Pseudomonas glycinea Coerper:
OCORRÊNCIA E VARIABILIDADE

LÉO PIRES FERREIRA

Orientador: HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1978

À minha mãe
e à memória de meu pai

À Marinez, minha querida esposa, pelo encorajamento e amor,
e às minhas filhas Marcia e Lucia

sem os quais teria sido impossível realizar

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa profundos agradecimentos:

- . ao ex-DNPEA, à EMBRAPA e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", U.S.P. que, juntos, possibilitaram a participação no curso de Pós-Graduação e a realização desta pesquisa;
- . à FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, na memória do seu ex-Diretor-Científico, Professor SYLVIO TORRES, cuja bolsa de estudos concedida proporcionou, além dos incentivos ao estudo e pesquisa, algumas despreocupações atinentes;
- . ao Professor Doutor HIROSHI KIMATI, pela orientação, pela revisão dos manuscritos e pelas sugestões;
- . ao Professor BILL W. KENNEDY, Ph.D., da Universidade de Minnesota, U.S.A., pela orientação e pela remessa do pulverizador, de isolados e de material bibliográfico;
- . ao Eng. Agr. PAUL S. LEHMAN, Ph.D., pelo constante apoio, pela bibliografia fornecida e pela amizade;
- . ao Professor Doutor ARMANDO BERGAMIN FILHO, colega de turma de P.G., pela revisão dos manuscritos, pelas sugestões e pela amizade;
- . à Chefia do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, nas pessoas dos colegas Engs. Agrs. EMÍDIO RIZZO BONATO, MILTON KASTER e EXPEDITO PAULO SILVEIRA, pelo apoio durante a reali

- lização deste trabalho;
- . ao Eng. Agr. ROMEU AFONSO DE SOUZA KIIHL, Ph.D., pelas sugestões, pela solicitação de sementes da série diferencial e pela versão do Resumo para o inglês;
 - . aos Engs. Agrs. LUIZ ANTONIO GERALDO PEREIRA, M.Sc., e CARLOS CAIO MACHADO pela versão do Resumo para inglês;
 - . ao Eng. Agr. JORGE YAMASHITA pelo primoroso trabalho fotográfico;
 - . à Senhorita ROSA LUCIA VASCONCELOS pelo excelente trabalho de datilografia executado;
 - . às Senhoritas ILKA KOBAYASHI, bióloga estagiária, e ZENITA MARIA LUCA, técnica de laboratório e à Sra. MARIA DE CASTRO E SILVA, auxiliar de laboratório, pelo auxílio nas lides no laboratório e na casa de vegetação;
 - . aos Senhores CÂNDIDO PEREIRA TANGERINO e SERAFIM COSTA SILVA, encarregados da casa de vegetação, pelo trato cuidadoso com as plantas;
 - . à todos os colegas do curso de Pós-graduação e do CNPSoja pelo estímulo; e
 - . à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1.
2. INTRODUÇÃO	3.
3. REVISÃO DE LITERATURA	5.
3.1. Antecedentes no Brasil	5.
3.2. Literatura estrangeira	6.
4. MATERIAL E MÉTODOS	13.
4.1. Local da pesquisa	13.
4.2. Procedência e origem das cultivares da série diferencial	13.
4.3. Procedência e coleta do material	14.
4.4. Obtenção, identificação e conservação do pa tôgeno	17.
4.5. Unidade experimental	20.
4.6. Preparo do inóculo e inoculação	22.
4.7. Ambiente e critério de avaliação	23.
4.8. Experimentos de inoculação em cultivares	24.
4.8.1. Determinação de raças fisiológicas	24.
4.8.2. Reação de 16 cultivares comerciais de soja a oito raças fisiológicas de <i>P.</i> <i>glycinea</i>	24.
4.8.3. Determinação da variabilidade de iso lados da raça R13, frente a treze cul tivares comerciais e uma linhagem	24.

5. RESULTADOS	26.
5.1. Determinação das raças fisiológicas	26.
5.2. Reação de cultivares comerciais de soja a al- gumas raças de <i>P. glycinea</i>	30.
5.3. Determinação da variabilidade de isolados da raça R13, frente a treze cultivares comerci- ais e uma linhagem	31.
6. DISCUSSÃO	32.
7. CONCLUSÕES	39.
8. SUMMARY	41.
9. LITERATURA CITADA	43.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1	Reação de sete cultivares diferencias a sete raças fisiológicas a 16 isolados 11.
2	Origem das cultivares da série diferencial usadas na detecção de raças fisiológicas de <i>Pseudomonas glycinea</i> 14.
3	Origem dos isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> 15.
4	Reação de cultivares de soja diferencias de raças fisiológicas a 31 isolados de <i>Pseudomonas glycinea</i> 27.
5	Distribuição das raças fisiológicas de <i>P. glycinea</i> constatadas no Brasil, conforme os Estados 29.
6	Reação de 16 cultivares comerciais de soja a algumas raças de <i>P. glycinea</i> encontradas no Brasil 30.
7	Reação de cultivares comerciais e uma linhagem de soja a alguns isolados da raça fisiológica R13 31.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Atomizador Paasche Airbrush H3	20.
2	Unidade experimental para determinação de raças	21.
3	Escala de leitura para reação à <i>Pseudomo</i> <i>nas glycinea</i>	21.

