Okechukwu & Ekpo, 2008;). Entretanto, Okechukwu & Ekpo (2008) relataram que *Xav* foi detectada em sementes e restos culturais oito meses após o término da estação de cultivo de feijão-caupi, mas, não foi encontrada no solo, evidenciando que as sementes e os restos de cultura são os principais meios pelo qual *Xav* sobrevive entre cultivos. Segundo Kishun (1989), sementes infectadas por *Xav* podem reduzir a emergência em até 67% e aumentar a mortalidade em até 81%, causando perdas na produção de até 92%, dependendo da cultivar e do estágio de crescimento em que a planta foi infectada. O inóculo presente em sementes e restos de cultura é importante para a iniciação de infecções primárias, enquanto a dispersão da bactéria por meio de respingos da chuva implica em infecções secundárias (Walker & Patel, 1964; Okechukwu & Ekpo, 2008).

Segundo Viana *et al.* (2000), é possível que o patógeno sobreviva em espécies silvestres ou em outras plantas que são comumente plantadas onde se cultiva a cultura principal. Assim, tanto as plantas daninhas quanto as culturas utilizadas em rotação, podem hospedar patógenos que atacam a cultura e com auxílio de insetos vetores, podem ser transmitidas para as plantas hospedeiras, podendo interferir no

desenvolvimento e na produtividade dos grãos (Nascimento *et al.*, 2004; Zandjanakou-Tachin *et al.*, 2007; Silva & Albertino, 2009). Há relatos de que *Xav* sobrevive de forma epifítica em espécies de plantas daninhas como *Euphorbia heterophylla*, *Chamaesyce hirta*, *Digitaria horizontalis*, *Synedrella nodiflora*, *Panicum subalbidum* e *Talinum triangulare*, que servem como reservatório do patógeno, constituindo uma fonte de inóculo para as culturas suscetíveis (Sikirou & Wydra, 2004). Conforme Beattie & Lindow (1999), muitas espécies bacterianas podem estabelecer grandes populações epifíticas, sem causar nenhum efeito aparente na planta. A maioria das espécies de *Xanthomonas* possui a capacidade de sobreviver epifiticamente (Swing & Civerolo, 1993). Em estudo feito por Sikirou & Wydra (2004) testando 12 espécies leguminosas como hospedeiros alternativos de *Xav*, a espécie *Sphenostylis stenocarpa*, que é comumente cultivada em áreas onde se cultiva feijão-caupi na África, apresentou sintomas típicos da mancha-bacteriana do feijão-caupi, sendo considerada como novo hospedeiro alternativo da bactéria. Entretanto, hospedeiros alternativos de *Xav* no Brasil ainda é desconhecida. Dentro do manejo integrado de doenças a eliminação de hospedeiros alternativos do patógeno em áreas produtivas é um dos métodos de controle utilizado (Nechet *et al.*, 2009).

A umidade constitui-se num dos fatores mais importantes que influenciam no desenvolvimento das doenças das plantas, pois a ocorrência de infecção pela maioria dos fungos e bactérias pode ser influenciada pela quantidade e duração da umidade (Silva *et al.*, 2001). Segundo Jones (1986), entre os fatores de ambiente que influenciam as doenças de plantas, a umidade é, geralmente, o mais importante, seguido pela temperatura. A ocorrência de água livre na superfície foliar é indispensável à movimentação e penetração de bactérias fitopatogênicas em seus respectivos hospedeiros, uma vez que estas penetram principalmente por aberturas naturais, como os estômatos (Romeiro, 1995; Beattie & Lindow, 1999). Vários trabalhos demonstraram que a severidade da doença aumenta com a elevação da duração do período de molhamento foliar, confirmando que a água livre, apesar de não ser essencial, favorece o aumento da severidade da doença (Silveira *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2001).

Apesar da importância da mancha-bacteriana do feijão-caupi, pesquisas sobre a epidemiologia desta doença são escassas no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi

conhecer alguns aspectos epidemiológicos relacionados à mancha-bacteriana do feijão-caupi, de forma a se determinar o período de incubação (PI), a severidade da doença, a desfolha e a transmissibilidade da bactéria para as sementes, em função da concentração de inóculo de *Xav* e do período de molhamento foliar, bem como identificar outras espécies de plantas que podem ser utilizadas em testes de reação de hipersensibilidade (HR) para diferenciar *Xav* de outras espécies.

## **2. Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Roraima, utilizando-se as estruturas do laboratório de Fitopatologia, casa-de-vegetação e área experimental, localizado em ecossistema de cerrado, de Latossolo Amarelo, textura arenosa e topografia plana, no município de Boa Vista/RR, no período de março de 2009 a junho de 2011.

### **Obtenção e manutenção do patógeno**

O isolado de *Xav* utilizado nos ensaios pertence à coleção de microrganismos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, previamente identificado e caracterizado como *Xav*. Após a confirmação da pureza e da patogenicidade do isolado, este foi preservado adotando-se os métodos de repicagem tubo a tubo e liofilização (Dewald, 1966; Tuite., 1969; Király *et al.*, 1970), a fim de garantir a manutenção de sua viabilidade no decorrer dos trabalhos.

### **Efeito da concentração de inóculo na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em plantas cultivadas em casa-de-vegetação**

Plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança, suscetível à mancha-bacteriana (Souza *et al.*, 2007), foram cultivadas em vasos plásticos de 5L contendo uma mistura de solo e areia (proporção 2:1) desinfestados previamente com metam-sódico. O isolado de *Xav* foi semeado em placas de Petri contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantido em incubadora tipo BOD durante três dias a 25°C ±2°C. Após este período, as células bacterianas obtidas foram suspensas em água destilada esterilizada e as concentrações de inóculo ajustadas para 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

A inoculação foi realizada por aspersão, com pulverizador costal, em plantas de feijão-caupi no estágio de dois a três trifólios até o ponto de escorrimento e como controle, plantas foram pulverizadas com água esterilizada. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara úmida em casa-de-vegetação, utilizando-se sacos plásticos umedecidos. Após este período, as plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação com temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição um vaso contendo uma planta. A irrigação foi feita duas vezes por dia com sistema de aspersão.

A avaliação do período de incubação (PI), calculado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença foi feita diariamente, após a inoculação. A avaliação da severidade final da doença, baseando-se na porcentagem de área foliar lesionada (Horsfall & Barrat, 1945) com auxílio de escala diagramática, foi feita aos 33 dias após a inoculação. Os dados de PI e severidade final da doença foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Bartlett e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

### **Efeito da concentração de inóculo na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em plantas cultivadas em campo**

O ensaio foi conduzido no período de setembro a dezembro de 2009, sendo feita a incorporação com grade de  $500 \text{ kg.ha}^{-1}$  de superfosfato simples +  $1 \text{ t.ha}^{-1}$  de calcário, 30 dias antes do plantio. Na semeadura, foram adicionados  $250 \text{ kg.ha}^{-1}$  do formulado NPK (04 28 20 + micronutrientes). Sementes de feijão-caupi cv. BRS Bragança foram semeadas nas parcelas contendo cinco linhas de 5 m espaçadas de 0,5 m entre linhas e 0,25m entre plantas. O espaçamento entre parcelas foi de 2,0 m, onde foi plantado milho, como barreira física entre as parcelas. Os tratos culturais foram restritos ao controle de plantas daninhas, com capina manual, nos primeiros 15 dias após a semeadura. O delineamento adotado foi o de blocos casualizados com quatro tratamentos e três repetições. Os tratamentos corresponderam a não inoculação de

plantas e a inoculação com três concentrações de inóculo de *Xav* ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) que foram obtidas seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para o ensaio de casa-de-vegetação. As plantas foram inoculadas no estádio de dois a três trifólios, até o ponto de escorrimento, com pulverizador costal manual. A severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi foi determinada com base num mensuramento combinado da porcentagem de área necrótica e a porcentagem de desfolha. A avaliação visual da porcentagem de área foliar necrótica foi estimada em intervalos semanais em 20 plantas de cada parcela, com auxílio de escala diagramática, totalizando cinco avaliações. No mesmo período, foi avaliada a porcentagem de desfolha, obtida pela contagem do número de folíolos caídos em relação ao total de folíolos da planta. O percentual de desfolha ocorrida em plantas não inoculadas também foi quantificado. A severidade corrigida foi obtida pela integração da doença visível (porcentagem de área necrótica) com a desfolha, utilizando-se a equação sugerida por Aquino *et al.* (1992), com adaptações:

$$Y_t = [(1-d)Y_v] + (d-d')$$

onde  $Y_t$  representa a severidade corrigida,  $Y_v$  é a proporção de doença visível (proporção de área necrótica),  $d$  é a proporção de desfolha ocorrida em plantas inoculadas com o patógeno (desfolha causada pela doença) e  $d'$  é a proporção de desfolha ocorrida em plantas não inoculadas (desfolha causada pela senescência natural da planta). Com os dados da severidade corrigida pela desfolha, obtiveram-se curvas de progresso da doença e calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela expressão: AACPD =  $\left\{ \sum [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i) \right\}$ , onde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e  $t_{i+1} - t_i$  o intervalo entre avaliações (Campbell e Madden, 1990). Análises descritivas para cada tratamento foram feitas com base nos dados das variáveis estudadas. As taxas de progresso da severidade corrigida foram estimadas pelo parâmetro  $b$  da equação de regressão linear simples, tendo a proporção da severidade corrigida diária da doença ( $y$ ) (dados originais) como variável dependente e o tempo em dias após a inoculação ( $x$ ) como variável independente (Campbell & Madden, 1990). As taxas de progresso da doença foram comparadas calculando-se o intervalo de confiança para a diferença entre as taxas médias de cada dois tratamentos, conforme Campbell e Madden (1990).

### **Efeito da concentração de inóculo sobre a transmissibilidade da bactéria para as sementes**

Após a finalização do ensaio de campo, descrito anteriormente, as vagens das plantas foram colhidas para retirada das sementes a fim de se verificar a transmissibilidade da bactéria para as sementes. Amostras de 50 g de sementes de cada tratamento foram colocadas em Erlenmeyers contendo 250 mL de solução estéril de  $\text{MgSO}_4$  (0,01 M) e mantidas a 18 °C por 12 horas sob agitação. Após esse período, foi feita uma filtração em gaze para retenção das sementes e impurezas maiores. A suspensão obtida foi centrifugada a 12000 g por 20 minutos e o pellet resultante ressuspendido em 5 mL de solução estéril de  $\text{MgSO}_4$  (0,01M). Após isso, foram feitas diluições seriadas até o fator  $10^{-5}$  e alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  foram depositadas em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo CCM (Wydra *et al.*, 2004). As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD a 26 °C por 48 h. Após esse período, foi feita a contagem do número de colônias de *Xav* de cada amostra e calculou-se a quantidade de  $\text{UFC.g}^{-1}$  de sementes. Para cada amostra de sementes/tratamento foram realizadas três repetições, sendo cada uma, constituída por uma placa de Petri. Análises descritivas para cada tratamento foram feitas com base nos dados de  $\text{UFC.g}^{-1}$  de sementes detectadas em cada tratamento. Para confirmar a detecção de *Xav* no meio CCM, colônias de bactérias que apresentaram características morfológicas diferentes no meio CCM foram semeadas em placas de Petri contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantidas em incubadora tipo BOD durante três dias a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Após este período, as células bacterianas foram suspensas em água esterilizada e as concentrações de inóculo ajustadas para  $10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . A inoculação foi realizada por aspersão, com pulverizador manual, em plantas de feijão-caupi no estágio de dois trifólios até o ponto de escorrimento.

### **Efeito da duração do período de molhamento foliar na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi**

A condução das plantas de feijão-caupi e o preparo da suspensão de inóculo seguiram os mesmos procedimentos descritos anteriormente no ensaio de casa-de-

vegetação. Plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança no estágio de dois a três trifólios foram inoculadas com uma suspensão de *Xav* na concentração  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> até o ponto de escorrimento. As plantas foram cobertas por saco plástico transparente previamente umedecido, após a inoculação, simulando câmara úmida, de forma a se obter os períodos de molhamento foliar de 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. Durante e após cada período as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura em torno de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Como controle, plantas foram pulverizadas com água destilada esterilizada e submetidas aos mesmos períodos de molhamento foliar. No período em que as plantas foram mantidas em câmara úmida, a irrigação foi efetuada pela deposição de água nos vasos com auxílio de uma mangueira de irrigação, e após a retirada dos plásticos, a irrigação foi feita duas vezes por dia com sistema de aspersão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta. A avaliação do período de incubação (PI), calculado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença foi feita, diariamente, após a inoculação. Avaliações semanais foram feitas para quantificar a severidade e a desfolha causada pela doença, de forma a calcular a severidade corrigida da mancha-bacteriana do feijão-caupi, baseada numa avaliação combinada da porcentagem de área necrótica e a porcentagem de desfolha, seguindo o mesmo procedimento descrito no ensaio de campo. O ensaio foi finalizado aos 30 dias após a inoculação, realizando seis avaliações da severidade da doença e da desfolha. Com os dados de severidade ao longo do tempo corrigido pela desfolha, foram obtidas a AACPD e a taxa de progresso da doença (TPD), que foi estimada pelo parâmetro *b* da equação de regressão linear simples e comparada entre os diferentes PMF com base no intervalo de confiança, conforme citado anteriormente. Os dados de desfolha e severidade corrigida foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Bartlett, sendo então transformados em *log* devido a normalização (Gomez & Gomez, 1984) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Posteriormente, para os dados de PI e AACPD realizou-se a análise de regressão linear e não-linear, a fim de selecionar os modelos com melhores ajustes para

duração do período de molhamento foliar, com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), no quadrado médio do resíduo e na ausência de tendências indesejáveis no gráfico de resíduo.

### **Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* em plantas indicadoras**

Plantas de soja (*Glycine max* L.) cv. BRS Tracajá, feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Pérola e uma espécie de planta daninha conhecida vulgarmente como leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.) foram inoculadas 12 dias após a semeadura, pela atomização com uma suspensão de *Xav*, na concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O procedimento de inoculação foi o mesmo descrito no ensaio de concentração de inóculo, adotando-se o período de molhamento foliar de 24h. O ensaio foi conduzido com 10 repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Como controle negativo as plantas foram pulverizadas com água esterilizada e como controle positivo, plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança foram inoculadas com *Xav*. As avaliações do período de incubação (PI) e da incidência foram realizadas, diariamente, após a inoculação, por um período de até 30 dias.

Teste de reação de hipersensibilidade (HR) também foi realizado para verificar se a bactéria poderia provocar HR nessas espécies. O ensaio foi conduzido com 10 repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. O inóculo utilizado foi preparado conforme descrito anteriormente e a inoculação realizada aos 12 dias após a semeadura. A metodologia adotada para a inoculação das plantas foi a de injeção, introduzindo-se as células bacterianas diretamente no interior do tecido foliar da planta com auxílio de seringa hipodérmica estéril (Romeiro, 2001) e como testemunha, plantas foram infiltradas com água esterilizada. Em plantas de feijão-comum e soja, a infiltração da suspensão de inóculo foi feita tanto nas folhas primárias quanto nas secundárias. Posteriormente, todas as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, realizando-se a avaliação dos sintomas de tecido necrosado 24 horas após a inoculação.

### 3. Resultados

#### **Efeito da concentração de inóculo na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em plantas cultivadas em casa-de-vegetação**

O PI oscilou de sete a oito dias e não diferiu ( $p>0,05$ ) entre as diferentes concentrações de inóculo. Entretanto, houve diferença ( $p\leq 0,05$ ) entre as concentrações de inóculo de  $X_{av}$  na severidade final da doença, sendo esta maior com o incremento da concentração de inóculo, atingindo o valor máximo de 10%, quando as plantas foram inoculadas com suspensão de  $X_{av}$  na concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 1 - A).

#### **Efeito da concentração de inóculo na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em plantas cultivadas em campo**

A severidade final da doença aos 35 d.a.i, referentes as concentrações de inóculo de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi de 4,02, 4,16 e 5,20%, respectivamente, verificando-se uma tendência de incremento da severidade com aumento da concentração de inóculo (Figura 1 - B).

As curvas de progresso da severidade da mancha-bacteriana, da desfolha e da severidade corrigida pela desfolha, em plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança encontram-se representadas na Figura 2. Em plantas inoculadas com  $X_{av}$ , a desfolha se tornou evidente a partir de 14 dias após a inoculação (d.a.i), havendo um índice máximo de desfolha de 2,44 e 2,88% referentes às concentrações de inóculo  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, aos 28 d.a.i, enquanto que para a concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o máximo de desfolha (1,63%) só foi obtido aos 35 d.a.i. Nas plantas não inoculadas a desfolha só começou a ocorrer a partir dos 28 d.a.i, chegando a um índice máximo de 0,65%. Entretanto, houve um declínio da desfolha em plantas inoculadas com concentração de inóculo de  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> a partir de 28 d.a.i, enquanto que em plantas inoculadas com  $X_{av}$  na concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> verificou-se que houve continuidade da desfolha, seguindo o mesmo padrão das plantas não inoculadas no período de 28 à 35 d.a.i (Figura 2B). Comparando-se os dados de desfolha ocorrida aos 28 d.a.i, antes da senescência natural (Figura 2B), verificou-se uma tendência de aumento da desfolha conforme o incremento da concentração de inóculo.

