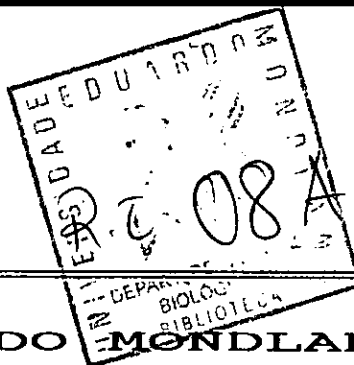


BIO-161



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

TRABALHO DE LICENCIATURA

Título: Estudo da Pústula Bacteriana (Xanthomonas sp) no  
Feijão nhemba (Vigna unguiculata (L.))

PREVIA

Autor: Américo Uaciquete

Supervisor: Dr. Y.P. Rao

Setembro, 1993

Dedico este trabalho à Paz, Estabilidade e Prosperidade de Moçambique em nome da malograda professora Dr<sup>a</sup> Angelina Maite.

Por Américo Uaciquete

## Agradecimentos

Quero nesta página expressar particular honra e gratidão ao professor Dr. Y. P. Rao o qual é digno pelo seu grande contributo prático e moral para que este trabalho fosse o que é. Ao projecto DANIDA, na pessoa do coordenador Dr. Arne Jensen, o meu muito obrigado pelo sustento financeiro do trabalho. Votos de longa vida na sua carreira ao Engr. Marcos Freire e sua equipe que muito fizeram desde a disponibilização do campo para o ensaio até o uso de equipamento disponível sem o qual este trabalho seria bem diferente do que é. Destaco também a contribuição dos Engrs. Piet e Rinie pela elaboração fotográfica e revisão do texto respectivamente. Aos Drs. Amable e Doto e ainda ao dr. Novunga, os meus mais sinceros desejos para que continuem amáveis, ajudando sempre os mais jovens na investigação. E a dona Gilda, paciente assistente, e todos os que directa ou indirectamente deram ajuda neste trabalho, que Deus lhes abençoe para sempre.

## Sumário

Um estudo sobre a pústula bacteriana no feijão nhemba, foi levado a cabo entre Outubro de 1992 e Março de 1993, no campo experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade Eduardo Mondlane e no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Sanidade Vegetal .

O estudo tinha como objectivos: Dar contribuição na determinação da variedade patogénica que causa a pústula bacteriana, descrição dos sintomas da mesma e ainda procurar algumas variedades de feijão nhemba resistentes a esta doença.

O estudo abrangiu a obtenção, o isolamento e multiplicação de dois patógenos bacterianos da cultura de feijão nhemba. Por um lado o agente causal de crestamento bacteriano e por outro lado o patógeno que provoca a pústula bacteriana para o qual foi prestado maior atenção. Para o estudo, foram utilizados três meios culturais nomeadamente: Nutriente Agar (N.A.), King e Glucose yeast chalk Agar (GYCA).

A doença foi descrita em sete variedades de feijão nhemba, cujas plantas foram cultivadas tanto em vasos como no campo.

A avaliação para a selecção de variedades resistentes foi feita com base no número de folhas caídas da planta. Concluiu-se que duas variedades, Timbawene Creme e Timbawene Violeta são relativamente tolerantes à pústula bacteriana.

Foram testados três métodos para inoculação foliar do agente da pústula bacteriana entre os quais o método Smear revelou-se ser o melhor.

Em plantas de feijão nhemba inoculadas com o patógeno da pústula bacteriana, foi estudada a relação entre a posição da folha na planta e o desenvolvimento da infecção . Observou-se que as folhas das extremidades (mais jovens) são mais susceptíveis do que as restantes.

Também foi investigado o espectro de ataque do agente causal da pústula bacteriana inoculando-o numa série de outras espécies de plantas leguminosas, nas quais nenhuma infecção ocorreu.

Sementes de nhemba provenientes do ensaio em campo foram testadas para a transmissão da doença através da semente e não foram encontradas evidências deste tipo de transmissão

Foi feito um estudo em paralelo no qual o agente de crestamento bacteriano e o agente da pústula bacteriana foram isolados, multiplicados e inoculados lado a lado em plantas de feijão nhemba e de feijão manteiga. Os resultados revelaram diferenças particulares que são apresentados numa discussão resumida sobre a taxonomia do agente que causa a pústula bacteriana . Desta discussão concluiu-se que a variedade patogénica Xanthomonas Campestris pv. vignapustulae Nova (Américo e Rao, 1993) é a causa da pústula bacteriana.

ESPECIE

C/ MINUSCULA

## Índice

	Conteúdo		Páginas
	Agradecimentos .....		2
	Sumário .....		3
	Lista de Anexos .....		6
1.0	Introdução .....		7
2.0	Revisão da Literatura		
2.1	A cultura de feijão nhemba .....		9
2.2	Bacterioses		
2.2.1	Patogenicidade e Sintomatologia .....		9
2.2.2	Propagação e Sobrevivência .....		10
2.2.3	Importância económica .....		11
2.2.4	Resistência e Controle .....		12
2.3	Terminologia .....		13
3.0	Metodologia .....		14
3.1	Isolamento do Patógeno .....		14
3.1.1	Colecção e exame do material infectado .....		14
3.1.2	Preparação dos meios de cultura .....		14
3.1.3	Isolamento em diferentes meios de cultura .....		16
3.2	Crescimento em diferente meios de cultura .....		16
3.3	Teste de patogenicidade .....		17
3.3.1	Preparação da suspensão bacteriana .....		17
3.3.2	Inoculação sob diferentes métodos .....		18
3.4	Susceptibilidade das folhas em função da sua posição na planta .....		18
3.5	Espectro de ataque a outras leguminosas .....		19
3.6	Experiência de conservação em GYCA (meio de cultura) .....		19
3.7	Descrição da doença e avaliação para a resistência .....		19
3.7.1	Sementeira e cuidados culturais .....		19
3.7.2	Preparação do inóculo e inoculação .....		20
3.7.3	Caracterização da doença e outros parâmetros .....		21
3.8	Teste de transmissão do patógeno através da semente .....		22

3.9	Estudo comparativo de patógenos causadores de PB e CB	22
4.0	Resultados	23
4.1	Isolamento do patógeno	23
4.1.1	Teste de Ooze	23
4.1.2	Isolamento em diferentes meios de cultura	23
4.2	Crescimento em diferentes meios de cultura	24
4.3	Teste de patogenicidade	24
4.4	Susceptibilidade das folhas em função da sua posição na planta	25
4.5	Espectro de ataque a outras leguminosas	26
4.6	Experiência de conservação em GYCA (meio de cultura)	26
4.7	Descrição da doença e outros parâmetros	26
4.8	Teste de transmissão do patógeno através de sementes	28
4.9	Discussão sobre a taxonomia do agente causal da doença	29
4.10	Estudo comparativo de patógenos causadores de PB e CB	30
5.0	Conclusões e recomendações	31
	Bibliografia	32
	Anexos	35

## Lista de anexos

### No. de Ordem

- 1 Fig.1 Mapa de distribuição do Nhemba em Moçambique
- 2 Esquema da disposição dos vasos
- 3 Esquema do delineamento do campo
- 4 Tabela 1: Alguns aspectos de aproveitamento do campo
- 5 Fig.2 e Fig.3 Vista microscópica (200x) de células bacterianas de PB e de CB mediante o teste de Ooze
- 6 Tabela 2: Diâmetro de colónias de PB (em milímetros), 72 horas crescendo em diferentes meios de cultura
- 7 Fig.4 Ataque do caule de feijão nhemba pelo agente causal de pústula bacteriana
- 8 Fig.5 Página inferior da folha de feijão nhemba mostrando o estágio de pústula
- 9 Fig.6 Página superior da folha de feijão nhemba revelando o estágio de manchas
- 10 Tabela 3: Número e percentagem (calculada em torno da média) das plantas infectadas por variedade ao longo do tempo
- 11 Fig.7 Mostra a percentagem de plantas infectadas pela PB por variedade, em duas avaliações desde o dia de inoculação foliar
- 12 Tabela 4: Número de folhas apanhadas no chão por variedade e por replicação ao longo do tempo
- 13 Tabela 5: Totais e médias das folhas apanhadas por replicação e por variedade
- 14 Tabela 6: Determinação do coeficiente de variação
- 14 Tabela 7: Diferenças entre as médias das folhas apanhadas, obtidas a partir do Dunca'ns multiple range teste, a 5% de significância
- 15 Tabela 8: Rendimento em gramas de grão seco, por variedade por replicação
- 15 Tabela 9: Total do rendimento e a média convertida a toneladas por hectar.
- 16 Tabela 10: Peso de 100 grãos secos por variedade.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão nhemba, Vigna unguiculata (L) Walp. é uma planta dicotiledonea que pertence à:

Ordem: Rosales  
Família: Leguminosae  
Sub-família: Papilionoideae  
Tribo: Phaseoleae  
Sub-tribo: Phaseolinae  
Género: Vigna

De acordo com Libombo (1990) esta classificação botânica foi estabelecida por Savi em 1984.

Em África há 4.5 milhões de hectares sob cultivo de feijão nhemba totalizando mais de 90% da sua área mundial de cultivo (Bakumovsky e Ustimenko, 1983). Só para ilustrar, dois países apenas, Nigéria e Níger são responsáveis por 850.000 toneladas (t) e 271.000 t respectivamente ou seja 49,3% da produção mundial (Singh e Rackie, 1985).

Dados de 1970 (Heemskerk, 1985) indicam que em Moçambique o feijão nhemba é cultivado numa área aproximada de 180.000 hectares com o rendimento de 300 kg por hectare. A distribuição das zonas de cultivo de cultivo no país, pode ser vista no mapa em anexo 1.

Em África, esta leguminosa representa o legume de opção da maioria da população e em particular de mulheres grávidas ou em lactação e crianças (Singh e Rackie, 1985).

O feijão nhemba tem folhas comestíveis, frescas ou secas. Consume-se também em vagens antes da plena maturação ou em grãos verdes e secos (Chilenge, 1990 citando Amone, 1988). É também usado como forragem, planta de cobertura, silagem ou aplicado na produção de feno e incorporação de matéria orgânica (Heemskerk, 1985).

As doenças nas plantas podem ser causadas por Fungos, Bactérias, Vírus e Micoplasmas (Singh e Allen, 1979). Designa-se por Bacterioses apenas as doenças causadas por Bactérias.

No feijão nhemba há duas bacterioses que se mostram muito relevantes:

Crestamento bacteriano (CB) causado por X. C. pv. vignicola

Pústula bacteriana (PB) causada por Xanthomonas sp.

Embora haja concordância entre cientistas no que se refere ao facto de que os sintomas de PB nas plantas, são caracteristicamente distintos dos sintomas de CB, e que o agente causal de CB é



X.C. pv. vignicola, persiste ainda uma discussão sobre a identidade do agente causal de PB : Patel e Jindal (1982), sugeriram que uma nova variedade patogénica ( pv.), a qual designaram por X.C. pv. vignaeunguilatae, seria a causa da PB. Porém, Allen (1983) admite que se possa tratar de X. C. pv. vignicola, a mesma que causa o CB só que, provavelmente uma estirpe particular. Entretanto, Ouko e Buruchara (1989) afirmam que a PB é causada por X. C. pv. vignicola. Além disso ainda não são encontradas as técnicas adequadas para a inoculação de plantas de modo a permitir um estudo mais elaborado sobre estes patógenos.

Não há ainda uma abordagem detalhada sobre os sintomas de PB os quais são relevantes para o diagnóstico da doença quer no campo quer em laboratório embora se reconheça o trabalho de William (1975) sobre a descrição da doença.