1. RESUMO

Trinta e um isolados amostrados em seis municípios do Rio Grande do Sul, oito do Paraná, um de São Paulo, um do Mato Grosso do Sul, um de Goiás, um de Rondônia, além do Distrito Federal, foram pesquisados para a determinação de raças fisiológicas de *Pseudomonas glycinea* Coerper. Todos os isolados produtores de pigmento verde-fluorescente no meio King B, com reação oxidase negativa e patogênicos foram inoculados em sete cultivares diferenciais de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit e Norchief), adotando-se o critério de avaliação de três níveis: Suscetível(S), Intermediário (I) e Resistente (R). Dez raças fisiológicas novas foram detectadas, além da raça R6, já descrita nos Estados Unidos. Às raças foi atribuído o símbolo R, seguido dos algarismos diferenciais de 8 a 17, sendo a raça R13 a mais comum.

As reações de oito raças foram pesquisadas em 16 cultivares comerciais e nenhuma apresentou resistência a todas essas raças. Sete isolados, todos pertencentes à raça R13, ino

culados em 13 cultivares comerciais e uma linhagem puderam ser separados pela sua patogenicidade. A linhagem Pel 71017 foi resistente a seis desses isolados.

2. INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] no Brasil pode ser afetada por três diferentes bactérias, *Pseudomonas glycinea* Coerper, *Xanthomonas glycines* Nakano e Prévot e *Pseudomonas tabaci* (Wolf e Foster) Stevens (FERREIRA, 1973). Entre estas, destaca-se a *Pseudomonas glycinea*, agente causal da doença denominada "crestamento bacteriano" da soja, por ser a mais disseminada e prevalente nas lavouras desta leguminosa em todos os Estados produtores.

Nos levantamentos de ocorrência de doenças da soja realizados por FERREIRA (1971), LEHMAN *et alii*, (1976) e BRASIL (1978) tem sido constatado que esta doença pode ocorrer em todas as cultivares comerciais, permitindo atribuir-se a não existência de resistência, nas condições de lavoura.

Embora a bactéria *Pseudomonas glycinea* ocorra mais intensamente na fase vegetativa da cultura da soja, período de pré-floração, quando as condições ambientes lhe são mais

propícias (temperaturas mais amenas), têm sido constatadas fortes infecções durante todo o ciclo da cultura. Ataques severos causam intensos rasgamentos de folhas e desfolha (FERREIRA, 1973).

Segundo STAKMAN e CHRISTENSEN (1960) para os propósitos do melhoramento visando resistência às doenças a questão crítica é quantos biótipos diferem em patogenicidade, como podem ser detectados e como podem ser classificados em raças. Um dos maiores obstáculos para a produção e manutenção de cultivares resistentes é a multiplicidade de raças fisiológicas, aliada ao número de hospedeiros diferenciais que possam ser encontrados.

No Brasil, ainda não existem relatos da ocorrência de raças fisiológicas de *Pseudomonas glycinea*. Nos Estados Unidos foram constatadas sete raças (CROSS *et alii*, 1966).

A constatação da ocorrência e do conhecimento da variabilidade de um dado patógeno, aliada à existência de fontes de resistência, é fundamental como subsídio a programas de melhoramento de uma cultura.

O presente trabalho visa, como objetivo principal, detectar a variabilidade de *P. glycinea* no Brasil, além do estudo sobre a reação de algumas cultivares comerciais a essas raças.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Antecedentes no Brasil

Literatura disponível de trabalhos realizados no Brasil sobre Crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas glycinea* Coerper, é escassa, apenas existindo poucas citações, principalmente com relação à ocorrência e descrição de sintomas.

A primeira citação de ocorrência deste patógeno no Brasil foi feita por BITANCOURT (1934), segundo o qual *Bacterium glycineum* foi um dos patógenos estudados no laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, durante o período de 1931 a 1932.

JARDIM FREIRE (1962) constatou, pela primeira vez no Estado do Rio Grande do Sul, a presença de *Pseudomonas glycinea*, na quase totalidade de cultivares de soja observada. No trabalho é apresentada relação de notas de infecção, em con

dições de campo. As cultivares apresentam notas correspondendo a níveis que variam de média a alta suscetibilidade. Dada a homogeneidade das reações, provavelmente aquele foi um ano de alta incidência desta bactéria no ambiente onde foi realizada a pesquisa.

