

EDIVALDO CIA
Engenheiro Agrônomo
Instituto Agrônômico

VARIABILIDADE DE *Xanthomonas malvacearum*
(E.F.SMITH) DOWSON, NO ESTADO DE SÃO PAULO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ERIC BALMER

Tese de doutoramento apresentada
à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universida
de de São Paulo.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
1972

*a meus pais,
espôsa e filhas,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

O autor apresenta os seus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. *Erio Balmer* pela valiosa orientação, estímulo e sugestões apresentadas durante a realização do presente trabalho e confecção da tese.

Ao eng^o agr^o *Carlos Antonio Menezes Ferraz* e ao Dr. *Imre Lajos Gridi-Papp*, pelo apoio, colaboração e estímulo durante a realização deste trabalho e redação da tese.

Ao eng^o agr^o *Oswaldo Paradela Filho* pela colaboração prestada durante a realização dos trabalhos e redação da tese.

Ao Dr. *E.W. Kitagima* pelas microfotografias eletrônicas e sugestões na confecção da tese.

Ao eng^o agr^o *Toshio Igue* pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos Drs. *Clélio L. Salgado* e *Hiroshi Kimati* pelas sugestões apresentadas na confecção do presente trabalho.

Ao eng^o agr^o *Heli Camargo Mendes* e a bibliotecária *Luiza S.E. Hermann* pelos trabalhos na revisão da tese.

Aos eng^{os} agr^{os} *Jaciro Soave* e *Mauro H. Suginori*, pela colaboração prestada nos trabalhos para identificação do patógeno.

Aos eng^{os} agr^{os} *Popilio Angelo Cavaleri*, *Milton Geraldo Fuzatto*, *Raphael Alvarez*, *Nelson P. Sabino* e *Nelson M. Silva* pelo estímulo na realização desta tese.

A bibliotecária *Maria Regina de Castro Brochado*, pela organização e execução da parte datilográfica.

Ao Dr. *L.S. Bird* pelo fornecimento dos hospedeiros diferenciais.

Aos funcionários das Seções de Algodão e Microbiologia Fitotécnica (IAC) pela colaboração prestada na condução dos trabalhos.

Ao Instituto Agronômico, às Seções de Algodão e Microbiologia Fitotécnica (IAC), ao Departamento de Fitopatologia (ESALQ) e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	pg.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Hospedeiros utilizados e obtenção das plantas para os testes	11
3.2. O patógeno e sua manutenção	11
3.2.1. Origem dos isolados	11
3.2.2. Isolamento do material	15
3.2.3. Meios de cultura utilizados	16
3.2.4. Manutenção de bactérias em meio de cultura e preservação do patógeno em folhas herborizadas.	16
3.2.5. Identificação do patógeno	17
3.2.6. Obtenção e preparo do inóculo	18
3.3. Método de inoculação	18
3.4. Métodos de avaliação dos sintomas	19
3.5. Condições de ambiente reinantes por ocasião da realização dos testes de patogenicidade e experimentos	21
3.6. Identificação das raças fisiológicas	21
3.6.1. Teste de patogenicidade nº 1:- Estudo de isolados de <i>X.malvacearum</i> , procedentes de várias localidades, em variedades de algodoeiro com diferentes genes de resistência.	21
3.6.2. Teste de patogenicidade nº 2:- Estudo da patogenicidade para os isolados de <i>X.malvacearum</i> , pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.	22
3.6.3. Teste de patogenicidade nº 3:- Estudo da patogenicidade para isolados pertencentes a diferentes grupos, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.	22
3.6.4. Teste de patogenicidade nº 4:- Estudo da patogenicidade para isolados de diferentes grupos, em hospedeiros diferenciais, para identificação de raças fisiológicas.	23
3.6.5. Teste de patogenicidade nº 5: Comparação de patogenicidade entre isolados	

	PG.
mantidos em laboratório e os respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pela variedade IAC 12-2.	23
3.6.6. Teste de patogenicidade nº 6:- Teste de patogenicidade para isolados e reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças de <i>X.malvacearum</i> .	24
3.6.7. Experimento nº 1:- Estudo da patogenicidade de reisolados de <i>X.malvacearum</i> , pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, inoculados nos cotilédones e folha nova de hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas.	24
3.7. Experimento nº 2:- Comportamento de algumas variedades e linhagens paulistas de algodoeiro, em presença de diferentes raças fisiológicas de <i>X.malvacearum</i> .	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Identificação do patógeno	27
4.2. Identificação das raças fisiológicas	29
4.2.1. Teste de patogenicidade nº 1:- Estudo da patogenicidade de isolados de <i>X.malvacearum</i> , procedentes de várias localidades, em variedades de algodoeiro com diferentes genes de resistência.	29
4.2.2. Teste de patogenicidade nº 2:- Estudo da patogenicidade para os isolados de <i>X.malvacearum</i> , pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.	30
4.2.3. Teste de patogenicidade nº 3:- Estudo da patogenicidade para isolados pertencentes a diferentes grupos, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.	32
4.2.4. Teste de patogenicidade nº 4:- Estudo da patogenicidade para isolados de diferentes grupos, em hospedeiros diferenciais, para identificação de raças fisiológicas.	34
4.2.5. Teste de patogenicidade nº 5:- Comparação de patogenicidade entre isolados mantidos em laboratório e os respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pela variedade IAC 12-2.	36

	Pg.
4.2.6. Teste de patogenicidade nº 6:- Teste de patogenicidade para isolados e reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais, nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças de <i>X.malvacearum</i> .	37
4.2.7. Experimento nº 1:- Estudo da patogenicidade de reisolados de <i>X.malvacearum</i> , pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, inoculados nos cotilédones e folha nova de hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas.	39
4.3. Experimento nº 2:- Comportamento de algumas variedades e linhagens paulistas de algodoeiro, em presença de diferentes raças fisiológicas de <i>X.malvacearum</i> .	41
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	50
7. RESUMO	51
8. SUMMARY	52
9. BIBLIOGRAFIA	53
APÊNDICE	I a XII

1. INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas malvacearum* (E.F.Smith) Dowson, é uma doença muito comum no Estado de São Paulo, ocorrendo de forma generalizada em todas as regiões produtoras de algodão. Dependendo das condições de ambiente a bacteriose pode ocorrer com maior ou menor severidade, segundo BASTOS CRUZ e colab. (3) e BAZAN DE SEGURA (4).

Embora os prejuízos de ordem econômica nas culturas algodoeiras do Estado de São Paulo não tenham sido avaliados, foi relatado por CIA e colab. (19), que, em épocas favoráveis, e com o plantio de variedades suscetíveis, o agente causador da mancha angular pode destruir boa parte das folhas e maçãs do algodoeiro. Em alguns países a ocorrência da mancha angular em condições favoráveis a bactéria já causou grandes prejuízos na cultura do algodoeiro, segundo BIRD e BLANK (7), CARVALHO (16) e CROSS (21).

As lesões causadas por *X.malvacearum* são observadas principalmente nas folhas e maçãs, podendo ainda incidir nas hastes, bracteias e ponteiros das plantas. A presença da bactéria contribui para aumentar os danos de fungos causadores de podridões em maçãs, como ocorre por exemplo com o *Colletotrichum gossypii* South, diminuindo o valor comercial do produto conforme foi verificado por BAZAN DE SEGURA (4), WEINDLING e MILLER (41). É interessante notar que *C.gossypii* foi o fungo isolado mais frequentemente de lesões em maçãs de algodoeiro no Estado de São Paulo, segundo BALMER e colab.(2).

No tocante à patogenicidade, a variabilidade de *X.malvacearum* é conhecida em muitos países produtores de algodão, conforme BRINKERHOFF (8, 9, 10), BRODIE e COOPER (14), CHEW e colab. (20), CROSS (21, 22), CROSS e HAYWARD (23), HUNTER e BLANK (29), MILLER (34), NAYUDU (35), SCHNATHORST (36), SMITH (38) e VERMA e SING (40). Para o Estado de São Paulo ainda não existem relatos sobre a ocorrência de raças fisiológicas de *X.malvacearum*.

O conhecimento de raças fisiológicas é de primor-

dial importância para o melhoramento do algodoeiro. Desse modo poderiam ser orientados os trabalhos de melhoramento visando à obtenção de material resistente às raças de maior importância.

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a variabilidade de *X.malvacearum* no Estado de São Paulo e a reação de algumas variedades e linhagens de algodoeiro a este agente patogênico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os principais testes culturais, morfológicos e fisiológicos para identificação de *X.malvacearum*, foram relatados em "BERGEY'S manual of determinative bacteriology" (BERGEY'S)(5). DYE (24), realizando estudos morfológicos e fisiológicos para diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* encontrou características semelhantes para as várias espécies testadas, tais como: não produção de esporo, reação gram-negativa, forma de bastonete com um único flagelo, colônia de coloração amarelada, produção de ácidos em determinados carboidratos, não produção de ácido no leite.

BURKHOLDER e STARR (15) procuraram caracterizar os gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, de acordo com a morfologia e comportamento em diferentes meios de cultura. Foram determinadas diferenças no tocante ao número de flagelos, produção de H₂S e utilização de asparagina como única fonte de carboidrato.

No tocante à estabilidade da resistência do hospedeiro ao agente patogênico, LOGAN (33) não conseguiu alterar a patogenicidade de *X.malvacearum*, mediante passagens seriadas do patógeno pelo hospedeiro resistente. Por outro lado, SCHNATHORST (36), inoculando bactérias da raça 1 na variedade Stoneville 20 e fazendo reisolamentos após 14 dias, verificou que todos os reisolados apresentaram reações características para a raça 1, enquanto 77% dos reisolados obtidos 56 dias após a inoculação apresentaram reações características para a raça 2. A alteração na especificidade do patógeno, observada por SCHNATHORST (36), foi associada à presença do gene B₇, na variedade Stoneville 20.

A variabilidade de *X.malvacearum* foi estudada em diferentes partes do mundo, por vários pesquisadores. A maioria deles usou o termo raça fisiológica, como BIRD (6), BRINKERHOFF (8, 9), BRODIE e COOPER (14), CHEW e colab. (20) HUNTER e BLANK (29), MILLER (34), NAYUDU (35), SCHNATHORST (36), SMITH (38) e VERMA e SING (40); alguns empregaram o ter

mo biótipo, como HUNTER e BLANK (29) e NAYUDU (35), e outros, "variant" como BIRD (6), CHEW e colab. (20) e SMITH (38). Neste trabalho foi adotado o termo raça fisiológica para a variação na patogenicidade de *X.malvacearum*.

Até o momento, foram descritas 17 raças fisiológicas de *X.malvacearum*. O início dos estudos para identificação de raças foi baseado em três variedades diferenciais: Stoneville 2B (suscetível a todas as raças), Stoneville 20 (resistente à raça 1 e suscetível à raça 2) e Mebane B-1 (resistente às raças 1 e 2). Utilizando estas três variedades, vários pesquisadores como BRINKERHOFF (10), BRODIE e COOPER (14), CHEW e colab. (20), SCHNATHORST e colab. (37), SMITH (38), relataram a ocorrência das raças 1 ou 2, juntas ou isoladamente numa mesma lavoura. Em 1961, BIRD e colab., citados por HUNTER e colab. (30), relataram a ocorrência de cinco raças fisiológicas, baseadas em reações de cinco linhagens de *Gossypium hirsutum* L..

Em 1963, BRINKERHOFF (9) relatou a ocorrência de 12 raças fisiológicas de *X.malvacearum*, utilizando para isso cinco linhagens de *G.hirsutum* e tres linhagens de *G.barbadense* L.. Posteriormente, HUNTER e colab. (30) relataram a ocorrência de 15 raças fisiológicas, baseados nas reações dos seguintes hospedeiros diferenciais: Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3, 101-102B e Gregg. Em 1970, VERMA e SING (40), utilizando estes mesmos hospedeiros diferenciais, relataram a ocorrência de mais duas raças fisiológicas, completando-se assim as 17 raças fisiológicas de *X.malvacearum* atualmente identificadas.

Paralelamente, 16 genes "B" ou maiores, assim denominados por KNIGHT segundo BRINKERHOFF (11), para resistência a *X.malvacearum*, têm sido descritos no algodoeiro. Estes genes foram encontrados em diferentes espécies de algodoeiro, principalmente em *G.hirsutum*, *G.barbadense*, *G.arboreum* L..

HUNTER e BLANK (29), trabalhando com a variedade de algodoeiro Acala, possuidora do gene B₇ para resistência a *X.malvacearum*, detectaram dois isolados que foram patogênicos a esta variedade. Estes mesmos autores concluíram que a ocorrência de "biótipo" patogênico poderia representar uma ameaça ao programa de melhoramento que vinha sendo conduzido, visando resistência à mancha angular.

BRINKERHOFF (8) evidenciou a variabilidade de *X.malvacearum*, inoculando isolados provenientes de algumas regiões dos EE.UU. e da África em 12 variedades de algodoeiro, portadoras de diferentes genes para resistência, mostrando que os isolados de diferentes **origens** variaram em sua patogenicidade.

SCHNATHORST e colab. (37) estudaram 11 isolados da bactéria causadora da mancha angular do algodoeiro, na Califórnia, EE.UU., sendo que a inoculação em três hospedeiros diferenciais permitiu identificar somente a raça 1.

BRODIE e COOPER (14) testaram 16 isolados de *X.malvacearum*, provenientes das principais regiões algodoeiras da Carolina do Norte, EE.UU., em três variedades de algodoeiro, diferenciais de raças fisiológicas, e observaram que todos os isolados reagiram como a raça 1, tendo havido entre tanto uma variação na patogenicidade dos isolados que pareceu ser mais quantitativa que qualitativa.

SMITH (38) isolou *X.malvacearum* de material proveniente da variedade Mebane B-1, possuidora de gene para resistência às raças 1 e 2 e inoculou os cotilédones de plantas de algodoeiro 1517BR 1, Mebane B-1, N.M. 8373, N.M. 9136, Okla. 17-3-4 e Stoneville 20, mostrando a ocorrência de um isolado que se comportou diferentemente das raças 1 e 2. O autor denominou este isolado de "New Mexico Variant 1".

BRINKERHOFF (9) descreveu 10 novas raças com base nas reações em oito linhagens diferenciais de algodão, em acréscimo às duas raças já identificadas e obteve também novas raças fisiológicas na variedade de algodoeiro Acala e na espécie *G.barbadense*, portadoras de vários genes "B" para resistência a *X.malvacearum*.

CROSS (21), estudando a patogenicidade de 10 populações de *X.malvacearum* provenientes da região de Tanganyika, em 18 variedades de algodoeiro, observou diferenças marcantes entre os isolados testados.

NAYUDU (35) identificou quatro raças fisiológicas de *X.malvacearum* baseado na reação de patogenicidade observada em 4 espécies de *Gossypium* cultivadas na Índia. Detecou ainda, dentro de uma das quatro raças, reação diferente entre os isolados, que denominou de "biótipo".

CROSS e HAYWARD (23), estudando isolados de *X.mal*

vacearum, mostraram diferenças distintas em patogenicidade entre os mesmos. CROSS (22) comparou a patogenicidade de duas populações de *X.malvacearum*, em condições de campo, constatando o comportamento diferente entre as mesmas. Nenhuma das variedades de algodoeiro testadas, portadoras de apenas um gene de resistência, mostrou boa resistência para as populações da bactéria estudada. As variedades Bar 11/9 e Reba W-296, portadoras de mais de um gene "B" de resistência foram altamente resistentes para as duas populações estudadas.

BRINKERHOFF (10) testou 13 culturas de *X.malvacearum*, provenientes da Austrália, isoladas de variedades de algodoeiro suscetíveis e resistentes, mostrando que todas pertenciam à raça 1, embora algumas culturas fossem isoladas de plantas de variedades resistentes. Analisando os resultados obtidos, sugeriu que as variedades resistentes utilizadas poderiam estar contaminadas, ou que as condições locais de ambiente permitiram a infecção de plantas resistentes.