Sabe-se que as perdas potenciais no rendimento, devido a esta doença, variam entre 1.8% e 26.6% nas variedades resistente e susceptível, respectivamente (Allen, 1983).

Em Moçambique, nenhum estudo foi feito com vista a selecção de variedades de feijão nhemba que sejam resistentes a esta doença embora se saiba da sua existência quase em todo o país. Neste contexto, este trabalho tem em vista alcançar os seguintes **OBJECTIVOS:**

- 1) Dar contribuição à determinação da patovar que causa Pústula bacteriana.  
*PORTUGUESE PLEASE*
- 2) Estabelecer um quadro de sintomas nos diferentes estádios da cultura incluindo a sua variabilidade nas variedades de feijão nhemba.
- 3) Procurar algumas variedades de feijão nhemba resistentes à doença.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A cultura de feijão nhemba

O feijão nhemba tem a sua origem em África donde expandiu-se para Índia, China, América Central e América do Norte (Bakumovsky e Ustimenko, 1983). A distribuição no interior do continente africano ocorreu através de migrações. E, para outros continentes, a cultura dispersou-se através do estabelecimento de contactos comerciais (Libombo, 1990).

O feijão nhemba é considerado cultura da época quente. Exige para o seu crescimento e desenvolvimento temperaturas máximas compreendidas entre 27°C e 30°C, podendo suportar temperaturas até 40-45°C, temperaturas mínimas compreendidas entre 20-22°C (Saúde, 1990).

Quanto aos solos, a cultura não mostra nenhum requerimento especial (Bakumovsky e Ustimenko, 1983). No Sul do país, o nhemba é às vezes cultivado sob condições de rega com 2400 a 3000 metros cúbicos por hectare, aplicado em três ou quatro regas se não chover.

Segundo Doto (1988) citado por Chilenge (1990), o fotoperiodismo manifestado por algumas variedades é um dos factores que limitam a produção e em dias longos, as variedades sensíveis ao fotoperiodismo conhecem um crescimento vegetativo contínuo.

O nhemba é cultivado em consociação com cereais como milho, mapira e mexoeira (Singh e Rachie, 1985) ou em monocultura; pode também ser cultivado em consociação com mandioca (Libombo, 1990 citando Nogueira e Silva, 1988)

### 2.2. Bacterioses

#### 2.2.1. Patogenicidade e sintomatologia

Bactérias fitopatogénicas não formam esporos de resistência (endosporos) embora possam apresentar cápsulas e camadas mucilaginosas mais resistentes à influências externas mantendo assim a sua viabilidade por longos períodos (Galli, 1978). A ausência de endosporos favorece a necessidade duma dispersão directa e rápida (Allen, 1983).

Duas propriedades determinam a fitopatogenicidade das bactérias:

1 - Agressividade ou capacidade de penetrar, sobreviver e disseminar-se dentro da planta hospedeira.

2 - Toxicidade ou capacidade de produzir substâncias tóxicas no tecido e as endotoxinas as quais são maioritariamente partes integrantes da parede celular e liberta-se após a morte da bactéria (Janse, 1991).

Elas não são capazes de atravessar a epiderme intacta pois não possuem enzimas para destruir a cutícula e facilitar-lhes a passagem. Elas podem penetrar nas plantas através de feridas ou aberturas naturais: Estomas, lentículas, hidátodos, nectários, tricomas etc. Podem ainda entrar através dos botões florais uma vez que estes órgãos não são revestidas de cutícula (Margarida, 1980).

A planta como hospedeiro, apresenta susceptibilidade e sensibilidade que podem ser observados através de sintomas. A ocorrência de sintomas depende da sua estrutura, factores externos, capacidade de reacção e mecanismos de defesa (Janse, 1991). Esses sintomas são padronizados e agrupados no sentido de facilitar o diagnóstico (Galli, 1978) e podem ser classificados de diferentes maneiras.

Janse (1991) classificou os sintomas com base no tipo de danos causados em:

- 1 - Redução da superfície de assimilação por amarelecimento e necrose. Exemplo Xanthomonas campestris pv. vesicatoria no tomateiro.
- 2 - Morte de órgãos ou da planta inteira: Pseudomonas syringae pv. syringae pode matar flores, folhas, botões e rebentos no feijão vulgar.
- 3 - Murcha, quando o sistema vascular é afectado: Pseudomonas solanacearum na batateira e outras plantas.
- 4 - Mal formação e diminuição do crescimento com especial referência de tumores causados por Agrobacterium tumefaciens em Péssegos.

### 2.2.2. Propagação e sobrevivência

Está na origem da disseminação ou propagação duma bacteriose a utilização de sementes infectadas, material de propagação vegetativa proveniente de plantas doentes, efeitos de agentes atmosféricos como o vento e a chuva que transportam o exsudato bacteriano que escorre das aberturas de feridas; acções de insectos e nemátodos; alfaias agrícolas bem como água de rega

(Margarida, 1980) e o solo levantado pelo vento sob condições secas (Allen, 1983 citando Burke, 1957 e Clafin et al., 1973).

A sobrevivência duma bactéria pode operar-se na semente, quer externamente aderente à superfície quer internamente; no material vegetal, por exemplo, sob forma de cancro bacteriano; epifiticamente à superfície dos órgãos aéreos de plantas sãs, no solo, tanto em detritos e restos de culturas anteriores, assim como saprofiticamente (Margarida, 1980).

### 2.2.3. Importância económica

As bacterioses tem grande importância pelos prejuízos causados nas culturas. Entre 1860 a 1880 no Leste e Nordeste do Brasil houve ocorrência de epidemias sucessivas de gomose de cana-de-açúcar provocada pela bactéria Xanthomonas vasculorum a qual levou a destruição completa dos canaviais existentes (Galli, 1978).

X. malvacearum, já causou perdas calculadas entre 18% a 38% da produção potencial de algodão na Nigéria (Campos, 1960).

As perdas económicas causadas por Xanthomonas Campestris pv. vignicola no feijão nhemba são superiores a 25% de rendimento (Allen, 1983).

O crestamento bacteriano foi pela primeira vez encontrado nos E.U.A. em 1931 e até 1964 já era reportado na Tanzânia. Sabe-se que a doença ocorre também no Quênia, na Etiópia, Zâmbia, Camarões, Alto Volta, Níger e Nigéria (Allen, 1983 citando Ekpo, 1979).

Os seus sintomas primários são pequenos pontos ou manchas aquosas na página inferior das folhas (Williams, 1975) os quais permanecem pequenos mas o tecido à volta torna-se necrótico e é de cor castanho alaranjado. Áreas necróticas das folhas bastante infectadas coalescem para formar largas lesões que retêm as manchas escuras individuais da infecção inicial (Singh e Rachie, 1985).

O patógeno infecta também o caule e o pedúnculo. Assim provoca que as vagens ficam moles e dessas as bactérias entram nas sementes. Na Índia, a transmissão desta doença pela semente, causa mortalidade de plantulas. A dispersão secundária causa apenas manchas foliares (Allen, 1983 citando Shekhawat e Patel, 1977).

O patógeno é transmitido através da semente e é disperso pela chuva e solo transportado pelo vento, insectos e restos de plantas infectadas (Allen, 1983 citando Kaiser e Vakili, 1978; Copr, 1981).

As lesões da pústula bacteriana começam como pequenas manchas aquosas na superfície inferior das folhas. Depois as manchas alargam-se tornando-se ligeiramente circulares (1-3 mm de diâmetro) (Williams, 1975).

Quando novos, surgem como pústulas aquosas na página inferior das folhas e como manchas necróticas castanho-escuras na página superior. As pústulas velhas são largas e tornam-se secas, deprimidas no centro, e aquosas à volta da margem.

As folhas consideravelmente infectadas tornam-se amarelas podendo observar-se uma queda total destas nas variedades susceptíveis (Singh e Rachie, 1985).

A pústula bacteriana é por vezes confundida com ferrugem cor de rosa (*Phakopsora pachyrhizi*) mas ela é caracterizada pelas suas pústulas cónicas e não oleosas como acontece com a ferrugem (Singh e Allen, 1979). Segundo Singh e Rachie, (1985) citando COPR (1981), o patógeno origina da semente e dispersa rapidamente durante o tempo chuvoso ou em condições de rega por aspersão.

#### 2.2.4 Resistência e controle

Allen (1983) citando vários autores refere que já foram identificadas variedades resistentes tanto ao crestamento bacteriano como à pústula bacteriana. Muitas variedades combinam resistência a várias doenças. Para ambas bacterioses, a hipersensibilidade controlada por genes dominantes ou recessivos e a resistência parcial, expressa por redução do desenvolvimento da doença, são os dois mecanismos de resistência reconhecidos.

Segundo Margarida (1980) podemos dividir os meios de luta contra bacterioses em 5 aspectos:

- 1 - Utilização de variedades resistentes
- 2 - Utilização de sementes e plantas sãs
- 3 - Uso de práticas culturais
- 4 - Erradicação da doença (tirando e destruir as plantas doentes)
- 5 - Luta química

Esses métodos podem ser utilizados, de acordo com a situação concreta, isoladamente ou combinados.

### 2.3 Terminologia (Viégas, 1979)

Raça biológica = Grupo de indivíduos dentro da variedade, que apenas se separam por umas tantas reacções fisiológicas diferentes (morfologicamente esses indivíduos não se distinguem uns aos outros)

Estirpe = Descendência de um vegetal (quando não se tem muita certeza donde proveio)

Variedade = Hierarquia botânica de âmbito menor que o de uma espécie. Grupo cujos caracteres não são suficientes para serem tomados como espécie

Patovariedade = variedade do patógeno, definida na base de características patológicas

Categorias taxonómicas :(Dr. Rao, 1993, comunicação oral)

Género

Espécie

Sub-espécie /variedade

Raça      Estirpe= strain

Biotipo

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Isolamento do patógeno

##### 3.1.1 colecção e exame do material infectado

Foram colhidas amostras de folhas frescas e intactas revelando sintomas da pústula bacteriana em sacos plásticos para manter o seu estado fresco.

A confirmação da presença de bactérias nos locais de infecção foi feita mediante o Teste de Ooze:

Cortou-se um pedaço de tecido foliar infectado através duma lamina de barbear limpa. O pedaço foi colocado sobre algumas gotas de água destilada numa lamina e em seguida coberta por uma lamela. Examinou-se imediatamente a preparação sob um microscópio binocular, ampliação 200x. Na ausência do microscópio, (no campo) fez-se o mesmo teste deixando-se 2 a 3 minutos a lamina depois de cobri-la com a lamela, para permitir que houvesse difusão massiva das bactérias e no fim examinou-se a lamina erguendo-a entre o polegar e o indicador, para o espaço .

##### 3.1.2 Preparação dos meios de cultura

Usando uma balança normal de precisão igual a 0,1 gramas, pesou-se cada uma das substâncias nas quantidades indicadas em gramas:

###### a) Nutriente Agar ( N.A.) .

Peptone-----10.0

Beef-extract----- 5.0

Agar-----20.0

###### b) Meio de King (KB)

Proteose Peptone 3 (Difco)-----20.0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O----- 1.5

Mgso4.7H2o----- 1.5

Agar-----15.0

Glicerol-----15.0 ml

c) GYCA

Yeast extract-----10.0

Glucose-----20.0

Calcium carbonate-----20.0

Agar-----20.0

Para cada meio, na sequência indicada de substâncias, misturou-se num balão, juntando água destilada (AD) até perfazer um litro .