Mais recentemente, FERREIRA (1971) faz relato das doenças da soja constatadas nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, durante levantamentos realizados no período de 1969 a 1971. O crestamento bacteriano foi uma das doenças mais disseminadas da cultura da soja.

SCHUCK (1973), em levantamento de ocorrência de bacterioses em soja no Rio Grande do Sul, constatou que o crestamento bacteriano foi a principal doença bacteriana, nos locais amostrados, naquele ano.

Por esses levantamentos pode-se aquilatar que a bactéria *P. glycinea* é um dos patógenos mais prevalentes nas lavouras de soja.

FERREIRA (1975) realizou um trabalho de pesquisa de fontes de resistência ao crestamento bacteriano da soja. Constatou que a linhagem Pel 71017 apresenta boa resistência a esta doença, em condições de campo, quando comparada a outras linhagens e cultivares.

3.2. Literatura estrangeira

A literatura estrangeira, principalmente a prove

niente dos Estados Unidos é relativamente farta com relação a este patógeno.

As primeiras citações de ocorrência desta doença datam do início deste século. HEALD (1906) faz referência a ela ocorrendo no Estado de Nebraska. Dez anos após, CLINTON (1916), em relato sobre as doenças de plantas do Estado de Connecticut, cita a presença desta bacteriose. Um ano depois, JOHNSON e COERPER (1917) relatam a ocorrência desta doença no Estado de Wisconsin, e fazem descrição mais detalhada do patógeno, inclusive tentando já classificá-lo como pertencente aos gêneros *Pseudomonas* ou *Bacterium*. Esta pesquisa teve prosseguimento e COERPER (1919) faz a descrição completa dos sintomas e do patógeno, ao qual classificou como *Bacterium glycinum*. Quanto à variabilidade, foi constatada apenas em laboratório: algumas culturas tornavam pardo-escuro o meio de peptona, não havendo, porém, referência sobre reações diferentes em cultivares.

Um ano mais tarde, WOLF (1920) dava a publicação de um patógeno a que denominou de *Bacterium sojae*. Em rodapé deste trabalho, o autor cita que, quando seu manuscrito havia sido submetido à publicação, tomou conhecimento do trabalho publicado no ano anterior por COERPER. WOLF faz pequena referência à suscetibilidade de cultivares. Entre onze cultivares de soja testadas, juntamente com outras 40 introduções, o autor afirma que onde apareceu evidência de diferenças com relação à resistência à doença, essas diferenças não foram acre-

ditadas serem devidas a qualidades inatas, embora as observações não fossem suficientemente continuadas para justificar um julgamento final.

Nos anos de 1951, 1952 e 1953, Chamberlain publica três trabalhos relacionando resistência e suscetibilidade associadas à concentrações de inóculo.

No primeiro, CHAMBERLAIN (1951) informa que inóculo altamente diluído induziu apenas clorose em cultivares resistentes; para a mesma diluição, cultivares suscetíveis desenvolvem sintomas típicos de crestamento. Não faz qualquer referência à concentração utilizada, nem se trabalhou com mais do que um isolado. Das 1200 cultivares e introduções testadas apenas três introduções altamente resistentes foram relacionadas, mas não faz referência a elas.

No segundo, CHAMBERLAIN (1952) reporta um isolado com capacidade de produção de grandes halos cloróticos quando inoculado em plantas no estágio de terceira folha trifoliolada. Este isolado diferia de outros, incapazes de induzir a formação do halo. Não há relação à diferenças de resistência entre cultivares quando inoculadas com este e outros isolados incapazes de formar halo.

Um ano mais tarde, o mesmo autor (CHAMBERLAIN, 1953) publica que inóculo com concentrações entre 8.10^4 e 8.10^5 células por mililitro permitiram maior diferença entre cultivares resistentes e suscetíveis em testes com inoculação em condições de casa de vegetação, do que concentrações de 8.10^2 ,

8.10^3 e 8.10^6 . Esta última concentração (8.10^6) dava excelentes resultados quando usada a campo, mas mostrava-se muito severa quando em casa de vegetação.

Pesquisa de fonte de resistência ao crestamento bacteriano foi feita por DUNLEAVY *et alii* (1960), durante o período de 1953 a 1959. Durante este período a doença foi constatada em 25 a 72 por cento dos campos examinados. A P.I. 68708 foi considerada resistente tanto em condições de infecção natural quanto em inoculações artificiais. Concluiu que essa P.I. é uma boa fonte de resistência para ser incorporada ao programa de resistência ao crestamento bacteriano da soja para as cultivares do norte dos E.U.A.