HUNTER e colab. (30) relataram a ocorrência de mais três raças 13, 14 e 15 de *X.malvacearum*, baseadas nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças: Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3, 101-102B e Gregg. Esta última foi considerada diferencial temporariamente, porque apresentou maior variação na reação aos isolados. Estas linhagens foram reconhecidas como diferenciais para raças de *X.malvacearum*, pelo "Cotton Disease Council".

MILLER (34), em Missouri, EE.UU., isolou *X.malvacearum* de 16 amostras de folhas de algodoeiro em 1966, e de 46 amostras em 1967, e inoculando nas linhagens diferenciais, detectou em 1966 a seguinte ocorrência: nove isolados pertenciam à raça 11, um isolado pertencia a cada uma das seguintes raças: 1, 3, 4, 12 e 15 e dois isolados não puderam ser enquadrados entre as 15 raças conhecidas. Em 1967, nove isolados foram identificados como pertencentes à raça 1, dezoito isolados como sendo da raça 11 e dezesseis isolados da raça 12, e os isolados restantes também não puderam ser identificados.

CHEW e colab. (20), em trabalhos feitos anualmente para determinar a presença e a distribuição das raças de *X.malvacearum* nas áreas produtoras de algodão no Novo México

e oeste do Texas, detectaram a ocorrência das raças 1 e 2 como também ocasionalmente "variants" das mesmas.

VERMA e SINGH (40), mostraram, na Índia, a ocorrência das raças 16 e 17 de *X.malvacearum*, baseando-se nas reações das linhagens diferenciais reconhecidas pelo "Cotton Disease Council".

Nas condições do Estado de São Paulo, foi observado, preliminarmente, por CIA (18), que dois isolados de *X.malvacearum* comportaram-se diferentemente em duas variedades de algodoeiro testadas.

Com relação ao comportamento de variedades cultivadas em condições de campo ou em casa de vegetação, em presença de *X.malvacearum*, no Estado de São Paulo, foram poucos os trabalhos publicados.

BASTOS CRUZ e colab. (3), estudando o comportamento de variedades de algodoeiro cultivadas no Estado de São Paulo em condições de campo, concluíram que as variedades RM2 IAC 8 e IAC RM3 foram consideravelmente resistentes ao agente causador da mancha angular, durante todo o ciclo da planta, enquanto que as variedades RM-1 e IAG-61/60 foram mais suscetíveis.

CIA e colab. (19) estudaram o comportamento das variedades de algodoeiro Stoneville 20, Nu-16, Gregg, Mebane, RM-2 e IAC 12 em condições de casa de vegetação e das variedades Stoneville 20, Nu-16, RM-4 e RM-2 em condições de campo. Os dados revelaram que as variedades Nu-16 e Stoneville 20, tanto em casa de vegetação como em condições de campo, foram resistentes ao isolado testado, enquanto que as variedades Gregg, Mebane e IAC 12, em casa de vegetação, e a variedade RM-4, em condições de campo, mostraram-se suscetíveis.

No tocante aos efeitos da concentração de inóculo e condições de ambiente ao desenvolvimento dos sintomas, vários pesquisadores mostraram a importância do controle destes fatores no estudo da interação patógeno-hospedeiro.

GUNN e INNES (27) mostraram a influência da con-

concentração do inóculo na incidência da mancha angular. As concentrações de inóculo utilizadas variaram de $3-4 \times 10^6$ a $3-4 \times 10^2$ bactérias/ml. As variedades portadoras dos genes de resistência B_2 , B_2B_3 ou B_5 mostraram resposta linear para o efeito da concentração de inóculo, enquanto que na variedade possuidora dos genes $B_2B_3B_6$ houve pouca variação.

INNES e LAST (32) também mostraram a importância da concentração de inóculo. Testaram diferentes variedades de algodoeiro resistentes e suscetíveis à *X.malvacearum*, a concentrações de $2-3 \times 10^6$ e $2-3 \times 10^2$ bactérias/ml. A avaliação dos sintomas foi feita mediante o uso de uma escala de notas que variou de 0 a 12. A incidência da bacteriose variou em função da concentração de inóculo. Quando utilizada a maior concentração, a média alcançada para todas as variedades foi de 5,3, caindo para 3,3 na menor concentração.

BRINKERHOFF e PRESLEY (13) estudaram a influência de temperaturas diurna e noturna no aparecimento dos sintomas em variedades de algodoeiro imune, resistente e suscetível. Os regimes de temperatura utilizados foram 19°C e $26,5^\circ\text{C}$, 19°C e $36,5^\circ\text{C}$, $26,5^\circ\text{C}$ e $26,5^\circ\text{C}$, $26,5^\circ\text{C}$ e $36,5^\circ\text{C}$. Os autores mostraram que a variedade Im2-4.4 permaneceu imune para todos os regimes de temperatura estudados. Por outro lado, a variedade Acala 44, suscetível, apresentou sintomas mais severos quando foi utilizada a temperatura noturna mais baixa. Os mesmos autores mostraram que no regime de temperatura noturna de 19°C e diurna de $36,5^\circ\text{C}$ houve quebra de resistência das linhagens diferenciais Acala 1517-BR-1 e 20-3 x 4 Ac.44.

ARNOLD e BROWN (1) estudaram a relação hospedeiro patógeno, utilizando diferentes isolados de *X.malvacearum* em várias condições de ambiente. Procuraram elucidar a importância relativa dos três componentes principais de variações: genótipo do hospedeiro, genótipo do agente patogênico e condições do ambiente. Foi demonstrado que o grau de resistência do hospedeiro variou para os isolados testados e condições do meio ambiente. Também foi demonstrado que o agente patogênico apresentou uma variação contínua na sua patogenicidade, dificultando a determinação das raças fisiológicas.

Nos estudos das relações *X.malvacearum* e plantas de algodoeiro realizados pelos diferentes pesquisadores, foram utilizados vários métodos de inoculação e avaliação dos sintomas, como também parte diferente das plantas a serem inoculadas.

BIRD e BLANK (7), nos trabalhos de melhoramento do algodoeiro visando resistência à *X.malvacearum*, inocularam em condições de casa de vegetação, os cotilédones do algodoeiro, avaliando os sintomas por intermédio de uma escala de notas que variou de 0 a 4. Os mesmos autores fizeram inoculações por ferimentos e por pulverizações a alta pressão, em casa de vegetação e em condições de campo. Utilizando várias escalas para avaliação dos sintomas concluíram, para as condições do Texas, E.E.UU., que a escala mais adequada foi aquela cujas notas variaram de 1 a 7.

INNES (31), no estudo de transferência de genes de resistência B_{6m} e B_2B_{6m} ao agente da mancha angular, optou pela inoculação de *X.malvacearum* na nervura principal das folhas mais novas, em condições de casa de vegetação, por considerar este método sujeito a menor erro na inoculação, e por ser uma técnica menos cansativa.

GUNN (26) optou pela inoculação no início do desenvolvimento da primeira folha definitiva na qual foram colocadas gotas de uma suspensão de bactéria. As plantas inoculadas que se mostravam resistentes por esta técnica, confirmaram o seu estado de resistência quando testadas pela técnica de inoculação na nervura principal da folha. A avaliação dos sintomas foi feita de acordo com uma escala de notas que variaram de 0 a 4.

CARVALHO (16) estudou o comportamento de variedades de algodoeiro, em condições de campo, inoculando-as artificialmente por pulverização com uma suspensão bacteriana nas folhas ou por ferimento dos frutos, através de picadas. A escala para avaliação da resistência variou de 0 a 12 e permitiu detectar variedades que foram classificadas de praticamente imunes até suscetíveis. Trabalhando em diferentes regiões o autor verificou que a severidade da doença variou, o que poderia estar correlacionado com as condições ecológicas locais.

FERRAZ (25) estudou em condições de campo a rea-

ção de 10 variedades, inoculando *X.malvacearum* por meio de ferimentos provocados por palito e carborundo. Concluiu que a inoculação por meio de palito apresentou melhores resultados.

Com relação aos prejuízos causados por *X.malvacearum* quando associada a outros microorganismos, BAZAN DE SEGURA (4) mostrou que houve redução no comprimento da fibra e no tipo do algodão produzido.

CAUQUIL e FOLLIN (17) demonstraram que as maçãs das variedades de algodoeiro, possuidoras dos genes de resistência B_2B_3 ou $B_2B_3B_{6m}$, foram menos afetadas pelos fungos causadores de podridão das maçãs, tais como *Colletotrichum gossypii* South., *Botryodiplodia theobromae* Pat. e *Aspergillus niger* V.Tigh.

BRINKERHOFF e HUNTER (12) estudaram o comportamento de linhagens de *G.hirsutum* e *G.barbadense*, resistentes e suscetíveis ao agente causador da mancha angular, em condições de campo infestado com *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Snyder e Hansen e *Meloidogyne incognita acrita* (Kafoid) Chitwood. Os autores mostraram que várias das linhagens resistentes à bactéria apresentaram maior porcentagem de plantas resistentes aos agentes causadores da "murcha" que as linhagens suscetíveis.

BIRD (6) demonstrou a existência de correlações entre resistência a *X.malvacearum* e resistência às principais doenças do algodoeiro. O autor concluiu que as plantas resistentes aos isolados das raças 1 e "variant" 3 apresentaram melhores correlações que aquelas resistentes aos isolados da raça 2 e das "variants" 4 e 6.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Hospedeiros utilizados e obtenção das plantas para os testes

No presente trabalho foram utilizadas preliminarmente as variedades e linhagens de algodoeiro existentes na coleção da Seção de Algodão do Instituto Agrônomo, Estado de São Paulo (IAC). Posteriormente, para a identificação das raças fisiológicas de *X.malvacearum* foram empregadas as linhagens diferenciais, reconhecidas pelo "Cotton Disease Council" e provenientes de "Texas College Station, EE.UU". A linhagem diferencial Gregg não foi introduzida nos estudos em razão do baixo poder germinativo das sementes fornecidas. Os hospedeiros utilizados, vários portadores de genes de resistência à *X.malvacearum*, são apresentados no quadro 1.

Inicialmente foi feito o deslincamento químico das sementes em ácido sulfúrico comercial, a 66°Be, e seguido de lavagem das mesmas em água, até completa remoção do ácido. As sementes foram semeadas em vasos de barro, com capacidade aproximada de 1 litro, contendo substrato constituído de cinco partes de areia lavada de rio, quatro partes de solo latos solo roxo e duas partes de esterco de curral seco e peneirado.

3.2. O patógeno e sua manutenção

3.2.1. Origem dos isolados

Os isolados de *X.malvacearum* foram obtidos de folhas de algodoeiro apresentando lesões angulosas, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, nos anos agrícolas de 1967/68 e 1968/69. Os diferentes isolados utilizados neste trabalho são apresentados nos quadros 2 e 3.

Quadro 1. Material genético da Seção de Algodão do Instituto Agronômico (IAC) e linhagens diferenciais introduzidas, utilizados no estudo de variabilidade de *X.malvacearum* no Estado de São Paulo

Genes para Resistência	Variedades ou Linhagens	Procedência
	Mebane B-1	IAC
	Gregg Gr-1	"
B ₇	Stoneville 20	"
B ₂ B ₃ B ₆	95-96A Bu 61	"
B ₂ B ₃	101-102B Bu 61	"
B _{9L} B _{10L}	REBA B-50	"
	(Acala 61/60xNu-16)70/H-37	"
	IAC RM3-4123 70/H-4	"
	IAC RM2-2160 70/H-24	"
	IAC RM3-4133 71/523	"
	(Acala x Nu-16) 71/213	"
	IAC 12-2 71/170	"
	IAC RM3	"
	IAC 13-1	"
	IAC 12-2	"
nenhum	Acala 44	Texas-EE.UU.
poligenes	Stoneville 2B-S9	" "
B ₇ + poligenes	Stoneville 20	" "
B ₂ + poligenes	Mebane B-1	" "
B _{In} + poligenes	1-10B	" "
B _N + poligenes	20-3	" "
B ₂ B ₃ + desconhecido	101-102B	" "

Quadro 2. Origem dos isolados de *X.malvaearum* obtidos a partir de variedades ou linhagens IAC.

Nº do isolado obtido de material	Origem dos isolados (hospedeiro)	Local	Data do isolamento
3	Rex Cotton 68/303	Campinas	19- 6-68
4	St.41-Ston.20 68/443	"	"
5	IAC RM3-4133 68/201	"	"
7	IAC RM3	Tatui	"
9	IAC 12-2	Aguaí	"
11	IAC 12-2	Jau	"
17	IAC 13	Viradouro	"
18	IAC 12-2	Votuporanga	"
20	IAC RM2-2173	Fernandópolis	"
23	IAC RM2-2173	Guaraçá	"
25	IAC 12-2	Oswaldo Cruz	"
28	IAC RM2-2173	Pres.Bernardes	"
30	IAC 12-2	Taquarituba	25- 3-69
31	IAC 13-1	Aguaí	21-11-69
34	IAC RM3	Tiete	"
36	IAC RM4	Mococa	8- 1-70
38	IAC RM4	Coroados	"
40	IAC RM4	Jales	"
42	IAC 13-1	Orlândia	"
43	IAC RM3	Pres.Bernardes	"
46	IAC 12-2	St.Ant.Posse	"
52	não conhecido	Leme	14- 1-70
54	IAC RM3	Flórida Pta.	"
55	IAC 13-62/63	Oswaldo Cruz	"
57	IAC RM3	Sto.Anastácio	"
60	IAC RM3	Pres.Bernardes	20- 1-70
61	IAC RM4-SM5	Birigui	"
66	não conhecido	Sto.Ant.Posse	23- 2-70
70	IAC 12-2	São Simão	"
71	não conhecido	Ituverava	"
72	IAC 13-1	Viradouro	"
75	nao conhecido	Ribeirão Preto	2- 3-70

Quadro 3. Isolados de *X.malvacearum* e seus respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais.

Nº do reisolado obtido de hospedeiro diferencial	Nº do isolado obtido de material IAC	Hospedeiro diferencial	Data do reisolamento
101	5	Stoneville 2B-S9	18- 8-1971
102	7	1-10B	"
103	20	1-10B	"
104	23	Stoneville 2B-S9	"
105	25	1-10B	"
106	34	1-10B	"
107	36	1-10B	"
108	36	Mebane B-1	"
109	38	1-10B	"
110	42	1-10B	"
111	43	1-10B	"
112	46	1-10B	"
113	46	20-3	"
114	52	Mebane B-1	"
115	54	Mebane B-1	"
116	55	1-10B	"
117	57	Mebane B-1	"
118	60	1-10B	"
119	66	Stoneville 2B-S9	"
120	71	20-3	"
121	71	Stoneville 2B-S9	"
122	75	Stoneville 2B-S9	"
123	36	Stoneville 2B-S9	"

3.2.2. Isolamento do material

As folhas de algodoeiro com lesões angulosas foram primeiramente herborizadas. Posteriormente, foi feito isolamento do patógeno na Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC), adotando-se a seguinte técnica:

- 1) Corte de pedaços de parte lesada do tecido foliar, na região de transição para a área sadia da folha.
- 2) Imersão dos pedaços do limbo foliar cortados em álcool 96° G.L., durante um minuto.
- 3) Imersão dos pedaços de limbo foliar em uma solução contendo 1,7% de hipoclorito de sódio, durante dois minutos.
- 4) Lavagem dos pedaços de limbo foliar em água esterilizada, por aproximadamente meio minuto.
- 5) Os pedaços de limbo foliar foram em seguida triturados em uma caixa de petri esterilizada, contendo aproximadamente 0,5 ml. de água esterilizada.
- 6) A suspensão bacteriana assim obtida foi transferida e plaqueada, pelo método de "riscas" em caixa de petri contendo o meio de cultura, utilizando-se para isto alça circular.
- 7) As caixas foram em seguida colocadas em estufa incubadora regulada para 28°C.