Os valores iniciais ( $y_0$ ) da severidade corrigida pela desfolha praticamente não apresentaram variação entre as diferentes concentrações de inóculo, porém, a partir de 21 d.a.i, houve uma variação dos valores de severidade, sendo estes maiores conforme o aumento da concentração de inóculo (Figura 2C). As taxas de progresso da doença (TPD) referentes às concentrações de inóculo  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram de 0,199, 0,205 e 0,245 unidades de infecção/dia, respectivamente. Pela análise do intervalo de confiança, os valores de TPD para severidade corrigida da mancha-bacteriana do feijão-caupi referentes às diferentes concentrações de inóculo, foram diferentes ( $p \leq 0,05$ ), havendo um incremento da TPD da doença com o aumento da concentração de inóculo. A média de cinco avaliações da severidade da mancha-bacteriana para as concentrações de inóculo de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram de 0,67, 0,67 e 0,83%, respectivamente, quando se considerou a severidade como a porcentagem de área necrótica na planta toda. Porém, quando utilizou-se a severidade corrigida, os valores foram de 2,12, 2,12 e 2,45% para  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3A). O valor da AACPD para as concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi de 27,98, atingindo valor máximo de 31,53 na concentração  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 3B).

#### **Efeito da concentração de inóculo sobre a transmissibilidade da bactéria para as sementes**

A extração seguida do semeio no meio semi-seletivo CCM permitiu detectar e quantificar, com segurança,  $X_{av}$  em sementes de feijão-caupi inoculadas com a bactéria independente da concentração de inóculo utilizada. Entretanto,  $X_{av}$  não foi detectada nas amostras de sementes provenientes de plantas não inoculadas. A quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectada em sementes provenientes de plantas inoculadas com  $X_{av}$  foi de 133, 127 e 153, referentes as concentração de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4).

#### **Efeito da duração do período de molhamento foliar na severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi**

Não houve desfolha e nem sintomas da mancha-bacteriana em plantas não inoculadas com  $X_{av}$  durante o período de avaliação. Entretanto, houve diferença

( $p \leq 0,05$ ) na desfolha (Figura 5A) e na severidade corrigida da doença (Figura 5B) entre as plantas submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar (PMF) após a inoculação com *Xav*. Os valores de desfolha (%) e severidade corrigida (%) referentes a 4 e 8 h de PMF não diferiram ( $p > 0,05$ ) do tratamento sem PMF (0h). Entretanto, os PMF acima de 12h diferiram ( $p \leq 0,05$ ) do tratamento sem PMF (0h). Não houve diferença significativa da severidade corrigida entre períodos de 12, 16, 20 e 24 h de molhamento foliar. Dos modelos matemáticos testados, o que proporcionou melhor ajuste para duração do período de molhamento foliar (PMF) foi o exponencial negativo para PI (Figura 6A) e o linear para AACPD (Figura 6B). O PI da doença variou de 4,0 a 5,4 dias, sendo maior nas plantas sem molhamento foliar 24h após a inoculação (0h de PMF). Nos períodos de 4 a 20 h, o PI manteve-se praticamente constante (4,2 dias) sendo o menor valor (4,0 dias) verificado nas plantas submetidas a molhamento foliar 24 h após inoculação. Na ausência de molhamento foliar (0h de PMF), verificaram-se sintomas da mancha-bacteriana com valores de AACPD de 216,45, que foi o menor valor, sendo o maior valor (573,86), obtido com 24h de PMF, havendo incremento da AACPD com o aumento da duração do PMF. Entre os PMF aos quais as plantas foram submetidas após a inoculação, o de 20 e 24h, foram os que apresentaram os maiores valores de TPD, e o tratamento de 0h de PMF, apresentou o menor valor. Houve aumento da TPD com o incremento do período de molhamento foliar até 20h. Os PMF de 20 e 24h não apresentaram diferença significativa quando se comparou o valor da TPD (Tabelas 1 e 2).

Algumas plantas com PMF acima de 12h apresentaram sintomas de cancro na haste, sendo estes mais severos em plantas com PMF acima de 20h (Figura 7).

### **Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* em plantas indicadoras**

Não se observou sintomas típicos da mancha-bacteriana em plantas de soja, feijão-comum e leiteira, inoculados com *Xav* por aspersão, no período de 30 dias após a inoculação (Figuras 8A e 8C). Entretanto, todas as plantas de feijão-comum inoculadas por aspersão apresentaram pequenas manchas acinzentadas distribuídas sob o limbo foliar, dois dias após a inoculação (d.a.i), que aos quatro dias apresentaram o centro necrosado. Contudo, não houve expansão do tamanho da lesão aos 30 d.a.i,

demonstrando que plantas de feijão-comum apresentaram reação de HR, sendo assim, resistentes à *Xav* (Figura 8B). Plantas de feijão-caupi do controle positivo apresentaram sintomas da doença a partir do 4º dia após a inoculação (Figura 8D).

No teste de HR, o isolado de *Xav* induziu, em menos de 24 horas, lesões necróticas, escuras, típicas da reação de hipersensibilidade, em folhas de leiteira (Figuras 9C). Já em plantas de soja e feijão-comum, houve um amarelecimento do tecido no local onde a bactéria foi infiltrada 24 horas após a inoculação, sendo observado, três d.a.i, escurecimento do tecido, similar a necrose, em plantas de soja, e ressecamento do tecido, que se tornou translucido em plantas de feijão-comum.

#### **4. Discussão**

Todas as concentrações de inóculo foram suficientes para promover infecção tanto em campo quanto em casa-de-vegetação. Isto indica, provavelmente, a elevada viabilidade das células de *Xav* e que as condições ambientais foram favoráveis à infecção. Pelos dados obtidos, considera-se que a concentração de inóculo de  $10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup> é a mais indicada para inoculação de plantas de feijão-caupi visando estudos epidemiológicos. Esta concentração também foi indicada por Gitaitis (1983) como a mais propícia para selecionar cultivares resistentes à *Xav*. O aumento da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em função da concentração de inóculo, observada no presente trabalho, também foi verificado por Silveira *et al.* (2003) no patossistema *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* x *Cucumis melo*. A severidade da mancha-bacteriana foi maior em casa-de-vegetação do que em campo. Esses resultados são corroborados por relatos anteriores de que algumas cultivares de feijão-caupi com moderada suscetibilidade em campo, apresentaram-se altamente suscetíveis em casa-de-vegetação devido ao alto nível de inóculo, à distribuição do inóculo e ao limitado escape da doença neste ambiente (Okechukwu & Ekpo, 2004). Observou-se que em campo, houve uma pequena diferença nos valores de severidade aos 35 d.a.i entre as diferentes concentrações de inóculo. Isto, provavelmente, foi consequência da desfolha causada pela senescência natural da planta, ocorrida entre o período de 28 a 35 d.a.i. Assim, deve-se considerar como desfolha causada pela doença, aquela que ocorreu até 28 d.a.i. A cultivar BRS Bragança inoculada com *Xav* apresentou maior desfolha quando

comparada a plantas que não foram inoculadas. Com isso, é possível detectar diferenças na severidade corrigida pela desfolha causada pela doença em plantas inoculadas sob diferentes concentrações de inóculo de *Xav*, indicando que a severidade da doença aumenta com o incremento da concentração de inóculo, o que confirma o resultado observado em casa-de-vegetação. Segundo Kushalappa & Ludwig (1982), a proporção da doença pode diminuir devido à remoção de folhas com sintomas da doença e também pode aumentar devido à queda de folhas não infectadas. Apesar de a desfolha ser difícil de ser mensurada, especialmente devido ao hábito de crescimento indeterminado de alguns hospedeiros, acredita-se que se ela for quantificada, a relação entre doença e produção pode ser encontrada (Bergamin Filho *et al.*, 1997; Jesus Junior *et al.* 2001; Bassanezi *et al.* 2001). Diante disto, a avaliação da desfolha combinada com a avaliação da severidade se torna uma ferramenta a mais na determinação exata da severidade total da doença conforme sugerido por Aquino *et al.* (1992).

Todas as três concentrações de inóculo de *Xav* testadas permitiram detectar a bactéria em sementes utilizando o meio semi-seletivo CCM, o que demonstra que independente da concentração de inóculo de *Xav* com a qual a planta foi inoculada, a bactéria foi transmitida para as sementes. Resultado similar foi relatado por Schuster & Coyne (1975) que também isolaram a bactéria de sementes de feijão-caupi na Colômbia. A detecção de *Xav* utilizando o meio semi-seletivo CCM no presente trabalho comprova a viabilidade deste meio em testes de diagnose, conforme sugerido por Wydra *et al.* (2004). Segundo Okechukwu & Ekpo (2008), *Xav* pôde ser detectada em sementes oito meses após a colheita. Estes autores também relataram que quando sementes infectadas por *Xav* foram plantadas, a germinação epígea favoreceu a transmissão do patógeno para a parte aérea da planta, fazendo com que 30% das plântulas fossem infectadas. Em outro estudo realizado por Okechukwu *et al.* (2010), a transmissibilidade de *Xav* para as sementes colhidas de plantas infectadas chegou a causar 24% de mortalidade das plântulas após a emergência e até 49% de incidência da doença nas plantas. Assim, as sementes infectadas por *Xav* são importantes para a iniciação de infecções primárias, devendo-se evitar seu plantio em áreas livres do patógeno, ou adotar medidas que vise eliminar ou reduzir o patógeno das sementes.

O fato de não haver diferença significativa da severidade corrigida em plantas submetidas aos períodos de molhamento foliar de 12 a 24 h após a inoculação, indica que um período de molhamento foliar de 12h pode ser suficiente para avaliar resistência à mancha-bacteriana do feijão-caupi. O desenvolvimento de cancro na haste de plantas de feijão-caupi em plantas inoculadas com *Xav* no presente trabalho confirma a natureza sistêmica da bactéria, conforme relatado por Okechukwu & Ekpo (2004). A ocorrência de sintomas da doença mesmo na ausência de molhamento foliar 24h após a inoculação indica que a infecção pode ocorrer em plantas de feijão-caupi. Esses resultados são corroboradas pelo relato de Silveira *et al.* (2003), que verificaram que após a chegada de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* na superfície foliar de plantas de meloeiro, na ausência de molhamento foliar, a população bacteriana iniciou a infecção, com lesões incipientes e pouco visíveis, distribuídas no limbo foliar, mas que com a elevação da umidade, a infecção tornou-se generalizada e as lesões progrediram, coalescendo e formando grandes áreas necrosadas. Hirano & Upper (1983) relataram que o molhamento foliar é fundamental para a ocorrência de doenças bacterianas em plantas. Portanto, a ocorrência de uma baixa severidade da doença em plantas que não foram mantidas sob molhamento foliar após a inoculação, indica que a presença da lâmina de água favorece a infecção de *Xav* em plantas de feijão-caupi. Diversos trabalhos demonstram que períodos mais longos de molhamento foliar favorecem o aumento da severidade da doença (Vale *et al.*, 1990; Zerh *et al.*, 1996; Godoy *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2003; Pria *et al.*, 2006). O aumento da desfolha, da TPD e da AACPD, com a elevação da duração do período de molhamento foliar, demonstra que a água livre é um fator que favorece o aumento da severidade da doença. A dispersão secundária de patógenos pode ocorrer, a partir de folhas infectadas, pela chuva ou irrigação por aspersão. Porém, sem molhamento foliar após a chegada do patógeno na planta, a infecção é retardada, aumentando o tempo para o patógeno causar lesões (sítios de infecção), o que conseqüentemente, aumenta o tempo para que este seja dispersado (O'Brien & Martin, 1999).

Muitas espécies de *Xanthomonas* apresentam características morfológicas e fisiológicas muito similares, que podem ser diferenciadas somente pela gama de hospedeiros (Rudolph, 1993). Plantas de soja, feijão-comum e leiteira não são

hospedeiras alternativas de *Xav*, pois não manifestaram sintomas da doença. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) e *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) tem como hospedeiro o feijão-comum e a soja, respectivamente (OEPP/EPPO, 1990). Assim, a inoculação de *Xav* em plantas de feijão-comum e soja auxilia em testes de diagnose, devendo tais plantas ser utilizadas como plantas indicadoras para diferenciar *Xav* de *Xap* e *Xag*.

Os sintomas atípicos de pequenas manchas observados em plantas de feijão-comum foram similares aos observados por Sikirou & Wydra (2004) em *Vigna angularis* e *Lablab purpureus* quando inoculadas com *Xav*. Patel (1981) relatou que plantas de feijão-caupi não apresentaram qualquer sintoma de doença quando inoculadas com outras bactérias fitopatogênicas, o que confirma a infecção por *Xav* apenas em plantas de feijão-caupi, observada no presente trabalho. A planta daninha leiteira (*E. heterophylla*) não foi suscetível à *Xav*. Entretanto, Sikirou & Wydra (2004) relataram que a bactéria sobrevive como epífita por até 30 dias em *E. heterophylla* em campo e em casa-de-vegetação, após a inoculação por aspersão e/ou infiltração nas folhas, sem provocar sintomas da doença.

É evidente a importância do estudo dos hospedeiros alternativos de *Xav*, ou de plantas que permitam a sobrevivência da bactéria de forma epifítica, pois a sobrevivência do patógeno na entressafra pode estar relacionada a estes fatores. Este conhecimento evitará rotações de culturas ineficientes e enfatizará o cuidado com a eliminação de plantas invasoras e/ou voluntárias, impedindo que tais plantas sejam uma fonte de inóculo primário para a próxima estação de cultivo da cultura hospedeira (Nascimento *et al.*, 2004; Sikirou & Wydra, 2004). Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, plantas de soja e feijão-comum podem ser utilizadas em rotação de culturas ou em cultivo consorciado com o feijão-caupi.

A resposta da planta a bactérias fitopatogênicas incompatíveis tem sido relatada como uma reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pelo súbito e rápido colapso do tecido, dentro de 6-24h após a inoculação (Klement, 1963; Klement *et al.*, 1964). No teste de HR, entre as espécies testadas, *E. heterophylla* foi a que apresentou o resultado mais rápido, pois respondeu de maneira hipersensível em menos de 24 horas após a inoculação. A reação de HR observada em plantas de soja, quando a bactéria foi

infiltrada diretamente no interior do tecido foliar com auxílio de seringa hipodérmica, também foi observada por Sikirou & Wydra (2004). Porém, a HR observada em plantas de soja e feijão-comum três dias após a inoculação é considerada uma reação atípica de defesa da planta, pois conforme Gitaitis (1983), apesar da HR ser descrita como uma morte prematura do tecido infectado, esta pode ocorrer como uma resposta de resistência da planta ao patógeno não envolvendo um súbito colapso seguido de morte prematura do tecido, sendo tais reações atípicas de HR consideradas como tipos de resistência específica, caracterizada pelo efeito bacteriostático e localização do patógeno sem a rápida morte prematura dos tecidos. Assim, plantas de soja e feijão-comum podem fazer parte da gama de plantas indicadoras em testes de HR, porém o resultado esperado ao infiltrar *Xav* em tais plantas demorará mais tempo do que o obtido em *E. heterophylla*. A habilidade de bactérias fitopatogênicas em induzir HR em plantas não-hospedeiras é uma ferramenta útil para se testar de maneira rápida a patogenicidade de isolados bacterianos (Gitaitis, 1990; Umesha, 2006). Desta forma, a utilização de plantas de soja, feijão-comum e leiteira em testes de HR é uma ferramenta a mais na detecção de *Xav*, sendo isto particularmente útil na diferenciação de *Xav* de outras bactérias saprófitas que apresentam morfologia semelhante nos meios semi-seletivos, quando da detecção deste patógeno em sementes ou em outros materiais para plantio, com a vantagem de ser um teste cuja resposta é rápida (Wydra *et al.*, 2004).

## 5. Referências

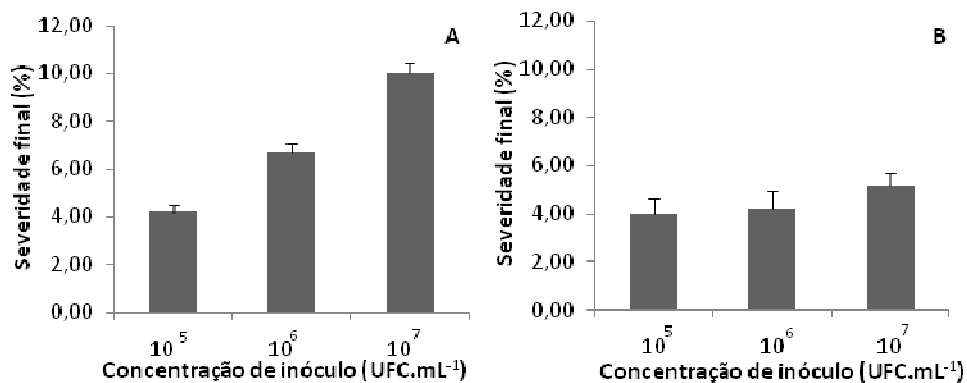
- AQUINO, V. M., SHOKES, F. M., BERGER, R. D., GORBET, D. W., KUCHARÉK, T. A. Relationships among late leafspot, healthy leaf area duration, canopy reflectance, and pod yield of peanut. **Phytopathology**, v.82, p.546-552, 1992.
- BASSANEZI, R.B., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., HAU, B., BERGER, R.D. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathology**, v.50, p.443-452, 2001.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, n.5, p.353-359, 1999.
- BERGAMIN FILHO, A., CARNEIRO, S. M. T. P., GODOY, C. V., AMORIM, L., BERGER, R. D., HAU, B. Angular leaf spot of *Phaseolus* beans: relationships between disease, healthy leaf area, and yield. **Phytopathology**, v.87, p.506-515, 1997.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. 1990. Crop loss assessment and modeling. In: Campbell, C.L. & Madden L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York, John Wiley & Sons, Cap. 14, p. 393-422.
- DEWALD, R.R. Preservation of *Serratia marcescens* by high-vacuum lyophilization. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p.561-567, 1966.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.) **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.
- GITAITIS, R.D. Induction of a hypersensitive like reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant Disease**. v.74, 58-60, 1990.
- GITAITIS, R.D. Two resistant responses in cowpea induced by different strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **Plant Disease**, v.67, n.9, p.1025-1028, 1983.
- GODOY, C.V., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. Influência da duração do período do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.160-165, 1999.