CROSS e KENNEDY (1964) publicaram nota relativa ao trabalho realizado com dez isolados, provenientes de vários Estados norte-americanos; como hospedeiro foram usadas nove cultivares comerciais de Minnesota e uma seleção resistente à doença. Houve diferenças estatísticas em patogenicidade entre os diversos isolados. Os autores concluem que essa pesquisa indica ampla diversidade patogênica da bactéria *P. glycinea*.

KENNEDY e CROSS (1966), compararam 16 métodos de inoculação para determinar o melhor para testes de raças fisiológicas do agente do crestamento bacteriano da soja. Concluíram pelo encharcamento de uma pequena área, cerca de 0,005m de diâmetro, do limbo foliar de folha primária, com o uso do atomizador Paasche Airbrush, tipo H3, acoplado a um compressor de ar.

Nesse mesmo ano, CROSS *et alii* (1966) realizaram pesquisa na qual determinaram a existência de sete raças patogênicas de *Pseudomonas glycinea*, as quais foram separadas pela seguinte série diferencial: Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit e Norchief (Tabela 1). Seis das sete raças descritas foram detectadas no Estado de Minnesota. O método de inoculação foi o encharcamento com o atomizador Paasche Air brush, usando inóculo contendo 10 a 20 x 10⁶ células por mililitro. Esta concentração foi padronizada por estes autores, não obstante os resultados obtidos por CHAMBERLAIN (1953), apesar das concentrações usadas nas duas pesquisas serem muito semelhantes. Constataram, também, que isolados da raça R2 produziram um pigmento pardo-escuro no meio de agar nutritivo (AN), resultado semelhante ao obtido por COERPER (1919) com alguns isolados.

Em trabalho feito nos E.U.A. e apresentado no Brasil, ATHOW (1976) relatou a ocorrência de três raças de *P. glycinea*, sendo que uma foi denominada raça 0. Essas raças foram descritas com base na reação de três cultivares e três introduções, mas não é feita qualquer referência ao trabalho de CROSS *et alii* (1966), embora as três cultivares usadas sejam as mesmas utilizadas nesse trabalho. Estes resultados não são comparáveis com os de CROSS *et alii* (1966) nem com os de FETT (1977).

FETT (1977) trabalhando com 16 isolados, provenientes de diversas lavouras do Estado de Wisconsin, E.U.A., e

usando a série diferencial de CROSS *et alii* (1966), detectou que dez pertencem à raça R4, três à raça R2 e três diferiam das raças previamente descritas (Tabela 1). Testou a influência da idade da folha a ser inoculada e constatou que folhas mais velhas dão reações mais resistentes quando comparadas com folhas mais jovens.

Tabela 1 - Reação^{a/} de sete cultivares^{b/} diferenciais a sete raças fisiológicas^{c/} e 16 isolados^{d/}.

Raça ou isolado	Cultivares diferenciais						
	A	C	F	H	L	M	N
R1	S	R	S	R	R	R	R
R2	S	R	S	S	S	I	I
R3	S	R	R	S	S	I	I
R4	S	I	S	S	S	S	S
R5	R	R	R	S	R	S	R
R6	R	R	S	R	R	R	S
R7	S	R	R	S	R	R	R
J11-1	S	I	S	S	S	S	S
J18-1	S	S	S	S	S	S	S
J21-2	S	S	S	S	S	S	S
J21-3	S	S	S	S	S	S	S
J21-4	S	S	S	S	S	I	S
J21-8	S	R	R	S	S	R	R
J21-9	S	S	S	S	S	S	S

continua ...

Raça ou Isolado	Cultivares diferenciais						
	A	C	F	H	L	M	N
A29-2	S	S	S	S	S	S	S
A29-7	S	S	S	S	S	S	S
S9-1	S	S	S	S	S	S	S
S17-3	S	S	S	S	S	S	S
A1. 6-5A	S	R	R	S	S	R	S
A1.10-9B	S	I	S	S	S	S	S
A1.10-11A	S	S	S	S	S	S	S
S1.2-1	S	I	S	S	S	S	S
S1.9-1	S	S	S	S	S	S	S

a/ R - resistente; I - intermediário; S - suscetível.

b/ A - Acme; C - Chippewa; F - Flambeau; H - Harosoy;

L - Lindarin; M - Merit e N - Norchief.

c/ CROSS *et alii* (1966).

d/ FETT (1977).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada nas dependências, laboratório e casa de vegetação, da Área de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, em Londrina, PR.

4.2. Procedência e origem das cultivares da série diferencial

As sete cultivares utilizadas como série diferencial foram obtidas diretamente dos Estados Unidos (Tabela 2). As vinte e cinco sementes recebidas foram multiplicadas, primeiro na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, SP, e depois nas casas de vegetação da antiga sede do IPEAS, em Pelotas, RS, para que se dispusesse de uma quantidade suficiente para a instalação dos ensaios.