Cozeu-se em Banho-Maria durante uma hora e meia à temperatura de 100°C . O meio foi transferido para um frasco de vidro no qual foi esterilizado .

A esterilização dos meios de cultura foi feita em calor húmido, numa autoclave a 15 P.S.I. e temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

O meio de cultura já esterilizado, em condições de assépcia, foi lançado para placas de Petri ou para tubos de ensaio, ainda morno. Entre 20 - 30 mililitros foram lançados em cada placa de Petri e 7-8 mililitros em cada tubo de ensaio. A inclinação dos tubos de ensaio foi feita imediatamente sob placas de madeira de formato apropriado e num ângulo de inclinação de cerca de 30° de modo a permitir que o meio de cultura oferecesse longa superfície para o crescimento de bactérias. As placas foram invertidas logo após a solidificação do meio.

A conservação do meio de cultura para o uso posterior foi feita numa Geleira à temperaturas entre 5 e 8°C e em casos de necessidade, a dissolução foi feita em Banho-maria a 100°C.

A esterilização de material de vidro: Placas de Petri, Pipetas, Frascos, Copos e tubos de ensaio, foi feita em ar quente e seco numa estufa à temperatura de 160°C durante uma hora. No caso de material metálico que inclui : Lâminas de barbear, agulhas, e ança ou anel de inoculação fez-se a esterilização sob a chama de uma lamparina, expondo o material até ficar avermelhado, previamente à altura da sua utilização .



### 3.1.3 Isolamento em diferentes meios de cultura

Depois da confirmação da presença de bactérias nos locais de infecção foram seleccionadas das folhas lesões jovens ainda em desenvolvimento para prevenir quantidades enormes de saprófitos possíveis contaminantes nas placas de isolamento.

Em seguida, cortou-se pequenos pedaços (1x1 centímetros incluindo a lesão) usando uma lamina de barbear esterilizada. Os pedaços foram transferidos para uma série de três placas de petri. A primeira, contendo dicloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) a 0.1% concentração para esterilização da superfície. Nesta placa os pedaços foram mergulhados na solução entre 1-2 minutos. Com ajuda duma Pinça esterilizada transferiu-se os pedaços sucessivamente para as restantes placas contendo ADE para a lavagem. " A esterilização da superfície dos pedaços elimina possíveis contaminantes de natureza saprofítica (Shekhawat, 1972). Depois disto, os pedaços foram transferidos para a superfície duma lamina previamente esterilizada contendo duas a três gotas de água destilada e esterilizada ( ADE ). Sobre essa superfície, masserou-se o pedaço com auxílio duma lamina. A suspensão resultante foi deixada dois a três minutos para permitir a difusão de bactérias para fora do tecido. Assim obtida a suspensão, seguiu-se a sementeira em placas de petri. Foram utilizados três meios de cultura diferentes (Ver 3.1.2) e três placas para cada meio. Uma ança de inoculação cheia de suspensão foi semeiada em cada placa obedecendo a técnica de assépcia.

Após a sementeira, as placas foram tapadas com outras placas, marcadas (através duma caneta de filtro) e encubadas à temperatura do laboratório ( 25-28 °C ) numa posição invertida durante 3 a 4 dias. Após a sementeira, as placas foram tapadas com outras placas, marcadas e encubadas à temperatura do laboratório, ficando depois numa posição invertida durante 3 a 4 dias.

### 3.2 Crescimento em diferentes meios de cultura

A fim de encontrar um meio de cultura adequado para a multiplicação desta bactéria até se obter em quantidades suficientes para inocular as plantas, foram testados três meios de cultura para se observar qual entre eles, favorecesse a um crescimento melhor. Uma ança cheia de inóculo puro, foi semeiada em três placas, sucessivamente, de cada um dos meios anteriormente referidos.

Para a conservação, inóculo foi transferido sob condições de assépcia (Chama de uma Lamparina) para tubos de ensaio contendo meio de cultura (GYCA) de superfície inclinada. Uma

ança de inóculo foi depositada em cada tubo de ensaio. Os tubos foram conservados à temperatura do laboratório 25 a 28 °C para o crescimento das bactérias e 3 dias mais tarde transferidos para a Geleira ( 6-8 °C )

### 3.3. Teste de Patogenicidade

A inoculação de plantas em vasos tinha em vista os seguintes objectivos específicos:

1. Provar a patogenicidade do agente bacteriano isolado.
2. Testar a eficácia de diferentes métodos de inoculação no desenvolvimento de sintomas da pústula bacteriana.
3. Observar possíveis variações de sintomas entre as variedades.

Assim, foram considerados quatro vasos (ver anexo 2) com solo misturado (uma parte, solo de Umbeluze, rico em nutrientes e outra parte constituída pelo solo local) para compensar a estrutura compacta do primeiro. A mistura foi numa proporção de 50% peso.

Cinco sementes foram lançadas em cada um dos quatro vasos de cada variedade . Os vasos foram regular e suficientemente regados desde o dia da sementeira. O desbaste consistiu na eliminação de duas das cinco plantas germinadas deixando-se as restantes três com maior vigor garantindo-se deste modo melhor uniformidade das plantas.

#### 3.3.1 Preparação da suspensão bacteriana

Preparou-se uma suspensão bacteriana usando culturas de 48 horas crescendo à temperatura da incubadora ( 25-28 °C ) e em tubos de ensaio com GYCA inclinado . Juntou-se AD até encubrir o meio de cultura. Deixou-se 3 a 4 minutos para difundir as bactérias na água. Depois, agitou-se os tubos rodando-os entre as palmas das mãos e imediatamente, transferiu-se a suspensão para um pequeno pulverizador manual de capacidade volumétrica igual a 110 mililitros. Dois tubos de suspensão foram usados para um só pulverizador e em seguida encheu-se com AD. Tapou-se e agitou-se ligeiramente para homogenizar a suspensão.

### 3.3.2 Inoculação sob diferentes métodos

**Spray:** Folhas tenras seleccionadas, mas sem arranca-las, foram cuidadosamente pulverizadas com a suspensão bacteriana na sua página inferior.

**Smear:** A suspensão de bactérias obtida tal como se descreveu anteriormente, foi transferida depois de uma agitação prévia para uma placa de petri. Na altura de inoculação e usando uma porção de algodão absorvente, ungiu-se cuidadosamente a página inferior das folhas jovens evitando a sua danificação.

**Pin-Prick:** Além dos procedimentos do método anterior, através dum sistema de dez agulhas finas transpassadas numa esponja, picou-se três vezes o limbo na sua superfície inferior facilitando dessa maneira a penetração das bactérias.

Para cada método foi usado único vaso com três plantas e um outro para controle em que apenas foi inoculada àgua destilada.

Espetou-se verticalmente no centro de cada vaso, uma pequena vareta de madeira para suportar um plástico interiormente humedecido com àgua através dum pulverizador. Assim, todas as plantas foram totalmente cobertas por sacos plásticos durante 24 horas . Ainda para conferir alto teor de humidade na superfície foliar, as plantas foram pulverizadas com àgua, três vezes ao dia no decurso da experiência. Neste teste foram utilizadas plantas de um mês e meio de idade.

### 3.4 Susceptibilidade das folhas em função da sua posição na planta

Em duas variedade de feijão nhemba, Timbawene Creme e IT-18, fez-se inoculação de folhas de posições diferentes na planta, segundo o método Smear. Três folhas por ramo foram inoculadas alternadamente, começando da extremidade do ramo. Dois ramos foram inoculados com a bactéria e terceiro serviu de testemunho, tendo sido inoculado somente com àgua.

### 3.5 Espectro de ataque a outras leguminosas

Com vista a estudar o espectro de ataque do agente causal da PB dentro da família das leguminosas, sob sistema de cultivo em vasos, conforme se descreveu para as variedades de feijão nhemba, sete outras espécies de leguminosas foram testadas inoculando as plantas segundo dois métodos, smear e spray. As espécies experimentadas são as seguintes: Vigna subterranea (feijão jugo), Vigna radiata (f. holoco), Phaseolus vulgaris (f. manteiga), Cajanus cajan (f. boer), Glicine max (soja), Mucuna pruriens (f. mascate), e Cyamopsis tetragonoloba.

### 3.6 Experiência de conservação em GYCA (meio de cultura)

Nove tubos de ensaio com meio inclinado (GYCA) contendo culturas bacterianas de 48 horas, foram colocadas numa Geleira à temperatura de 6-8 °C . Em períodos de sete dias, um tubo fora retirado . Deste modo e através dum anel de inoculação, transferiu-se inóculo para fazer crescer em três novos tubos enclinados com GYCA os quais foram depois encubados à temperatura do laboratório durante 48 horas.

### 3.7 Descrição da doença e avaliação para resistência

#### 3.7.1 Sementeira e cuidados culturais

O ensaio foi realizado durante a campanha agrícola de 1992/93 no campo experimental da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal da Universidade Eduardo Mondlane.

A fim de testar a sua resistência a PB foram usadas as mesmas sete variedades anteriormente utilizadas para o teste de patogenicidade.

O delineamento experimental que foi adoptado para o ensaio é o de Blocos Completos

Casualizados (Gomez & Gomez, 1984) em três repetições conforme se mostra no anexo 3.

A preparação do campo e a respectiva sementeira, foram realizados durante a primeira quinzena de dezembro. Após a lavoura, três sementes de cada variedade foram lançadas por covacho, num compasso variável de acordo com o tipo de variedade como se pode ver no anexo 4.

Alguns cuidados culturais considerados durante o ensaio incluem:

Rega: foi usado um regime de rega por aspersão (60\_80 milímetros) repetida em cada três dias ao longo do período cultural excepto nos dias suficientemente chuvosos.

Desbaste: o campo foi sachado duas vezes durante o período de cultura. A primeira sacha foi três semanas após a sementeira e segunda, quatro semanas mais tarde. Um dia antes de inocular as plantas com o agente causal da PB, eliminou-se uma, das três plantas em cada covacho, seleccionando-se deste modo as de crescimento anormal a favor daquelas de maior vigor e mais uniformes no crescimento.

Controlo de pragas e outras doenças: embora algumas plantas em determinadas variedades se revelassem com sintomas de crestamento bacteriano e viroses foram muito poucas plantas e também a níveis de ataque bastante insignificantes. Afídios, tornaram-se casos relevantes com ataque ligeiro entre a quinta e a sexta semanas após a sementeira. Por isso que ápices das plantas e páginas inferiores das folhas foram pulverizadas com Basudine (dose igual a 2 mililitros por litro de água) para 400 litros de calda por hectar (Recomendado por Dr. Piet, 1993. Comunicação oral).

### 3.7.2 Preparação do inóculo e inoculação

Folhas de feijão nhemba (variedade IT\_18) com infecções jovens foram colhidas em sacos plasticos. Auxiliando-se dum faca e sobre uma mesa de madeira, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços que em seguida foram masserados num Osterizer (máquina de masseração) com adição de 500 ml de água da torneira até formar-se uma suspensão. A mesma foi depois filtrada para um pulverizador de costas com capacidade para 15 litros. A filtração foi através dum crivo que retinha as partículas de tecido foliar que por sua vez poderiam impossibilitar a passagem da parte líquida através do canal do pulverizador. No fim, juntou-se água da torneira até perfazer 10 litros. Este trabalho foi repetido três vezes correspondendo a 10 litros de suspensão por cada bloco

experimental completo.

As plantas foram inoculadas numa tarde para evitar a dissecação das bactérias durante o dia por um lado e facilitar a entrada das mesmas via estomas abertos na manhã seguinte. Por outro lado isto foi realizado seis semanas após a sementeira e segundo o método de pulverização (spray) foliar. Até esta altura nenhuma planta se revelava com sintomas da doença.