- GOMEZ, K.A. & GOMEZ, A.A. 1984, Statistical procedures for agricultural research. Second edition. **International Rice Research Institute book**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Great Britain. 680p.
- HIRANO, S.S. & UPPER, C.D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.21, p.243-270, 1983.
- HORSFALL, J.G. & BARRAT, R.W. An improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology**, v.80, n.4, p.655, 1945.
- JESUS JUNIOR, W. C., VALE, F. X. R., MARTINEZ, C. A., COELHO, R. R., COSTA, L. C., HAU, B., ZAMBOLIM, L. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Photosynthetica**, v. 39, n. 4, p. 603-606, 2001.
- JONES, A.L. Role of the wet weather in predicting foliar diseases. In: LEONARD, K.J. & FRY, W.E. (Eds.). **Plant Disease Epidemiology: Population Dynamics and Management**. New York. Macmillan Publishing Co. 1986. p.87-100.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KHATRI-CHHETRI, G.B., WYDRA, K., RUDOLPH, K. Metabolic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agent of cowpea bacterial blight and pustule. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.851-860, 2003.
- KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOŠKY, E., VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.
- KISHUN, R. Appraisal of loss in yield of cowpea due to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **Indian Phytopathology**, v. 42, p. 241-246, 1989.
- KLEMENT, Z. Methods for the rapid detection of the pathogenicity of phytopatogenic pseudomonas. **Nature**, v.199, p.299-300, 1963.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G.L., LOVREKOVICH, L. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. **Phytopathology**, v.54, p.474-477, 1964.
- KUSHALAPPA, A.C & LUDWIG, A. Calculation of apparent infection rate in plant diseases: Development of a method to correct for host growth. **Phytopathology**, v.72, n.10, p.1373-1377, 1982.

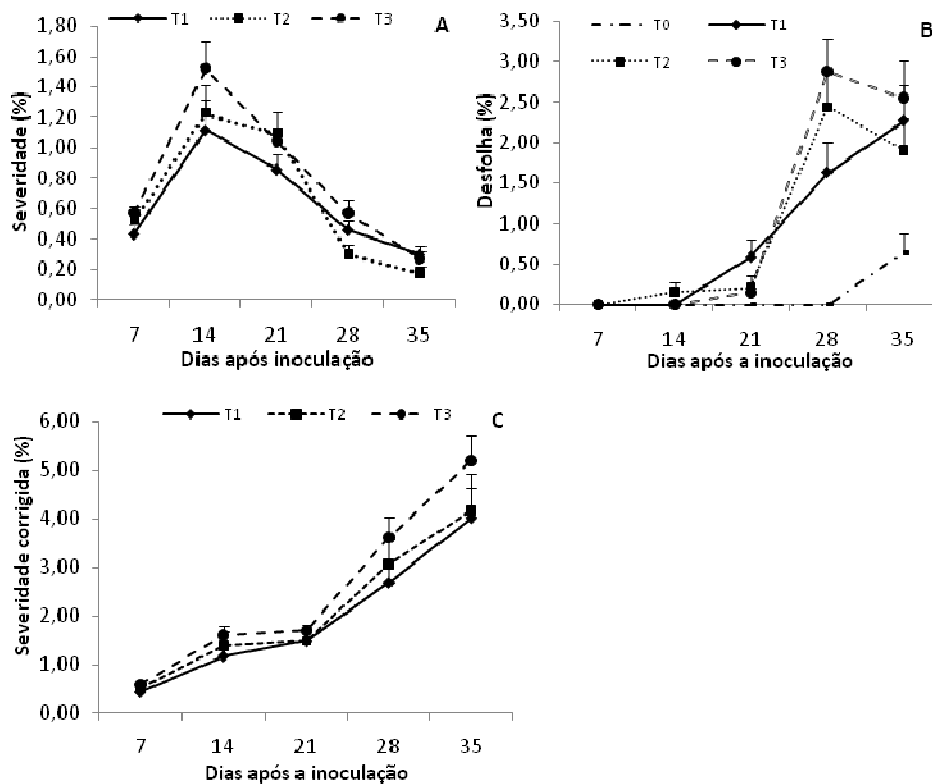
- NASCIMENTO, A.R.P., MARIANO, R.L.R., SILVA, E.I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, v.22, n. 3, p.511-515, 2004.
- NECHET, K.L., HALFELD-VIEIRA, B.A., BOARI, A.J., NASCIMENTO, J.F. Doenças. In: ZILLI, J.E., VILARINHO, A.A., ALVES, J.M.A (Eds.). In: ZILLI, J. E., VILARINHO, A.A., ALVES, J.M.A. (Org.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. 1ed. BoaVista: Embrapa Roraima, 2009. v. 1, p. 245-270.
- O'BRIEN, R.G. & MARTIN, A.L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.39, p.479-485, 1999.
- OKECHUKWU, R.U., EKPO, E.J.A., OKECHUKWU, O.C. Seed to plant transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* isolates in cowpea. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.6, p.431-435, 2010.
- OKECHUKWU, R.U. & EKPO, E.J.A. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in infested soil, cowpea seed and cowpea debris. **Tropical Agricultural Research Extension**, v.11, p.45-48, 2008.
- OKECHUKWU, R.U. & EKPO, E.J.A. Sources of resistance to cowpea bacterial blight disease in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.345-351, 2004.
- OEPP/EPPO (1990) Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. Roth, D. (1985) Detection of *Xanthomonas phaseoli*. Second International Workshop on Seed Bacteriology, Copenhagen, Denmark. Danish Government Institute for Seed Pathology in Developing Countries, Copenhagen, Denmark.
- PATEL, P.N. Pathogen variability and host resistance in bacterial pustule disease of cowpea in Africa. **Tropical Agric**, n.58, p.275-280, 1981.
- PRIA, M.D., CHRISTIANO, R.C.S., FURTADO, E.L., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. Effects of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathology*, v.55, p.657-663, 2006.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.
- ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa: Editora UFV, 1995. 283p.

- RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G & CIVEROLO, E.L. (Eds.). *Xanthomonas*. Chapman and Hall, London. 1993. p.193-264.
- SANTOS, A.A., BARRETO, P.D., QUINDERÉ, M.A.W. Identificação de fontes de resistência à *Xanthomonas vignicola*, agente causal da mancha-bacteriana do caupi. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical/Embrapa Meio-Norte**, n.28, Boletim de Pesquisa, 2000. 12p.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Genetic variation in bean bacterial pathogens. **Euphytica**, v.24, p.143-147, 1975.
- SIKIROU, R., WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis stenocarpa* as a potential new host. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 939-947, 2004.
- SILVA, S.R., RIOS, G.P., SILVA, S.C. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.726-731, 2001.
- SILVA, J.F. & ALBERTINO, S.M.F. Manejo de plantas daninhas. In: ZILLI, J.E., VILARINHO, A.A., ALVES, J.M.A (Eds.). **Embrapa**: A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima. 2009. 356p.
- SILVEIRA, E.B., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Severidade da Mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.171-175, 2003.
- SOUZA, G.R., HALFELD-VIEIRA, B.A., NECHET, K.L. Resistência de genótipos de feijão-caupi à *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá-PR. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras-MG: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.32, suplemento p. S115, 2007.
- SWING, J. G. & CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. 399p.
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.
- UMESHA, S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Crop Protection**, v.25, p.375-381, 2006.

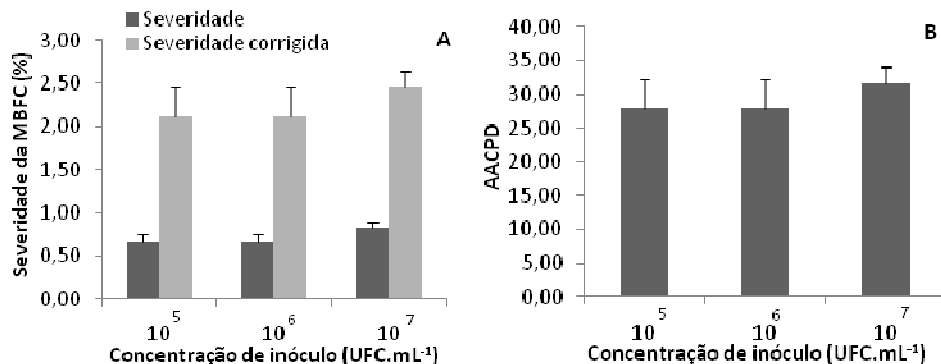
- VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito do binômio temperaturaduração do molhamento foliar sobre a infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília DF, v.15, n.3, p. 200-202, 1990.
- VIANA, F.M.P., SANTOS, A.A., CARDOSO, J.E., FREIRE, F.C.O., LOPES, C.A. Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte: recomendações preliminares de controle. Fortaleza:EMBRAPA Agroindústria Topical, 2000. (Comunicado técnico, 50)
- ZANDJANAKOU-TACHIN, M., FANOUE, A., LE GALL, P., WYDRA, K. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *X. axonopodis* pv. *vignicola* causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology**, v.155, p. 159-169, 2007.
- ZEHR, E., SHEPARD, D.P., BRIDGES, W.C. Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf, wetness duration, and temperature. **Plant Disease**, v.80, p.339-341, 1996.
- WALKER, J.C. & PATEL, P.N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight of bean. **Phytopathology**, v. 54, p. 140-141, 1964.
- WYDRA, K., KHATRI-CHHETRI, G., MAVRIDIS, A., SIKIROU, R. A diagnostic medium for semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 991-1001, 2004.



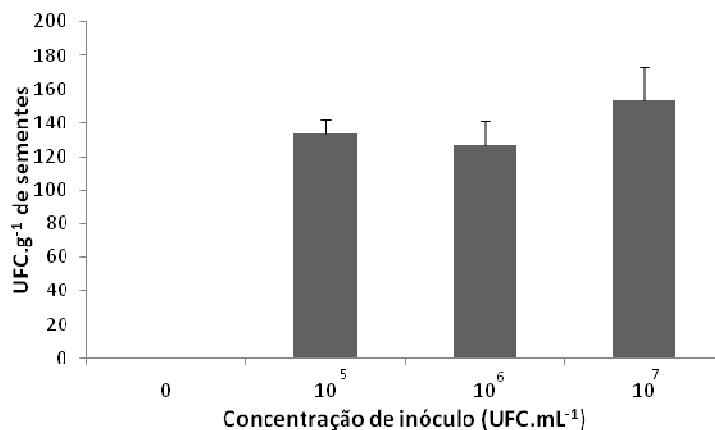
**Figura 1.** Média da severidade final da mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio de 2 a 3 trifólios com diferentes concentrações de inóculo ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>), em casa-de-vegetação, aos 33 dias após a inoculação (A) e em campo, aos 35 dias após a inoculação (B). Colunas representam a média de 10 repetições (A) e a média de três repetições (B). Barras em cada coluna representam o erro padrão da média.



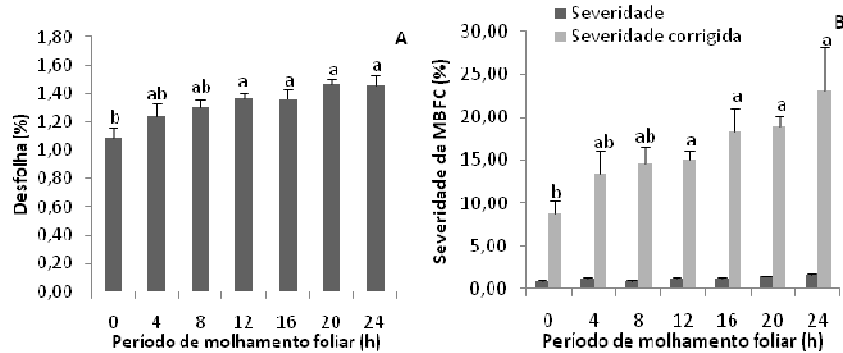
**Figura 2.** Progresso da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi (A), progresso de desfolha (B) e progresso da severidade corrigida (C) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio de 2 a 3 trifólios com concentrações de inóculo de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> (T1),  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (T2) e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (T3), em campo. T0 - representa as plantas não inoculadas. Cada ponto representa a média de três blocos e barras em cada ponto representam o erro padrão da média.



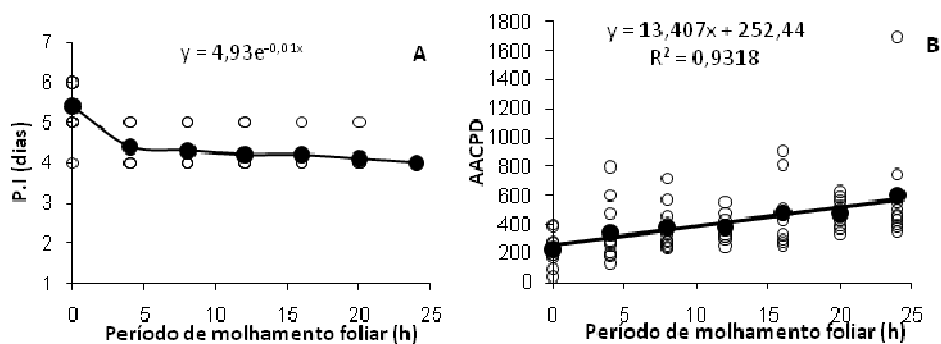
**Figura 3.** Média de cinco avaliações da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi – MBFC (Severidade), da severidade corrigida pela percentagem de desfolha (Severidade corrigida) (A) e da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença - AACPD (B) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola no estágio de 2 a 3 trifólios com diferentes concentrações de inóculo (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), em campo. Colunas representam a média de três blocos e barras em cada coluna representam o erro padrão da média.



**Figura 4.** Quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC.g<sup>-1</sup> de sementes) detectadas em sementes de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola no estágio de 2 a 3 trifólios, com diferentes concentrações de inóculo (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), em campo. 0 - representa as plantas não inoculadas. Colunas representam a média de três repetições e barras em cada coluna representam o erro padrão da média.



**Figura 5.** Média de seis avaliações da desfolha (A), da severidade da doença e da severidade corrigida (B) da mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, com concentração de inóculo de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, no estágio de 2 a 3 trifólios, em condições de casa-de-vegetação, submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar após a inoculação. Cada coluna representa a média de 10 plantas e barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pretas (desfolha) e nas colunas cinza (severidade corrigida), não são significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 6.** Período de incubação - PI (A) e Área abaixo da curva de progresso da mancha-bacteriana - AACPD (B) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio de 2 a 3 trifólios, em condições de casa-de-vegetação e submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar. Pontos pretos representam a média de 10 repetições e pontos brancos representam as repetições.

**Tabela 1.** Taxas médias de progresso (TPD) da mancha-bacteriana do feijão-caupi e erros padrões em diferentes períodos de molhamento foliar (PMF).

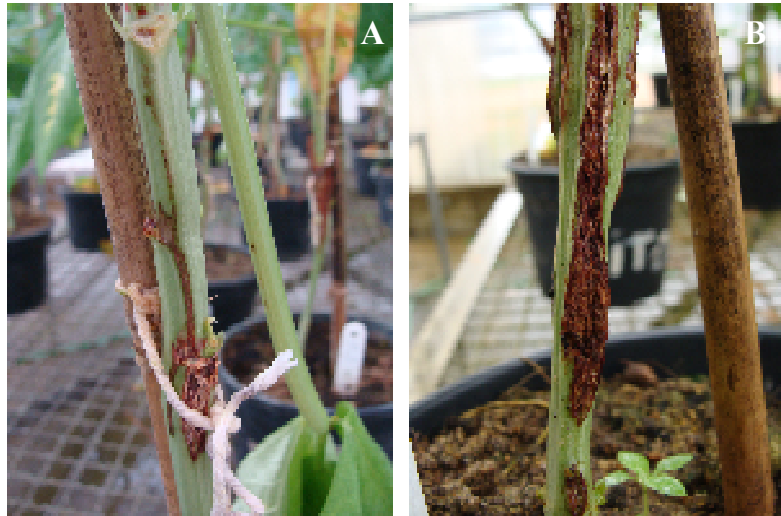
PMF <sup>1</sup>	Taxa (unidades/dia)	Erro padrão
0	0,0039	0,0005
4	0,0059	0,0011
8	0,0063	0,0013
12	0,0078	0,0008
16	0,0084	0,0019
20	0,0112	0,0008
24	0,0112	0,0019

<sup>1</sup>0) Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança, inoculadas com *X. axonopodis* pv. *vignicola*, com concentração de inóculo de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, no estágio de 2 a 3 trifólios, em condições de casa-de-vegetação, submetidas a 0h de PMF após a inoculação; 4) plantas submetidas a 4h de PMF após a inoculação; 8) plantas submetidas a 8h de PMF após a inoculação; 12) plantas submetidas a 12h de PMF após a inoculação; 16) plantas submetidas a 16h de PMF após a inoculação; 20) plantas submetidas a 20 de PMF após a inoculação e 24) plantas submetidas a 24h de PMF após a inoculação.