Tabela 2 - Origem das cultivares da sêrie diferencial usadas na detecção de raças fisiológicas de *Pseudomonas glycinea* (Cross *et alii*, 1966).

Cultivar	Origem
Acme	Seleção de Pagoda
Chippewa	Lincoln x (Lincoln x Richland)
Flambeau	Introdução da Rússia
Harosoy	Mandarin x (Mandarin x A.K.)
Lindarin	Ottawa Mandarin x Lincoln
Merit	Blackhawk x Capital
Norchief	Hawkeye x Flambeau

Cultivares de soja recomendadas para cultivo comercial e uma linhagem foram utilizadas para pesquisa de resistência. As cultivares foram Andrews, Bossier, Bragg, Campos Gerais, Davis, Flórida, Hardee, IAS-4, Mineira, Paranã, Pérola, Santa Rosa, Santana, São Luiz, UFV-1 e Viçoja, além da linhagem Pel 71017. Esta linhagem, proveniente da UEPAE, Pelotas, RS, foi incluída devido ter mostrado alta resistência em leitu_ ra realizada em parcelas experimentais (FERREIRA, 1975).

4.3. Procedência e coleta de material

Um total de 19 municípios, pertencentes a seis

Estados e um Território serviram como pontos de coleta das amostras. Além dos 31 isolados, foram utilizados isolados de quatro das raças norte-americanas (R1, R2, R4 e R5), provenientes de Minnesota, E.U.A. (gentileza do Dr. Kennedy), para comparação com os isolados obtidos aqui (Tabela 3).

Tabela 3 - Origem dos isolados de *Pseudomonas glycinea*.

Número do Isolado	Município/Estado
B 01	Campo Mourão, PR
B 03	Toledo, PR
B 04	Osório, RS
B 05	Guaíba, RS
B 06	Santa Maria, RS
B 07	Passo Fundo, RS
B 09	Ponta Grossa, PR
B 10	Toledo, PR
B 11	Londrina, PR
B 12	Londrina, PR
B 13	Campinas, SP
B 14	Cruz Alta, RS
B 15	Maringá, PR
B 16	Osório, RS
B 17	Guaíba, RS
B 18	Santa Maria, RS
B 19	Toledo, PR

continua...

Número do Isolado	Município/Estado
B 23	Pelotas, RS
B 34	Londrina, PR
B 57	Dourados, MT
B 58	Campinas, SP
B 59	Anápolis, GO
B 60	Brasília, DF
B 64	Castro, PR
B 69	Cambé, PR
B 71	Mal. Cândido Rondon, PR
B 72	Toledo, PR
B 74	Dourados, MT
B 78	Pelotas, RS
B 79	Brasília, DF
B 80	Vilhena, RO
R1	Minnesota, U.S.A.
R2	Minnesota, U.S.A.
R3	Minnesota, U.S.A.
R4	Minnesota, U.S.A.

Folhas trifolioladas ou simplesmente folíolos foram colhidos e guardados em sacos plásticos, quando o intervalo de tempo entre a coleta e a realização do isolamento permitiu que se trabalhasse com folhas ainda verdes e turgidas.

Quando esse intervalo de tempo impediu que assim se procedesse, as folhas ou folíolos foram guardados entre folhas de papel, levemente prensadas e postas à sombra para que desidratassem. Para tanto foram utilizados exemplares velhos de guias telefônicos.

4.4. Obtenção, identificação e conservação do patógeno

O meio de cultura utilizado para os isolamentos e as repicagens foi o King B (KING *et alii*, 1954), com a seguinte composição (modificada):

Proteose peptona nº 3	20,0 g
Glicerol	12,0 ml
K ₂ HPO ₄ (anidro)	1,5 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g
Agar-agar	17,0 g
Água	q.s.p. 1000,0 ml

Para observar a produção de pigmento pardo, *in vitro*, foi utilizado o meio agar nutritivo (AN), com a seguinte composição:

Peptona	10 g
Extrato de carne	3 g
Agar-agar	17 g
Água	q.s.p. 1000,0 ml

Os isolados foram obtidos de duas formas, direta e indiretamente do material colhido no campo. Pelo processo direto, pequenos pedaços de folíolos, correspondentes às manchas necróticas da doença, são cortados, com o auxílio de bisturi, em uma lâmina escavada, ambos flambados e esfriados ao ar. Em uma gota de água esterilizada esses pedaços são finalmente cortados em vários outros, de forma a possibilitar o máximo de exudação dos talos bacterianos. Após um período de cerca de dois minutos, essa gota é transferida para a superfície, previamente seca, do meio de cultura contido em placa de petri (100 x 20), por intermédio de uma alça de platina flambada e esfriada ao ar. É utilizado o método da diluição por estrias, em placa de petri. As placas são incubadas em estufa a 28°C.