### 3.7.3 Descrição da doença e outros parâmetros

Para a descrição dos sintomas da PB, foram colhidos cinco folíolos infectados em cada talhão nas três repetições sucessivamente. Os folíolos de cada talhão foram conservados num saco plástico marcado a caneta de filtro, para manter o seu estado fresco na altura de caracterização e facilitar o reconhecimento da variedade da qual foram colhidas. Descrições de forma e cor das pústulas foram feitas com auxílio duma Lupa de mão de ampliação dez vezes.

A fim de determinar a eficiência do método de inoculação no campo, foi avaliado o número de plantas infectadas que nos resultados será dado como incidência e expressa em percentagem.

A intensidade da doença nas diferentes variedades foi avaliada como o número de folhas caídas a partir do dia de inoculação. Este método é aplicado pela primeira vez na avaliação para a resistência à PB e está baseado no facto de que : " Folhas severamente infectadas, tornam-se cloróticas e caem prematuramente ( Williams, 1975 )". Assim , nas duas linhas centrais de cada talhão ( apenas área útil ), todas as folhas caídas foram recolhidas em sacos plásticos marcados para em seguida serem contados uma por uma. A apanha de folhas foi feita de seis em seis dias, antes que as primeiras folhas a caírem ficassem detrioradas. A apanha de folhas só terminou na altura de colheita de vagens secas das variedades precoces.

Para a avaliação do rendimento colheu-se vagens secas para sacos de nylon marcados separadamente: As vagens da área útil para um lado e da restante parte do talhão para outro.

A secagem de vagens antes de debulhar foi feita à luz do sol durante dois dias.

A debulha consistiu na efectuação de batidas sucessivas das vagens, contidas num saco de nylon, por meio duma estaca. Depois separou-se a casca da semente com ajuda duma peneira manual.

Foram feitas pesagens de grão da área útil do talhão e também da restante parte do talhão. Sacos plásticos de peso previamente conhecido foram usados para as pesagens que por sua vez, foram feitas numa balança de precisão igual a 0,1. Neste processo, foi depois subtraído o peso do plástico. Além disso, foi assumido que o conteúdo de água nas sementes estivesse entre 9% e 11% do peso da semente. E no fim, o rendimento por talhão foi convertido a rendimento em toneladas por hectare.

O tratamento estatístico dos resultados foi feito num computador, programa de estatística agrícola Mstatc, versão 4.1 o qual reflete os princípios do delineamento experimental em Blocos Completos Casualizados descritos em Gomez & Gomez (1984).

### **3.8 Teste de transmissão de patógeno através da semente**

Catorze vasos com solo extraído de uma profundidade de cerca de 20 centímetros foram usados para a sementeira. Este solo, confere melhor segurança no que se refere a possível transmissão do patógeno através do solo se o compararmos com o solo obtido à superfície. Cinquenta sementes de cada variedade foram lançadas por vaso num total de 100 sementes por variedade. Os vasos foram regular e suficientemente regados. Com um Pulverizador manual, as plantas foram regadas duas vezes ao dia, molhando totalmente as folhas a fim de oferecer condições húmidas apropriadas para o desenvolvimento da doença. As observações foram feitas ao longo de um mês.

### **3.9 Estudo comparativo de patógenos de PB e CB**

Embora o estudo estivesse essencialmente virado para o patógeno de PB, convista a clarificação de alguns aspectos ligados a relação taxonómica entre os dois patógenos, foi paralelamente estudado o patógeno de CB. As mesmas metodologias utilizadas na colecção de amostras, no diagnóstico, isolamento e crescimento em diferentes meios culturais foram igualmente aplicadas para este agente

patogénico.

Ainda mais, os dois patógenos foram inoculados repetidas vezes, tal como se descreveu para o agente de PB em duas culturas: feijão nhemba e feijão manteiga.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento do Patógeno

#### 4.1.1 Teste de Ooze

Do agente causal de PB foi observada uma massa neblada de células bacterianas saindo lentamente ao longo de toda a margem cortada do tecido foliar. Assim, pela difusão marginal não localizada das bactérias do tecido para fora, (ver anexo 5 Fig.2) podemos afirmar segundo Shekhawat, (1972) que a doença é de origem bacteriana e é de natureza parenquimatosa.

#### 4.1.2 Isolamento em diferentes meios de cultura

As placas foram observadas depois de 48 horas. Numerosas colónias pequenas, circulares, consistentes, elevadas e amanteigadas tinham se desenvolvido, entre outras diferentes, tanto no meio de King como em N.A . No meio de cultura GYCA, colónias deste tipo eram já maiores coalescendo com colónias de saprófitos dificultando assim a possibilidade de isolar culturas puras. Este meio é muito rico em açúcar na sua composição provavelmente daí que o crescimento bacteriano tenha sido abundante. Além disso, a sua opacidade e principalmente a cor tornam difícil a distinção de colónias de Xanthomonas, tal como Fahy e Parseley (1983) se referiram. Por isso, este meio é inadequado para fins de isolamento de Xanthomonas spp.



## 4.2 Crescimento em diferentes meios de cultura

A Tabela 2 no anexo 6 mostra que há crescimento nos diferentes meios de cultura. As diferenças no tamanho das colónias que se podem observar nos diferentes meios possivelmente tem a sua origem no conteúdo de carboidratos disponíveis em cada meio. GYCA, contém açúcar (glucose) na forma disponível para utilização imediata pelas bactérias no metabolismo e conseqüentemente o seu rápido crescimento. E os restantes são os chamados "meios mínimos" para sustentar o crescimento das bactérias devido ao baixo conteúdo de açúcar (Dr. Rao, 1993. Comunicação oral). Nisto, deve ter influência também a eficiência do regulador de pH evitando a acumulação dos ácidos orgânicos resultantes do metabolismo bacteriano os quais por sua vez contribuem na diminuição da taxa de crescimento das bactérias já que o pH optimal nestes meios é sete. Estas observações estão de acordo com as de Fahy e Perseley (1983), em que muitos dos *Xanthomonas spp.* crescem fracamente em N.A. mostrando contudo melhor crescimento em GYCA.

## 4.3 Teste de Patogenicidade

Do teste de patogenicidade resultou que:

O aparecimento de sintomas característicos de PB foi observado 3 a 4 dias depois da inoculação. As plantas-testes (não inoculadas com o patógeno) não apresentaram sintomas. Do re-isolamento a partir das plantas infectadas por inoculação os resultados mantiveram-se. Dessa maneira confirmou-se que aquele agente isolado é de facto o causador da PB.

Não houve diferenças observáveis de sintomas entre as variedades testadas.

Quanto aos métodos utilizados notou-se que, no caso de Pin-Prick a colonização da lamina foliar ocorrera rapidamente acelerando a severidade da doença. Isto levou ao amarelecimento e conseqüente perda rápida das folhas pelas plantas. Este método embora eficiente no que se refere ao desenvolvimento severo de sintomas, requiere muito cuidado ao picar o limbo de modo a evitar danos nas plantas.

No método smear, observou-se que a colonização da lamina foliar foi muito rápida, tendendo a elucidar os sintomas em apenas 72 horas após a inoculação. Ainda mais, ilustrou claramente o

estágio de forma de cabeça de agulha. O rigor do método na franqueza com que se deve fazer a inoculação permite para além da penetração de bactérias sem danificar o tecido foliar, maior eficiência no desenvolvimento da doença embora não seja muito prático para inoculação em muito material.

A pulverização (spray) não diferiu bastante do método smear quanto aos resultados produzidos. Porém a pressão na qual se faz a pulverização é um factor relevante para evitar a destruição do tecido foliar e pode ser regulada através da aproximação ou afastamento do escape de suspensão da folha a ser inoculada. Portanto, conclui-se que em todos os métodos é possível observar sintomas típicos da doença. Nos sintomas típicos, ocorrem exactamente as mesmas alterações na inoculação artificial das plantas como se fosse na natureza (Shekhawat, 1972) e por isso, qualquer dos métodos é eficaz para a inoculação do agente da PB desde que se observem os cuidados necessários.

#### **4.4 Susceptibilidade das folhas em função da sua posição na planta**

Desta experiência verificou-se que as folhas junto a extremidade do ramo desenvolvem primeiro a infecção (em 3 dias) do que as restantes que precisaram de 4 a 5 dias. No entanto, as restantes folhas também foram infectadas embora o tempo necessário para o aparecimento de sintomas tivesse aumentado com a posição da folha no ramo. Estes resultados estão de acordo com Fahy e Persly, (1983). Segundo estes autores, a inoculação deve ser feita em tecidos vegetais imaturos ainda em desenvolvimento rápido e que quando o tecido atinge a maturidade torna-se resistente à infecção. Provavelmente, a resistência esteja relacionada com as mudanças na concentração de carboidratos ao longo da maturação (Tarr, 1972). Alto teor de açúcares e fragilidade do tecido nas folhas jovens justifiquem possivelmente esta preferência do patógeno. Daí poder se concluir que a doença é do tipo HSD (high sugar disease), aliás o resultados do crescimento em meios culturais com diferentes conteúdos em açúcares confirmam esta ideia (Ver Tabela 2 anexo 6).

#### 4.5 Espectro de ataque a outras leguminosas

Fez-se observações semanais durante um mês e meio e nenhum sintoma de doença de origem bacteriana foi observado. Este resultado indica a grande especificidade do patógeno na sua relação com o hospedeiro. Allen (1983) ressalta no espectro de ataque de *X.C. pv. vignicola* às culturas que este ataca feijão manteiga e feijão holoco. No entanto, o patógeno estudado revela não atacar estas culturas afastando ainda mais a hipótese de ser a mesma patovariedade a causar tanto PB como CB.

#### 4.6 Experiência de conservação de bactérias de PB em GYCA

Depois de onze semanas de permanência na Geleira, à temperatura entre 5-8°C, verificou-se que ao transferir o inóculo para novos tubos de crescimento, já não se podia observar multiplicação de bactérias. Assim, concluiu-se que o tempo de conservação sob as condições descritas é de cerca de onze semanas.

#### 4.7 Descrição da doença e outros parâmetros.

Ataque: O agente da PB ataca essencialmente as folhas embora outros órgãos nomeadamente o caule e as vagens também sejam atacados. Sintomas iniciais e tardios podem ser vistos na Fig.4, anexo 7.

Os sintomas desta doença tem dois estagios distintos:

a) Estágio de cancro ou verdadeiras pústulas: Abrange os sintomas Iniciais desta doença que se descrevem como, pequenas pústulas de diâmetro compreendido entre 0,5 e 1,0 milímetros, elevadas em forma de cabeça de agulha, margens circulares, exsudando água e com brilho verde escuro. Geralmente aparecem numerosas e distribuídas ao longo de toda a superfície foliar na sua parte inferior ( ver Fig.5 anexo 8 ). Observadas contra a luz , as pústulas diferenciam-se como centros castanhos rodeados por uma zona clorótica verde amarelada.

b) Estágio de Mancha ou Queima: Inclue os sintomas tardios, em que as pústulas convertem-se em pequenas manchas irregulares, proeminentes nas duas páginas da folha com 1 a 4 milímetros de diâmetro. Tendem a tornar-se ásperas mas relativamente lisas e adquirem a cor castanha escura. As margens cloróticas em torno do centro tornam-se menos significantes como sintomas. Gradualmente os centros tornam-se claros ou translúcidos rodeados por margens escuras. Neste estágio, as pequenas manchas assumem aparência rugosa e coalescem. A área foliar infectada fica "queimada" (ver Fig.6 anexo 9). Esta fase da doença pode ser designada fase de queima embora as margens ainda se mostrem com sintomas característicos de cancro os quais não são típicos da queima bacteriana para suscitar confusão no diagnóstico.