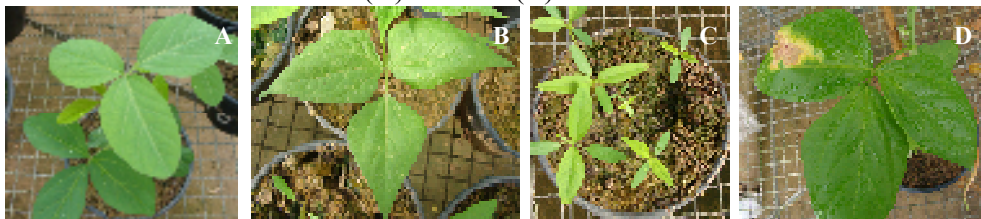
**Tabela 2.** Comparação dos períodos de molhamento foliar (PMF) através do cálculo dos intervalos de confiança para a diferença das taxas médias de progresso (TPD) da mancha-bacteriana do feijão-caupi (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*).

PMF <sup>1</sup>	0	4	8	12	16	20	24
0	-						
4	0,0020*	-					
8	0,0024*	0,0004*	-				
12	0,0039*	0,0019*	0,0015*	-			
16	0,0045*	0,0025*	0,0021*	0,0006*	-		
20	0,0073*	0,0053*	0,0049*	0,0034*	0,0028*	-	
24	0,0073*	0,0053*	0,0049*	0,0034*	0,0028*	0,0000 <sup>ns</sup>	-

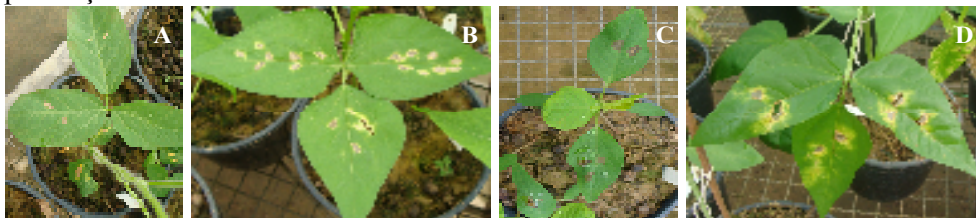
<sup>1</sup>0) Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança, inoculadas com *X. axonopodis* pv. *vignicola*, com concentração de inóculo de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, no estágio de 2 a 3 trifólios, em condições de casa-de-vegetação, submetidas a 0h de PMF após a inoculação; 4) plantas submetidas a 4h de PMF após a inoculação; 8) plantas submetidas a 8h de PMF após a inoculação; 12) plantas submetidas a 12h de PMF após a inoculação; 16) plantas submetidas a 16h de PMF após a inoculação; 20) plantas submetidas a 20 de PMF após a inoculação e 24) plantas submetidas a 24h de PMF após a inoculação; ns – Diferença não significativa de acordo com intervalo de confiança a 95% de probabilidade.\* - Diferença significativa de acordo com intervalo de confiança a 95% de probabilidade.



**Figura 7.** Plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança inoculadas pelo método de aspersão com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, com concentração de inóculo de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, no estágio de 2 a 3 trifólios, em condições de casa-de-vegetação, submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar (PMF) após a inoculação. Sintomas de cancro na haste em plantas submetidas à 12h (A) e a 24 h (B) de PMF.



**Figura 8.** Plantas inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* pelo método de aspersão. A. Folhas de soja - ausência de sintomas da mancha-bacteriana; B. Folha de feijão-comum – reações de hipersensibilidade; C. Folha de leiteira - ausência de sintomas da mancha-bacteriana; D. Folha de feijão-caupi - presença de sintomas da mancha-bacteriana.



**Figura 9.** Plantas onde células bacterianas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* foram introduzidas diretamente no interior do tecido foliar com auxílio de seringa hipodérmica estéril, para indução da reação de hipersensibilidade (HR). A. Folha de soja - HR positiva; B. Folha de feijão-comum - HR positiva; C. Folha de leiteira - HR positiva; D. Folha de feijão-caupi – Controle positivo - presença de sintomas da mancha-bacteriana.

### **CAPÍTULO 3**

#### **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DO FEIJÃO- CAUPI NA INFECCÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola***

## **Influência de diferentes estádios fenológicos do feijão-caupi na infecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola***

### **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da infecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (*Xav*) em plantas de feijão-caupi inoculadas em diferentes estádios fenológicos em casa-de-vegetação e campo sobre os componentes de produção e transmissibilidade da bactéria para sementes, bem como determinar o progresso da doença. Plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança em quatro estádios fenológicos (com folhas primárias - EFP; com 2 a 3 trifólios - ET; em florescimento - EF e em formação de vagens - EV) foram inoculadas com *Xav* na concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A doença causou desfolha independente do estágio fenológico. Houve diferença na área abaixo da curva de progresso relativa da doença (AACPRD) entre os estádios fenológicos e redução de alguns componentes de produção, principalmente o de massa de grãos secos (MGS). Foi possível isolar *Xav* em sementes de plantas infectadas, independente do estágio fenológico, utilizando o meio semi-seletivo CCM, sendo os maiores valores de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectados em amostras provenientes de plantas inoculadas no EV e no ET. Em campo, realizou-se dois experimentos em estações seguidas de cultivo, com as cultivares BRS Vita-7 e BRS Bragança, não inoculadas (NI), inoculadas com *Xav* no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET) e inoculadas no estágio de florescimento (IEF). A severidade foi maior no segundo experimento nas duas cultivares testadas. A doença foi mais severa na cultivar BRS Bragança, sendo AACPRD maior em plantas IET. Houve redução da MGS em BRS Bragança IET e IEF, quando comparadas com plantas NI, nas duas estações de cultivo. *Xav* foi detectada em sementes provenientes de plantas das cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7, independente do estágio fenológico em que a planta foi inoculada com *Xav*, sendo a maior quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectada em amostras provenientes de plantas BRS Bragança IET.

**Palavras-chaves:** *Vigna unguiculata*, mancha-bacteriana, dano, transmissibilidade.

## 1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura de grande importância econômica em alguns países da África, por ser a principal fonte de proteína para a população de baixa renda (Verdier *et al.*, 1998). No Brasil, é a leguminosa alimentar mais importante das regiões Norte e Nordeste (Freire Filho *et al.*, 2005). A cultura é adaptada às mais diversas condições de clima e solo, sendo cultivada em aproximadamente sete milhões de hectares distribuídos na África, Ásia e Américas (Ehlers & Hall, 1997). A mancha-bacteriana do feijão-caupi, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye, é uma das principais doenças do feijão-caupi onde se cultiva a cultura (Khatri-Chhetri, 2003; Kishun, 1989). Os sintomas são observados primeiramente pela formação de manchas foliares, pustiliformes, necróticas, angulares com centro amarronzado, envolvido frequentemente por um halo amarelado, de tecido encharcado de aspecto úmido (Moretti *et al.*, 2007; Freire Filho *et al.*, 2005). Em certas condições, o patógeno pode invadir o caule, onde surgem cancos bem característicos (fissuras longitudinais). Nas vagens, são observadas manchas irregulares de aspecto úmido, por onde o patógeno infecta as sementes (Freire Filho *et al.*, 2005). A queda prematura de folhas tem sido observada em plantas infectadas naturalmente em campos de cultivo no estado de Roraima (dados não publicados). No Ceará, a mancha-bacteriana ocorreu de forma epidêmica e com grande severidade, afetando 100% das plantas de cultivares suscetíveis, e reduzindo drasticamente a produção de grãos (Santos *et al.*, 2000). No entanto, não há dados precisos sobre o potencial de dano ocasionado pela doença (Freire Filho *et al.*, 2005). Rios & Watt (1980), fizeram o levantamento de doenças fúngicas e bacterianas do feijão-caupi no Brasil e observaram que sua importância está fundamentalmente relacionada à região, à forma de cultivo e à época de plantio. Dados oriundos de outros países indicam que a mancha-bacteriana do feijão-caupi, pode ocasionar epidemias severas (Moretti *et al.*, 2007) e reduzir a produção (Ekpo, 1978; Okechukwu *et al.*, 2000) podendo atingir índices próximos a 92% (Kishun, 1989).

A importância de *X. axonopodis* pv. *vignicola* como patógeno do feijão-caupi está relacionada, principalmente, à sua elevada agressividade, transmissibilidade pelas sementes (Wydra *et al.*, 2004), bem como por insetos (Zandjanakou-Tachin *et al.*, 2007)

e sua capacidade de sobrevivência em restos culturais. Além disso, os hospedeiros alternativos podem constituir uma fonte de inóculo primário entre as estações de cultivo (Sikirou & Wydra, 2004).

Não existe um método eficiente para o controle da mancha-bacteriana do feijão-caupi, sendo recomendado o uso de cultivares resistentes, plantio em áreas livres do patógeno e uso de sementes saudáveis (Freire Filho *et al.*, 2005; Wydra *et al.*, 2004; Sikirou & Wydra, 2004; Gitaitis, 1983). Apesar da importância dessa doença para a cultura do feijão-caupi, estudos epidemiológicos são escassos no Brasil e no mundo, havendo pouca disponibilidade de informações sobre o patossistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*-feijão-caupi. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram identificar os estádios fenológicos do feijão-caupi que apresentam maior suscetibilidade à mancha-bacteriana e verificar a influência da época de infecção da doença nos componentes de produção e na transmissibilidade da bactéria para as sementes.

## **2. Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Roraima no ano de 2010, utilizando-se as estruturas do laboratório de Fitopatologia, casa-de-vegetação e área experimental, localizado em ecossistema de cerrado, de Latossolo Amarelo, textura arenosa e topografia plana, no município de Boa Vista/RR, Brasil (02°45'27"N, 60°43'52"W, 090 m de altitude).

### **Obtenção e manutenção do patógeno**

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (*Xav*) utilizado nos ensaios pertence à coleção de microrganismos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, previamente identificado e caracterizado como *Xav*. Após a confirmação da pureza e da patogenicidade do isolado, este foi preservado adotando-se os métodos de repicagem tubo a tubo e liofilização (Király *et al.*, 1970; Tuite., 1969; Dewald, 1966), a fim de garantir a manutenção de sua viabilidade no decorrer dos trabalhos.

### **Experimento em casa-de-vegetação**

Plantas de feijão-caupi cv. BRS Bragança foram cultivadas em vasos plásticos de 5L contendo uma mistura de solo e areia (proporção 2:1) desinfestados previamente com fumigante de solo do princípio ativo metam-sódico. A semeadura foi feita em intervalos semanais, para se obter na época da inoculação, plantas em quatro estádios

fenológicos: plantas com folhas primárias (EFP), plantas com 2 a 3 trifólios (ET), plantas em florescimento (EF) e plantas com formação de vagens (EV). O isolado de *Xav* foi semeado em placas de Petri contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantido em incubadora tipo BOD durante três dias, a 25°C. Após este período, as células bacterianas foram suspensas em água esterilizada, ajustando-se a concentração de inóculo para  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A inoculação das plantas foi feita por pulverização até o ponto de escorrimento. Plantas de feijão-caupi nos mesmos estádios fenológicos foram pulverizadas com água esterilizada e constaram como controle. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos umedecidos, em casa-de-vegetação com temperatura em torno de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **Avaliações da severidade da doença e da desfolha**

A avaliação visual da porcentagem de área foliar necrótica foi estimada em intervalos variados, com auxílio de escala diagramática, totalizando 9, 11, 14 e 16 avaliações para plantas no EV, EF, ET e EFP, respectivamente. Para a análise dos dados de severidade, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 10 repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta.

Para a determinação da porcentagem de desfolha causada pela doença, cada trifólio da planta foi identificado com uma etiqueta de papel vegetal, sendo a porcentagem de desfolha obtida pela contagem do número de folíolos caídos em relação ao total de folíolos da planta, no mesmo período em que se avaliou a severidade. O percentual de desfolha ocorrida em plantas não inoculadas também foi quantificado. Para as plantas referentes ao EFP, a desfolha foi avaliada considerando o tempo requerido para a ocorrência da queda das folhas primárias em plantas inoculadas com *Xav* comparadas com as plantas não inoculadas no mesmo estágio fenológico.

A severidade corrigida (severidade total) da mancha-bacteriana do feijão-caupi foi determinada com base num mensuramento combinado da porcentagem de área necrótica e a porcentagem de desfolha para plantas referentes ao EV, EF e ET, sendo a severidade corrigida da doença obtida pela integração da doença visível (porcentagem de área necrótica) com a desfolha, utilizando-se a equação sugerida por Aquino *et al.* (1992), com adaptações:

$$Y_r = [(1-d)Y_v] + (d-d')$$

onde  $Y_i$  representa a severidade corrigida,  $Y_v$  é a proporção de doença visível (proporção de área necrótica),  $d$  é a proporção de desfolha ocorrida em plantas inoculadas com o patógeno (desfolha causada pela doença) e  $d'$  é a proporção de desfolha ocorrida em plantas não inoculadas (desfolha causada pela senescência natural da planta). Para a análise dos dados de desfolha, adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2, com 10 repetições, considerando como fatores os três estádios fenológicos de plantas de feijão-caupi (ET, EF e EV) x inoculação ( $X_{av+}$  ou  $X_{av-}$ ). Os dados das variáveis estudadas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Bartlett. Os dados de severidade e severidade corrigida foram transformados em *log* e os dados de desfolha transformados em raiz quadrada e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Foi efetuada a análise de correlação de Pearson ( $P=0,05$ ) entre a severidade da doença e desfolha ocorrida desde a primeira avaliação da severidade e desfolha após a inoculação até a última avaliação.

### **Curvas de progresso da doença**

Curvas de progresso da mancha-bacteriana do feijão-caupi para os EV, EF e ET foram obtidas, utilizando-se os valores de severidade corrigida no tempo. Com os dados da severidade corrigida da doença foi calculada a área abaixo da curva de progresso relativa da doença (AACPRD), pela expressão:  $AACPRD = \{\sum [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)\} / n$ , onde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas,  $t_{i+1} - t_i$  o intervalo entre avaliações e  $n$  a duração do período de avaliação (Fry, 1978). Os dados de AACPRD foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Bartlett, sendo então transformados em *log* e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). As taxas absolutas de progresso da doença para cada estágio fenológico foram calculadas conforme Campbell & Madden (1990). Os dados de intensidade das doenças em proporção ( $y$ ), dados não transformados ou transformados com as fórmulas de Exponit ( $y$ )= $\ln(y)$ , Monit ( $y$ )= $\ln[1/(1-y)]$ , Logit

$(y)=\ln[y/(1-y)]$  e Gompit  $(y)= -\ln[-\ln(y)]$  (Campbell & Madden, 1990), foram ajustados a modelos de regressão linear simples, tendo o tempo, em dias após a inoculação (d.a.i), como variável independente. Os melhores ajustes foram selecionados com base no maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para reciprocidade entre valores observados e previstos de severidade da doença, menor quadrado médio do resíduo (QMR) e ausência de tendências indesejáveis no gráfico de dispersão de resíduos. Utilizando os melhores ajustes, foi estimada a taxa de progresso da doença ( $b$ ), determinada pelo parâmetro  $b$  da equação de regressão. As taxas de progresso para cada estágio fenológico foram comparadas com base no intervalo de confiança.

### **Avaliação dos componentes de produção e da transmissibilidade da bactéria para as sementes**

A colheita das vagens foi feita em intervalos de dois dias, após a maturação das primeiras vagens, e se estendeu até 93 dias após a semeadura. O material colhido em cada planta foi acondicionado em saco de papel, previamente identificado conforme seu tratamento, para medições dos seguintes componentes de produção: número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV) e massa de grãos secos de três amostras de 100 grãos (MGS). Após a debulha e a contagem dos grãos, três amostras de 100 grãos de cada tratamento foram retiradas para determinação da matéria seca, sendo as amostras mantidas em estufa de ventilação forçada a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, para posterior pesagem e correção da umidade dos grãos para 13%. Do restante das sementes, foram retiradas amostras de cada tratamento para verificar a transmissibilidade da bactéria para as sementes, sendo 50 g de sementes colocadas em Erlenmeyers contendo 250 mL de solução de  $\text{MgSO}_4$  (0,01 M) esterilizada e mantidas a  $18^{\circ}\text{C}$  por 12 horas sob agitação. Após esse período, foi feita filtração em gaze para retenção das sementes e impurezas maiores. A suspensão obtida foi centrifugada a 12000 g por 20 minutos e o pellet resultante ressuspensionado em 5 mL de solução de  $\text{MgSO}_4$  (0,01M) esterilizada. Após isso, foram feitas diluições seriadas até o fator  $10^{-5}$  e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram depositadas em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo CCM (Wydra *et al.*, 2004). As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD a  $26^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Após esse período, foi feita a contagem do número de colônias de *Xav* de cada amostra e calculou-se a quantidade de  $\text{UFC.g}^{-1}$  de sementes. Para cada amostra de

sementes, por tratamento, foram realizadas cinco repetições, sendo cada uma, constituída por uma placa de Petri. Para análise dos dados, considerou-se o delineamento experimental como inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta, dispostos em esquema fatorial, 4 x 2, considerando como fatores os quatro estádios fenológicos de plantas de feijão-caupi (EFP, ET, EF e EV) x inoculação ( $X_{av+}$  ou  $X_{av-}$ ). Os valores das variáveis avaliadas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Bartlett e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

### **Experimento em campo**

Foram realizados dois experimentos em campo, em estações seguidas de cultivo, no período de junho a setembro e de setembro a dezembro de 2010. Na área do plantio foi feita a incorporação com grade de 500 kg.ha<sup>-1</sup> de superfosfato simples + 1 t.ha<sup>-1</sup> de calcário, trinta dias antes do plantio. Na semeadura, foi adicionado 250 kg.ha<sup>-1</sup> de 04 28 20 + micronutrientes. Sementes de feijão-caupi das cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7, consideradas suscetível e resistente à mancha-bacteriana do feijão-caupi, respectivamente (Souza *et al*, 2007), foram semeadas nas parcelas contendo 4 linhas de 5 m espaçadas de 0,5 m entre linhas e 0,25m entre plantas e com, aproximadamente, quatro plantas por metro linear após o desbaste. O espaçamento entre parcelas foi de 2,0 m, onde foi plantado sorgo, como barreira física entre as parcelas. Os tratos culturais foram restritos ao controle de plantas daninhas, com capina manual, nos primeiros 15 dias após a semeadura.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com cinco repetições, dispostos em esquema fatorial, 2 x 3, considerando duas cultivares (BRS Bragança e BRS Vita-7) e três tratamentos, correspondentes à não inoculação de plantas de feijão-caupi (NI), à inoculação de plantas de feijão-caupi com  $X_{av}$  no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET) e à inoculação de plantas de feijão-caupi com  $X_{av}$  no estágio fenológico de florescimento (IEF) nas duas cultivares de feijão-caupi. A inoculação das plantas foi feita na concentração de inóculo de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> até o ponto de escoamento, com pulverizador costal manual. A quantificação da severidade da

doença, definida como a porcentagem da área foliar com sintomas da doença, foi realizada com auxílio das escalas diagramáticas para folíolos ovais e lanceolados. As avaliações foram realizadas a partir de sete dias após a inoculação até o início da colheita das vagens, em intervalos semanais, avaliando-se 20 plantas de cada parcela, sendo a média da severidade uma estimativa da média da doença na parcela. Foram realizadas sete avaliações para o tratamento IET e três avaliações para o tratamento de IEF.