Depois de 40 horas, foi possível repicar colônias individuais para tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado. De cada isolado procurou-se repicar de 3 a 4 colônias. Constatada a uniformidade das mesmas, foi tomada uma ao acaso para posterior purificação, após teste de patogenicidade em variedades de algodoeiro.

A purificação dos isolados foi feita pela técnica de diluição por "riscas" em meio de cultura, sendo o processo repetido 3 vezes.

3.2.3. Meios de cultura utilizados

Inicialmente, foi utilizado o meio de cultura peptona, extrato de levedura, glicerina e agar (P.E.G.A.), adotado por HAYWARD (28), com a seguinte composição:

peptona -----	5g
extrato de levedura -----	3g
glicerina -----	20g
agar -----	15g
água destilada -----	1.000 ml

O meio foi ajustado para pH 7,2.

Posteriormente, por facilidade na obtenção, foi utilizado o meio de batata-dextrose-agar (B.D.A.), com a seguinte composição:

dextrose -----	10g
batata -----	200g
agar -----	15g
água destilada -----	1.000 ml

3.2.4. Manutenção de bactérias em meio de cultura e preservação do patógeno em folhas herborizadas

A manutenção das culturas de bactérias foi feita mediante repicagens espaçadas de 20 a 30 dias, para tubos de ensaios contendo meio de cultura inclinado. Após cada repicagem, os tubos foram colocados em estufa incubadora, regulada para 28°C, durante 7 dias, e posteriormente transferidos para as condições de ambiente, no laboratório.

Vários isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura "em pé", sendo, depois de três dias, adicionado óleo mineral "nujol", previamente esterilizado.

Folhas com lesões angulares, causadas por *X. malva cearum*, foram previamente secas e preservadas em herbário, com tendo assim material para isolamento do patógeno, sempre que necessário.

3.2.5. Identificação do patógeno

A determinação dos caracteres culturais, morfológicos e fisiológicos para a identificação de *X. malvacearum* foi feita conforme recomendação do "Manual of microbiological methods" (39), aplicada a 4 reisolados do referido patógeno.

Os caracteres culturais e morfológicos observados foram: desenvolvimento, coloração, mobilidade, reação de gram, presença de flagelos e cápsulas.

O estudo morfológico para tamanho e forma da bactéria bem como do tamanho do flagelo foi feito ao microscópio eletrônico (IAC). As bactérias foram suspensas em água destilada, transferidas para as telinhas porta espécime previamente cobertas com película de colódio e carbono, contrastadas negativamente com acetato de uranila e examinadas ao microscópio eletrônico ELMISKOP I da Siemens. A calibração da magnificação do aparelho foi feita com réplica de grade de difração (2.160 linhas/mm), o que dá erros da ordem de 5%.

Os testes fisiológicos foram baseados nas características da bactéria relatadas em BERGEY'S (5), DYE (24) e feitos de acordo com o material disponível no laboratório. Os testes realizados foram os seguintes:

- 1) Liquefação de gelatina
- 2) Redução de Nitratos
- 3) Produção de H₂S
- 4) Ação sobre o leite
- 6) Utilização de ácidos a partir de ácido lático e oxálico
- 7) Produção de ácidos e gases a partir dos seguintes substratos: glicose, sacarose, maltose, arabinose, galactose, manitol, salicina, lactose, manose, dulcita, fructose, rafinose e xilose.

Para a identificação das raças fisiológicas de *X. malvacearum*, no Estado de São Paulo, foram feitos seis testes de patogenicidade (numerados de 1 a 6) e um experimento (denominado experimento nº 1).

Foi feito também um estudo do comportamento de variedades e linhagens de algodoeiro em presença de raças fisiológicas.

lógicas do patógeno em um segundo experimento (experimento número 2).

3.2.6. Obtenção e preparo do inóculo

Na obtenção do inóculo, tomou-se para cada isolado, uma cultura de bactéria que foi repicada para tubo de ensaio, contendo meio de cultura inclinado. O tubo de ensaio foi mantido em estufa incubadora, na temperatura aproximada de 28°C, por 4 dias. Posteriormente foram adicionados 5ml. de água esterilizada por tubo de ensaio, obtendo-se uma suspensão de bactérias contendo aproximadamente 7×10^8 bactérias/ml. A técnica para obtenção de inóculo foi a mesma nos 6 testes de patogenicidade. Para os dois experimentos a técnica desenvolvida na obtenção do inóculo foi semelhante, sendo posteriormente diluído o inóculo em água destilada, na proporção de 1:7.

Durante o desenvolver dos trabalhos, quando necessário, foram feitos reisolamentos de plantas de algodoeiro, para obtenção de culturas novas do isolado original.

3.3. Método de inoculação

A inoculação dos isolados foi feita na página inferior das folhas, nos cotilédones ou nas primeiras folhas definitivas do algodoeiro, através de ferimentos, mediante leve pressão de um palito.

Nos testes de patogenicidade, dependendo do número de plantas disponíveis para cada hospedeiro, foram inoculados, separadamente, até um máximo de quatro isolados por cotilédone ou folha nova. Estes isolados foram inoculados mediante ferimentos feitos com um palito de bambu, previamente mergulhado na suspensão bacteriana.

Para a avaliação da patogenicidade dos isolados, foi estabelecido o número de quatro plantas, com pelo menos oito inoculações por isolado, para cada uma das variedades ou linhagens testadas.

Para os experimentos 1 e 2 a técnica usada na inoculação foi a mesma descrita anteriormente, sendo que as inoculações obedeceram delineamento estatístico.

Foi incluído um tratamento testemunha, para cada uma das variedades ou linhagens testadas, onde a suspensão de bactérias foi substituída por água esterilizada.

3.4. Métodos de avaliação dos sintomas

A avaliação dos sintomas causados por *X.malvacearum* foi realizada, nos seis testes de patogenicidade e nos dois experimentos, quinze dias após a inoculação, mediante uma escala de notas, na fase denominada de encharcamento das lesões.

Para a avaliação dos sintomas nos seis testes de patogenicidade, foi adotada uma escala de notas que variou de 0 a 3 como segue:

- 0 = risco sem encharcamento, seco
- 1 = risco encharcado, verde-oleoso, em alguns pontos apresentando início de lesões redondas, pequenas.
- 2 = risco encharcado, verde-oleoso, com lesões pequenas em aproximadamente 50% do risco, e apresentando o início de lesões angulosas.
- 3 = lesões angulosas, verde-oleosas bem desenvolvidas ao longo de todo o risco.

A nota atribuída a cada isolado foi representada pela média das lesões obtidas nas folhas das plantas inoculadas.

As plantas com as notas 0 e 1 foram consideradas resistentes (R) e aquelas cujas notas foram 2 e 3, suscetíveis (S).

A figura 1 ilustra os sintomas de mancha angular em folhas de algodoeiro na escala adotada.

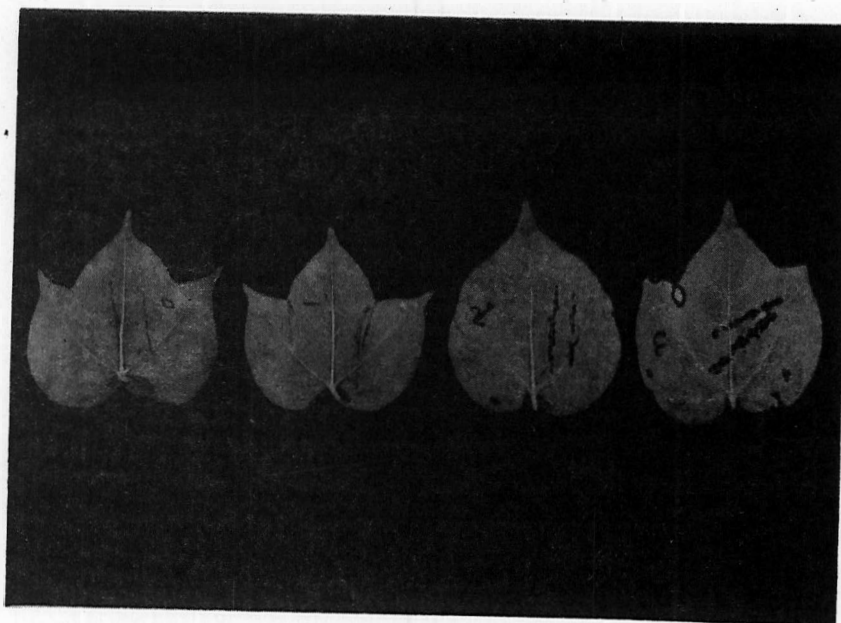


Figura 1. Escala de notas utilizadas para avaliação dos sintomas de mancha angular, em folhas definitivas de algodoeiro. Da esquerda para a direita a sequência de notas de 0 a 3, de acordo com o grau de severidade dos sintomas.

Para avaliação dos sintomas nos experimentos 1 e 2 foi adotada outra escala, cujas notas variaram de 1 a 5. Esta escala de notas é semelhante àquela adotada por BRINKERHOFF (9), para condições de casa de vegetação, sendo apresentada a seguir:

- 1 = risco sem encharcamento, seco
- 2 = risco encharcado, verde-oleoso, com algumas lesões pequenas, arredondadas, nunca angulosas
- 3 = risco encharcado, verde-oleoso, com várias lesões pequenas, arredondadas e algumas angulosas
- 4 = risco mostrando lesões angulosas, verde-oleosas, não ultrapassando 3mm.
- 5 = risco mostrando lesões angulosas, verde-oleosas maiores que 3mm.

Nos experimentos 1 e 2 as notas da escala de 1 a 5, para avaliação dos sintomas, foram dadas para cada risco de inoculação.

Como critério de avaliação, para a reação apresentada pelos hospedeiros diferenciais no experimento nº 1, considerou-se como resistentes (R) as linhagens que apresentaram nota média máxima de 1,9 e suscetíveis (S), as linhagens com nota média acima de 3. As linhagens cujas notas variaram de 2 a 2,9 foram consideradas de reações intermediárias (I). A utilização do presente critério de avaliação permite uma melhor visualização das reações dos hospedeiros diferenciais e comparação com o quadro citado por BRINKERHOFF (11), onde são apresentadas as reações das linhagens diferenciais para as 17 raças fisiológicas identificadas até a presente data.

3.5. Condições de ambiente reinantes por ocasião da realização dos testes de patogenicidade e experimentos

Todos os testes de patogenicidade e experimentos foram estudados em casa de vegetação, onde a temperatura média variou de 22 a 30°C e a umidade relativa do ar foi superior a 70%.

3.6. Identificação das raças fisiológicas

3.6.1. Teste de patogenicidade nº 1:- Estudo de patogenicidade de isolados de *X.malvacearum*, procedentes de várias localidades, em variedades de algodoeiro com diferentes genes de resistência.

Os isolados 3, 4, 7, 9, 11, 17, 18, 20, 23, 25, 28, 30 e 31, apresentados no quadro 2, foram escolhidos entre 31 culturas de *X.malvacearum* levando-se em consideração os graus de patogenicidade quando inoculados na variedade IAC 12-2.

Os treze isolados mencionados foram testados nas variedades de algodoeiro: Mebane B-1, Stoneville 20, 95-96A Bu 61, 101-102B Bu 61, REBA B-50 e IAC 12-2.

A inoculação dos isolados e a avaliação dos sintomas foram feitas segundo técnica descrita respectivamente nos

Ítems 3.3 e 3.4.

3.6.2. Teste de patogenicidade nº 2:- Estudo da patogenicidade para os isolados de *X.malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, em variedades de algodoeiro portadores de genes de resistência e linhagens IAC.

Dentre os treze isolados utilizados no teste de patogenicidade nº 1, os isolados nºs 3, 4, 7, 20 e 25 apresentaram diferenças em patogenicidade e foram selecionados e inoculados nas linhagens de algodoeiro: (Acala 61/60 x Nu-16) 70/H-37, IAC RM3-4123 70/H-4, IAC RM2-2160 70/H-24 e nas variedades 101-102B Bu 61, Stoneville 20 e IAC 12-2.

A inoculação dos isolados e a avaliação dos sintomas foram feitas segundo técnica descrita respectivamente nos ítems 3.3 e 3.4.

3.6.3. Teste de patogenicidade nº 3:- Estudo da patogenicidade para isolados pertencentes a diferentes grupos, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.

Os isolados 3, 5, 7, 20, 23, 25, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 66, 70, 71 e 72, apresentados no quadro 2, foram selecionados para este teste, após purificação e avaliação do grau de patogenicidade dos mesmos na variedade IAC 12-2.

No presente teste foram inoculadas as variedades de algodoeiro 101-102B Bu 61, Stoneville 20 e IAC 12-2 e as linhagens (Acala 61/60 x Nu-16) 70/H-37, IAC RM3-4123 70/H-4 e IAC RM2-2160 70/H-24.

A inoculação dos isolados e a avaliação dos sintomas foram feitas segundo técnica descrita respectivamente nos ítems 3.3 e 3.4

3.6.4. Teste de patogenicidade nº 4:- Estudo da patogenicidade para isolados de diferentes grupos, em hospedeiros diferenciais, para identificação de raças fisiológicas.

No presente estudo foram utilizados os isolados 3, 5, 7, 20, 23, 25, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 66, 70 e 71, selecionados de acordo com a patogenicidade apresentada nos testes anteriores e os isolados 52, 54, 55.1, 55.2, 57, 60, 61 e 75 previamente testados para patogenicidade na variedade IAC 12-2. Os vinte e quatro isolados foram inoculados nas linhagens diferenciais Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3 e 101-102B.

A inoculação dos isolados e a avaliação dos sintomas foram feitas segundo técnica descrita respectivamente nos itens 3.3 e 3.4.

3.6.5. Teste de patogenicidade nº 5:- Comparação de patogenicidade entre isolados mantidos em laboratório e os respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pela variedade IAC 12-2.

Neste teste de patogenicidade foram utilizados os isolados nºs 3, 5, 7, 20, 23, 25, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 52, 54, 55.1, 55.2, 57, 60, 61, 66, 70, 71 e 75, mantidos em laboratório mediante tres a quatro repicagens sucessivas, e os respectivos reisolados, oriundos de reisolamentos obtidos a partir da variedade IAC 12-2.

Oito folhas da variedade IAC 12-2 foram inoculadas para cada isolado, sendo que em uma mesma folha foram inoculados os dois tipos de cultura (nova e mantida por repicagens).

A inoculação dos isolados e a avaliação dos sintomas foram feitas segundo técnica descrita respectivamente nos itens 3.3 e 3.4.

3.6.6. Teste de patogenicidade n° 6:- Teste de patogenicidade para isolados e reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças de *X.malvacearum*.

Os reisolados n°s 101 a 123, utilizados no presente teste, foram obtidos através dos reisolamentos feitos para dezenove isolados de *X.malvacearum* utilizados no teste de patogenicidade n° 4. Os reisolados foram obtidos a partir de folhas dos hospedeiros diferenciais que apresentavam maior grau de severidade de sintomas.

Neste estudo, foi testada a patogenicidade dos isolados de n°s 3, 7, 25, 40, 42, 43, 46, 52, 54, 57, 60, 61, 70 e 71, mantidos mediante seis repicagens, e dos reisolados de n°s 101 a 123.

As suspensões de bactérias obtidas para as diferentes culturas foram inoculadas, separadamente, seguindo a técnica descrita no item 3.3., nos hospedeiros diferenciais de raças fisiológicas de *X.malvacearum*.

A avaliação dos sintomas foi feita segundo a técnica descrita no item 3.4.

3.6.7. Experimento n° 1:- Estudo da patogenicidade de reisolados de *X.malvacearum* pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, inoculados nos cotilédones e folha nova de hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas.