Como o material proveniente de campos experimentais ou lavoura raramente contém lesões ainda não necrosadas, o isolamento pelo método direto proporciona uma grande porcentagem de perda devido a contaminação com outros organismos, principalmente bactérias, mesmo realizando-se desinfestação superficial, conforme os métodos preconizados, ou seja, tratamento com etanol, solução clorada e lavagem em água esterilizada.

Devido a este fato, foi usado o chamado método indireto que consiste em triturar pedaços doentes de folíolos em tubo de ensaio (70 x 10) contendo água de torneira, com o auxílio de um bastão de vidro com extremidade arredondada. Após cerca de 20 minutos, essa suspensão é inoculada, por meio

de um cotonete, em folhas primárias de cultivares de soja suscetíveis ao patógeno, cujo tecido é previamente encharcado com água em uma área aproximadamente circular com cinco milímetros de diâmetro. Esse cotonete apenas serve para o transporte e distribuição de uma porção da suspensão bacteriana, sem causar, porém, ferimentos na superfície da folha. O encharcamento é obtido com o atomizador Paasche Airbrush modelo H3 (Figura 1) acoplado a um compressor marca Primar. A pressão utilizada é de 15 psi. O isolamento, pelo processo de estrias em placa de petri, é realizado cinco a seis dias após a inoculação. Um pequeno pedaço do folíolo, correspondente à área com anasarca, de tamanho de cerca de um milímetro quadrado é processado como exposto anteriormente no método direto. As placas são mantidas em estufa a 28°C e a repicagem, para tubo de cultura com meio inclinado, realizada cerca de 36-48 horas após.

A bactéria foi identificada com base nos testes de produção positiva de pigmento verde fluorescente no meio King B, oxidase negativa (BRADBURY, 1970) e patogenicidade em plântulas de soja das cultivares Acme, Harosoy e Santana.

Os isolados são conservados em folhas primárias ou folíolos de folhas trifolioladas, previamente inoculadas com suspensões produzidas como descrito no item 4.6., desidratadas e conservadas em geladeira à temperatura de 4 - 5°C. As folhas são colhidas cinco a sete dias após a inoculação, quando os tecidos inoculados apresentam transparência quando observados contra a luz. As cultivares utilizadas para isso são

as mais suscetíveis a todos os isolados (Acme, Harosoy e Santa na).

Fig. 1 - Atomizador Paasche Airbrush H3

4.5. Unidade experimental

Foram utilizadas bandejas de plástico medindo 41 x 35 x 6 cm; o substrato esterilizado foi solo tipo latossolo roxo distrófico misturado com areia de construção e solo superficial de mata na proporção de 3 x 1 x 1. Em cada bandeja foram semeadas as sete cultivares da série diferencial proposta por CROSS *et alii* (1966), distribuídas conforme a figura 2.

Após a germinação, foram selecionadas quatro plân

tulas de cada uma das cultivares diferenciais, permitindo quatro repetições por tratamento, sendo que cada isolado foi testado três vezes, dando um total de 12 leituras. Em cada teste foi usada uma bandeja como testemunha.

Fig. 2 - Unidade experimental para determinação de raças
A - Acme; C - Chippewa; F - Flambeau; H - Harosoy;
L - Lindarin; M - Merit e N - Norchief.

4.6. Preparo do inóculo e inoculação

Foram repicadas, das placas de petri, colônias individualizadas para o meio King B, inclinado em tubo de cultura com tampa de baquelite, com a superfície previamente seca. Esses tubos foram mantidos a 28°C durante 24 à 36 horas. Após, foram preparadas suspensões da bactéria em água de torneira, na concentração de aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células por mililitro. Esta concentração foi usada para todos os testes realizados e baseou-se no método das diluições seriadas em placa de petri, auxiliado pela escala de MacFarland (KIRÁLY *et alii*, 1974).

A suspensão foi inoculada na face abaxial das folhas primárias de plântulas de soja com a idade de 10-12 dias após a germinação. Nessa idade as folhas estavam completamente desdobradas e com cerca da metade do seu tamanho máximo. O método foi o preconizado por KENNEDY e CROSS (1966).

A inoculação foi feita com o pulverizador Paasche Airbrush modelo H3, acoplado a um compressor marca Primar, até a obtenção de uma área encharcada com cerca de 5 mm de diâmetro. A pressão utilizada foi de 15 psi. A testemunha recebeu o mesmo tipo de tratamento, apenas que com água pura. As inoculações foram feitas sempre entre às 09:00 e 11:00 horas da manhã, período em que se obtinha a melhor infecção. O solo era molhado na tarde do dia anterior e uma hora antes da inoculação para que as plantas estivessem túrgidas.