### **Curvas de progresso da doença**

Curvas de progresso da mancha-bacteriana do feijão-caupi para o tratamento IET foram obtidas, utilizando-se os valores de severidade no tempo para cada cultivar, nas duas estações de cultivo. Para o tratamento IEF, os dados de severidade de plantas de BRS Bragança e BRS Vita-7 foram representados num gráfico de barras, pelo fato de terem sido feitas apenas três avaliações. Com os dados da severidade da doença foi calculada a área abaixo da curva de progresso relativa da doença (AACPRD), conforme citado anteriormente. Os dados de AACPRD foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância de Levene e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Durante o período de execução dos experimentos em campo, foi feito o monitoramento das condições ambientais através de estação meteorológica automática, registrando-se os dados de temperaturas máximas e mínimas, os de umidade relativa do ar e da precipitação pluviométrica para verificar a relação destes componentes com o progresso da doença. Foi efetuada a análise de correlação de Pearson ( $P=0,05$ ) entre as taxas absolutas da severidade da doença de BRS Bragança e BRS Vita-7 com as variáveis ambientais ocorridas desde a semeadura até a última avaliação da severidade, nos dois experimentos.

### **Avaliação dos componentes de produção e da transmissibilidade da bactéria para as sementes**

Após a finalização de cada ensaio de campo, as vagens das 20 plantas de cada parcela foram coletadas para avaliar o número de vagens/planta/tratamento (NVP), o número de grãos/vagem/planta/tratamento (NGV) e a média da massa de grãos secos de

três amostras de 100 grãos/tratamento (MGS). A determinação da matéria seca foi feita seguindo o mesmo procedimento descrito para o experimento de casa-de-vegetação. A partir dos dados dos componentes de produção das duas cultivares de feijão-caupi, calculou-se a estimativa de produtividade em  $\text{Kg.ha}^{-1}$ . A metodologia do teste de transmissibilidade de *Xav* para as sementes foi feita de forma similar ao experimento de casa-de-vegetação, alterando-se a quantidade das amostras de sementes de 50 para 150 g de sementes e da solução esterilizada de  $\text{MgSO}_4$  (0,01 M) de 150 para 750 mL. Para cada amostra de sementes/tratamento foram realizadas três repetições, sendo cada uma, constituída por uma placa de Petri, e após a contagem do número de colônias de *Xav* de cada amostra calculou-se a quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes. Os valores das variáveis avaliadas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o software Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

### **3. Resultados**

#### **Severidade da mancha-bacteriana e desfolha no ensaio de casa-de-vegetação**

Os valores da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi para plantas inoculadas com *Xav* no EFP, ET, EF e EV foram de 1,42; 1,20; 4,39 e 6,71%, respectivamente, quando se considerou a severidade como a porcentagem de área necrótica na planta toda. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey na severidade entre EV e EF, mas houve diferença destes em relação à ET e EFP, que não diferiram entre si (Figura 1 - A). Não foram constatadas correlações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre a severidade e a desfolha em plantas inoculadas com *Xav* no EF e no EV. Em plantas inoculadas no ET, a severidade correlacionou-se significativamente ( $P \leq 0,05$ ) com a desfolha.

Quando a severidade foi corrigida baseando-se na desfolha provocada pela doença, os valores de severidade corrigida foram de 7,44; 26,65 e 33,42% para ET, EF e EV, respectivamente. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey na severidade corrigida entre EV e EF, mas houve diferença destes em relação ao ET (Figura 1 - B). No tratamento de EFP não foi possível determinar a severidade corrigida com base na desfolha dos trifólios uma vez que a planta foi inoculada no estágio de folhas primárias.

As folhas primárias de plantas de feijão-caupi que não foram inoculadas com *Xav* (*Xav*-) no EFP, só caíram aos 35 dias (Figura 2 – A), enquanto que em plantas inoculadas com *Xav* (*Xav*+) no mesmo estágio, a queda das folhas primárias ocorreu em menos de 12 dias após a inoculação (Figura 2- B e C). Para o ET, EF e EV, houve desfolha em todas as plantas inoculadas com *Xav* (*Xav*+) quando comparadas com as plantas não inoculadas (*Xav*-) e esta variou conforme o estágio fenológico (Figuras 3, 4 e 5), havendo diferença ( $P \leq 0,05$ ) para os fatores inoculação (*Xav*+ ou *Xav*-), estágio fenológico e para a interação inoculação x estágio fenológico (Tabela 1). Quando os estádios fenológicos foram comparados dentro do fator *Xav*+, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey na desfolha entre EV (77, 37%) e EF (59,93%), mas houve diferença destes em relação à ET (13,93%) e quando se analisou os estádios fenológicos dentro do fator *Xav*-, não houve diferença estatística na desfolha ocorrida entre eles (Tabela 1).

#### **Curvas de progresso da doença e desfolha**

As curvas de progresso da severidade da mancha-bacteriana e da desfolha causada pela doença em plantas de feijão-caupi inoculadas no EV, EF e ET, cultivadas em casa-de-vegetação, encontram-se representadas na Figura 6, e as curvas de progresso da severidade corrigida da mancha-bacteriana e de taxas absolutas de progresso encontram-se representadas na Figura 7. Em relação à severidade, os valores iniciais ( $y_0$ ) de severidade corrigida da doença apresentaram pequena variação entre ET, EF e EV, porém, os valores máximos ( $y_{max}$ ) de severidade, apresentaram diferenças mais evidentes, sendo que para o EV, os valores de  $y_{max}$  atingiram 76,44%, seguido pelo EF (57,84%) e ET (14,03%), conforme mostrado na figura 7A. O ajuste dos modelos de regressão com dados de severidade corrigida da mancha-bacteriana do ET, EF e EV sem transformação (dados originais) ou linearizados para os modelos exponencial, monomolecular, logístico e de Gompertz, foram comparados em termos de coeficiente de determinação e quadrado médio do resíduo (Tabela 2). O progresso da severidade corrigida da mancha-bacteriana para ET, EF e EV foi melhor descrito quando os valores sem transformação foram utilizados, sendo que a taxa estimada de progresso ( $b$ ) da mancha-bacteriana no EV foi de 0,023 unidades de infecção por dia, diferindo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) do verificado para o EF (0,014 unidades de infecção por

dia) quando analisado pelo intervalo de confiança. Quando comparou-se a taxa de progresso do EV com a do ET, que teve 0,003 unidades de infecção por dia, também houve diferença significativa entre essas duas taxas conforme o intervalo de confiança. O mesmo foi verificado quando as taxas estimadas de progresso do EF e ET foram comparadas (Tabela 2). Assim, as taxas de progresso referentes ao ET, EF e EV apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) nos valores de  $b$  quando comparadas pelo intervalo de confiança. Em relação à AACPRD, houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as plantas inoculadas em diferentes estádios fenológicos. Os valores de AACPRD referentes ao EV (33,06) e EF (28,71) não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Entretanto, os valores de AACPRD do EV e do EF diferiram significativamente quando comparados com os valores do ET (8,20), sendo a severidade do EV e EF cerca de três vezes superior ao constatado no ET (Tabela 1)

#### **Avaliação dos componentes de produção e da transmissibilidade da bactéria para as sementes**

Houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) para os fatores inoculação ( $X_{av+}$  ou  $X_{av-}$ ), estágio fenológico e para a interação inoculação x estágio fenológico para a variável número de vagens por planta (NVP) e número de grãos por vagem (NGV), enquanto que para a variável massa de grãos secos (MGS) só não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para a interação inoculação x estágio fenológico (Tabela 3). Quando os estádios fenológicos foram analisados dentro do fator  $X_{av+}$  em relação à variável NVP, plantas inoculadas no estágio fenológico de florescimento (EF) produziram maior NVP, diferindo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey do estágio de folhas primárias (EFP), do estágio de 2 a 3 trifólios (ET) e do estágio de formação de vagem (EV). As plantas inoculadas no EFP produziram menor NVP, diferindo significativamente das plantas inoculadas nos EV, EF e ET. Entretanto, quando os estádios fenológicos foram comparados dentro do fator não inoculação ( $X_{av-}$ ), o EV diferiu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey dos EF, ET e EFP em relação ao NVP. Porém, quando os estádios fenológicos foram analisados dentro do fator  $X_{av+}$  em relação à variável NGV, não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre EFP, ET e EV, mas estas diferiram significativamente do EF. Entretanto, quando os estádios fenológicos foram comparados dentro do fator não

inoculação (Xav-), plantas do ET produziram em média dois grãos a mais que plantas dos demais estádios fenológicos, diferindo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey do EV, EF e EFP em relação ao NGV. Para a variável MGS, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os estádios fenológicos dentro dos fatores Xav+ e Xav- (Tabela 3).

No teste de transmissibilidade da bactéria para as sementes, não foi observado nenhum crescimento bacteriano no meio semi-seletivo CCM nas amostras de sementes provenientes de plantas não inoculadas. Houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) na quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes para os fatores inoculação (Xav+ ou Xav-), estágio fenológico e para a interação inoculação x estágio fenológico (Tabela 4), sendo que quando os valores de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes de cada estágio fenológico foram comparados dentro do fator inoculação (Xav+), o EV ( $3,6 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e o ET ( $3,1 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>), foram os que apresentaram os maiores valores, não havendo diferença significativa ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre eles. Porém, EV e ET diferiram do EF ( $2,5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>), e este diferiu do EFP ( $0,5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>), que apresentou a menor quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes (Tabela 4). Dentro do fator não inoculação (Xav-), não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os estádios fenológicos em relação à quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes, pois Xav não foi detectada em tais sementes.

### **Experimento em campo:**

#### **Curvas de progresso da doença**

As curvas de progresso da severidade da mancha-bacteriana de plantas das cultivares de feijão-caupi BRS Bragança e BRS Vita-7 inoculadas com a bactéria no estágio de 2 a 3 trifólios, em duas estações seguidas de cultivo em campo encontram-se representadas na Figura 8. Para a estação de cultivo de junho a setembro (primeiro experimento) e para estação de cultivo de setembro a dezembro (segundo experimento), os valores iniciais da severidade ( $y_0$ ) da doença em plantas da cultivar BRS Bragança foram significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste *t*, sendo que no primeiro experimento, o valor de  $y_0$  foi de 1,8%, enquanto que no segundo experimento as plantas não apresentaram sintomas da doença sete dias após a inoculação (d.a.i). Os valores máximos de severidade ( $y_{max}$ ) foram similares nos dois experimentos para BRS

Bragança, porém, no primeiro experimento o  $y_{max}$  foi obtido aos 21 d.a.i, enquanto que para o segundo experimento foi aos 28 d.a.i. Após a obtenção do  $y_{max}$  nos dois experimentos, houve um declínio na curva de progresso da doença, reduzindo em torno de 4,2% da severidade, devido à desfolha causada pela doença nas plantas, sendo que após o declínio da severidade, ocorreu um aumento desta nos dois experimentos (Figura 8). Entretanto, para a cultivar BRS Vita-7, os valores iniciais da severidade ( $y_0$ ) da mancha-bacteriana foram muito baixos, não havendo diferença significativa ( $P>0,05$ ) pelo teste  $t$  na severidade da doença até 21 d.a.i nos dois experimentos. Após esse período, houve um declínio na severidade em plantas do primeiro experimento, o que só foi observado a partir de 28 d.a.i em plantas do segundo experimento, sendo que aos 42 d.a.i, a severidade nos dois experimentos foi similar novamente, apresentando um aumento após esse período. Houve diferença significativa ( $P\leq0,05$ ) pelo teste  $t$  nos valores máximos de severidade ( $y_{max}$ ) nos dois experimentos para BRS Vita-7, sendo que no primeiro experimento o  $y_{max}$  foi de 0,18% aos 21 d.a.i, enquanto que para o segundo experimento foram necessários 28 d.a.i, para obtenção de 0,45% de  $y_{max}$ . Os valores de  $y_{max}$  de severidade e a duração da epidemia foram maiores no segundo experimento que no primeiro experimento (Figura 8). Muitas plantas da cultivar BRS Vita-7 apresentaram necroses foliares de coloração marrom, similares as de reação de hipersensibilidade 24 a 48 horas após a inoculação, porém, em algumas plantas foram observados baixos valores de severidade da doença. Houve diferença significativa ( $P\leq0,05$ ) pelo teste  $t$  nos valores de  $y_{max}$  entre BRS Bragança e BRS Vita-7 nos dois experimentos. Para plantas inoculadas com a bactéria no estágio de florescimento, a severidade média visual da doença nas cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7, encontram-se representadas na figura 9. Tanto para o primeiro experimento (Figura 9A) quanto para o segundo experimento (Figura 9B), houve diferença significativa ( $P\leq0,05$ ) pelo teste  $t$ , entre a média da severidade em BRS Bragança e em BRS Vita-7 nas três avaliações, sendo observado maiores níveis de severidade em plantas de BRS Bragança. Entretanto, no segundo experimento a média da severidade da doença 21 d.a.i em BRS Bragança (2,46%) foi cerca de três vezes superior ao constatado no primeiro experimento (0,75%). Para BRS Vita-7, a severidade aos 21 d.a.i (0,43%) no segundo experimento também foi maior que a constatada no primeiro experimento (0,18%),

chegando a ser o dobro do valor da primeira (Figura 9). Houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste  $t$  no valor da área abaixo da curva de progresso relativa da doença (AACPRD) entre as plantas da cultivar BRS Bragança inoculadas no estádio de 2 a 3 trifólios (1,39 no 1º experimento e 2,05 no 2º experimento) e as inoculadas no estádio de florescimento (0,30 no 1º experimento e 1,21 no 2º experimento) (Figura 10). Entretanto, não houve diferença entre os valores de AACPRD de IET (0,08 no 1º experimento e 0,21 no 2º experimento) e IEF (0,06 no 1º experimento e 0,16 no 2º experimento) para BRS Vita-7. Os resultados de campo apresentam-se diferentes dos obtidos em casa-de-vegetação, pois em campo, BRS Bragança apresentou maior severidade no estádio de trifólios, enquanto que em casa-de-vegetação, o estádio que apresentou maior severidade foi o de formação de vagem.

Os valores da AACPRD tanto para IET quanto para IEF foram maiores no segundo experimento do que no primeiro experimento, nas duas cultivares. Os valores da AACPRD de BRS Bragança foram bem maiores que os constatados em BRS Vita-7 nos dois experimentos, chegando a uma diferença de 87,5%. A temperatura e a umidade relativa do ar foram diferentes nesses períodos, sendo respectivamente de  $29,52 \pm 2,19^\circ\text{C}$  e  $68,39 \pm 6,98\%$  no primeiro experimento, e  $31,42 \pm 2,53^\circ\text{C}$  e  $63,96 \pm 6,29\%$  no segundo experimento. Houve uma grande diferença na precipitação pluviométrica entre os períodos de avaliação da severidade da doença, incluindo os 14 dias que antecederam as avaliações da doença, (desde a semeadura até a última avaliação da severidade), nos dois experimentos, sendo verificada uma pluviosidade mais elevada no primeiro experimento (586,7mm) que no segundo experimento (249 mm). Não foram constatadas correlações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as taxas absolutas da severidade da mancha bacteriana do feijão-caupi das cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7 com as temperaturas, umidades relativas do ar e precipitação pluviométrica.

#### **Avaliação dos componentes de produção e da transmissibilidade da bactéria para as sementes**

Para o primeiro experimento, houve efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para os fatores cultivares, tipo de inoculação (NI, IET e IEF) e para a interação cultivar x tipo de inoculação para a variável MGS, enquanto que para a variável PROD, só houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) para o fator tipo de inoculação (Tabela 5).