Durante o período quente, é comum ver-se nos campos com nhemba ambos estágios da doença co-existindo na mesma folha. No entanto, nos princípios da época fria começam a prevalecer infecções velhas nas folhas predominando assim o estágio de mancha até ao fim da cultura.

Em ambos casos as folhas depois de amarelecidas, caem deixando os pecíolos ainda firmes no caule e que só mais tarde é que caem.

Outros parâmetros incluem a incidência da doença, a severidade da doença e o rendimento da cultura no ensaio.

A incidência caracteriza por um lado a habilidade de progressão do patógeno na cultura infectando novos tecidos ou novas plantas, por outro lado, é a medida da eficácia do método de inoculação aplicado. Assim, pode se depreender claramente a partir da Fig.7, anexo 11 relativa à Tabela 3, anexo 10 que embora em algumas variedades a incidência fosse baixa (abaixo de 50%) no fim dos primeiros seis dias após a inoculação, veio a aumentar de tal maneira que no fim de doze dias após a inoculação, 100% de plantas estavam infectadas. Isto significa por um lado que o patógeno possui alta capacidade de incidir em novos tecidos e colonizar e por outro lado sob as condições do ensaio o método spray foi eficaz para o estabelecimento da doença no campo.

A severidade da doença no campo foi usada como medida de avaliação para a resistência e a Tabela 4, anexo 12 mostra os valores ( não tratados ) das folhas apanhadas no chão, por variedade e replicação ao longo de cerca de quatro semanas. A Tabela 5, anexo 13 são os valores anteriores já tratados ou agrupados podendo se ler os totais e as médias das folhas apanhadas por replicação e por variedade.

Os mesmos valores são ainda tratados na Tabela 6 anexo 13 para a determinação do coeficiente de variação (cv). O valor de cv encontrado é igual a 17,74% e significa que a avaliação foi

experimentalmente precisa e daí poder afirmar-se que o ensaio foi experimentalmente bom.

A Tabela 7 anexo 14 mostra as médias das folhas apanhadas no chão em cada variedade e também ilustra a comparação das médias através de letras que partem da média mais alta (A) até a média mais baixa (D). As variedades cujas médias não mostram diferenças significativas em termos estatísticos são representadas por uma letra comum. Ao contrário, as variedades com médias significativamente diferentes são representadas por letras também diferentes. Assim, a variedade IT-18 é significativamente mais susceptível à PB do que as variedades Timbawene creme e Timbawene violeta. Estas duas, são por sua vez menos susceptíveis do que as variedades: INIA-16, INIA-73 e IT-812 as quais não diferem significativamente de IT-18 e INIA-36.

Também se pode ver a partir das médias que as variedades ilustradas com a letra D, apresentam o nível relativamente mais baixo de susceptibilidade podendo por isso designar-se mais tolerantes do que as outras.

A Tabela 9 anexo 15 mostra o rendimento por hectare para cada variedade. As variedades Timbawene creme e Timbawene violeta são aparentemente as menos rentáveis. Isto é devido ao facto de não ter sido colhido todo o grão uma vez que estas variedades tem ciclo longo e por isso a produção relativamente tardia das vagens. A colheita foi interrompida com a total maturidade das vagens de variedades de ciclo curto, altura em que cessou a avaliação para a resistência. Também pode ser visto na Tabela 10 anexo 16, o peso de 100 grãos de semente seca.

#### 4.8 Teste de transmissão do patógeno através das sementes

A germinação foi mais de 95% em cada vaso da experiência. Não houve desenvolvimento de sintomas de PB nas plantas germinadas. Este resultado está de acordo com os resultados de Allen (1983) segundo os quais, muitas infecções desenvolvem-se a partir de sementes com sintomas pouco severos ou mesmo ausentes. Por outro lado, os resultados vem confirmar a baixa frequência de vagens infectadas observada no campo. Aparentemente as sementes testadas não estavam infectadas. Importante ainda é referir que este ensaio foi desenvolvido já no início da época fria a qual é menos apropriada para o desenvolvimento da doença. Também pode ser que o patógeno se encontrasse na

" Fase Residente" ou de inactividade. Fase na qual a bactéria nociva não manifesta a sua patogenicidade (Laben, 1974). Assim, apesar destes resultados, não se exclui o facto de ser uma doença transmitida pela semente conforme Allen (1983) e outros autores se referem e é esta maneira de propagação que deve estar na origem da sua larga distribuição .

#### 4.9 Discussão sobre a taxonomia do agente causal da doença

##### Natureza do ataque:

O teste de Ooze para o diagnóstico de bacterioses não deixa qualquer dúvida quanto a natureza de ataque manifestada pelos dois patógenos. O agente causador da pústula bacteriana manifesta um ataque de natureza parenquimatosa enquanto que o de crestamento bacteriano mostra um ataque de natureza vascular.

##### Espectro de ataque:

O patógeno da pústula bacteriana não ataca feijão holoco e feijão manteiga. Mas estas culturas são atacadas por *X.C. pv. vignicola*, agente causal do crestamento bacteriano. Isto demonstra que o patógeno da PB exclui pelo menos dois hospedeiros naturais do patógeno do CB . A inoculação na cultura de feijão manteiga revelou que este hospedeiro pode diferenciar os dois patógenos uma vez que é atacado pelo patógeno de CB e não pelo patógeno de PB.

A inoculação dos dois agentes na cultura de feijão nhemba mostrou que sob iguais oportunidades e condições de acesso para infectar novos tecidos, os sintomas resultantes são diferentes:

As manchas de CB desenvolvem uma zona clorótica larga e pronunciada ou significativa. Porém as manchas de PB apresentam áreas cloróticas insignificantes ou muito menos pronunciadas.

Allen (1983), aponta para além dos já mencionados, uma série de outros aspectos que marcam ainda mais as diferenças entre os dois patógenos, conforme se pode em seguida.

##### Origem da doença:

O CB foi reportado pela primeira vez nos Estados Unidos da América, em 1931. As primeiras colecções do patógeno da pústula bacterina datam de 1964 na Tanzania (África).

Crescimento em meios de cultura:

Os isolados de PB, tendem a crescer menos do que os isolados de CB em determinados meios culturais

Ecologia da doença:

Há evidências de que o patógeno de CB é melhor adaptado para savanas secas do que o da PB.

Reacção genética do hospedeiro:

Há indicações de que as fontes de resistência genética que o hospedeiro utiliza contra o agente de PB são diferentes das que utiliza contra a PB.

Portanto, essas diferenças todas são bastante suficientes para elucidar que a PB não é causada nem por *X.C. pv. vignicola* (Ouko e Buruchara, 1983) nem por estirpe de *X. C. pv. vignicola* (Allen, 1983). Trata-se de uma nova patovariedade conforme Patel e Jindal (1982), sugeriram. Só que, o nome *X.C. pv. vignaeunguiculatae* sugerido por estes autores, reflete para além do género, a espécie do hospedeiro o que não é muito frequente na nomenclatura de variedades patológicas. Tem sido comum a inclusão apenas do nome do género do hospedeiro como ocorre por exemplo em *X.C. pv. phaseoli* agente causal de cretamento comum no feijão manteiga. Além disso, o nome *Vignaeunguiculatae* é muito longo torna-se menos acessível ao uso corrente. Assim, mantendo a raíz do nome genérico do hospedeiro, reduzindo o comprimento do nome inicial, enaltecendo os sintomas da doença e diferenciando de *pv. vignicola*, sugere a modificação do nome para *X.C. pv. vignapústulae* Nova de Américo e Rao (1993).

#### 4. 10 Estudo comparativo de patógenos causadores de PB e CB

As Figuras 2 e 3 mostram claramente as diferenças que existem entre os dois patógenos quanto a natureza do ataque causado. O patógeno de CB apresenta-se como uma massa neblada de células bacterianas saíndo do mesmo foco ao longo da margem foliar cortada. Este facto reflete que o patógeno ataca o sistema vascular da folha. As células do patógeno de PB são também uma massa neblada escorrendo ao longo da margem foliar cortada, mas tem a particularidade de aparecerem não focalizadas. As células saem do parênquima ao longo de toda a margem cortada.

## 5.0 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A variedade patogénica que causa a pústula bacteriana é *X.C. pv. vignapústulae* Nova. Um estudo em que se use paralelamente isolados de CB e de PB de outras regiões é recomendável como via de reforço a esta conclusão. Um outro estudo mais aprofundado com vista a encontrar a relação taxonómica entre o agente bacteriano que causa crestamento no feijão manteiga e o que causa CB de feijão nhemba poderá ser levado a cabo.

O isolamento deste patógeno pode ser feito quer em Nutriente Agar quer em meio de King. Mas não é aconselhável o uso de GYCA para esses fins.

O meio de cultura GYCA, permite melhor crescimento de colónias da variedade patogénica que causa a PB, em relação a Nutriente Agar e King. Por isso, é o meio adequado para fins de multiplicação.

A conservação do patógeno causador de PB é viável apenas num período de onze semanas. Recomenda-se por isso a sua transferência para outros tubos até a décima semana ou então recorrer a outros métodos de preservação.

Qualquer destes métodos de inoculação, pin-prick, smear ou spray, resulta sintomas típicos quando aplicado para infectar plantas de feijão nhemba com o patógeno de PB. Mas no método smear os sintomas desenvolvem-se rapidamente (72 horas). Assim estes métodos são aplicáveis, desde que se observem os cuidados necessários.

O agente causal da PB desenvolve rapidamente sintomas típicos em folhas relativamente jovens do que nas velhas. Sendo assim, as folhas mais jovens são apropriadas para inoculação com finalidade de estudo. Por outro lado, delas se pode seleccionar infecções jovens no campo.

No espectro de ataque pelo patógeno de PB excluem-se as seguintes culturas: *Vigna subterranea*, *Vigna radiata*, *Phaseolus vulgaris*, *Cajanus cajan*, *Glicine max*, *Mucuna pruriens* e *Cyamopsis tetragonoloba*. Por essa razão, estas leguminosas podem ser recomendadas para rotação com feijão nhemba em campos com problemas sérios de pústula bacteriana.

As variedades Timbawene creme e Timbawene violeta são tolerantes à pústula bacteriana podendo por isso ser seleccionadas para o cultivo em épocas e/ou lugares potencialmente favoráveis ou com severo ataque desta doença, contrariamente às variedades INIA-16, INIA-36, INIA-73, IT-18 e IT-812 as quais são relativamente susceptíveis. As variedades tolerantes são, dentro de outras limitantes a considerar, uma fonte de genes para o desenvolvimento de novas variedades com certo grau de tolerância à pústula bacteriana.