O isolado 40 e os reisolados 101, 107, 112, 115 e 118, denominados daqui para a frente de reisolados, foram inoculados separadamente nas linhagens diferenciais Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3 e 101-102B.

Neste experimento, foram utilizadas plantas obtidas de sementeiras feitas em duas épocas de plantio, espaçadas entre si de vinte dias. A inoculação foi feita simultaneamente nos cotilédones e folha nova quando as plantas tinham sete e vinte e sete dias, respectivamente, após a germinação.

As plantas com inoculações feitas nos cotilédones foram mantidas nas casas de vegetação das Seções de Algodão e Microbiologia Fitotécnica (IAC), enquanto que as plantas mais velhas foram mantidas nas casas de vegetação das Seções de Algodão e Microbiologia Fitotécnica (IAC) e do Departamento de Fitopatologia (ESALQ).

Para cada um dos hospedeiros diferenciais foram semeados cinco vasos, deixando-se após a germinação um número de três plantas por vaso. Em cada uma das plantas foi feita a inoculação dos reisolados e o ferimento testemunha.

A avaliação da patogenicidade por reisolado, foi baseada na média das notas atribuídas a cada reisolado nas três plantas do vaso, segundo método descrito no item 3.4.

Neste experimento procurou-se verificar a eficiência da inoculação feita no cotilédone ou na folha nova do algodoeiro.

3.7. Experimento nº 2:- Comportamento de algumas variedades e linhagens paulistas de algodoeiro, em presença de diferentes raças fisiológicas de *X.malvacearum*.

Este experimento teve por objetivo testar as reações das variedades paulistas IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2 e das linhagens IAC RM3-4133 71/523, (Acala x Nu-16) 71/213, IAC 12-2 71/170 aos reisolados de *X.malvacearum* 101, 107, 112 e 115.

No experimento foi adotado o delineamento estatístico de blocos casualizados, com parcelas subdivididas, com oito repetições. Quatro repetições foram mantidas na casa de vegetação da Seção de Algodão (IAC) e as demais na casa de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica.

As parcelas foram representadas pelas três variedades e três linhagens. As subparcelas pelos diferentes reisolados e testemunha.

Cada variedade ou linhagem foi semeada em oito vasos, sendo deixadas três plantas por vaso. A inoculação dos reisolados foi feita separadamente, nos cotilédones de cada uma das plantas, juntamente com o ferimento testemunha. Em

cada repetição, foi tomada a média das notas obtidas por isolado, nas três plantas contidas no vaso.

Na análise estatística deste experimento, não entraram a linhagem (Acala x Nu-16) 71/713 e a testemunha, por não apresentarem variância.

Utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade para a comparação entre as médias dos tratamentos.

Neste experimento foi feito um estudo do possível efeito de ambiente na severidade dos sintomas. Para tal foram comparadas as médias das repetições obtidas nas duas casas de vegetação, anteriormente mencionadas, utilizando-se o teste de Scheffé a 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS

De acordo com os dados obtidos, os resultados foram grupados em três itens: identificação do patógeno, identificação das raças fisiológicas de *X.malvacearum*, e comportamento de algumas variedades e linhagens de algodoeiro em presença de diferentes raças fisiológicas do patógeno.

4.1. Identificação do patógeno

As pesquisas para características culturais e aspectos morfológicos revelaram que a bactéria apresenta uma reação gram negativa, é móvel e não produz cápsulas. A bactéria desenvolve-se bem em meio de cultura, apresentando colônia viscosa, em forma circular ou levemente irregular, e de coloração amarelada.

As fotomicrografias eletrônicas revelaram que a bactéria tem a forma de bastonete, com as extremidades arredondadas, e um flagelo polar. Estas características podem ser observadas na figura 2.

As mensurações de 98 talos bacterianos, feitas nos aumentos que variavam de 7.950X a 36.000X, mostraram que o comprimento da bactéria variou de 1,51 a 1,97 μm e a largura de 0,48 a 0,76 μm .

O comprimento do flagelo de dez talos bacterianos foi em média de 5,62 μm e a largura de 0,016 μm . Em média, o comprimento dos flagelos foi três vezes maior que o comprimento da bactéria.

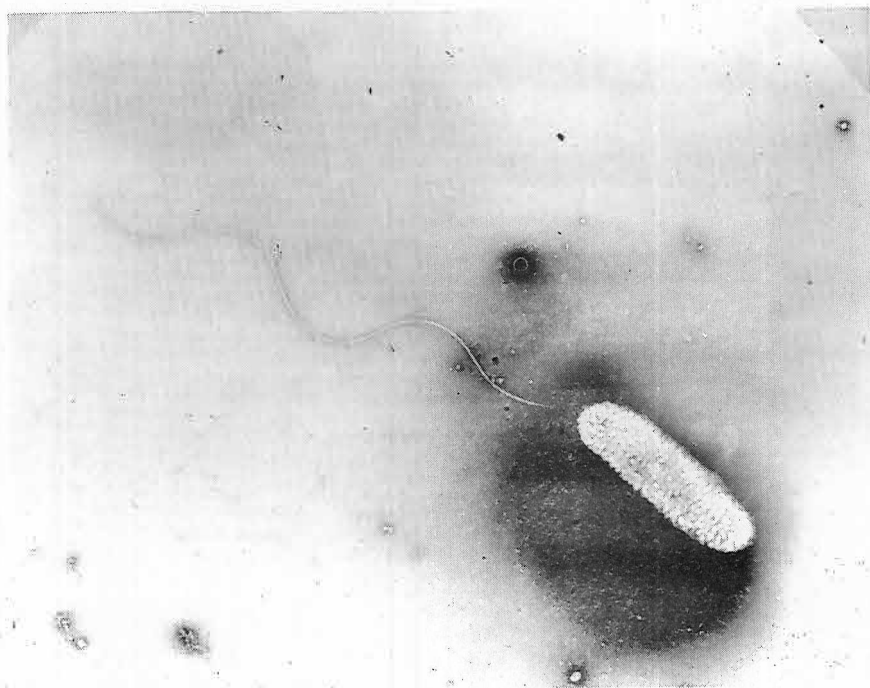


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de um talo bacteriano de *X. malvacearum*.

Os resultados obtidos para os testes fisiológicos são apresentados no quadro 4.

Os resultados obtidos no estudo das características fisiológicas, quadro 4, não mostraram diferenças entre os reisolados, com exceção do reisolado 101, que liquefez a gelatina mais rapidamente.

Os testes para observação dos caracteres fisiológicos mostraram que: a bactéria liquefez a gelatina; não reduziu o nitrato; produziu H_2S ; hidrolisou o amido; produziu reação alcalina em meio contendo ácido oxálico; e não produziu reação alcalina no meio contendo o ácido lático; não produziu gás em meios contendo os substratos: glicose, sacarose, maltose, arabinose, galactose, manitol e salicina; acidificou o meio a partir dos seguintes substratos: glicose, sacarose, maltose e galactose e não produziu ácido a partir de: arabinose, manitol e salicina.

A ação dos reisolados sobre o leite foi negativa, não havendo a coagulação do mesmo.

Quadro 4. Características fisiológicas apresentadas por quatro reisolados de *X.malvacearum* em diferentes meios de cultura

MEIOS DE CULTURA	REISOLADOS			
	101	107	112	115
Liquefação de gelatina	A+	A	A	A
Redução de nitratos	-	-	-	-
Produção de H ₂ S	A	A	A	A
Hidrólise do amido	A	A	A	A
Ação sobre ácidos	{ lático oxálico	B	B	B
		-	-	-
Ação sobre o leite	-	-	-	-
Utilização dos substratos (1)	{ glicose sacarose maltose arabinose galactose manitol salicina	C	C	C
		C	C	C
		C	C	C
		-	-	-
		C	C	C
		-	-	-
		-	-	-

A = liquefez a gelatina, produziu H₂S, e hidrolizou o amido.

A+ = liquefez a gelatina mais rapidamente.

B = produziu reação alcalina no meio contendo ácido lático.

C = produziu reação ácida nos substratos.

- = não reduziu o nitrato, não produziu reação alcalina no meio de ácido oxálico, não agiu sobre o leite e não produziu reação ácida nos substratos.

(1) = em nenhum dos substratos houve produção de gás.

4.2. Identificação das raças fisiológicas

4.2.1. Teste de patogenicidade nº 1:- Estudo da patogenicidade de de isolados de *X.malvacearum*, procedentes de várias localidades, em variedades de algodoeiro com diferentes genes de resistência.

Os resultados da inoculação dos 13 isolados de *X.malvacearum* em seis variedades de algodoeiro são apresentados no apêndice, quadro I.

As reações, resistentes (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades aos isolados testados são vistas no quadro 5.

Quadro 5. Teste de patogenicidade nº 1:- Reações, resistentes (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades, aos 13 isolados de *X.malvacearum*.

ISOLADOS	VARIEDADES					
	95-96A Bu 61	101-102B Bu 61	Ston.20	Mebane B-1	REBA B-50	IAC 12-2
3	R	R	R	S	R	S
4	R	R	R	S	R	S
9	R	R	R	S	R	S
11	R	R	R	S	R	S
17	R	R	R	S	R	S
18	R	R	R	S	R	S
20	R	R	R	S	R	S
23	R	R	R	S	R	S
28	R	R	R	S	R	S
30	R	R	R	S	R	S
31	R	R	R	S	R	S
7	R	R	S	S	R	S
25	R	R	S	S	R	S
Test.	-	-	-	-	-	-

Os resultados deste teste mostraram que somente os isolados 7 e 25 foram patogênicos para a variedade Stoneville 20. Nenhum dos 13 isolados testados foi patogênico nas variedades 101-102B Bu 61 e REBA B-50. As variedades Mebane B-1 e IAC 12-2 apresentaram reação de suscetibilidade a todos os isolados testados. A variedade 95-96A Bu 61 mostrou certa variação na resistência aos isolados 4, 9, 18, 25 e 31, conforme quadro 1 do apêndice, embora sendo considerada como resistente para todos os isolados.

4.2.2. Teste de patogenicidade nº 2:- Estudo da patogenicidade para os isolados de *X.malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.

Os resultados deste teste de patogenicidade para os cinco isolados, quando inoculados nas variedades e linhagens de algodoeiro, são apresentados no quadro II, do apêndice.

As reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades e linhagens aos cinco isolados testados, são mostradas no quadro 6.

Quadro 6. Teste de patogenicidade nº 2:- Reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades e linhagens, aos 5 isolados de *X.malvacearum*.

ISOLADOS	VARIEDADES E LINHAGENS					
	(Ac.61/60 x Nu-16) 70/H-37	IAC RM3 4123 70/H-4	IAC RM2 2160 70/H-24	101-102B Bu 61	Ston. 20	IAC 12-2
3	R	R	R	R	R	S
4	R	R	R	R	R	S
20	R	R	R	R	R	S
7	R	S	S	R	S	S
25	R	S	S	R	S	S
Test.	-	-	-	-	-	-

Os resultados obtidos neste teste mostraram que houve dois grupos de isolados que foram patogênicos às variedades e linhagens testadas. O primeiro grupo, formado pelos isolados 3, 4 e 20, provocou sintomas de suscetibilidade somente na variedade IAC 12-2, enquanto que os isolados 7 e 25 provocaram reação de suscetibilidade nas linhagens IAC RM3 4123 70/H-4 e IAC RM2-2160 70/H-24 e nas variedades Stoneville 20 e IAC 12-2. As reações apresentadas pelas variedades 101-102B Bu 61, Stoneville 20 e IAC 12-2 aos cinco isolados testados confirmaram os mesmos resultados obtidos no teste de patogenicidade nº 1.

A variedade 101-102B Bu 61 e a linhagem (Acala 61/60 x Nu-16) 70/H-37 apresentaram reação de resistência semelhante para todos os isolados testados, havendo uma exceção para esta linhagem onde mostrou certa variação ao isolado 25, conforme quadro II do apêndice. As linhagens IAC RM3-4123 70/H-4 e IAC RM2-2160 70/H-24 mostraram um grau de resistência semelhante a variedade Stoneville 20, sendo consideradas

resistentes aos isolados 3, 4 e 20 e suscetíveis aos isolados 7 e 25.

A figura 3 mostra a incidência da mancha angular provocada nas folhas de algodoeiro da linhagem IAC RM2-2160 70/H-24, pelos isolados 7, 20 e 25.

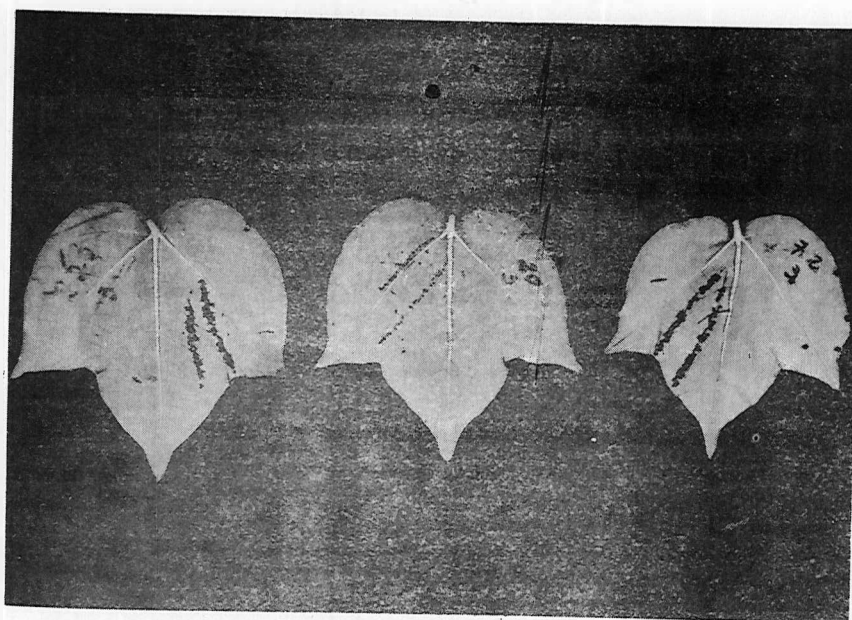


Figura 3. Reação da linhagem de algodoeiro IAC RM2-2160 70/H-24, a isolados de *X. malvacearum*. Esquerda: isolado 25 = reação suscetível; centro: isolado 20 = reação resistente; direita: isolado 7 = reação suscetível.

4.2.3. Teste de patogenicidade nº 3:- Estudo da patogenicidade para isolados pertencentes a diferentes grupos, em variedades de algodoeiro portadores de genes de resistência e linhagens IAC.

Os resultados obtidos pela inoculação dos 17 isolados de *X. malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, nas seis variedades e linhagens de algodoeiro são apresentados no quadro III, do apêndice.

As reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades e linhagens aos isolados, são vistas no quadro 7.

Quadro 7. Teste de patogenicidade nº 3:- Reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelas variedades e linhagens aos isolados de *X.malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade.