Quando a variável MGS foi analisada comparando as cultivares dentro do fator tipo de inoculação, os maiores valores de MGS foram obtidos pela cultivar BRS Vita-7, diferindo ( $P \leq 0,05$ ) de BRS Bragança na IET e IEF, sendo que em NI, não houve diferença significativa entre as cultivares para MGS. Entretanto, quando se analisou a variável MGS dentro do fator BRS Bragança, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre NI, IET e IEF, sendo o menor valor de MGS observado em IET, que apresentou 3,77g a menos do que em NI, seguido pelo IEF que apresentou 2,27g a menos. Para a variável PROD, analisada dentro do fator BRS Bragança, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey para NI em relação à IET e à IEF que apresentaram valores similares, sendo que em IET obteve-se 714,9 Kg.ha<sup>-1</sup> a menos do que o obtido em NI, enquanto que em IEF, a redução foi de 615,4 Kg.ha<sup>-1</sup> (Tabela 5).

No segundo experimento, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) para o fator cultivar para as variáveis NVP e PROD, enquanto que para a variável MGS, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) para o fator tipo de inoculação e para a interação cultivar x tipo de inoculação (Tabela 6). Quando as cultivares de feijão-caupi foram comparadas em relação à variável NVP dentro do fator tipo de inoculação, a cultivar BRS Vita-7 diferiu ( $P \leq 0,05$ ) de BRS Bragança em NI, pois produziu em média nove vagens/planta a mais que BRS Bragança. Também houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) para o fator cultivar de feijão-caupi para as variáveis MGS referente à NI e à IET, e para PROD referente à IET, sendo que para MGS referente à NI, a cultivar BRS Bragança apresentou 1,45g a mais do que a cultivar BRS Vita-7, enquanto que para o MGS referente à IET, BRS Vita-7 apresentou 2,21g a mais do que em BRS Bragança. Já para a variável PROD referente à IET, BRS Vita-7 produziu 728,4 Kg.ha<sup>-1</sup> a mais do que a cultivar BRS Bragança. Quando a variável MGS foi analisada dentro do fator BRS Bragança, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre NI, IET e IEF, sendo o maior valor de MGS obtido em NI, havendo uma redução de 1,79 e 3,16g em IET e IEF, respectivamente, em relação à NI. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey para PROD entre NI, IET e IEF dentro do fator cultivar para BRS Bragança. Tanto para o primeiro experimento como para o segundo experimento, os grãos provenientes de plantas NI da cultivar BRS Bragança, apresentaram massa de grãos secos maior do que os de grãos provenientes de plantas IET e IEF.

No teste de transmissibilidade da bactéria para as sementes, não foi observado nenhum crescimento bacteriano no meio semi-seletivo CCM nas amostras de sementes provenientes de plantas BRS Bragança e BRS Vita-7 não inoculadas nos dois experimentos. Por outro lado, a extração seguida do semeio no meio semi-seletivo CCM permitiu detectar e quantificar  $X_{av}$  em sementes de feijão-caupi inoculadas com a bactéria em qualquer estágio fenológico da cultura. Houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) na quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes para os fatores cultivar de feijão-caupi (BRS Bragança e BRS Vita-7), tratamentos (NI, IET e IEF) e para a interação cultivar x tratamentos (Tabela 7). A transmissibilidade de  $X_{av}$  (UFC.g<sup>-1</sup> de sementes) para as sementes provenientes de plantas IET e IEF foi diferente para a cultivar BRS Bragança nos dois experimentos (experimentos 1 e 2), mas foi similar para a cultivar BRS Vita-7. Quando à quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectadas em sementes provenientes de plantas IET e IEF foram analisadas dentro do fator cultivar de feijão-caupi, houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) na quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectadas entre BRS Bragança e BRS Vita-7 nos dois experimentos, sendo que a maior quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectada, foi na cultivar BRS Bragança, pois em plantas IET, BRS Bragança apresentou  $4,9 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de sementes a mais que a obtida em sementes da cultivar BRS Vita-7, enquanto que em plantas IEF, BRS Bragança apresentou  $3,1 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de sementes a mais que BRS Vita-7, para o primeiro experimento. Já no segundo experimento, para plantas IET, BRS Bragança apresentou  $1,83 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de sementes a mais que a obtida em sementes da cultivar BRS Vita-7 e para plantas IEF, apresentou  $1,02 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de sementes a mais que BRS Vita-7. Quando a quantidade detectada de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes foi analisada dentro de cada cultivar, tanto para o primeiro experimento quanto para o segundo experimento, houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre NI, IET e IEF para BRS Bragança, enquanto que para a cultivar BRS Vita-7, IET e IEF não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey, mas diferiram em relação ao NI. Em BRS Bragança, as maiores quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes foram detectadas em sementes provenientes de plantas IET, nos dois experimentos, sendo que no primeiro experimento, a quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes referentes à plantas IET foi  $0,21 \times 10^3$  a mais que a obtida em sementes de plantas IEF, e no segundo experimento, as sementes

provenientes de plantas IET apresentaram  $0,83 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de sementes a mais que a obtida em sementes de plantas IEF (Tabela 7).

#### 4. Discussão

Os resultados desse estudo demonstraram que *Xav* causa maior percentual de desfolha em plantas de feijão-caupi, em condições de casa-de-vegetação, independente do estágio fenológico em que a planta foi infectada. Entretanto, se a planta for infectada em estágio fenológico mais novo, como no estágio de 2 a 3 trifólios, esta apresentará menor desfolha em detrimento a um menor número de folhas terem sido infectadas na época da inoculação, além do que, a desfolha precoce das folhas infectadas reduz a disseminação da bactéria para as folhas novas que a planta repõe, e as folhas infectadas que permanecem na planta crescem mais rápido do que o tamanho da lesão da mancha-bacteriana presente nelas, fazendo com que esta apresente uma severidade menor do que plantas infectadas por *Xav* em estádios fenológicos mais tardios, onde há um menor aumento do tamanho da área foliar. Assim, plantas infectadas em estádios mais tardios de crescimento, em condições de casa-de-vegetação, apresentam maior severidade da doença, resultando também em maior AACPRD, devido a fatores tais como, a desfolha causada na maioria das folhas, o lento aumento do tamanho da folha e a baixa reposição de folhas novas. Estes resultados corroboram aqueles relatados por Nechet & Halfeld-Vieira (2011) em estudo feito com o patossistema *Rhizoctonia solani* x feijão-caupi, onde os maiores valores de severidade foram observados em plantas inoculadas nos estádios de flores abertas e enchimento de vagens, seguido do estágio de trifólios e plântulas, em duas cultivares. O estágio fenológico das plantas é um importante fator que afeta diretamente o desenvolvimento das doenças. Dependendo da doença, a suscetibilidade do tecido do hospedeiro pode aumentar ou decrescer ao longo do tempo (Furtado *et al.*, 2009). Kishun (1989) relatou que há diferença na severidade da doença entre os estádios fenológicos em que a planta for infectada e que esta varia conforme a cultivar. Em seu trabalho, plantas de feijão-caupi com 30 dias após a emergência, cultivadas na primeira estação de cultivo, apresentaram maior severidade, enquanto que na segunda estação de cultivo, a maior severidade foi observada em plantas com idade de 60 e 75 dias após a emergência. Entretanto, não foi avaliada a desfolha em seus estudos, sendo que o progresso da doença pode ter sido subestimado quando houve

desfolha causada pela doença, o que impede o ajuste adequado da severidade da doença, conforme relatado por Hamelin *et al.* (1993) para a ferrugem do álamo (*Melampsora medusae*). Kushalappa & Ludwig (1982), relataram que a proporção da doença pode diminuir devido à remoção de folhas com sintomas da doença e também pode aumentar devido à queda de folhas não infectadas. Diante disto, a avaliação da desfolha combinada com a avaliação da severidade se torna uma ferramenta a mais na determinação exata da redução de área fotossintética de plantas de feijão-caupi causada pela mancha-bacteriana. Neste trabalho esse parâmetro foi determinado conforme sugerido por Aquino *et al.*, (1992).

A radiação solar é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas, devido toda a energia necessária para a fotossíntese vir dela (Taiz & Zieger, 2004). Além disso, sabe-se que a produtividade muitas vezes depende da fotossíntese gerada pelas folhas, e qualquer fator que interfira em sua área foliar poderá afetar a produção. Portanto, o ataque de insetos desfolhadores ou de patógenos que provocam a desfolha precoce nas plantas, provocam decréscimo acentuado no rendimento, por sua atuação direta na redução da área foliar, com conseqüente diminuição na taxa fotossintética (Yorinori, 2002; Diogo *et al.*, 1997). Em soja, a perda na produção ocorre em detrimento da redução foliar devido à desfolha precoce provocada pela ferrugem asiática (Kumudini *et al.*, 2008). No presente trabalho, para o experimento de casa-de-vegetação, a severidade combinada com a desfolha contribuiu para a redução do rendimento de grãos em todos os estádios fenológicos, quando comparados com plantas não inoculadas. Essa redução foi mais evidente quando as plantas foram inoculadas no estágio de 2-3 trifólios. Isso demonstra que apesar do baixo percentual de desfolha e da AACPRD menor, a severidade e a desfolha causada pela doença no estágio de 2 a 3 trifólios acarreta uma redução no rendimento da cultura, seja em número de vagens, em quantidade de grãos por vagem ou no peso das sementes. Esses resultados corroboram os relatados por Kishun (1989), onde plantas de feijão-caupi com 15 dias após a emergência, inoculadas com *Xav*, apresentaram perdas na produção que variaram de 25,42 a 92,24%. Há relatos em outros patossistemas, mostrando a interferência da desfolha com a produção. Na soja, a desfolha diminuiu o tamanho do grãos e, em conseqüência, reduziu o seu rendimento (Yang *et al.*, 1991). No

pessegueiro a desfolha interferiu no acúmulo de carboidratos nos ramos e gemas (Alves *et al.*, 2008), enquanto que no álamo, o volume da madeira foi reduzido (May-De Mio *et al.*, 2006). Diogo *et al.* (1997) relataram que os níveis de desfolha em relação ao estágio fenológico da planta para a sua ocorrência, influenciaram significativamente, e de maneira diferenciada, nos componentes de produção.

Comparando os resultados obtidos com os ambientes em que foram conduzidos os experimentos, a severidade da doença nas plantas foi menor em condições de campo do que em casa-de-vegetação. Esses resultados corroboram o relato feito por Okechukwu & Ekpo (2004), que observaram que muitas variedades de feijão-caupi resistentes à mancha-bacteriana em condições de campo, foram suscetíveis em casa-de-vegetação. Apesar da desfolha não ter sido avaliada em campo, a queda na curva de progresso da doença para as cultivares BRS Bragança e BRS Vita-7, possivelmente se deva a ocorrência de desfolha causada pela doença, o que também contribuiu, juntamente com a severidade da doença, para a redução do MGS em BRS Bragança, sendo a produtividade em  $\text{Kg.ha}^{-1}$  afetada no primeiro experimento. A cultivar BRS Bragança apresentou uma redução na MGS tanto no experimento de casa-de-vegetação como nos de campo, quando as plantas foram inoculadas no estágio de 2 a 3 trifólios. Isto mostra que, a bactéria por ser sistêmica acompanhou praticamente todo o ciclo da cultura, o que ocasionou maior período de infecção, resultando na redução do tamanho dos grãos, com consequente redução do peso dos grãos, afetando assim o rendimento. Esses resultados corroboram o relato de Kishun (1989), em que plantas infectadas por *Xav* aos 15 dias após a emergência, apresentaram menor peso dos grãos em  $\text{Kg}/6 \text{ m}^2$  do que plantas infectadas em estádios fenológicos mais velhos.

A cultivar BRS Vita-7, foi moderadamente resistente à doença devido a expressão de hipersensibilidade que algumas plantas apresentaram. Hoffmaster (1944) e Sherwin & Lefebvre (1951) relataram que algumas cultivares de feijão-caupi apresentam resistência moderada, altos níveis de resistência e resistência total à mancha-bacteriana do feijão-caupi. Assim, apesar da reação atípica observada em plantas BRS Vita-7 ter-se desenvolvido de forma mais lenta do que a HR normal, esta ocorreu dentro de 48 horas, sendo mais rápida do que a reação de suscetibilidade que varia de 3 a 5 dias, conforme relatado por Gitaitis (1983). Este autor demonstrou que

algumas cultivares de feijão-caupi foram heterogêneas na expressão de hipersensibilidade, refletindo não só a existência de diferenças entre cultivares, mas também diferença dentro da população de uma mesma cultivar. BRS Vita-7 também foi considerada moderadamente resistente a nível de campo, devido aos baixos valores de severidade da doença em algumas plantas e aos componentes de produção, que não apresentaram diferenças significativas com os de plantas não inoculadas com *Xav*. Entretanto, estudos revelam que muitas variedades de feijão-caupi consideradas resistentes em campo, se mostram suscetíveis em casa-de-vegetação e isto provavelmente ocorre devido ao alto nível de inóculo na casa-de-vegetação, à distribuição do inóculo e ao escape limitado da doença, sugerindo que a avaliação em campo de uma variedade, nem sempre dá uma confiabilidade para poder considerar a cultivar como resistente, mesmo que haja alta pressão da doença em campo (Okechukwu & Ekpo, 2004).

Embora as condições ambientais no período de junho a setembro (1º experimento), tenham sido favoráveis à ocorrência de epidemias da mancha-bacteriana, conforme relatado por Kishun (1989) em regiões da Índia, devido principalmente à elevada pluviosidade, que na maioria das vezes é correlacionada positivamente com a elevada severidade das doenças (Kocks & Zadoks, 1996; Kocks *et al.*, 1999), essa expectativa não se concretizou, pois quando comparada aos níveis de severidade da doença verificados no período de setembro a dezembro (2º experimento), em que a pluviosidade foi menor, a severidade da doença foi maior no segundo experimento do que no primeiro, tanto para BRS Bragança quanto para BRS Vita-7. Resultados assim indicam a possibilidade de outros fatores serem determinantes para a ocorrência de elevados níveis das doenças em estações consideradas não favoráveis (Azevêdo *et al.*, 2002).

Na primeira estação de cultivo, a precipitação pluviométrica ocorrida foi maior do que na segunda estação de cultivo, sendo que logo após a inoculação, houve uma intensa chuva, com duração de quatro horas, o que provavelmente contribuiu para a lavagem do inóculo, resultando, em menor infecção do patógeno. Além disso, a maioria das chuvas ocorreu durante o dia, o que reduziu a intensidade luminosa e a temperatura,

além de acarretar o encharcamento do solo, condições estas desfavoráveis para o desenvolvimento das plantas.

Na segunda estação de cultivo, choveu menos e as chuvas ocorreram mais no fim da tarde e/ou durante a noite, permitindo uma maior intensidade luminosa durante o dia e com temperaturas mais elevadas. Além disso, a irrigação foi feita adotando-se sistema de aspersão, não permitindo o encharcamento da área, o que resultou em plantas mais vigorosas e mais produtivas. Tais fatores provavelmente contribuíram para uma maior produtividade em  $\text{Kg.ha}^{-1}$  nas cultivares de feijão-caupi no segundo experimento em relação ao primeiro. Entretanto, apesar de não haver correlação entre as condições climáticas e taxas de severidade da doença, a severidade da doença e a epidemia foram maiores no segundo experimento. Isso pode ter ocorrido pelo fato da irrigação por aspersão favorecer a disseminação de doenças foliares, conforme relatado por Lopes & Duval (2007).

A dificuldade na obtenção de estimativa precisa da taxa de progresso da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi referente ao ET no experimento da casa-de-vegetação, utilizando os dados originais ou transformados para os modelos exponencial, monomolecular, logístico e de Gompertz, pode estar associada aos baixos valores das proporções de severidade, muitos deles inferiores a 0,22, como verificado em outros patossistemas (Azevêdo *et al.*, 2002; Plaut & Berger, 1981). Apesar do modelo de Gompertz ter sido apropriado para estimar taxas epidêmicas com valores muito baixos de severidade da podridão negra (Kocks & Ruissen, 1996), no presente estudo essas características não ficaram evidentes para a severidade da mancha-bacteriana e não há relatos na literatura de trabalhos comparando taxas de progresso da mancha-bacteriana do feijão-caupi. A severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi nos experimentos de campo no presente trabalho foram menores que as verificadas por Kishun (1989) ao analisar a severidade da doença em diferentes estádios fenológicos do feijão-caupi. Em ambas as situações, a diferença nos valores observados pode ser devido à metodologia utilizada, uma vez que as epidemias foram analisadas em regiões diferentes, com condições ambientais diferentes e cultivares diferentes, sendo que as características das cultivares de feijão-caupi e dos isolados do patógeno podem ter influenciado nas diferenças dos resultados.

Os resultados deste trabalho demonstram que *Xav* pode ser isolado de sementes provenientes de plantas de feijão-caupi, independente do estágio fenológico em que a planta for inoculada, utilizando o meio semi-seletivo CCM. Isto indica que sementes infectadas pela bactéria podem ser uma fonte de inóculo primária importante e esforços devem ser feitos para tornar o uso de sementes saudáveis uma estratégia para o controle da doença (Hadas *et al.*, 2001).

A maior quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectadas em sementes provenientes de plantas BRS Bragança inoculadas com *Xav* no EV, em condições de casa-de-vegetação, foi devido ao contato direto da bactéria com as vagens quando estas estavam no início de sua formação. Enquanto que plantas inoculadas no ET, a grande quantidade de bactéria detectada se deve provavelmente ao fato da bactéria ser sistêmica (Wydra *et al.*, 2004; Kishun, 1989), e de ter passado mais tempo infectando a planta, o que favoreceu a transmissão de maior quantidade de bactéria para as sementes.