4.7. Ambiente e critério de avaliação

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação modelo Dantas, com temperatura média oscilando de 20^o à 31^oC , com umidade ambiental de 40 à 98 %.

As plantas não sofreram tratamento suplementar de luz e não foi utilizado qualquer tipo de câmara úmida nas unidades experimentais, apenas o compartimento da casa de vegetação era molhado internamente nas horas mais secas do dia. Essa metodologia é baseada em KENNEDY e MEW (1971) e KENNEDY (1975, comunicação pessoal).

As leituras foram realizadas cinco, sete e dez dias após cada inoculação. A escala de leitura foi a seguinte:

R - Resistente; necrose da área encharcada.

I - Intermediário; leve anasarca dos tecidos vizinhos às nervuras com ou sem avermelhamento destas.

S - Suscetível; grande anasarca, além da área encharcada.

Na figura 3, estão os três índices da escala de leitura.

Fig. 3 - Escala de leitura para reação à *Pseudomonas glycinea*
S - suscetível; I - intermediário; R - resistente.

4.8. Experimentos de inoculação em cultivares

4.8.1. Determinação de raças fisiológicas

4.8.2. Reação de 16 cultivares comerciais de soja a oito raças fisiológicas de *P. glycinea*

4.8.3. Determinação da variabilidade de isolados da raça R13, frente a 13 cultivares comerciais e uma linhagem

Todos esses experimentos foram realizados conforme a metodologia descrita, apenas foi mudada a unidade ex

perimental que foi vaso de barro, com quatro plântulas por cul
tivar, nos dois últimos experimentos (4.8.2. e 4.8.3.).

5. RESULTADOS

Todos os isolados utilizados formaram pigmento verde-fluorescente no meio King B, oxidase negativa e foram patogênicos em folhas primárias (unifolioladas) de plântulas de soja das cultivares Acme, Harosoy e Santana, consideradas como universalmente suscetíveis. O isolado da raça R2, proveniente dos E.U.A., em meio da cultura agar-nutritivo (AN), ocasionou mudança de cor de meio para pardo-escuro. Este fato é citado por CROSS *et alii* (1966). Nenhum isolado brasileiro proporcionou qualquer alteração de cor do meio AN.

5.1. Determinação das raças fisiológicas

Os trinta e um isolados de *P. glycinea*, inoculados nas sete cultivares diferenciais puderam ser separados em dez raças fisiológicas novas, designadas de R8 a R17, além da raça R6 já citada nos E.U.A. (CROSS *et alii*, 1966), o que demonstrou grande variabilidade. As inoculações, nas cultivares

Isolados	Reação ^{a/} das cultivares ^{b/} diferenciais ^{c/}							Raça fisiológica
	A	C	F	H	L	M	N	
B64	R	R	S	R	R	R	S	R6
B69	S	R	S	S	S	R	I	R16
B71	R	R	R	I	R	R	R	R17
B72	S	R	S	S	S	I	S	R12
B74	S	R	R	S	S	R	R	R13
B78	S	R	R	S	S	R	R	R13
B79	S	R	R	S	S	R	R	R13
B80	S	R	R	S	S	R	R	R13
-	S	R	S	R	R	R	R	R1
-	S	R	S	S	S	I	I	R2
-	S	I	S	S	S	S	S	R4
-	R	R	R	S	R	S	R	R5

a/ R - resistente; I - intermediário; S - suscetível.

b/ A - Acme; C - Chippewa; F - Flambeau; H - Harosoy;
L - Lindarin; M - Merit e N - Norchief.

c/ Avaliação em quatro plantas por cultivar.

Agrupando-se os isolados por regiões, constata-se que *P. glycinea* ocorre em todos os locais onde a soja é cultivada, sendo que a raça R13 é a mais comum, estando presente em quase todos os Estados amostrados (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das raças fisiológicas de *P. glycinea* constatadas no Brasil, conforme os Estados.

Estado/Município		Número de constatações das raças										
		R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R6
PR	Campo Mourão	1										
	Toledo		1			1	2					
	Ponta Grossa				1							
	Londrina	1	1				1					
	Maringá							1				
	Castro											1
	Cambé									1		
	Mal. Cândido Rondon										1	
RS	Osório		1				1					
	Guaíba			1			1					
	Santa Maria				1		1					
	Passo Fundo					1						
	Cruz Alta						1					
	Pelotas						2					
SP	Campinas						1			1		
MS	Dourados						1		1			
GO	Anápolis	1										
DF	Brasília	1					1					
RO	Vilhena						1					
T O T A I S		4	3	1	2	2	13	1	1	2	1	1

5.2. Reação de cultivares comerciais de soja a algumas raças de *P. glycinea*

As dezesseis cultivares recomendadas para cultivo no Estado do Paraná, testadas para níveis de resistência a oito isolados de *P. glycinea*, representantes de algumas raças ocorrentes no Brasil, demonstram alta suscetibilidade à maioria delas, notando-se baixa frequência da reação resistente (R) (Tabela 6).