ISOLADOS	VARIEDADES E LINHAGENS					
	(Ac.61/60 x Nu-16)	IAC RM3 4123	IAC RM2 2160	101-102B	Ston. 20	IAC 12-2
	70/H-37	70/H-4	70/H-24	Bu 61		
5	R	R	S	R	R	S
40	R	R	S	R	R	S
42	R	R	S	R	R	S
25	R	S	S	R	S	S
36	R	S	S	R	S	S
70	R	S	S	R	S	S
71	R	S	S	R	S	S
38	S	S	S	R	S	S
43	S	S	S	R	S	S
3	R	R	R	R	R	S
20	R	R	R	R	R	S
23	R	R	R	R	R	S
66	R	R	R	R	R	S
34	S	R	R	R	R	S
7	R	R	R	R	S	R
46	R	R	R	R	R	R
72	R	R	R	R	R	R
Test.	-	-	-	-	-	-

O teste de patogenicidade revelou que os isolados 5, 40 e 42 foram patogênicos à variedade IAC 12-2 e à linhagem IAC RM2-2160 70/H-24, enquanto que os isolados 25, 36, 70 e 71 provocaram reações de suscetibilidade nas variedades IAC 12-2 e Stoneville 20 e nas linhagens IAC RM2-2160 70/H-24 e IAC RM3-4123 70/H-4. Os isolados 38 e 43 provocaram reações de suscetibilidade em todas as variedades e linhagens testadas, com exceção da variedade 101-102B Bu 61, enquanto que os isolados 3, 20, 23 e 66 provocaram reação de suscetibilidade somente na variedade IAC 12-2. O isolado 34 provocou sintomas de suscetibilidade na variedade IAC 12-2 e na linhagem (Acala 61/60 x Nu-16) 70/H-37. O isolado 7 só provocou reação de suscetibilidade na variedade Stoneville 20, enquanto que os isolados 46 e 72 não provocaram sintomas de suscetibilidade em nenhuma das variedades.

A variedade 101-102B Bu 61 comportou-se como resistente a todos os isolados testados. O mesmo ocorreu com a linhagem (Acala 61/60 x Nu-16) 70/H-37, com exceção para os isolados 34, 38 e 43. As linhagens IAC RM3-4123 70/H-4 e IAC RM2-2160 70/H-24 apresentaram em média reações semelhante à variedade Stoneville 20 para os isolados 3, 20, 23, 25, 34, 36, 38, 43, 66, 70 e 71. A variedade IAC 12-2 foi suscetível a todos os isolados com exceção dos isolados 7, 46 e 72.

4.2.4. Teste de patogenicidade nº 4:- Estudo da patogenicidade de para isolados de diferentes grupos, em hospedeiros diferenciais, para identificação de raças fisiológicas.

A média das leituras da inoculação dos 24 isolados de *X.malvacearum* nos hospedeiros diferenciais são apresentadas no quadro IV, do apêndice.

As reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelos hospedeiros diferenciais, aos isolados de diferentes grupos de patogenicidade, são vistas no quadro 8.

Este teste revelou uma grande variação da patogenicidade dos isolados nas linhagens diferenciais.

Os isolados 5, 42, 55.2, 60, 71 e 75 provocaram sintomas de suscetibilidade nas linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9 e 1-10B, enquanto que os isolados 23, 40 e 66 provocaram reação de suscetibilidade nas linhagens Acala 44 e Stoneville 2B-S9. As linhagens Acala 44 e 1-10B apresentaram reação de suscetibilidade aos isolados 3 e 52. Os isolados 43 e 57 provocaram reação de suscetibilidade nas linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20 e 1-10B enquanto que os isolados 7 e 61 foram patogênicos somente para a linhagem 1-10B. Os isolados 25, 38, 54, 70 e 34 mostraram diferenças em patogenicidade nos hospedeiros diferenciais, não sendo possível grupá-los. Ocorreu o mesmo com os isolados 36 e 46. O isolado 46 só não foi patogênico na linhagem 101-102B, enquanto que o isolado 36 não foi patogênico nas linhagens 101-102B e 20-3. Os isolados 20 e 55.1 não foram patogênicos em nenhuma das linhagens.

A linhagem 101-102B foi resistente a todos os isolados testados. A linhagem 20-3 foi suscetível somente aos

Quadro 8. Teste de patogenicidade nº 4:- Reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentadas pelos hospedeiros diferenciais, aos isolados de *X.malvacearum*, de diferentes grupos de patogenicidade.

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA							
ISOLA DOS	Ac.44 (ne- nhum)	Ston. 2B-S9 (pol.*)	Ston.20 (B ₇ + + pol.)	Mebane B-1 (B ₂ + + pol.)	1-10B (B _{In} + + pol.)	20-3 (B _N + + pol.)	101-102B (B ₂ B ₃ + + desc.**)
5	S	S	R	R	S	R	R
42	S	S	R	R	S	R	R
55.2	S	S	R	R	S	R	R
60	S	S	R	R	S	R	R
71	S	S	R	R	S	R	R
75	S	S	R	R	S	R	R
23	S	S	R	R	R	R	R
40	S	S	R	R	R	R	R
66	S	S	R	R	R	R	R
3	S	R	R	R	S	R	R
52	S	R	R	R	S	R	R
43	S	S	S	R	S	R	R
57	S	S	S	R	S	R	R
7	R	R	R	R	S	R	R
61	R	R	R	R	S	R	R
25	S	S	S	R	S	S	R
38	S	S	R	S	S	S	R
54	S	S	S	R	R	R	R
70	R	R	S	S	S	R	R
34	S	R	R	S	S	S	R
36	S	S	S	S	S	R	R
46	S	S	S	S	S	S	R
20	R	R	R	R	R	R	R
55.1	R	R	R	R	R	R	R
Test.	-	-	-	-	-	-	-

* = pol. = poligenes

** desc. = desconhecido

isolados 25, 38, 34 e 46, enquanto que a linhagem Mebane B-1 foi suscetível aos isolados 38, 70, 34, 36 e 46. A linhagem Stoneville 20 foi suscetível aos isolados 43, 57, 25, 54, 70, 36 e 46 e resistentes aos outros isolados testados. A linhagem 1-10B foi resistente somente aos isolados 23, 40, 66 e 54, enquanto que a linhagem Stoneville 2B-S9 foi resistente aos

isolados 3, 52, 7, 61, 70 e 34. A linhagem Acala 44 foi suscetível a todos os isolados com exceção dos isolados 7 e 61.

A figura 4 em uma única folha inoculada ilustra a reação da linhagem diferencial Stoneville 2B-S9 aos isolados 3 e 5, inoculados numa mesma folha, sendo o hospedeiro resistente ao isolado 3 e suscetível ao isolado 5.

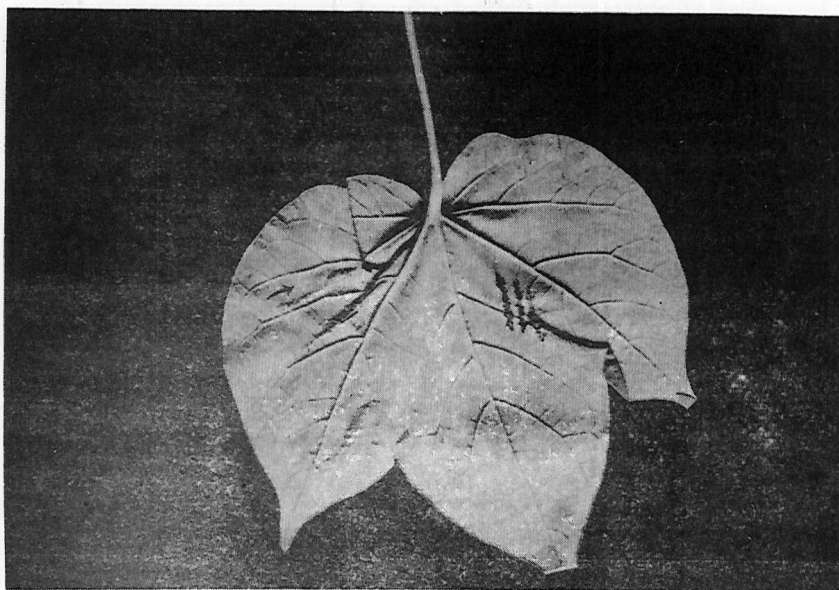


Figura 4. Reação da linhagem diferencial Stoneville 2B-S9 a isolados de *X. malvacearum*. Esquerda: (ll) isolado 3 = reação resistente. Direita: (lll) isolado 5 = reação suscetível.

4.2.5. Teste de patogenicidade nº 5:- Comparação de patogenicidade entre isolados mantidos em laboratório e os respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pela variedade IAC 12-2.

Os resultados obtidos para este teste são apresentados no quadro V, do apêndice.

Os resultados para verificar a possível perda de patogenicidade mostraram, que não ocorreu diferença na severidade da doença, na variedade IAC 12-2, quando inoculada pelos isolados mantidos em laboratório e os reisolados (culturas novas) de nºs 3, 61, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 57, 70, 71, 75, 5,

23, 60 e 66. Os isolados 7, 25 e 55.2, mantidos em laboratório, causaram uma maior severidade de doença, quando comparados com os respectivos reisolados, enquanto que o inverso foi observado para os isolados 46, 52 e 54. Foi verificado que os isolados 20 e 55.1 perderam a patogenicidade.

4.2.6. Teste de patogenicidade nº 6:- Teste de patogenicidade para isolados e reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças de *X.malvacearum*.

Os resultados da inoculação nos hospedeiros diferenciais para os 23 reisolados obtidos após "passagem" pelos hospedeiros diferenciais, e os 14 isolados mantidos em laboratório mediante seis repicagens são apresentados no quadro VI, do apêndice.

As reações, resistente (R) e suscetível (S), apresentada pelos hospedeiros diferenciais aos 23 reisolados e 14 isolados de *X.malvacearum*, são mostradas no quadro 9.

Os resultados deste teste mostraram que os reisolados 101, 116, 118, 120 e 121 provocaram sintomas de suscetibilidade nas linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9 e 1-10B, enquanto que os reisolados 106, 110 e 119 mostraram-se mais patogênicos nas linhagens Acala 44 e Stoneville 2B-S9. Os reisolados 107, 108 e 123 foram patogênicos em todos os hospedeiros com exceção das linhagens 20-3 e 101-102B, enquanto que os reisolados 112 e 113 foram patogênicos para todas as linhagens, com exceção feita a linhagem 101-102B. O reisolado 115 provocou reação de suscetibilidade nas linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9 e Stoneville 20. As linhagens 20-3 e 101-102B foram resistentes aos reisolados 102, 103, 104, 105, 109, 111, 114, 117 e 122.

Os resultados do quadro 9 mostram, também, que as reações das linhagens diferenciais foram semelhantes para os reisolados 107, 108 e 123, obtidos respectivamente das linhagens 1-10B, Mebane B-1 e Stoneville 2B-S9. Também o comportamento dos reisolados 120 e 121, obtidos respectivamente das linhagens 20-3 e Stoneville 2B-S9, foi semelhante. Finalmente, para os reisolados 112 e 113 obtidos respectivamente das

Quadro 9. Teste de patogenicidade nº 6:- Reações, resistente (R), e suscetível (S), apresentadas pelos hospedeiros diferenciais aos reisolados e isolados de *X.malvacearum*.

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA							
ISOLA DOS	Ac.44 (ne- nhum)	Ston. 2B-S9 (pol.*)	Ston.20 (B ₇ + +pol.)	Mebane 1-10B B-1 (B ₂ + +pol.)	20-3 (B _{In} + + pol.)	101-102B (B _N + + pol.)	B ₂ B ₃ + +desc.**)
101	S	S	R	R	S	R	R
116	S	S	R	R	S	R	R
118	S	S	R	R	S	R	R
120	S	S	R	R	S	R	R
121	S	S	R	R	S	R	R
106	S	S	R	R	R	R	R
119	S	S	R	R	R	R	R
107	S	S	S	S	S	R	R
108	S	S	S	S	S	R	R
123	S	S	S	S	S	R	R
115	S	S	S	R	R	R	R
112	S	S	S	S	S	S	R
113	S	S	S	S	S	S	R
102	S	S	R	R	R	R	R
103	S	R	R	R	S	R	R
104	S	R	R	R	R	R	R
105	S	R	R	R	R	R	R
109	S	R	R	R	R	R	R
110	S	S	R	R	R	R	R
111	S	S	S	R	R	R	R
114	R	R	R	R	R	R	R
117	R	S	R	R	R	R	R
122	S	S	R	R	R	R	R
42	S	R	R	R	R	R	R
60	S	S	R	R	R	R	R
71	S	S	R	R	S	R	R
40	S	S	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R	R
52	R	R	R	R	R	R	R
43	S	R	R	R	R	R	R
57	S	S	R	R	R	R	R
7	R	R	R	R	R	R	R
61	R	R	R	R	R	R	R
25	R	R	R	R	R	R	R
54	S	S	S	R	R	R	R
70	R	R	R	R	R	R	R
46	S	R	R	R	S	R	R
Test.	-	-	-	-	-	-	-

* pol. = poligenes

** desc. = desconhecido

linhagens 1-10B e 20-3, houve também mesma resposta.

A linhagem diferencial 101-102B foi resistente a todos os reisolados testados, enquanto que a linhagem 20-3, foi suscetível somente aos reisolados 112 e 113. As outras linhagens diferenciais apresentaram diferentes reações aos reisolados testados.

A perda de patogenicidade pode ser observada, pelo quadro 9, comparando-se as reações dos hospedeiros diferenciais. Os reisolados 110, 118, 111, 102, 105, 112 e 113 foram respectivamente mais patogênicos que os isolados originais 42, 60, 43, 7, 25 e 46, mantidos após seis repicagens. Os reisolados 120, 121 e 115 provocaram nos hospedeiros diferenciais sintomas semelhantes aos isolados originais 71 e 54, mantidos por seis repicagens. Já o reisolado 114 e o original 52 não provocaram sintomas de suscetibilidade em nenhuma das linhagens testadas.

4.2.7. Experimento nº 1:- Estudo de patogenicidade de reisolado de *X.malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, inoculados nos cotilédones e folha nova definitiva de hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas.

Os resultados obtidos pela inoculação dos reisolados e tratamento testemunha, nos hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas, são apresentados no quadro VII e VIII do apêndice.

Os dados apresentados no quadro VIII do apêndice, mostram que houve, na média geral obtida para cada reisolado, diferença para reisolados e variedades. O reisolado 112 foi o mais patogênico. As linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9, e 1-10B foram, em média, mais suscetíveis.

As reações, resistente (R), suscetível (S) e intermediária (I), apresentadas pelas linhagens diferenciais à *X.malvacearum*, são vistas no quadro 10.

Quadro 10. Experimento nº 1:- Reações, resistente (R), suscetível (S) e intermediária (I), apresentadas pelas linhagens diferenciais à *X.malvacearum*.

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA							
REISO LADOS	Ac.44	Ston. 2B-S9	Ston.20	Mebane B-1	1-10B	20-3	101-102B
	(ne- nhum)	(pol.*)	(B ₇ + pol.)	(B ₂ + pol.)	(B _{In} + pol.)	(B _N + pol.)	(B ₂ B ₃ + desc.**)
101	S	S	R	R	S	R	R
107	S	I	I	I	S	R	R
40	S	S	R	R	S	R	R
112	S	S	S	I	S	S	R
115	S	I	I	I	I	R	R
118	S	S	R	R	S	R	R
Test.	-	-	-	-	-	-	-

* pol. = polígenes

** desc. = desconhecido

Os dados apresentados no quadro 10 mostram que os reisolados 101, 40 e 118 provocaram reação de suscetibilidade nas linhagens Acala 44, Stoneville 2B-S9 e 1-10B. Os reisolados 107 e 115 provocaram reações semelhantes de suscetibilidade nas linhagens Acala 44 e intermediária nas linhagens Stoneville 2B-S9, Stoneville 20 e Mebane B-1. No estudo da linhagem 1-10B o reisolado 107 provocou reação de suscetibilidade enquanto que o reisolado 115 provocou reação intermediária. O reisolado 112 somente não foi patogênico na linhagem 101-102B.

Nos quadros IX e X, do apêndice, são apresentados os resultados das análises de variância obtidos nos estudos comparativos da inoculação feita na folha definitiva e nos cotilédones do algodoeiro, respectivamente para as casas de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC) e da Seção de Algodão (IAC).

As médias das notas obtidas em casa de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC), pela inoculação

da folha definitiva e nos cotilédones foram respectivamente 3,05 e 3,38, e em casa de vegetação da Seção de Algodão (IAC) foram respectivamente 2,87 e 3,19, não foram diferentes estatisticamente.