Segundo Wallen & Sutton (1965), taxas de transmissão de bactéria para as sementes como estas observadas no presente trabalho, são consideradas extremamente altas, visto que a presença de algumas sementes infectadas em um lote pode resultar em perdas consideráveis, sob condições climáticas favoráveis. As sementes provenientes de plantas inoculadas no EFP apresentaram uma menor quantidade de bactérias devido à queda prematura das folhas primárias, o que reduziu drasticamente a infecção da planta e impediu uma maior transmissão da bactéria para as sementes. No EF, a menor quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes provavelmente foi devido ao abortamento de algumas sementes que resultou num menor NGV, fazendo com que um menor número de sementes fosse infectado pela bactéria.

Para os experimentos de campo, a quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes detectadas em sementes provenientes de plantas da cultivar BRS Bragança IET também foi maior do que as IEF, provavelmente devido aos mesmos motivos do ocorrido em casa-de-vegetação. Entretanto, não se sabe ao certo o motivo de sementes da cultivar BRS Vita-7 IET não ter apresentado diferença significativa na quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes em relação as de sementes provenientes de plantas IEF. Wydra *et al.* (2004), mostraram que a quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes pode variar conforme a cultivar de feijão-caupi, sendo que a menor transmissão de *Xav* para as sementes de BRS Vita-7 pode ter

ocorrido devido a infecção de um menor número de trifólios da planta pela bactéria, resultando em menor severidade, menor desfolha e conseqüentemente menor quantidade de UFC.g<sup>-1</sup> de sementes.

Atualmente, a mancha-bacteriana ainda não é considerada problema para a cultura do feijão-caupi no Brasil, mas futuramente, pode ser que seja, pois, com a obtenção de genótipos e de sementes contaminadas provenientes da África, onde a doença é um grande problema para a cultura, poderá haver a introdução de genótipos mais suscetíveis ou de isolados mais agressivos, que dependendo das condições ambientais poderá acarretar a ocorrência de epidemias.

## 5. Referências

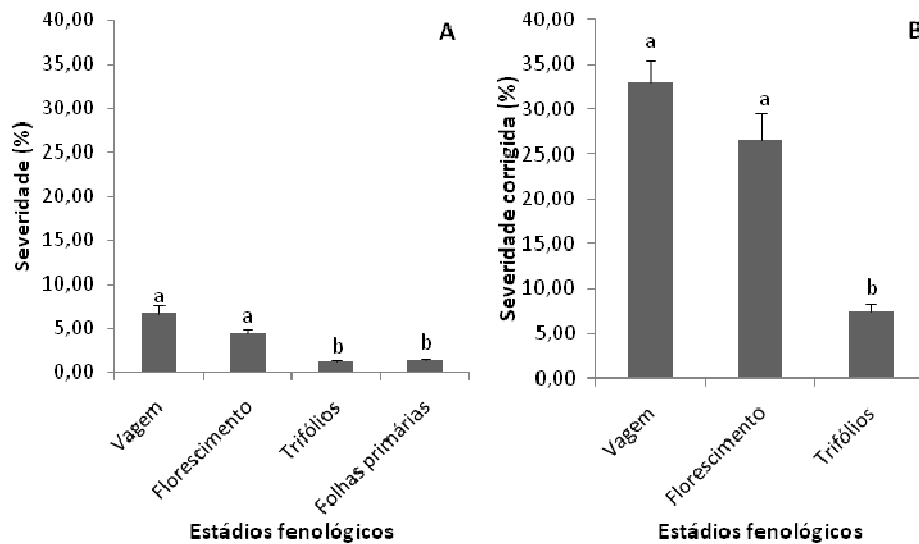
- ALVES, G. MAY-DE MIO, L.L., ZANETTE, F., OLIVEIRA, M.C. Ferrugem do pessegueiro e seu efeito na desfolha e na concentração de carboidratos em ramos e gemas. **Tropical plant pathology**, v.33, n.5, p. 370-376, 2008.
- AQUINO, V.M., SHOKES, F.M., BERGER, R.D., GORBET, D.W., KUCHARAK, T.A. Relationships among late leafspot, healthy leaf area duration, canopy reflectance, and pod yield of peanut. **Phytopathology**, v.82, p.546-552, 1992.
- AZEVEDO, S.S., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Epidemiologia comparativa da podridão negra e da alternariose do repolho do Agreste de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 17-26, 2002.
- DEWALD, R.R. Preservation of *Serratia marcescens* by high-vacuum lyophilization. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p.561-567, 1966.
- DIOGO, A.M., SEDIYAMA, T., ROCHA, V.S., SEDIYAMA, C.S. Influência da remoção de folhas, em vários estádios de desenvolvimento, na produção de grãos e em outras características agrônômicas da soja (*Glycine Max* (L.) Merrill). **Revista Ceres**, v.44, n.253, p. 272-285, 1997.
- EHLERS, J.D. & HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.
- EKPO, E.J.A. Effect of *Xanthomonas vignicola* on the yield of cowpea (*Vigna unguiculata*). **African Journal of Agricultural Sciences**, v.5, p.67-69, 1978.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.) **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

- FURTADO, G.Q., ALVES, S.A.M., CARNEIRO, L.C., GODOY, C.V., MASSOLA Jr, N.S.M. Influência do estágio fenológico e da idade dos trifolios de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p. 118-122, 2009.
- FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. **Phytopathology**, v.68, p.1650-1655, 1978.
- GITAITIS, R.D. Two resistant responses in cowpea induced by different strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **Plant Disease**, v.67, n.9, p.1025-1028, 1983.
- HADAS, R.T., KRITZMAN, G., GEFEN, T., MANULIS, S. Detection, quantification e characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology**, v.50, p.117-123, 2001.
- HAMELIN, R.C., SHAIN, L., FERRIS, R.S., THIELGES, B.A. Quantification of disease progress and defoliation in poplar leaf rust-eastern cottonwood pathosystem. **Phytopathology**, v.80, n.4, p.655, 1993.
- HOFFMASTER, D.E. Bacterial canker of cowpeas. **Phytopathology**, n.34, p.439-441, 1944.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KHATRI-CHHETRI, G.B., WYDRA, K., RUDOLPH, K. Metabolic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agent of cowpea bacterial blight and pustule. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.851-860, 2003.
- KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYOSKY, E., VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.
- KISHUN, R. Appraisal of loss in yield of cowpea due to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **Indian Phytopathology**, v. 42, p. 241-246, 1989.
- KOCKS, C.G. & RUISSEN, M.A. Measuring field resistance of cabbage cultivars to black rot. **Euphytica**, v. 91, p. 45-53, 1996.
- KOCKS, C.G. & ZADOKS, J.C. Cabbage refuse piles as sources of inoculum for black rot epidemics. **Plant Disease**, v. 80, p.789-792, 1996.

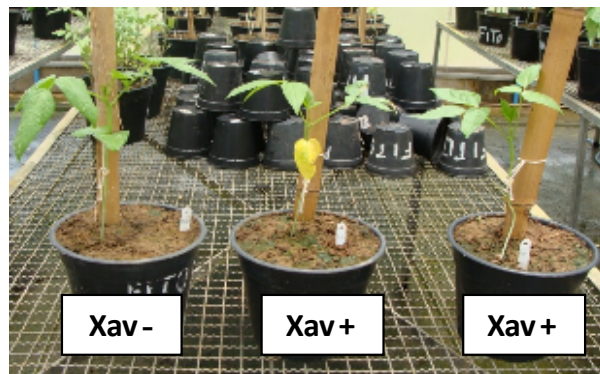
- KOCKS, C.G., ZADOKS, J.C., RUISSSEN, T.A. Spatio-temporal development of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) in cabbage in relation to initial inoculum levels in field plots in The Netherlands. **Plant Pathology**, v.48, p.176-188, 1999.
- KUMUDINI, S., KENNEDY, B., GODOY, C. V., OMIELAN, J., PRIOR, E., HERSHMAN, D., TOLLENAAR, M. Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. **Crop Science**, v.48, p.2343-2342, 2008.
- KUSHALAPPA, A.C & LUDWIG, A. Calculation of apparent infection rate in plant diseases: Development of a method to correct for host growth. **Phytopathology**, v.72, n.10, p.1373-1377, 1982.
- LOPES, C.A. & DUVAL, A.M.Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: Zambolim, L., LOPES, C.A., PICANÇO, M.C., COSTA, H.(Ed.). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 626 p.
- MAY-DE MIO L.L., AMORIM, L., MOREIRA, L.M. Progresso de epidemias e avaliação de danos da ferrugem em clones de álamo. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.133-139, 2006.
- MORETTI, C., MONDJANA, A. M., ZAZZERINI, A., BUONAURO, R. Occurrence of leaf spot on cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in Mozambique. **Plant Pathology**, v. 56, p. 347, 2007.
- NECHET, K.L. & HALFELD-VIEIRA, B.A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.2, p.104-109, 2011.
- OKECHUKWU, R.U., EKPO, E.J.A. Sources of resistance to cowpea bacterial blight disease in Nigeria. **Journal Phytopathology**, v.152, p.345-351, 2004.
- OKECHUKWU, R.U., EKPO, E.J.A., FLORINI, D.A. Yield depression in cowpea cultivars infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in Sudan savanna of Nigeria. **Tropical Agricultural Research Extension**, v.3, p.98-101, 2000.
- PLAUT, J.L. & BERGER, R.D. Infection rates in three pathosystems initiated with reduced disease severities. **Phytopathology**, v.71, p.917-921, 1981.

- RIOS, G. P. & WATT, E. E. Identificación de fontes de resistência a lãs principais enfermidades de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Fitopatologia**, v. 15, n. 1, p. 24, 1980.
- SANTOS, A.A., BARRETO, P.D., QUINDERÉ, M.A.W. Identificação de fontes de resistência à *Xanthomonas vignicola*, agente causal da mancha-bacteriana do caupi. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical/Embrapa Meio-Norte**, n.28, Boletim de Pesquisa, 2000. 12p.
- SHERWIN, H.S. & LEFEBVRE, C.L. Reaction of cowpea varieties to bacterial canker. **Plant Disease**, n.35, p.303-317, 1951.
- SIKIROU, R. & WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis stenocarpa* as a potential new host. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 939-947, 2004.
- SOUZA, G.R., HALFELD-VIEIRA, B.A., NECHET, K.L. Resistência de genótipos de feijão-caupi à *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá-PR. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras-MG: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.32, suplemento p. S115, 2007.
- TAIZ, L. & ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 719p.
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.
- VERDIER, V., ASSIGBÉTSÉ, K., KHATRI-CHHETRI, G., WYDRA, K., RUDOLPH, K., GEIGER, J.P. Molecular characterization of the incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.595-602, 1998.
- YANG, X.B., TSCHANZ, A.T., DOWLER, W.M., WANG, T.C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, v. 81, p.1420-1426, 1991.
- YORINORI, J. T. & PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sidow**. Londrina: Embrapa, 2002. 7p.
- WALLEN, V.R. & SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. **Can. J. Bot**, v.43, p.437-46, 1965.

WYDRA, K., KHATRI-CHHETRI, G., MAVRIDIS, A., SIKIROU, R. A diagnostic medium for semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 991-1001, 2004.



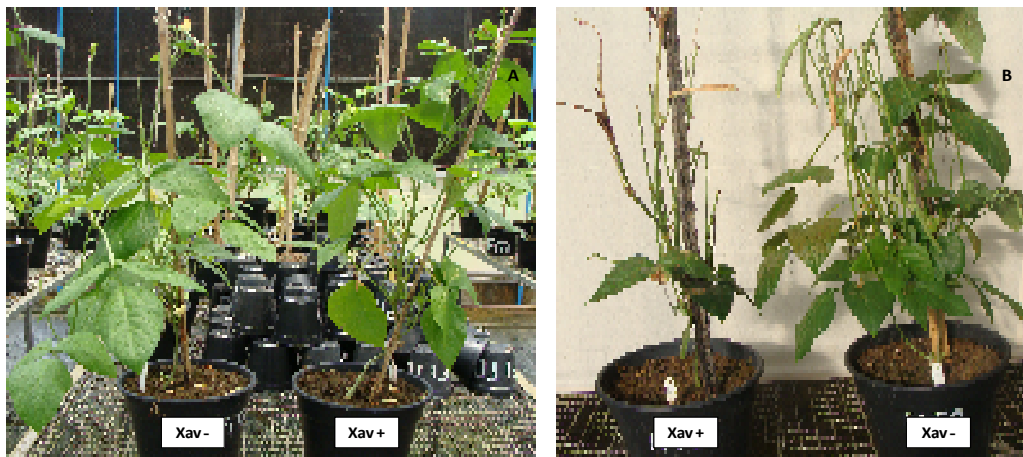
**Figura 1.** Média da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi- (A) e média da severidade corrigida pela percentagem de desfolha (B) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio fenológico de formação de vagem (Vagem), de florescimento (Florescimento), de 2 a 3 trifólios (Trifólios) e com folhas primárias (Folhas primárias). Cada coluna representa a média de 10 plantas e barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 2.** Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança não inoculadas (Xav-) e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola (Xav+) no estágio fenológico de folhas primárias – EFP, 11 dias após a inoculação.

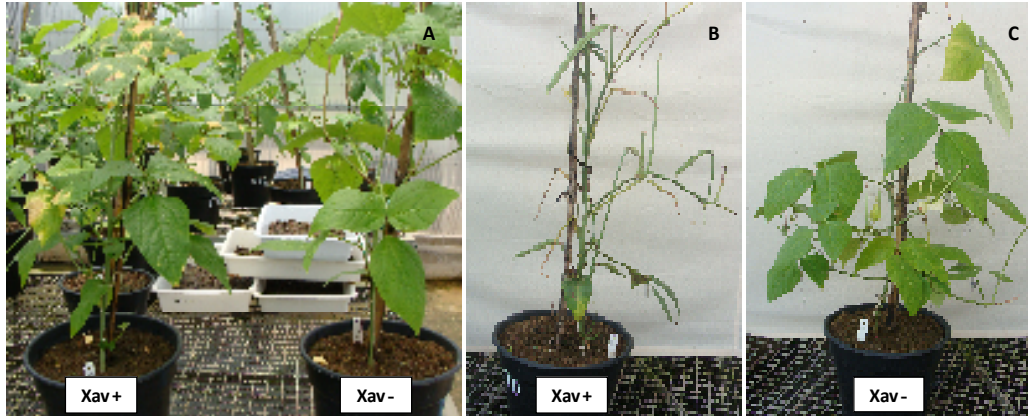


**Figura 3.** Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola (Xav+) e não inoculadas (Xav-) no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios - ET. (A) Plantas com 21 dias após a inoculação (B) Plantas com 58 dias após inoculação.

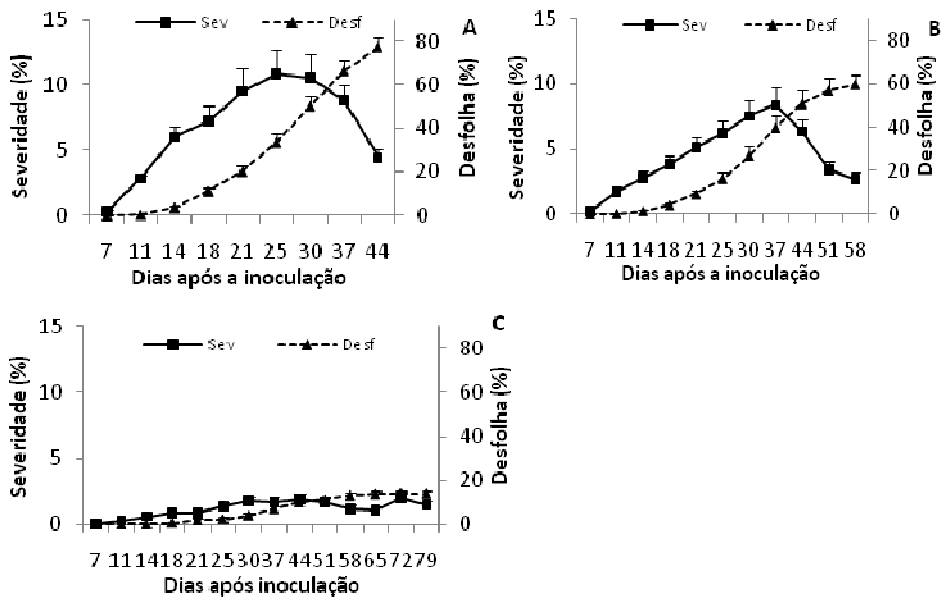


**Figura 4.** Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola (Xav+) e não inoculadas (Xav-) no

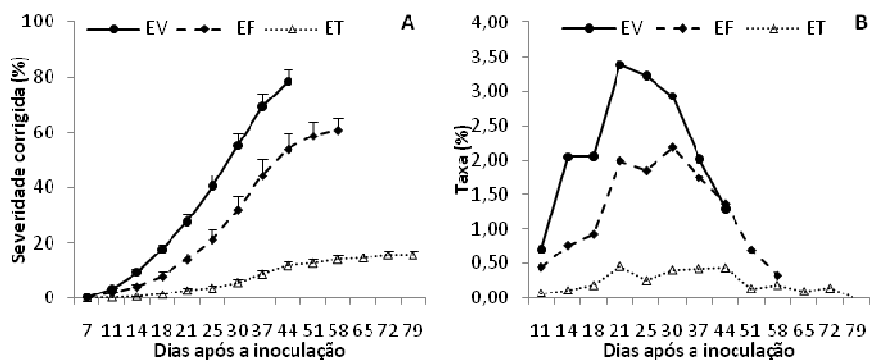
estádio fenológico de florescimento - EF. (A) Plantas com 21 dias após a inoculação (B) Plantas com 58 dias após inoculação.



**Figura 5.** Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola (Xav+) e não inoculadas (Xav-) no estágio fenológico de formação de vagem - EV. (A) Plantas com 21 dias após a inoculação (B) Plantas com 44 dias após inoculação.