## BIBLIOGRAFIA

- Allen, D.J. (1983). *The Pathology of Tropical Food Legumes. Disease Resistance in Crop Improvement*. 393 pp. Australia, Academic Press.
- Anon, (1992) *Tecnologia Agrícola, Variedades Recomendadas para multiplicação*. 8pp. Instituto Nacional de Investigação Agronómica. Moçambique.
- Bakumovsky & G.V. Ustimenko (1983). *Plant Growing in the Tropics and Subtropics*. 390 pp. Moscow, MIR.
- Campos, F.A. (1960). *Algumas notas sobre a Bacteriose dos Algodoeiros em Moçambique*, No. 124. 18 pp. Centro de Investigação Algodoeira, Lourenço Marques.
- Chilenge, F.X.R. (1990). *Comportamento de diferentes variedades de feijão nhemba (Vigna unguiculata L.) face ao ataque do Gorgulho (Callosobruchus sp)*. Trabalho de Diploma. Universidade Eduardo Mondlane. Moçambique.
- Fay, P.C. & Persley, G. J. (1983). *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. 393 pp. Australia, Academic Press.
- Galli, F. (1978). *Manual de Fitopatologia Vol.I. 2ª edição*. 373 pp. São paulo, Ceres LTDA.
- Gomez, A.K. & Gomez, A.A. (1984). *Statistical Procedures for Agricultural Research 2ª edição*. Canadá, John Wiley & Sons Inc
- Heemskerck, W. (1985). *Cultura do Feijão (Nhemba) Série-Agricultura 1*. 34 pp. Ministério de Agricultura. Moçambique.
- Heemskerck, W. (1987). *O regionalismo do feijão nhemba*. Série Agronomia 8. 16 pp. Instituto de Investigação Agronómica. Moçambique.

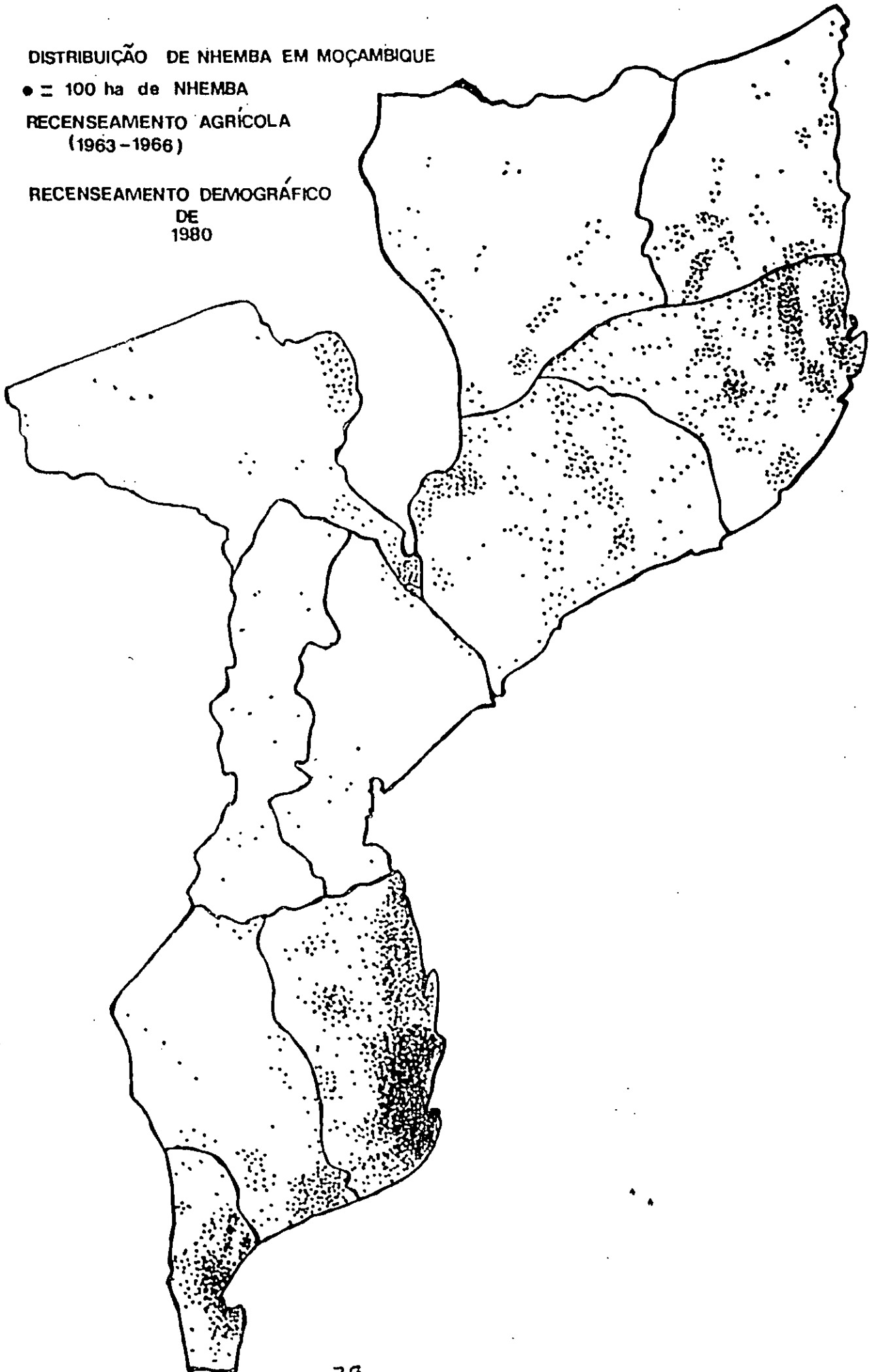
- Janse Ir.J.D. (1991); Introduction to Phytobacteriology,  
27 pp.. International Agricultural Centre, Wageningen , The Netherlands (Não publicado).
- Laben (1974) in Tsiantos, J. (1987) Journal of Phytopathology 119,(146-147). Berlim; Paul Parey Scientific Publishers.
- Libombo, M. (1990). A importância dos Trips no Feijão nhemba na Província de Maputo. 63 pp.. Trabalho de Diploma. Universidade Eduardo Mondlane. Moçambique.
- Margarida, B. (1980). Notas sobre Bactérias Fitopatogénicas. Edição A.E.A. 27 pp. Instituto Superior de Agronomia.
- Ouko, O.J. & Buruchara, R. A. (1989). Tropical Pest Management. 35(3) 297-300; Taylor and Francis Ltd.
- Saúde, C.C.N. (1990). Resistência genética contra Afídeos no feijão nhemba (Vigna unguiculata (L.) Walp.). 87 pp. Trabalho de Diploma. Universidade Eduardo Mondlane. Moçambique.
- Shekhawat, G.S. (1972). Plant Bacteriology & Phytobacteriological techniques. Vol.II. 79 pp. Indian Agriculture Research Institute; New Delli
- Singh, S.R. & O.J. Allen (1979). Cowpea Pests and Diseases. Manual series N° 2. 113 pp. International Institute of Tropical Agriculture. Nigeria.
- Singh e Rachie (1985) in Libombo, M. (1990) Importância dos Trips no Feijão Nhemba na província de Maputo. 63 pp. Trabalho de Diploma. Universidade Eduardo Mondlane. Moçamboque.
- Tarr, S.A.J. (1972). The Principles of Plant Pathology. 632 pp. Londres. MacMillan.
- Williams, R.J. (1975). Diseases of cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) in Nigéria. In: Pans, 21 (3) 257\_267.

Viégas, A.P. (1979). Dicionário de Fitopatologia e Micologia. 882 pp. Brasil. Ave Maria Ltda.

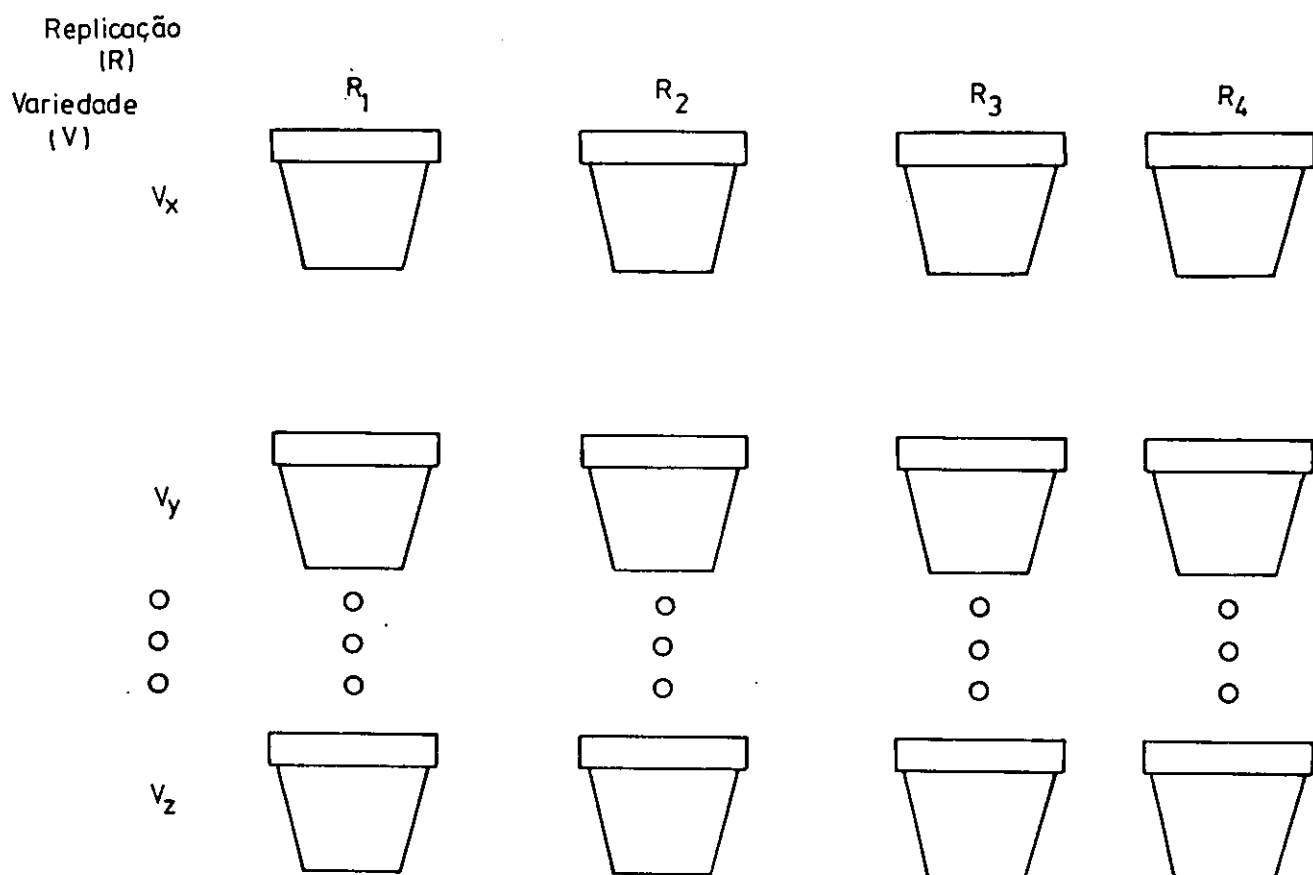
Fig. 1 : DISTRIBUIÇÃO DE NHEMBA EM MOÇAMBIQUE

● = 100 ha de NHEMBA  
RECENSEAMENTO AGRÍCOLA  
(1963-1966)