A figura 5 ilustra a reação obtida, por linhagem diferencial, numa única folha, pela inoculação dos reisolados e da testemunha.

4.3. Experimento nº 2:- Comportamento de algumas variedades e linhagens paulistas de algodoeiro em presença de diferentes raças fisiológicas de *Xanthomonas malvacearum*.

Os resultados obtidos pela inoculação de quatro reisolados e a testemunha em seis variedades e linhagens de algodoeiro, são encontrados no quadro XI do apêndice.

Para a análise da variância foi eliminado o tratamento de inoculação com água destilada, por não apresentar qualquer sintoma. Também não foi computada a linhagem (Acala x Nu-16) 71/213, por razão idêntica.

A análise da variância, para os dados obtidos e apresentados no quadro XII do apêndice, revelou um valor F significativo ao nível de 1% de probabilidade, para variedades e linhagens, repetições, reisolados, interações reisolados x variedades e linhagens.

Os dados apresentados no quadro XIII do apêndice, mostraram que não houve diferenças significativas entre os reisolados 101 e 112, enquanto que o reisolado 101 diferiu dos reisolados 107 e 115.

Os dados relativos às médias das variedades e linhagens mostraram que a linhagem IAC 12-2 71/170 foi mais resistente, diferindo estatisticamente das variedades IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2 e da linhagem IAC RM3 71/523.

O estudo dos reisolados dentro de variedades e linhagens, quadro XIII do apêndice, (d.m.s. = 0,38) mostrou que para a variedade IAC RM3, o reisolado 101 foi o mais patogênico diferindo dos reisolados 107 e 115. Para as variedades IAC 13-1 e IAC 12-2 o reisolado 101 foi o mais patogênico diferindo estatisticamente dos reisolados 107, 112 e 115. Na

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA

REISOLADOS	Acala 44 (nenhum)	Ston. 2B-S9 (pol.)	Ston. 20 (B ₇ + pol.)	Mebane B-1 (B ₂ +pol.)	1-10B (B _{In} + + pol.)	20-3 (B _N + + pol.)	101-102B (B ₂ B ₃ + + desc.)
------------	----------------------	-----------------------	-------------------------------------	---	--	--------------------------------------	--

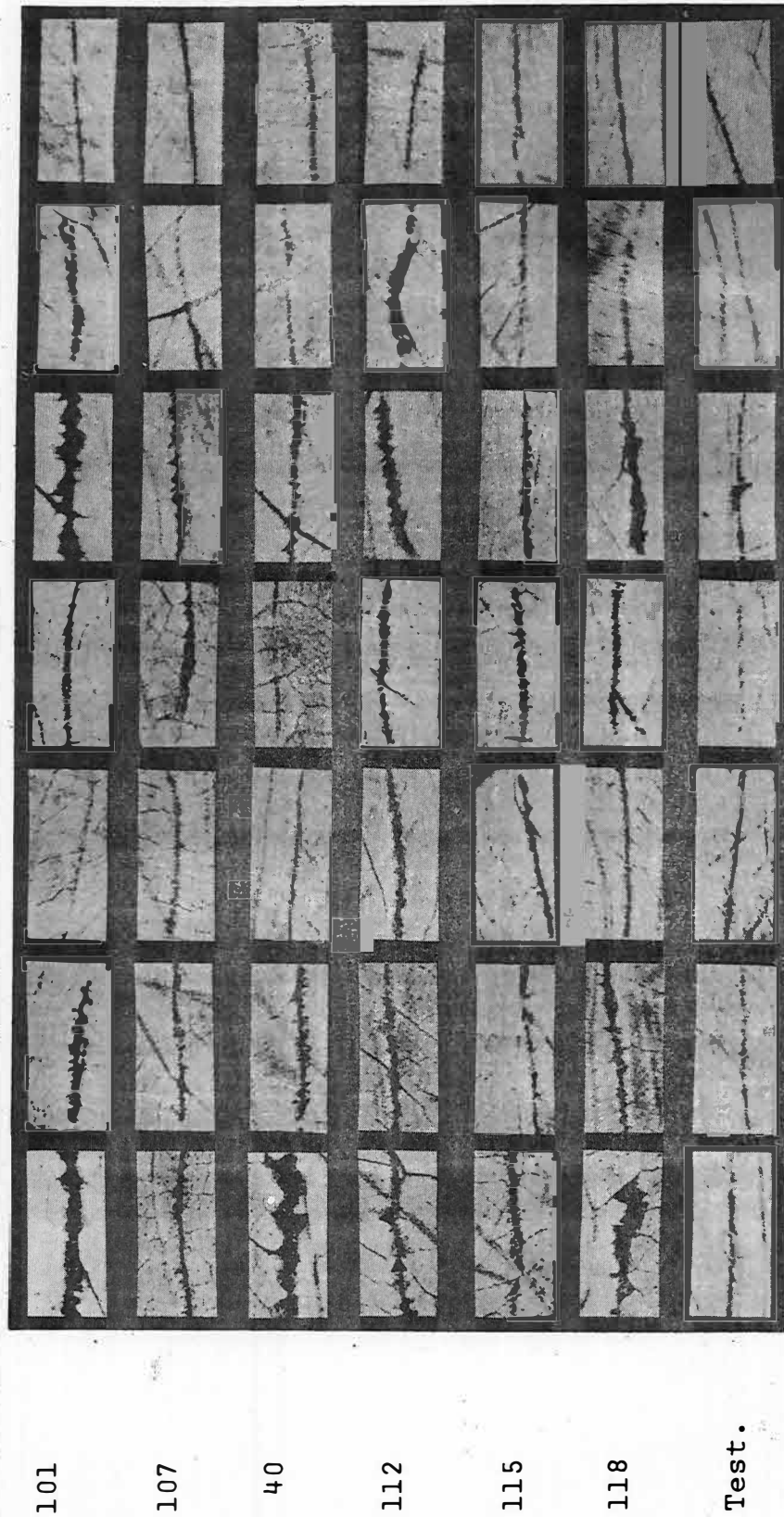


Figura 5. Reação das linhagens diferenciais quando inoculadas por reisolados de *X. mativacearum* junstamente com o tratamento testemunha.

linhagem IAC RM3 71/523 o reisolado 101 foi o menos patogênico, enquanto que para a linhagem IAC 12-2 71/170 não houve diferença estatística entre os quatro reisolados testados.

O estudo das variedades e linhagens para o reisolado 101 (d.m.s.=1,12) mostrou que as variedades IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2 foram iguais estatisticamente, diferindo das linhagens IAC RM3 71/523 e IAC 12-2 71/170. As variedades IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2 e a linhagem IAC RM3 71/523 foram estatisticamente iguais entre si para os reisolados 107 e 115, diferindo somente da linhagem IAC 12-2 71/170. A linhagem 71/170 foi a mais resistente ao reisolado 112.

As reações, resistente (R), suscetível (S) e intermediária (I), apresentadas pelas variedades e linhagens aos quatro reisolados testados são mostradas no quadro 11.

Quadro 11:- Experimento nº 2:- Reações, resistente (R), suscetível (S) e intermediária (I), apresentadas pelas variedades e linhagens aos reisolados de *X.malvacearum*.

VARIEDADES E LINHAGENS						
REISOLADOS	IAC RM3	IAC 13-1	IAC 12-2	IAC RM3 71/523	(Acala x Nu-16) 71/213	IAC 12-2 71/170
101	S	S	S	R	R	R
107	I	I	I	S	R	R
112	S	I	I	S	R	R
115	I	I	I	I	R	R
Test.	-	-	-	-	-	-

As reações das variedades observadas no quadro 11, foram, em média, semelhantes às observadas no quadro XIII do apêndice, obtidas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A linhagem (Acala x Nu-16) 71/213 mostrou-se juntamente com a linhagem IAC 12-2 71/170 resistente a todos os reisolados testados. Em nenhum dos riscos de inoculação para a linhagem (Acala x Nu-16) 71/213 houve aparecimento de sintomas típicos de *X.malvacearum*.

Comparando-se as médias das quatro repetições mantidas na casa de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC) com as médias das quatro repetições mantidas na casa de vegetação da Seção de Algodão (IAC), foi verificado pelo teste de Scheffé que houve variação estatística entre os dois locais. A incidência de *X.malvacearum*, foi menor na casa de vegetação pertencente à Seção de Algodão.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as características culturais, morfológicas e fisiológicas, nos diferentes testes efetuados no presente trabalho, foram semelhantes aos citados em BERGEY'S (5) e DYE (24), o que leva a conclusão de que a bactéria estudada pertence ao gênero *Xanthomonas*, tratando-se no caso de *X. malvacearum*. Os quatro isolados estudados apresentaram respostas semelhantes para todos os testes feitos, embora o reisolado 101 tenha liquefeito o meio de gelatina mais rapidamente que os demais.

As características observadas, não produção de esporos, forma de bastonete com um flagelo polar, reação gram negativa, crescimento viscoso com coloração amarelada e produção de H_2S , foram semelhantes às descritas pelos autores acima mencionados. Os resultados conseguidos para a liquefação de gelatina, na hidrólise do amido, na reação alcalina em meio contendo ácido lático e redução de nitratos, foram semelhantes aos descritos em BERGEY'S (5).

Nenhum dos reisolados testados produziu reação ácida no meio de cultura contendo o açúcar arabinose, estando este fato em concordância com as características citadas em BERGEY'S (5). Este fato contraria, por outro lado, os resultados encontrados por DYE (24), que obteve uma reação ácida para todas as espécies de *Xanthomonas* testadas, quando cultivadas no meio de cultura contendo arabinose.

Diferentemente do mencionado pelos dois autores citados, não foi observada coagulação no leite de "litmus" para os reisolados testados.

A comparação da patogenicidade dos isolados mantidos em laboratório após três ou quatro repicagens sucessivas, e os reisolados obtidos após a passagem pela variedade IAC 12-2, no teste de patogenicidade nº 5, apresentou de um modo geral respostas semelhantes. Tal fato sugere que durante este período não houve mudança brusca de patogenicidade para os isolados, como resultado de uma seleção de biótipos não patogênicos, condicionados pelo meio de cultura utilizado. Para a maioria dos isolados testados o grau de patogenicidade

obtido para os isolados mantidos em laboratório, após seis repicagens, foi menor quando comparado com os respectivos reisolados obtidos dos hospedeiros diferenciais. Para o isolado 25 a perda de patogenicidade foi praticamente total. Os dados relativos aos testes de patogenicidade n^os 4 e 6, conforme quadros IV e VI do apêndice, sugerem perda da patogenicidade para isolados mantidos mediante seis repicagens sucessivas em laboratório, para a maioria dos isolados testados. O fato de ocorrer perda de patogenicidade para culturas mantidas por repicagens sucessivas salienta a importância da frequente passagem dos isolados pelos hospedeiros, a fim de serem eliminados os biótipos não patogênicos.

Com relação a um possível efeito de seleção por hospedeiros diferenciais sobre um isolado, foi observado que os reisolados obtidos a partir de diferentes hospedeiros diferenciais quando inoculados com um mesmo isolado, não apresentaram diferenças em patogenicidade, quando inoculados no conjunto de hospedeiros diferenciais. Isto de certo modo mostra a pureza do isolado utilizado, como raça, na inoculação das diferentes linhagens diferenciais.

A diferença na intensidade da doença constatada nas casas de vegetação no experimento n^o 2, provavelmente foi motivada pelas condições de ambiente, como foi demonstrado por ARNOLD e BROWN (1), BRINKERHOFF (9, 10), BRINKERHOFF e PRESLEY (13).

No tocante a severidade dos sintomas para inoculações feitas em cotilédones ou folhas novas, não houve diferenças nas leituras aos quinze dias após a inoculação do agente patogênico, embora a média das notas fosse maior para as inoculações nos cotilédones. A inoculação nos cotilédones do algodoeiro tem a vantagem de permitir a obtenção de resultados numa idade menor das plantas. Entretanto, deve-se levar em conta que os cotilédones permanecem no algodoeiro menos tempo que as primeiras folhas definitivas exigindo que a avaliação dos sintomas seja feita dentro de um prazo menor do que no caso destas. Portanto a identificação das raças fisiológicas pode ser feita com segurança tanto em cotilédones como em folhas novas.

No estudo para identificação das raças fisiológicas de *X. malvacearum* que ocorrem no Estado de São Paulo, foi

observada certa variabilidade entre os diferentes isolados testados.

Nos testes de número 1, 2 e 3, com relação a patogenicidade dos isolados, foi observado que os isolados 7 e 25 causaram sintomas de suscetibilidade quando inoculados na variedade Stoneville 20, portadora do gene B_7 . Nos três testes acima mencionados, os isolados 3 e 20 não foram patogênicos para a variedade Stoneville 20, sendo porém patogênicos, para as variedades Mebane B-1 e IAC 12-2.

Deve-se salientar que foram utilizadas neste estudo sementes do hospedeiro Mebane B-1 de duas origens. Primeiramente no teste nº 1, foi utilizada semente introduzida a diversos anos. Neste caso a variedade foi susceptível a todos os isolados. Já nos demais testes, onde foi utilizado material Mebane B-1 recentemente introduzido, houve reação de resistência para diversos dos isolados testados. Isto leva a crer que o primeiro material testado, havia perdido a pureza genética, não sendo apropriado para testar raças de *X.malvacearum*.

Nenhum dos isolados testados produziu reação de suscetibilidade nos testes de patogenicidade 1, 2 e 3, na variedade 101-102B Bu 61, portadora dos genes B_2B_3 . No teste nº 1 a variedade REBA B-50, portadora dos genes $B_{9L}B_{10L}$, também não apresentou reação de suscetibilidade. Tal fato mostra que os isolados testados não foram patogênicos para as plantas possuidoras dos genes B_2B_3 ou $B_{9L}B_{10L}$.

Os isolados apresentaram, no geral, diferentes reações de resistência e suscetibilidade nos hospedeiros diferenciais. Convém salientar que no teste nº 4, os isolados 3 e 52 provocaram reação de suscetibilidade nas linhagens Acala 44 e 1-10B, deixando entrever a possibilidade da existência de outros grupos ou raças patogênicas de *X.malvacearum*, cuja identificação não foi possível no presente trabalho, uma vez que os isolados mencionados perderam a patogenicidade quando testados posteriormente.

Os resultados do experimento nº 1 mostraram a ocorrência de três grupos de reações apresentadas pelos reisolados, quando inoculados nos hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas. Comparando-se os resultados com os do quadro apresentado por BRINKERHOFF (11) e con

siderando como suscetível a reação intermediária, verificou-se que os reisolados 101, 40 e 118 se enquadram como representantes da raça 3, os reisolados 107 e 115 como representantes da raça 8 e o reisolado 112 como representante da raça 10.

Embora fosse determinada a existência de 3 raças fisiológicas, não foi possível determinar a distribuição das mesmas no Estado de São Paulo. Seria de grande interesse a determinação das áreas de distribuição das diferentes raças fisiológicas existentes.

A verificação da ocorrência da raça 10 é de suma importância, pois entre as linhagens diferenciais apenas a 101-102B, possuidora dos genes de resistência B_2B_3 + gene desconhecido, foi resistente. Este fato evidencia a necessidade de serem esquematizados programas de melhoramento do algodoeiro, visando a introdução dos genes B_2B_3 nas variedades a serem distribuídas, no Estado de São Paulo, evitando-se no futuro possíveis problemas na cotonicultura. A variedade RE-BA B-50, possuidora dos genes de resistência $B_{9L}B_{10L}$, também foi resistente aos isolados testados no teste nº 1, sendo assim uma outra fonte genética de interesse para o melhoramento do algodoeiro. A utilização de variedades possuidoras do gene B_7 , a semelhança da Stoneville 20, fica de certo modo comprometida, uma vez que já ocorre nas condições do Estado de São Paulo, isolados que podem induzir reações de suscetibilidade nas mesmas.