**Figura 6.** Progresso de desfolha e progresso da severidade da mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola no estágio fenológico de formação de vagem - EV (A), estágio de florescimento – EF (B) e estágio de 2 a 3 trifólios - ET (C), em condições de casa-de-vegetação. Cada ponto representa a média de 10 repetições e barras em cada ponto representam o erro padrão da média.



**Figura 7.** Curvas de progresso cumulativa (A) e taxas absolutas de progresso (B) da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi corrigida pela desfolha causada em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.*vignicola* no estágio de formação de vagem (EV), estágio de florescimento (EF) e estágio de 2 a 3 trifólios (ET) em condições de casa-de-vegetação. Cada ponto representa a média de 10 repetições e barras em cada ponto representam o erro padrão da média.

**Tabela 1.** Área Abaixo da Curva de Progresso Relativa da mancha-bacteriana do feijão-caupi (AACPRD) e porcentagem de desfolha ocorrida em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.*vignicola* (*Xav*+) e não inoculadas (*Xav*-) nos estádios fenológicos de formação de vagem (EV), florescimento (EF), e de 2 a 3 trifólios (ET).

Estádio fenológico	AACPRD		Desfolha	
	<i>Xav</i> +		<i>Xav</i> +	<i>Xav</i> -
EV	1,52 a (33,06) <sup>x</sup>		8,79 aA (77,37 %) <sup>†</sup>	1,29 aB (1,99 %) <sup>†</sup>
EF	1,44 a (28,71)		7,72 bA (59,93 %)	1,67 aB (3,19 %)
ET	0,94 b (08,20)		3,76 cA (13,93 %)	1,29 aB (1,52 %)
Média	1,30 (23,32)		6,75 (50,41 %)	1,41 (2,23 %)
CV (%)	12,14		20,71	

Para cada variável estudada, médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey. <sup>y</sup>Dados de AACPRD foram transformados em log; <sup>z</sup>Dados de desfolha foram transformados em raiz quadrada; <sup>x</sup>Números dentro dos parênteses representam médias dos dados reais de AACPRD e desfolha. CV=coeficiente de variação.

**Tabela 2.** Comparação de modelos lineares baseada nas estimativas do parâmetro b da equação de regressão, no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e no quadrado médio do resíduo (QMR) para descrever as taxas estimadas de progresso (b) da Mancha-bacteriana do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio de formação de vagem (EV), estágio de florescimento (EF) e estágio de 2 a 3 trifólios (ET) em condições de casa-de-vegetação.

Transformação	EV			EF			ET		
	b	R <sup>2</sup>	QMR	b	R <sup>2</sup>	QMR	b	R <sup>2</sup>	QMR
Dados sem transformação	0,023	0,98	0,0015	0,014	0,97	0,0017	0,003	0,95	0,0002
Monit	0,044	0,96	0,0111	0,021	0,97	0,0036	0,003	0,96	0,0002
Exponit	0,124	0,73	0,9822	0,090	0,71	1,0060	0,067	0,65	1,4150
Logit	0,168	0,86	0,7927	0,111	0,80	0,9393	0,070	0,67	1,4216
Gompit	0,084	0,98	0,0177	0,050	0,94	0,0434	0,019	0,82	0,0470

<sup>x</sup>Exponit (y)=ln(y); Monit (y)=ln[1/(1-y)]; Logit (y)=ln[y/(1-y)]; Gompit (y)= -ln[-ln(y)] (Campbell & Madden, 1990);

**Tabela 3.** Média do número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV) e peso seco de 100 grãos (MGS) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Xav+) e não inoculadas (Xav-) nos estádios fenológicos de formação de vagem (EV), florescimento (EF), de 2 a 3 trifólios (ET) e folhas primárias (EFP).

Estádio fenológico	Componentes de produção					
	NVP		NGV		MGS (g)	
	Xav+	Xav-	Xav+	Xav-	Xav+	Xav-
EV	6,80 bcB	8,50 bA	7,10 aA	7,60 bA	13,90 aB	15,19 aA
EF	9,70 aA	10,40 aA	6,00 bB	7,50 bA	14,28 aB	15,31 aA
ET	7,30 bB	10,80 aA	6,90 aB	9,20 aA	13,52 aB	15,00 aA
EFP	5,90 cB	10,00 aA	7,00 aA	7,20 bA	14,54 aB	15,37 aA
Média	7,42	9,95	6,75	7,87	14,06	15,22
CV (%)	9,72		16,67		2,74	

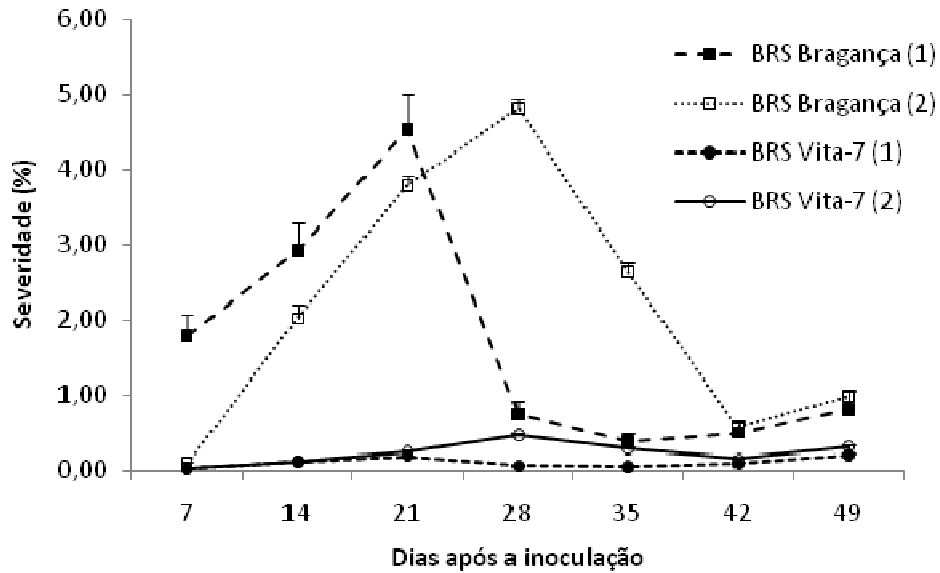
Para cada componente de produção, médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV= coeficiente de variação.

**Tabela 4.** Isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Xav) em sementes de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança inoculadas com Xav nos estádios fenológicos de vagem (EV), florescimento (EF), de 2 a 3 trifólios (ET) e folhas primárias (EFP), no meio CCM.

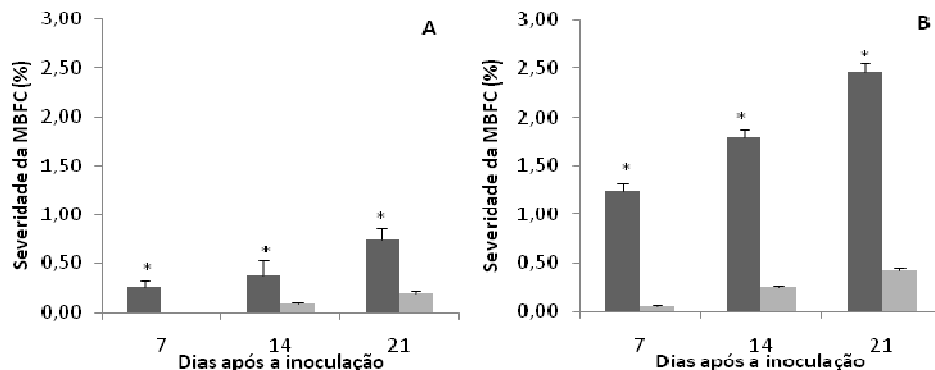
Estádios fenológicos	*UFC.g <sup>-1</sup> de sementes	
	Xav+	Xav-
EV	3,55 aA (3,6 x 10 <sup>3</sup> ) <sup>x</sup>	0,00 aB
EF	3,40 bA (2,5 x 10 <sup>3</sup> )	0,00 aB
ET	3,49 aA (3,1 x 10 <sup>3</sup> )	0,00 aB
EFP	2,70 cA (0,5 x 10 <sup>3</sup> )	0,00 aB
Média	3,28A	0,00B
CV (%)	1,94	

Médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são

significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV=coeficiente de variação. \*médias de unidades formadoras de colônias (UFC) de cinco repetições foram transformados em log; \*Números dentro dos parênteses representam médias dos dados reais de UFC.

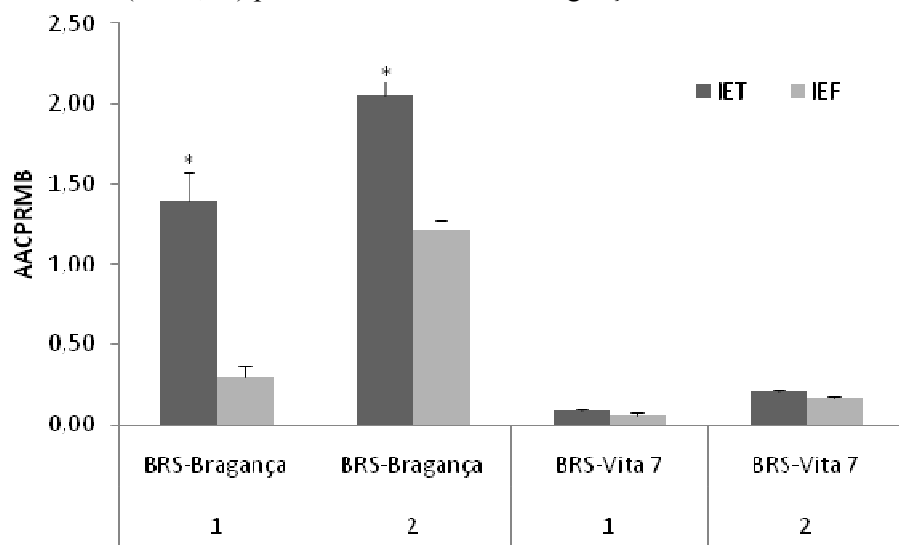


**Figura 8.** Progresso da severidade (%) da mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança e cv. BRS Vita-7, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios - IET em duas estações de cultivo consecutivas em campo, no período de junho a setembro (1) e de setembro a dezembro (2) no ano de 2010, Boa vista, RR, Brasil. Cada ponto representa a média de cinco blocos e barras representam o erro padrão da média.



**Figura 9.** Média da severidade visual da mancha-bacteriana do feijão-caupi (MBFC) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança (colunas pretas) e cv. BRS Vita-7 (colunas cinzas), inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv.vignicola no estágio fenológico de florescimento - IEF, em duas estações de cultivo consecutivas, no período de

junho a setembro (A) e de setembro a dezembro (B) no ano de 2010, Boa Vista, RR, Brasil. Cada coluna representa a média de cinco blocos e barras representam o erro padrão da média. \* indicam médias significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste t entre BRS Bragança e BRS Vita-7.



**Figura 10.** Área Abaixo da Curva de Progresso Relativa da mancha bacteriana (AACPRMB) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança e cv. BRS Vita-7, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET, Colunas pretas) e de florescimento (IEF, colunas cinzas) em duas estações de cultivo consecutivas, no período de junho a setembro (1) e de setembro a dezembro (2) no ano de 2010, Boa Vista, RR, Brasil. Cada coluna representa a média de cinco blocos e barras representam o erro padrão da média. \* indicam médias significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste t entre IET e IEF, dentro da mesma estação de cultivo para as mesmas cultivares.

**Tabela 5.** Média do número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), peso seco de 100 grãos (MGS) e estimativa de produtividade em  $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  (PROD) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança (Brag) e cv. BRS Vita-7 (Vita), não inoculadas (NI) e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET) e no estágio de florescimento (IEF). Estação de cultivo em campo no período de junho a setembro de 2010, Boa Vista, RR, Brasil.

Trat.	Componentes de produção							
	NVP		NGV		MGS (g)		PROD ( $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ )	
	Brag	Vita	Brag	Vita	Brag	Vita	Brag	Vita
NI	13,04 aA	14,91 aA	11,59 aA	11,76 aA	14,55 aA	13,67 aA	1767,50 aA	1911,00 aA
IET	11,12 aA	12,12 aA	10,95 aA	11,22 aA	10,78 cB	13,98 aA	1052,60 bA	1515,40 aA
IEF	10,81 aA	10,70 aA	10,95 aA	11,76 aA	12,28 bB	14,46 aA	1152,10 bA	1451,30 aA
Média	11,66	12,58	11,16	11,58	12,54	14,03	1324,04	1625,89
CV %	30,20		5,83		3,72		30,57	

Para cada componente de produção, médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV=coeficiente de variação.

**Tabela 6.** Média do número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), peso seco de 100 grãos (MGS) e estimativa de produtividade em  $\text{Kg.ha}^{-1}$  (PROD) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cv. BRS Bragança (Brag) e cv. BRS Vita-7 (Vita), não inoculadas (NI) e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET) e no estágio de florescimento (IEF). Estação de cultivo em campo no período de setembro a dezembro de 2010, Boa Vista, RR, Brasil.

Trat.	Componentes de produção							
	NVP		NGV		MGS (g)		PROD ( $\text{Kg.ha}^{-1}$ )	
	Brag	Vita	Brag	Vita	Brag	Vita	Brag	Vita
NI	15,22 aB	24,23 aA	10,37 aA	10,49 aA	14,87 aA	13,42 aB	1893,0 aA	2718,7 aA
IET	15,95 aA	19,25 aA	9,84 aA	10,37 aA	11,71 cB	13,92 aA	1484,3 aB	2212,7 aA
IEF	15,66 aA	21,50 aA	10,41 aA	10,42 aA	13,08 bA	13,66 aA	1723,1 aA	2417,2 aA
Média	15,61	21,66	10,21	10,43	13,22	13,67	1700,12	2449,53
CV %	22,97		6,72		4,76		24,16	

Para cada componente de produção, médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV=coeficiente de variação.

**Tabela 7.** Isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Xav) em sementes de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cv. BRS Bragança e BRS Vita-7, não inoculadas (NI) e inoculadas com Xav no estágio fenológico de 2 a 3 trifólios (IET) e no estágio de florescimento (IEF), no meio CCM.

Tratamento	*UFC.g <sup>-1</sup> de sementes			
	<sup>y</sup> Estação de cultivo 1		<sup>x</sup> Estação de cultivo 2	
	BRS Bragança	BRS Vita-7	BRS Bragança	BRS Vita-7
NI	0 cA	0 bA	0 cA	0 bA
IET	7,9 x 10 <sup>2</sup> aA	3,0 x 10 <sup>2</sup> aB	2,10 x 10 <sup>3</sup> aA	2,7 x 10 <sup>2</sup> aB
IEF	5,8 x 10 <sup>2</sup> bA	2,7 x 10 <sup>2</sup> aB	1,27 x 10 <sup>3</sup> bA	2,5 x 10 <sup>2</sup> aB
Média	4,5 x 10 <sup>2</sup>	1,9 x 10 <sup>2</sup>	1,12 x 10 <sup>3</sup>	1,7 x 10 <sup>2</sup>
CV (%)	25,92		19,58	

Médias na coluna seguidas pela mesma letra minúscula ou médias na linha seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV=coeficiente de variação.\*médias de unidades formadoras de colônias (UFC) de três repetições. Estações de cultivo em campo, de <sup>y</sup>junho a setembro e de <sup>x</sup>setembro a dezembro de 2010, Boa Vista, RR, Brasil.

## CONCLUSÕES GERAIS

- 1) Com as escalas diagramáticas propostas para avaliar a severidade da mancha-bacteriana em cultivares de feijão-caupi de trifólios com folíolos ovais e de trifólios com folíolos lanceolados foi possível quantificar os sintomas da doença de forma acurada, precisa e reproduzível;
- 2) A severidade da mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi foi maior conforme a elevação da concentração de inóculo, em condições de casa-de-vegetação;
- 3) O patógeno foi transmitido para sementes de feijão-caupi a partir de plantas inoculadas, independente da concentração de inóculo utilizada.
- 4) O meio semi-seletivo CCM é eficaz na detecção de *Xav* em sementes provenientes de plantas infectadas pela bactéria, sendo seu uso viável em testes de diagnose;

- 5) Plantas inoculadas com *Xav* apresentam maior percentual de desfolha quando comparadas com plantas não inoculadas;
- 6) Considerando que a desfolha causada pela doença começa ainda na primeira semana após a inoculação, recomenda-se que as avaliações de efeitos de tratamento e cultivares quanto a *Xav* sejam realizadas a partir desse período, avaliando-se a severidade combinada com a desfolha;
- 7) A severidade corrigida pela desfolha é um bom parâmetro para melhoristas e fitopatologistas avaliarem diferenças de cultivares, visando diferenciar níveis de resistência;
- 8) A severidade corrigida pela desfolha, causada pela mancha-bacteriana em plantas de feijão-caupi, foi maior com o incremento do período de molhamento foliar;
- 9) O período de incubação tende a ser menor com o aumento do período de molhamento foliar após a inoculação;
- 10) A umidade foi um fator importante no desenvolvimento de cancro na haste de plantas de feijão-caupi;
- 11) O patógeno pode ser transmitido para as sementes, independente do estágio fenológico em que a planta for infectada pela bactéria;
- 12) A mancha-bacteriana causou redução no rendimento de grãos independente do estágio fenológico em que a planta de feijão-caupi cv. BRS Bragança foi infectada, sendo observadas reduções na massa de grãos secos e maior transmissibilidade da bactéria para as sementes quando plantas são infectadas no estágio de dois a três trifólios ou no estágio de formação de vagem.