RECENSEAMENTO DEMOGRÁFICO  
DE  
1980



Esquema da disposição dos vasos



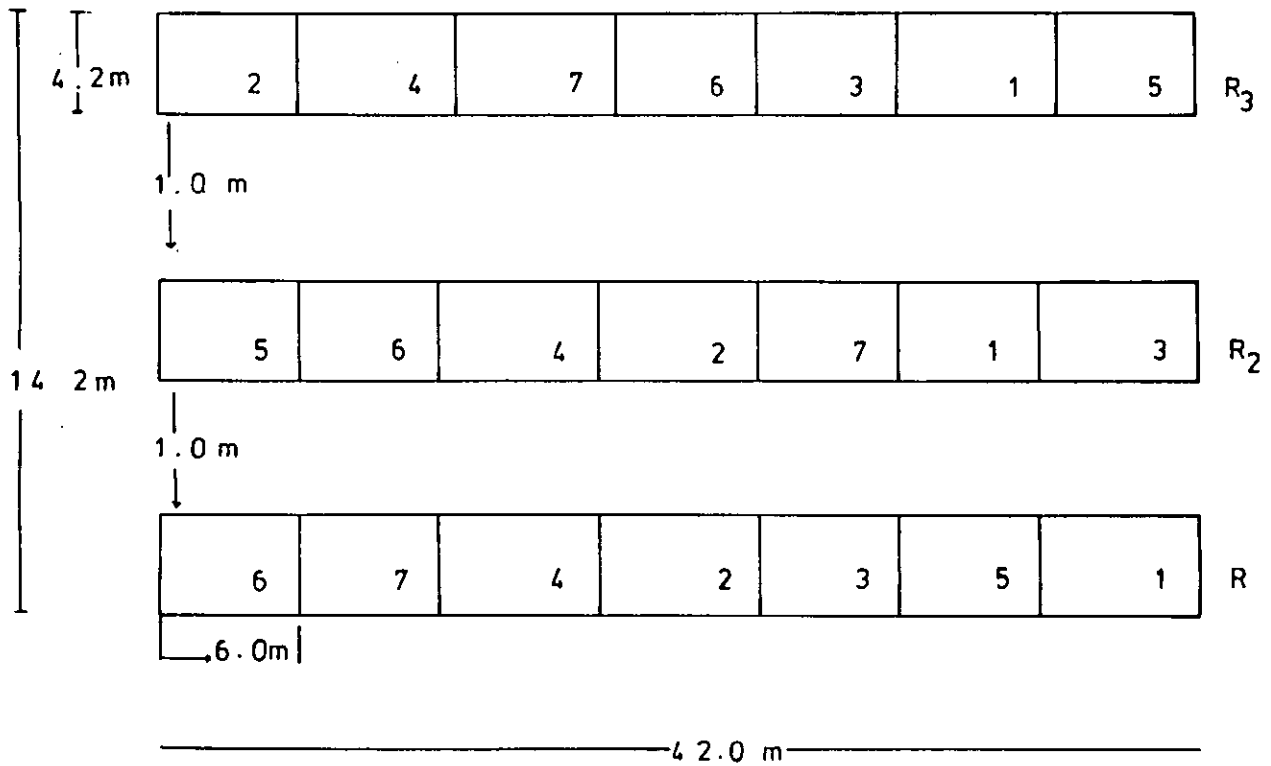
Legenda

x, y e z São as variedades 1,2,3,4,5,6 e 7

Onde

- 1 = Timbawene creme
- 2 = » violeta
- 3 = INIA 36
- 4 = INIA16
- 5 = INIA73
- 6 = IT 18
- 7 = IT 812

Esquema do campo



Legenda:

R = Replicação

1 2 3 4 5 6 e 7 = Variedades

**Tabela 1: Mostra alguns aspectos Agronômicos de aproveitamento do campo**

Tipo	Prostrado (P)	Semi-P	Erecto
VAR No	1 e 2	3, 4 e 5	6 e 7
Compasso (m)	1 * 0,70	0,70 * 0,30	0,70 * 0,20
No PL/ Linha	6	14	21
Número de Linhas/talhão	6	8	8
Linhas úteis por talhão	2	2	2
PL úteis por linha	4	12	17
PL úteis por talhão	8	24	34
Total de PL por thão	36	112	168
Comprimento da linha (m)	4,2	4,2	4,2
Àrea do talhão ( m <sup>2</sup> )	25,2	23,5	23,5

VAR = Variedade

PL = Planta

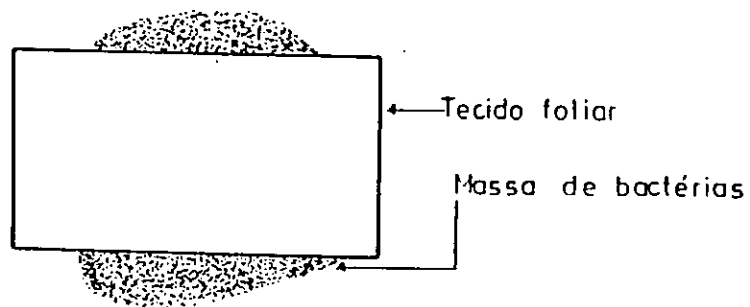


Fig.2 Vista microscópica 200× de células bacterianas (PB) mediante o teste de Ooze

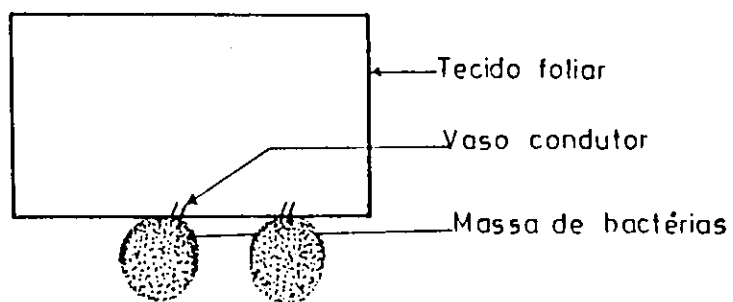


Fig.3 Vista microscópica 200× de células bacterianas (CB) mediante o teste de Ooze



Anexo 6

**Tabela 2: Diâmetro de colônia de PB (em mm), 72 horas crescendo em diferentes meios de cultura**

Meio	N.A.	King	GYCA
Colônia No			
1	2.0	1	4
2	2.0	1	4
3	1.0	1	4
4	2.0	1	3
5	1.5	1	3
6	2.0	1	3
7	1.5	1	3
8	2.0	1	3
9	2.0	1	3
10	1.5	1	4
11	2.0	1	3
12	2.0	1	3
13	2.0	1	3
14	2.0	1	3
15	1.0	1	3
16	2.5	1	3
17	1.0	1	3
18	2.0	1	3
19	1.5	1	3
20	2.0	1	3
Média	1,7	1	3,2

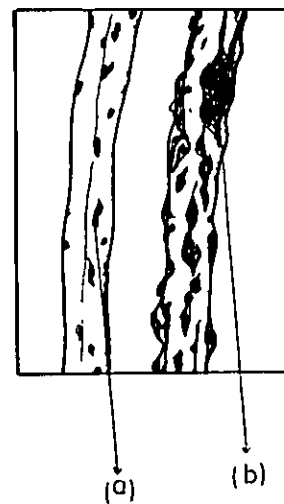
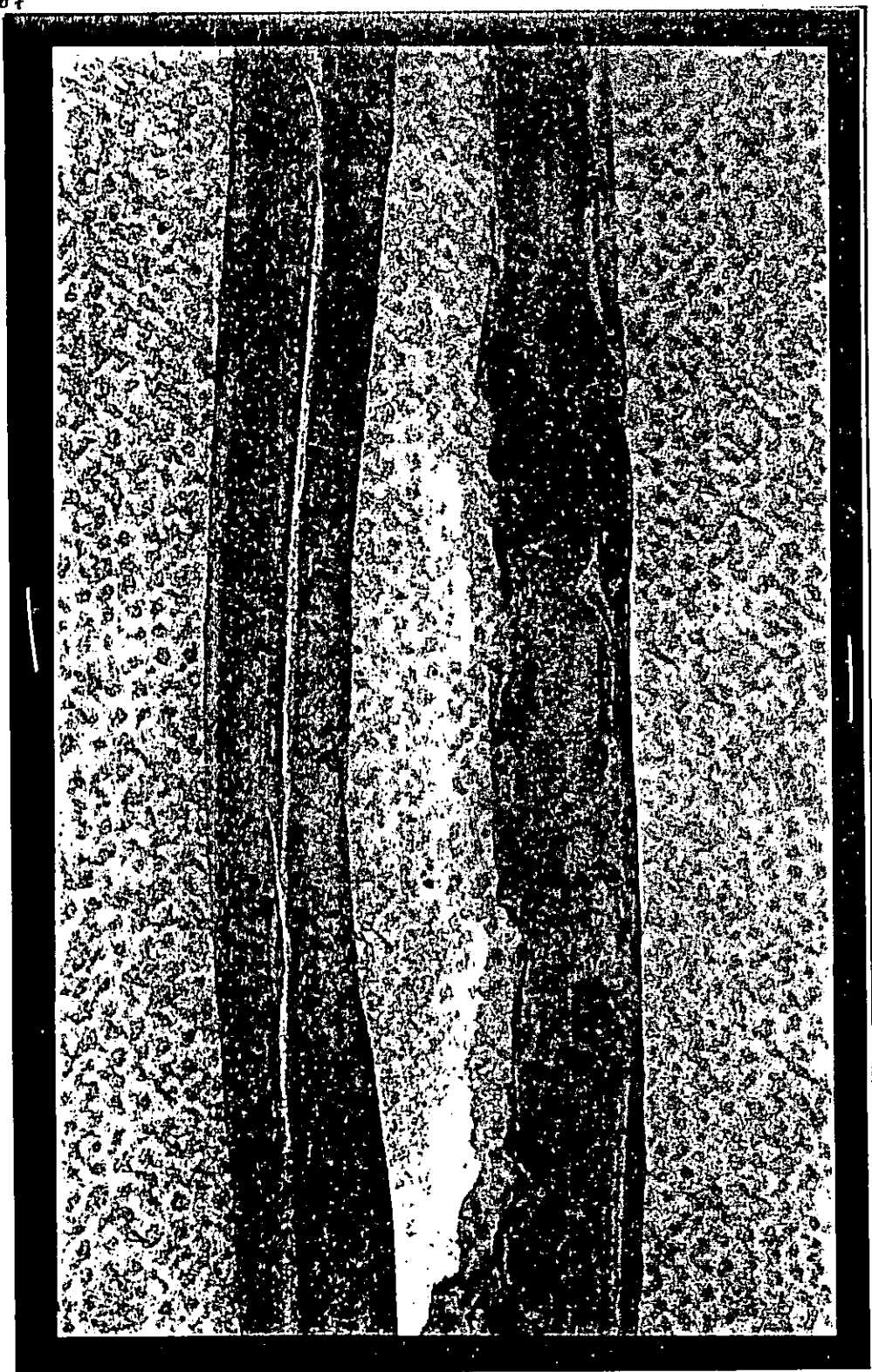
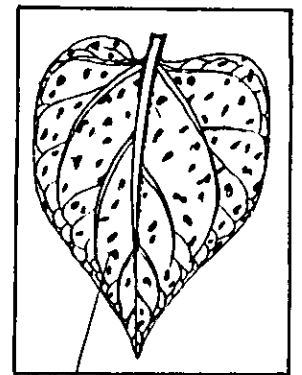
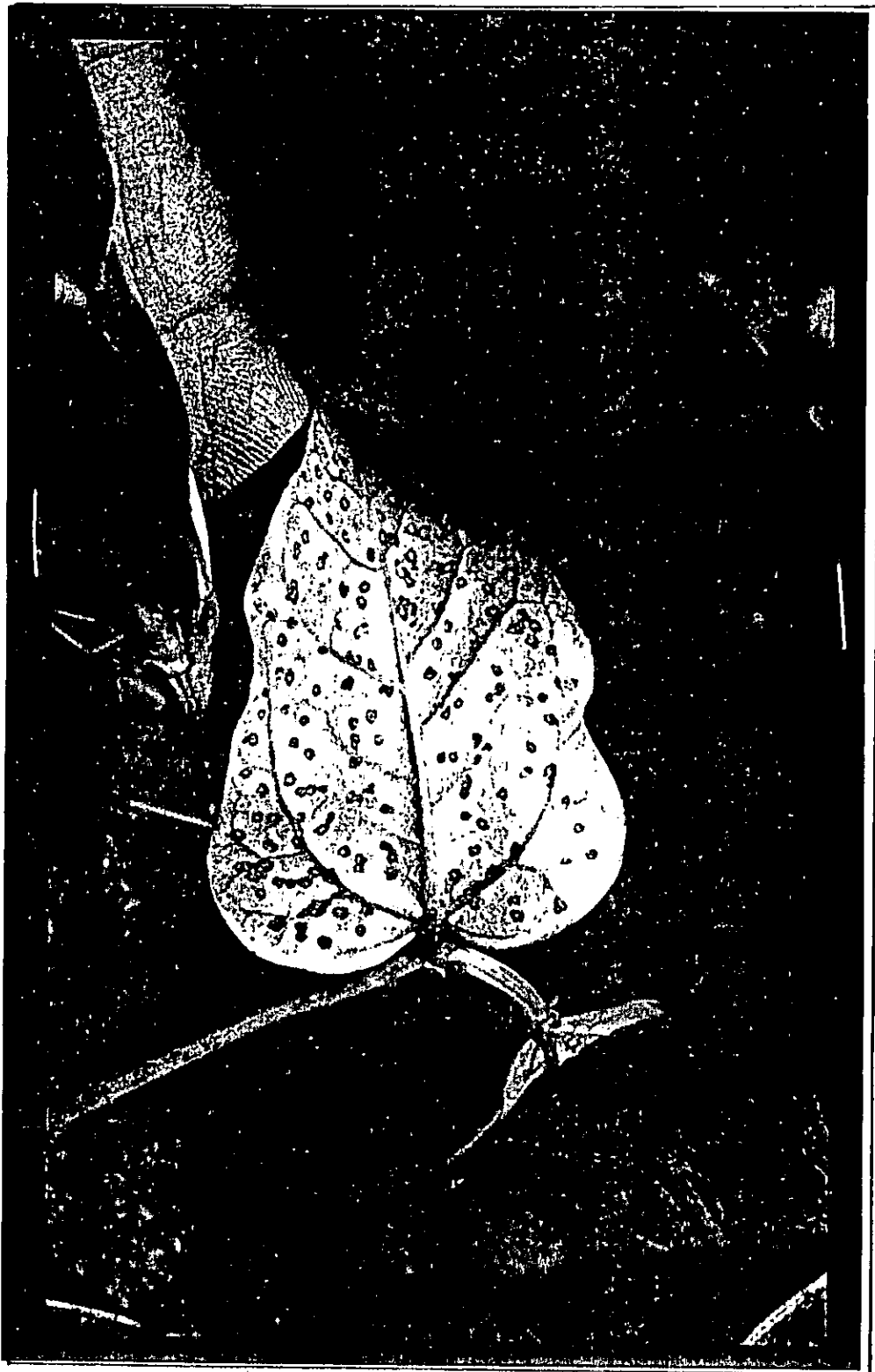