Os resultados, do experimento nº 2, sobre o comportamento das variedades e linhagens paulistas de algodoeiro, em presença das raças 3, 8 e 10 foram de muito interesse. A linhagem IAC RM3 71/523 foi resistente a raça 3, mostrando reação semelhante à Stoneville 20, enquanto que as linhagens (Acala x Nu-16) 71/213 e IAC 12-2 71/170, que foram resistentes aos isolados testados e identificados como raças 3, 8 e 10, apresentaram uma reação semelhante ao hospedeiro diferencial 101-102B.

O comentário feito acima para semelhança nas reações apresentadas pelas linhagens, não implica na semelhança genética dos hospedeiros discutidos.

As duas últimas linhagens são de grande interesse para os programas de melhoramento visando controle da man-

cha angular, uma vez que apresentam fontes de resistência a três raças fisiológicas no mínimo.

As variedades IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2 todas consideradas suscetíveis, não apresentaram reações diferentes entre si para as três raças testadas. A variedade IAC RM3, embora estatisticamente não tenha sido diferente das demais, para a raça 3, apresentou notas médias menores, dando a indicação de uma possível resistência no campo a essa raça, o que explicaria os resultados obtidos por BASTOS CRUZ e colab.(3), onde a variedade IAC RM3 foi mais resistente que a IAG 61/60 (IAC 13-1).

De maneira geral, comparando-se os resultados obtidos no experimento nº 2, foi verificada que as linhagens IAC RM3 71/523 e IAC 12-2 71/170, selecionadas a partir das variedades paulistas IAC RM3 e IAC 12-2, apresentaram reações de resistência não encontrada nas variedades originais. Isto mostra a existência de variabilidade na população do hospedeiro, quanto a reações para diferentes raças de *X.malvacearum*.

No tocante a estabilidade de resistência à *X.malvacearum*, BRINKERHOFF (9), CHEW e colab. (20), HUNTER e BLANK (29) e MILLER (34), mostraram que com o plantio de variedades possuidoras de um único gene B, é possível a ocorrência de outras raças fisiológicas de *X.malvacearum*, ainda não detectadas. Este fato deve ser encarado com toda a seriedade nos programas de melhoramento visando resistência à mancha angular.

Os trabalhos para obtenção de variedades resistentes a *X.malvacearum* apresentam uma maior importância quando se levado em consideração o fato de que, em certos casos, já foi encontrada uma maior resistência à outros patógenos, em plantas resistentes à *X.malvacearum*, conforme relatos de BIRD (6), BRINKERHOFF e HUNTER (12) e CAUQUIL e FOLLIN (17).

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir:

1) Foram identificadas as raças fisiológicas de *X.malvacearum* 3, 8 e 10, baseando-se na patogenicidade das mesmas nos hospedeiros diferenciais, reconhecidos pelo "Cotton Disease Council".

2) Não houve diferença nas reações das plantas para as inoculações feitas em cotilédones ou nas primeiras folhas do algodoeiro, quando os sintomas foram observados aos quinze dias após a inoculação.

3) Em 16 dos 22 isolados testados não foi observado diferença para a patogenicidade entre os isolados mantidos em laboratório mediante três ou quatro repicagens e os respectivos reisolados quando testados na variedade IAC 12-2. Foi, no entanto, constatada a perda de patogenicidade para a maioria dos isolados testados e mantidos em laboratório por um período de seis repicagens sucessivas, quando comparados com os respectivos reisolados obtidos das linhagens diferenciais para raças de *X.malvacearum*.

4) A linhagem de algodoeiro IAC RM3 71/523 foi resistente à raça fisiológica 3, enquanto que as linhagens (Acala x Nu-16) 71/213 e IAC 12-2 71/170 foram resistentes às raças 3, 8 e 10.

5) A variedade REBA B-50, possuidora dos genes $B_{9L}B_{10L}$ apresentou reação de resistência a *X.malvacearum* semelhante à da linhagem 101-102B Bu 61, possuidora dos genes B_2B_3 .

6) As variedades IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2, consideradas suscetíveis, não diferiram estatisticamente quando inoculadas com as raças fisiológicas 3, 8 e 10.

7. RESUMO

Foi realizado um estudo sobre a variabilidade de *Xanthomonas malvacearum* (E.F.Smith) Dowson, em condições de casa de vegetação, utilizando-se 76 isolados provenientes das principais regiões algodoeiras do Estado de São Paulo. Foram observados os caracteres culturais, morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade dos isolados.

No início do estudo utilizaram-se variedades e linhagens de algodoeiro existentes na coleção da Seção de Algodão do Instituto Agrônomo, Estado de São Paulo, e posteriormente os hospedeiros diferenciais para identificação das raças fisiológicas de *X.malvacearum*, reconhecidas pelo "Cotton Disease Council".

A técnica de inoculação empregada foi a de riscos feitos com um palito na página inferior do cotilédone ou das primeiras folhas.

Na avaliação dos sintomas foi adotada uma escala de notas que inicialmente variou de 0 a 3 e posteriormente de 1 a 5. As leituras foram feitas quinze dias após a inoculação.

Foi detectada a ocorrência das raças fisiológicas de *X.malvacearum* 3, 8 e 10, baseando-se nas reações dos hospedeiros diferenciais.

A linhagem IAC RM3 71/523 foi resistente a raça fisiológica 3, enquanto que as linhagens (Acala x Nu-16) 71/213 e IAC 12-2 71/170 foram resistentes às raças 3, 8 e 10.

As variedades de algodoeiro IAC RM3, IAC 13-1 e IAC 12-2, suscetíveis, acusaram diferenças pequenas de comportamento, estatisticamente não significativas, para os isolados testados.

8. SUMMARY

VARIABILITY OF *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson IN
THE STATE OF SÃO PAULO

The variability of *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson was studied under greenhouse conditions as a preliminary step for further work on breeding cotton varieties resistant to this microorganism. Isolates obtained from the principal cotton growing regions of the State of São Paulo were studied for the cultural, morphological and physiological characteristics as well as for their pathogenicity to differential hosts.

In preliminary tests, varieties and lines coming from the collection of the Cotton Department of the Instituto Agronômico do Estado de São Paulo were used and in the final tests, differential lines, recognized by the Cotton Disease Council, were employed.

The isolates were introduced into the tissues of leaves or cotyledons by scratch made on the lower surface with a bamboo pick previously dipped into bacterial suspension.

For the evaluation of the symptoms a scale was adopted based on four infection types in the preliminary test, and on five types in the final tests.

As a result of these tests the isolates were grouped into three races of *X. malvacearum* respectively races 3, 8, and 10. The possibility that other races might also occur, however, was not excluded.

The IAC RM3 71/523 line showed resistance to race 3 and (Acala x Nu-16) 71/213 and IAC 12-2 71/170 lines showed resistance to races 3, 8, and 10.

The susceptible cotton varieties IAC RM3, IAC 13-1 and IAC 12-2 cultivated in São Paulo, were statistically equal in behavior to these races.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ARNOLD, M.H. & BROWN, S.J. Variation in the host parasite relationship of a crop disease. J.agric.Sci. 71:19-36, 1968.
2. BALMER, E.; BASTOS CRUZ, B.P. & SILVEIRA, A.P. Ocorrência de fungos que afetam as maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), no Estado de São Paulo. Arq.Inst. biol. São Paulo 34:161-167, 1967.
3. BASTOS CRUZ, B.P.; SILVEIRA, A.P.; ABRAHÃO, J. & SILVEIRA, S.G.P. Observações relativas a resistência de algumas variedades de algodoeiro ao ataque da "mancha angular" (*Xanthomonas malvacearum*) (E.F.Sm.)Dow. Arq.Inst.biol. São Paulo 32:45-51, 1965.
4. BAZAN DE SEGURA, C. Problemas fitopatológicos del algodón nero en Latinoamérica. In: Reunion Latinoamericana de Fitotecnia, Mesa de Algodon. 6., Buenos Aires, 1961. p.83-129.
5. BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957. 1094p.
6. BIRD, L.S. Interrelation of resistance and scape of cotton from five major disease. In: Annual Cotton Disease Council, 26th, Memphis, Tennessee, 1966. Proceedings. p.92-107.
7. _____ & BLANK, L.M. Breeding strains of cotton resistant to bacterial blight. Texas, Agric.Exp.Sta., 1951. 25p. (Bull. 736)
8. BRINKERHOFF, L.A. Variability for pathogenicity of *Xanthomonas malvacearum*. Phytopathology 49(9):534, 1959. (Abstract)

9. BRINKERHOFF, L.A. Variability of *Xanthomonas malvacearum*. The cotton bacterial blight pathogen. Oklahoma, Agric.Exp.St., 1963. 95p. (Tech.Bull. T-98).
10. _____ Tests for races of *Xanthomonas malvacearum* from Australia. Pl.Dis.Reptr. 50:323-324, 1966.
11. _____ Variation in *Xanthomonas malvacearum*, and its relation to control. An.Rev.Phytopath. 8:85-110, 1970.
12. _____ & HUNTER, R.E. Frequency of cotton plants resistant to *Fusarium* wilt some lines of cotton resistant or susceptible to bacterial blight. Pl. Dis.Reptr. 45:126-127, 1961.
13. _____ & PRESLEY, J.T. Effect of four day and night temperature regimes on bacterial blight reactions of immune, resistant, and susceptible strains of Upland cotton. Phytopathology 57:47-51, 1967.
14. BRODIE, B.P. & COOPER, W.E. Reaction of differential cotton varieties to isolates of *Xanthomonas malvacearum* in North Carolina. Plt.Dis.Reptr. 44:800-801, 1960.
15. BURKHOLDER, W.H. & STARP, M.P. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 38:494-502, 1948.
16. CARVALHO, P.P. Susceptibilidade de cultivares de algodão à bacteriose. Técnicas para pesquisa da doença. Agronomia Moçambicana 3(1):27-49, 1969.
17. CAUQUIL, J. & FOLLIN, J.C. Étude de l'action de quelques caracteres morphologiques ou génétiques sur le comportement du cotonnier a l'égard des pourritures de capsules. Coton Fibr.trop. 25:375-380, 1970.

18. CIA, E. Nota sobre patogenicidade de *Xanthomonas malvacearum* em variedades de algodoeiro. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 22., Salvador, Ba., 1970. Resumos. p.226.
19. _____; SALGADO, C.; CONTI, E. de & BALMER, E. Reações fisiológicas de resistência à *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dow., em algumas variedades de algodão. Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz" 23:265-271, 1966.
20. CHEW, C.F.; PRESLEY, J.T. & STATES G. Survey, screening and breeding for bacterial blight resistance in cotton. Plt. Dis. Reprtr. 53:390-391, 1969.
21. CROSS, J. E. Pathogenicity differences in Tanganyika populations of *Xanthomonas malvacearum*. Emp. Cott. Grow. Rev. 40:125-130, 1963.
22. _____ Field differences in pathogenicity between Tanganyika populations of *Xanthomonas malvacearum*. Emp. Cott. Grow. Rev. 41:44-48, 1964.
23. _____ & HAYWARD, A. C. Relationship between pathogenicity and phage type in *Xanthomonas malvacearum*. Emp. Cott. Grow. Rev. 41:49-50, 1964.
24. DYE, D. W. The inadequacy of usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. N. Z. Sci. 5(4):393-416, 1962.
25. FERRAZ, C. A. M. Estudos preliminares sobre a inoculação de mancha angular no algodoeiro. Rev. Soc. bras. Fitopat. 1-72-73, 1967.
26. GUNN, R. E. Bacterial blight of cotton. A seedling inoculation technique. Emp. Cott. Grow. Rev. 39:188-190, 1962.

27. GUNN, R.E. & INNES, N.L. Effect of inoculum concentration upon severity of leaf infection. *Emp.Cott.Grow. Rev.* 38:279-283, 1961.
28. HAYWARD, A.C. Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas malvacearum*. *Gen.Microbiol.* 35(2):287-298, 1964.
29. HUNTER, R.E. & BLANK, L.M. Pathogenicity differences of *Xanthomonas malvacearum* isolates. *Phytopathology* 44:332, 1954. (Abstract)
30. _____; BRINKERHOFF, L.A. & BIRD, L.S. The development of a set of Upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* 58:830-832, 1968.
31. INNES, N.L. Breeding bacterial blight resistant cotton in the Sudan by combining greenhouse inoculation with field spraying. *Emp.Cott.Grow.Rev.* 38:92-100, 1961.
32. _____ & LAST, F.T. Cotton disease symptoms caused by different concentrations of *Xanthomonas malvacearum*. *Emp.Cott.Grow.Rev.* 38:27-29, 1961.
33. LOGAN, C. Host specificity of two *Xanthomonas* species. *Nature* 188:479-480, 1960.
34. MILLER, J.W. Race building of *Xanthomonas malvacearum*, on cotton in Southeast Missouri. *Pl.Dis.Reptr.* 52:739-740, 1968.
35. NAYUDU, M.V. Variation in *Xanthomonas malvacearum*. *Indian Cott.Grow.Rev.* 18(6):350-355, 1964.
36. SCHNATHORST, W.C. Altered host specificity in race 1 of *Xanthomonas malvacearum* by passage through a resistant variety of *Gossypium hirsutum*. *Phytopathology* 60:258-260, 1970.

37. SCHNATHORST, W.C.; HALISKY, P.M. & MARTIN, R.D. History, distribution, races and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. Pl.Dis.Reptr. 44:603-608 1960.
38. SMITH, T.E. A variant culture of *Xanthomonas malvacearum* obtained from weeds roots. Phytopathology 52: 1313-1314, 1962.
39. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill, 1957. 315p.
40. VERMA, J.P. & SING, R.P. Two new races of *Xanthomonas malvacearum*, the cause of blackarm of cotton. Cott. Grow.Rev. 47:203-205, 1970.
41. WEINDLING, R. & MILLER, P.R. The relation of *Bacterium malvacearum* to antracnose boll rot of cotton. Phytopathology 31:24, 1941. (Abstract)

A P È N D I C E

Quadro I- Teste de patogenicidade nº 1:- Estudo da patogenicidade de isolados de *X.malvacearum*, procedentes de várias localidades, em variedades de algodoeiro com diferentes genes de resistência.

ISOLADOS	VARIETADES					
	95-96A Bu 61	101-102B Bu 61	Ston.20	Mebane B-1	REBA B-50	IAC 12-2
3	● ⁽¹⁾	0	0	2	0	3
4	1	0	0	3	0	3
9	1	0	1	3	0	3
11	0	0	0	3	0	3
17	0	0	0	3	0	3
18	1	0	0	3	0	3
20	0	0	0	3	0	3
23	0	0	0	2	0	3
28	0	0	0	3	0	3
30	0	0	0	3	0	3
31	1	0	1	3	0	3
7	0	0	3	3	0	3
25	1	0	3	3	0	3
Test.	-	-	-	-	-	-

(¹) Média das notas obtidas para cada isolado, no mínimo de oito riscos de inoculação e em quatro plantas de uma mesma variedade.

As notas 0 e 1 corresponderam a uma reação resistente, enquanto que as notas 2 e 3 corresponderam a reação suscetível.

Quadro II:- Teste de patogenicidade nº 2:- Estudo de patogenicidade para os isolados de *X.malvacearum*, pertencentes a diferentes grupos de patogenicidade, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.

ISOLADOS	VARIEDADES E LINHAGENS					
	(Ac.61/60 x Nu-16)	IAC RM3 4123	IAC RM2 2160	101-102B	Ston. 20	IAC 12-2
	70/H-37	70/H-4	70/H-24	Bu 61		
3	0 (¹)	0	1	0	0	3
4	0	1	0	0	0	2
20	0	0	0	0	0	3
7	0	2	3	0	3	3
25	1	2	3	0	2	3
Test.	-	-	-	-	-	-

(¹) Média das notas obtidas para cada isolado, no mínimo de oito riscos de inoculação e em quatro plantas de uma mesma variedade ou linhagem.

As notas 0 e 1 corresponderam a uma reação resistente, enquanto que as notas 2 e 3 a uma reação suscetível.

Quadro III- Teste de patogenicidade nº 3:- Estudo de patogenicidade para isolados pertencentes a diferentes grupos, em variedades de algodoeiro portadoras de genes de resistência e linhagens IAC.

ISOLADOS	VARIEDADES E LINHAGENS					
	(Ac.61/60 x Nu-16)	IAC RM3 4123	IAC RM2 2160	101-102B	Ston. 20	IAC 12-2
	70/H-37	70/H-4	70/H-24	Bu 61		
5	0 ⁽¹⁾	0	3	0	0	3
40	0	0	2	0	0	3
42	0	0	2	0	0	3
25	1	2	3	0	3	3
36	0	3	3	0	3	3
70	0	3	2	0	2	3
71	0	2	3	0	2	3
38	3	2	3	0	2	3
43	2	3	3	0	3	3
3	0	0	1	0	0	2
20	0	0	0	0	0	3
23	0	0	1	0	0	3
66	1	0	1	0	1	3
34	2	0	1	0	0	3
7	0	0	1	0	2	1
46	0	0	1	0	0	1
72	0	0	0	0	0	0
Test.	-	-	-	-	-	-

(¹) Média das notas obtidas para cada isolado no mínimo de oito riscos de inoculação e em quatro plantas de uma mesma variedade ou linhagem.

As notas 0 e 1 corresponderam a uma reação resistente, enquanto que as notas 2 e 3 a uma reação suscetível.

Quadro IV- Teste de patogenicidade nº 4:- Estudo da patogenicidade para isolados de diferentes grupos, em hospedeiros diferenciais, para identificação de raças fisiológicas.

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA							
ISOLA- DOS	Ac.44	Ston. 2B-S9	Ston.20	Mebane B-1	1-10B	20-3	101-102B
	(ne- nhum)	(pol.*)	(B ₇ + + pol.)	(B ₂ + + pol.)	(B _{In} + + pol.)	(B _N + + pol.)	(B ₂ B ₃ + +desc.**)
5	3 ⁽¹⁾	2	0	0	3	0	0
42	3	2	0	1	2	0	0
55.2	3	3	0	0	3	0	0
60	3	2	0	0	3	0	0
71	2	2	0	0	2	1	0
75	3	3	0	0	3	0	0
23	2	3	0	0	0	0	0
40	3	3	0	0	1	1	0
66	3	2	0	0	1	0	0
3	3	0	0	0	2	0	0
52	2	0	0	1	2	0	0
43	3	2	3	1	2	0	0
57	2	3	3	1	2	0	0
7	1	0	1	0	2	0	0
61	1	0	0	0	2	0	0
25	3	3	2	0	2	2	0
38	3	3	0	2	3	2	0
54	2	3	3	1	1	0	0
70	1	0	3	2	2	1	0
34	3	0	0	2	3	2	0
36	2	3	3	2	3	0	0
46	3	2	2	2	2	2	0
20	1	1	0	0	1	0	0
55.1	0	0	0	0	0	0	0
Test.	-	-	-	-	-	-	-

(¹) Média das notas obtidas para cada isolado, no mínimo de oito riscos de inoculação e em quatro plantas de uma mesma linhagem.

As notas de 0 e 1 corresponderam a uma reação resistente, enquanto que as notas 2 e 3 a uma reação suscetível.

* pol. = poligenes

** desc. = desconhecido

Quadro V. Teste de patogenicidade nº 5:- Comparação de patogenicidade entre isolados mantidos em laboratório e os respectivos reisolados obtidos após a "passagem" pela variedade de IAC 12-2

ISOLADOS	Isolados mantidos em laboratório por três ou quatro repicagens	REISOLADOS (culturas novas)
3	1 ⁽¹⁾	1
61	1	1
34	2	2
36	2	2
38	2	2
40	2	2
42	2	2
43	2	2
57	2	2
70	2	2
71	2	2
75	2	2
5	3	3
23	3	3
60	3	3
66	3	3
20	0	0
55.1	0	0
7	1	0
25	2	1
55.2	3	2
46	0	2
52	2	3
54	0	1
Test.	-	-

⁽¹⁾ A média das notas foram obtidas para cada isolado, em oito riscos de inoculação, e em quatro plantas da variedade IAC 12-2

Quadro VI- Teste de patogenicidade nº 6:- Teste de patogenicidade para isolados e reisolados obtidos após a "passagem" pelos hospedeiros diferenciais nas linhagens de algodoeiro diferenciais para raças de *X.malvacearum*.

REISO LADOS e ISOLA DOS	HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA						
	Ac.44	Ston. 2B-S9	Ston.20	Mebane B-1	1-10B	20-3	101-102B
	(ne- nhum)	(pol.*)	(B ₇ + + pol.)	(B ₂ + + pol.)	(B _{In} + + pol.)	(B _N + + pol.)	(B ₂ B ₃ + + desc.**)
101	3 ⁽¹⁾	2	0	0	2	0	0
116	3	3	0	0	2	0	0
118	3	2	0	1	3	0	0
120	2	2	0	1	2	0	0
121	2	2	0	1	2	0	0
106	2	2	0	0	1	1	0
119	3	3	0	0	0	0	0
107	2	2	2	2	2	0	0
108	3	2	2	2	2	0	0
123	2	2	2	2	2	0	0
115	2	2	2	1	1	0	0
112	3	2	2	2	2	2	0
113	3	2	2	2	2	2	0
102	3	2	1	0	1	0	0
103	2	0	0	0	2	0	0
104	3	0	0	0	1	0	0
105	2	1	1	0	1	0	0
109	2	1	0	0	0	0	0
110	3	2	0	0	1	0	0
111	2	2	2	1	1	0	0
114	1	1	0	0	1	0	0
117	1	2	1	0	0	0	0
122	3	2	0	0	1	0	0
42	2	1	0	0	1	0	0
60	3	2	0	0	1	0	0
71	2	2	0	0	2	0	0
40	3	2	0	0	1	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0
52	1	0	0	0	1	0	0
43	2	1	1	0	0	0	0
57	2	2	1	0	1	0	0
7	1	1	1	1	0	0	0
61	1	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0
54	2	2	2	0	1	0	0
70	1	1	0	1	1	0	0
46	2	1	1	1	2	1	0
Test.	-	-	-	-	-	-	-

(¹) Média das notas obtidas para cada isolado em 8 riscos de inoculação, e em quatro plantas de uma mesma linhagem.

As notas 0 e 1 corresponderam a uma reação resistente, enquanto que as notas 2 e 3 a uma reação suscetível.

* pol. = poligenes

** desc. = desconhecido

Quadro VII- Experimento nº 1:- Médias das notas obtidas em cada linhagem diferencial, pela inoculação de reisolados de *X.malvacearum*

HOSPEDEI- ROS E	REISOLADOS	REPETIÇÕES (1)					HOSPEDEI- ROS E	REISOLADOS	REPETIÇÕES (1)				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
Ac.44	101	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	1-10B	101	4,7	4,7	5,0	5,0	5,0
	107	5,0	3,5	3,3	3,0	3,5		107	3,3	2,7	3,3	3,3	3,3
	40	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0		40	3,0	2,0	2,7	3,0	4,7
	112	5,0	4,0	4,3	3,7	3,5		112	4,3	4,3	4,0	4,3	4,0
	115	4,0	2,0	3,7	3,7	1,5		115	2,3	3,0	2,7	3,2	3,3
	118	5,0	4,0	4,7	4,3	4,0		118	2,7	4,0	4,7	3,8	5,0
	Test.	-	-	-	-	-		Test.	-	-	-	-	-
Ston.	101	4,7	4,0	3,7	4,5	4,7	20-3	101	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2B-S9	107	3,7	3,3	1,3	2,5	2,0		107	2,7	2,0	1,0	1,6	1,0
	40	5,0	3,7	3,0	5,0	4,3		40	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	112	4,0	4,3	2,7	4,3	3,0		112	4,0	4,0	3,3	4,4	3,5
	115	3,0	2,7	1,7	2,0	2,3		115	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0
	118	3,0	3,0	3,7	4,3	4,0		118	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Test.	-	-	-	-	-		Test.	-	-	-	-	-
Ston.	101	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	101-	101	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
20	107	3,0	2,7	1,7	3,3	3,0	102B	107	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	40	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		40	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	112	3,0	4,0	3,7	4,3	3,0		112	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	115	2,0	2,7	2,7	2,3	4,0		115	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	118	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		118	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Test.	-	-	-	-	-		Test.	-	-	-	-	-
Meba-	101	1,3	1,0	1,0	2,4	1,7							
ne	107	3,0	2,0	1,3	2,2	1,0							
B-1	40	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0							
	112	3,0	3,7	2,3	2,6	2,3							
	115	1,7	2,3	1,3	2,4	1,7							
	118	1,0	1,0	1,0	2,0	1,3							
	Test.	-	-	-	-	-							

TOTAL

(1) Rep.	1- inoculação na folha definitiva-ESALQ-	-111,4
	2- inoculação na folha definitiva-Microb. IAC	-104,6
	3- inoculação na folha definitiva-Algodão IAC	-97,8
	4- inoculação nos cotilédones-Microb. IAC	-112,4
	5- inoculação nos cotilédones-Algodão IAC	-104,6

Quadro VIII- Experimento nº 1:- Médias das notas obtidas, do quadro VII, para o estudo dos reisolados de *X.malvacearum*, nos hospedeiros diferenciais para identificação de raças fisiológicas

HOSPEDEIROS DIFERENCIAIS E GENES DE RESISTÊNCIA								
ISOLADOS	Ac.44 (ne- nhum)	Ston. 2B-S9 (pol.*)	Ston.20 (B ₇ + + pol.)	Mebane B-1 (B ₂ + + pol.)	l-10B (B _{In} + + pol.)	20-3 (B _N + + pol.)	101-102B (B ₂ B ₃ + + desc.**)	MÉDIA
101	5,00	4,32	1,00	1,48	4,88	1,00	1,00	2,67
107	3,66	2,56	2,74	1,90	3,18	1,66	1,00	2,39
40	5,00	4,20	1,00	1,00	3,08	1,00	1,00	2,33
112	4,10	3,66	3,60	2,78	4,18	3,84	1,00	3,31
115	2,98	2,34	2,74	1,88	2,90	1,20	1,00	2,15
118	4,40	3,60	1,00	1,26	4,04	1,00	1,00	2,33
Test.	-	-	-	-	-	--	-	-
Média	4,19	3,45	2,01	1,72	3,71	1,62	1,00	

* pol. = poligenes

** desc. = desconhecido

As notas médias de 1 a 1,9 corresponderam a uma reação resistente, de 2 a 2,9 a uma reação intermediária e de 3 a 5 a uma reação suscetível.

Quadro IX- Experimento nº 1:- Análise da variância das médias das notas obtidas pela inoculação de reisolados de *X.malva cearum*, na folha definitiva e nos cotilédones do algodoeiro, em condições de casa de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC)

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	SQ.	QM.	F
Inoculações	1	1,0779	1,0779	3,97 ns.
Reisolados	18	24,9806	1,3878	5,11**
Erro	18	4,8921	0,2718	
TOTAL	37	30,9506		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade
C.V. = 16,2 %

Quadro X- Experimento nº 1:- Análise da variância das médias das notas obtidas pela inoculação de reisolados de *X.malva cearum*, na folha definitiva e nos cotilédones do algodoeiro, em condições de casa de vegetação da Seção de Algodão (IAC)

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	SQ.	QM.	F
Inoculações	1	1,0116	1,0116	2,18 ns.
Reisolados	18	42,9522	2,3862	5,14**
Erro	18	8,3584	0,4643	
TOTAL	37	52,3222	1,4141	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade
C.V. = 22,5%

Quadro XI- Experimento nº 2:- Médias de notas por subparcela, obtida pela inoculação de quatro reisolados de *X.malvacearum* no cotilédone de seis variedades e linhagens de algodão eiro.

VARIETADES LINHAGENS	E	REISO LADOS	REPETIÇÕES (1)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
IAC RM3		101	3,0	2,3	3,0	4,0	5,0	2,7	4,0	4,7
		107	2,7	1,0	1,3	2,0	4,7	2,7	3,0	2,7
		112	2,3	1,3	2,3	2,7	4,7	1,7	4,0	4,3
		115	2,0	1,7	1,0	1,7	3,7	2,3	2,7	3,0
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC 13-1		101	3,0	3,0	4,0	5,0	4,7	4,0	4,0	4,3
		107	2,0	2,3	1,0	1,7	3,7	2,7	2,3	3,3
		112	2,3	1,7	1,7	2,0	3,7	3,3	5,0	2,3
		115	1,7	2,0	1,7	2,0	3,0	3,3	2,7	2,0
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC 12-2		101	3,5	3,5	3,0	2,0	5,0	4,0	4,7	4,0
		107	2,5	2,5	1,0	1,5	4,0	3,0	3,3	2,5
		112	2,5	2,0	1,5	1,0	3,5	4,0	3,0	2,5
		115	2,0	2,5	1,0	2,0	2,0	3,5	3,7	4,0
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC RM3-4133 71/523		101	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0
		107	2,0	2,0	2,0	1,7	4,3	4,7	4,0	4,7
		112	2,7	3,0	2,0	2,7	5,0	4,0	4,7	5,0
		115	2,0	1,3	1,3	1,7	4,3	4,0	2,7	4,7
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
(Acala x Nu-16) 71/213		101	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		107	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		112	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		115	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC 12-2 71/170		101	1,7	1,7	1,7	2,3	2,7	1,0	1,3	1,7
		107	1,0	1,0	1,0	1,0	2,3	1,0	1,3	1,0
		112	1,7	1,0	1,0	1,7	2,0	1,0	1,7	1,3
		115	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,3	1,3
		Test.	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL			46,6	41,8	37,5	44,7	74,6	58,9	64,7	64,3

(1) Repetições 1 a 4 = Seção de Algodão (IAC)

Repetições 5 a 8 = Seção de Microbiologia Fitotécnica (IAC)

Quadro XII- Experimento nº 2:- Análise de variância das médias das notas obtidas pela inoculação no cotilédone de seis variedades e linhagens de algodoeiro.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	SQ.	QM.	F
Variedades e Linhas (VL)	4	52,1027	13,0257	13,96**
Repetições (R)	7	61,5569	8,7938	9,42**
Resíduo (a)	28	26,1253	0,9330	
TOTAL	39	139,7849		
Reisolados (I)	3 *	9,2536	3,0845	11,33**
Interação I x VL	12	54,8148	4,5679	16,78**
Interação I x R	21	10,9599	0,5219	1,92*
Resíduo (b)	84	22,8692	0,2723	
TOTAL	159	237,6824		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

C.V. (a) = 38,5%

C.V. (b) = 20,8%

Quadro XIII- Experimento nº 2:- Média das notas atribuídas aos quatro reisolados de *X.malvacearum* em três variedades e duas linhagens de algodoeiro.

REISO- LADOS	VARIEDADES E LINHAGENS					Média
	IAC RM3	IAC 13-1	IAC 12-2	IAC RM3 71/523	IAC 12-2 71/70	
101	3,59a	4,00a	3,71a	1,04c	1,76a	2,82a
107	2,51b	2,38b	2,54b	3,18ab	1,20a	2,36bc
112	2,91ab	2,75b	2,50b	3,64a	1,43a	2,65ab
115	2,26b	2,30b	2,59b	2,75b	1,11a	2,20c
MÉDIA	2,82a	2,86a	2,83a	2,65a	1,38b	

As notas médias de 1 a 1,9 corresponderam a uma reação resistente, de 2 a 2,9 a uma reação intermediária e de 3 a 5 a uma reação suscetível.

a b c = teste de Tukey a 1% de probabilidade.