Fig.4 Ataque do caule feijão nhemba pelo agente causal de Pústula bacteriana  
(a) infecção jovem  
(b) infecção avançada



Pústulas cancerosas rodeadas por um exsudato aquoso

Fig.5 Pagina inferior da folha de feijão nhemba mostrando o estágio de Pústula

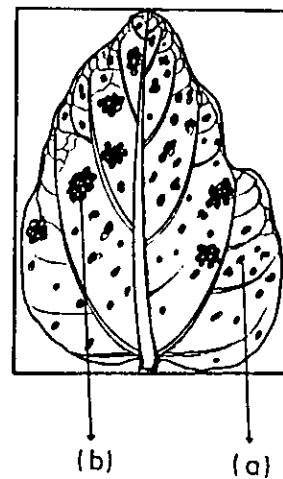


Fig.6 Página superior da folha de feijão nhemba revelando o estágio de manchas  
(a) manchas individuais (b) As manchas coalescem produzindo um aspecto de  
queima

Tabela 3: Número e percentagem ( calculada em torno da média ) das plantas infectadas por variedade

DAI	VAR	REP TT:PL	I	II	III	TT	M	%
6	1	36	25	13	15	53	18	50
	2	36	26	13	19	58	19	53
	3	112	81	81	52	224	75	67
	4	112	63	61	59	183	61	55
	5	112	73	70	53	196	65	58
	6	168	60	55	60	175	58	35
	7	168	33	38	41	112	37	22
12	1	36	36	36	36	108	36	100
	2	36	36	36	36	108	36	100
	3	112	112	112	112	336	112	100
	4	112	112	112	112	336	112	100
	5	112	112	112	112	336	112	100
	6	168	168	168	168	504	168	100
	7	168	168	168	168	504	168	100

DAI = Dias Após a Inoculação  
 VAR = Variedade  
 REP = Replicação  
 TT: PL = Total de Plantas  
 M = Média

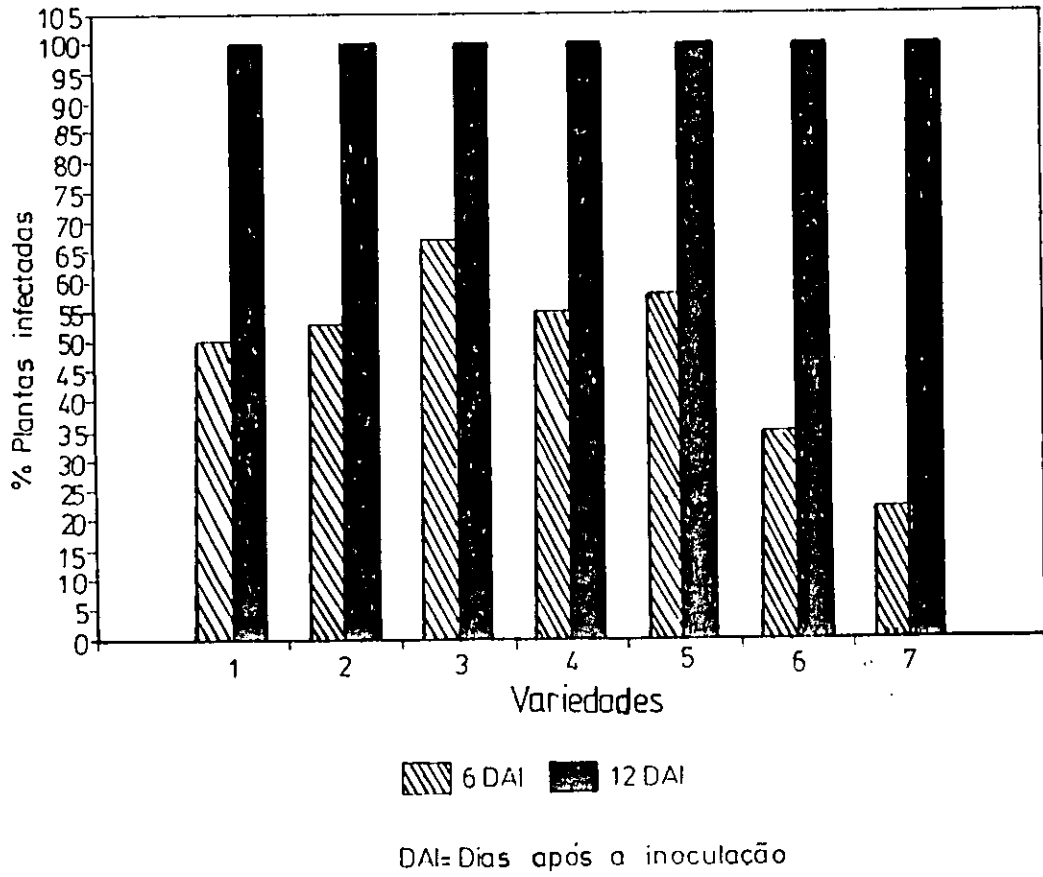


Fig.7 Mostra a percentagem de plantas infectadas pela (PB) por variedade em duas avaliações desde o dia de inoculação foliar

**Tabela 4: Número de folhas apanhadas no chão por variedade e replicação ao longo do tempo.**

DAI	VAR REP	1	2	3	4	5	6	7
6	I	128	270	328	218	239	722	104
	II	209	50	510	232	458	633	155
	III	56	119	592	303	697	610	406
12	I	577	416	798	356	392	819	717
	II	124	206	210	211	200	401	508
	III	119	128	896	419	404	691	358
18	I	154	228	490	374	406	382	383
	II	146	122	646	199	717	428	467
	III	61	134	399	425	364	396	319
24	I	101	283	145	512	426	345	362
	II	72	26	459	453	384	248	260
	III	110	150	226	384	397	497	386

**Tabela 5: Mostra os totais e médias das folhas apanhadas por replicação e por variedade.**

REP.	VAR	TOTAL	MEDIAS
1	*	10675,000	1525,000
2	*	8734,000	1247,714
3	*	10046,000	1435,143
*	1	1857,000	619,000
*	2	2132,000	710,667
*	3	5699,000	1899,667
*	4	4086,000	1362,000
*	5	5084,000	1694,667
*	6	6172,000	2057,333
*	7	4425,000	1475,000

**Tabela 6: Determinação do coeficiente de variação.**

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	M.Q.	Valor F	Prob
REP	2	280212,667	140106,333	2,2632	0,1466
VAR	6	5582234,286	930372,381	15,0285	0,0001
ERRO	12	742884,000	61907,000		
Total	20	6605330,952			

G.L. = Grau de liberdade                      C.V. = 17,74%  
 S.Q. = Soma dos Quadrados  
 M.Q. = Média dos quadrados  
 Prob. = Probabilidade  
 C.V. = coeficiente de variação



Anexo 14

**Tabela 7: Mostra as médias de folhas apanhadas no chão, calculadas pelo Dunca'ns multiple range test, a 5% de significância e a respectiva comparação.**

Tipo de VAR	VAR NO	Média	Comparação
Erecto	6	2057.0	A
Semi-Prostrado	3	1900.0	A B
	5	1695.0	A B C
Erecto	7	1475.0	B C
Semi-Prostrado	4	1362.0	C
Prostrado	2	710.7	D
	1	619.0	D

**Tabela 8: Mostra o rendimento em gramas de grão seco, por variedade por replicação.**

REP VAR	RI		RII		RIII	
	a	b	a	b	a	b
1	50	30	60	25	63	55
2	120	16	113	15	90	23
3	530	1440	390	1900	550	1800
4	490	1400	650	1400	600	1410
5	390	1350	520	1610	500	1160
6	650	1360	500	1650	540	1300
7	60	120	80	190	80	300

**Tabela 9: Mostra o total e a média do rendimento convertida a toneladas por hectare segundo a equação  $R = (y/z) \times 0,01$  onde y é o rendimento em gramas e z, a área do talhão expressa em m<sup>2</sup>**

VAR	Rendimento total (g)	Rendimento Médio/Talhão (g)	Rendimento Médio em t/ha
1	283	94	0,02
2	377	126	0,03
3	6610	2203	0,87
4	5950	1983	0,79
5	5530	1843	0,73
6	6000	2000	0,79
7	830	277	0,11

Anexo 16

Tabela 10: Peso de 100 grãos secos

REP VAR	I	II	III	M
1	17	16	17	17
2	22	23	21	22
3	12	12	12	12
4	12	12	12	12
5	13	13	13	13
6	13	13	13	13
7	13	13	12	13

M = Média