Tabela 6 - Reação de 16 cultivares comerciais de soja a algumas raças de *P. glycinea* encontradas no Brasil.

Cultivares	Reação ^{a/b/} aos isolados das raças correspondentes							
	B01 (R8)	B03 (R9)	B05 (R10)	B07 (R12)	B15 (R14)	B57 (R15)	B71 (R17)	B64 (R6)
Andrews	S	I	S	I	I	S	S	S
Bossier	S	S	S	S	R	S	S	I
Bragg	S	I	S	S	S	I	S	S
Campos Gerais	S	S	S	R	R	R	I	S
Davis	S	S	S	I	S	S	I	S
Flórida	I	I	S	I	I	I	I	S
Hardee	S	I	S	S	S	I	I	I
IAC-4	S	S	S	S	I	S	S	S
Mineira	S	I	S	S	R	S	I	I
Paraná	S	I	S	S	R	I	S	R
Pérola	S	S	S	S	I	S	S	S
Santana	S	I	S	S	S	I	S	S
Santa Rosa	S	I	S	S	S	S	S	S
São Luiz	S	S	S	S	R	S	I	S
UFV-1	S	S	S	S	S	S	S	S
Viçoja	S	I	S	S	S	S	I	S

a/ R - resistente; I - intermediário e S - suscetível.

b/ Avaliação em quatro plantas por cultivar.

5.3. Determinação da variabilidade de isolados da raça R13, frente a treze cultivares comerciais e uma linhagem

Sete isolados, de um total de treze que reagiram como raça R13, frente às cultivares diferenciais, mostraram variabilidade dentro dessa raça, sendo possível, inclusive, com base na reação de algumas cultivares comerciais, caracterizar cada um como uma nova raça (Tabela 7).

Tabela 7 - Reação de cultivares comerciais e uma linhagem de soja a alguns isolados da raça fisiológica R13.

Cultivares e Linhagem	Reação ^{a/b/} aos isolados da raça R13						
	B10	B13	B14	B19	B23	B74	B80
Andrews	S	S	I	I	S	S	S
Bossier	S	S	I	I	S	S	S
Bragg	S	I	S	I	S	S	S
Davis	I	S	I	S	S	S	S
Flórida	S	R	I	R	I	I	S
Hardee	S	S	I	I	S	S	S
IAC-4	S	S	I	I	S	I	S
Mineira	S	S	S	R	I	S	S
Paraná	I	R	R	I	I	R	R
Pêrola	S	S	I	I	S	S	S
Santa Rosa	I	S	S	I	S	S	S
São Luiz	I	S	S	S	S	S	S
Viçoja	S	S	S	I	S	S	S
Pel 71017	S	R	R	R	R	R	R

a/ R - resistente; I - intermediário e S - suscetível.

b/ Avaliação em quatro plantas por cultivar.

6. DISCUSSÃO

A idade da folha, quando da inoculação, tem grande importância na sua reação. FETT (1977) testou três tamanhos de folhas unifolioladas (primárias) e concluiu que a resistência aumenta quando a folha fica mais velha, fato também constatado por KENNEDY e CROSS (1966), trabalhando com o mesmo binômio soja/*P. glycinea* e por CHAND e WALKER (1964), trabalhando com o binômio pepino/*P. lachrymans*.

Nos trabalhos de CROSS *et alii* (1966) e KENNEDY e CROSS (1966) a idade das folhas unifolioladas foi a mesma, ou seja, quando estavam completamente expandidas. No presente trabalho, foram tomados todos os cuidados para que as cultivares da série diferencial tivessem idade uniforme à época da inoculação, isto é, 10 a 12 dias após a germinação. Nessa idade as folhas unifolioladas estavam desdobradas e com o tamanho correspondente à cerca da metade do seu tamanho máximo e mostravam reações uniformes quando inoculadas. A utili

zação correta do método é comprovada pela inoculação dos isolados americanos, correspondentes às raças R1, R2, R4 e R5, que produziram as mesmas reações obtidas por CROSS *et alii* (1966).

Utilizando-se a série diferencial de raças de *P. glycinea*, composta das sete cultivares (Tabela 2) e a avaliação de níveis de resistência, baseada em três reações (R, I e S), propostas por CROSS *et alii* (1966), há a possibilidade de se detectarem $3^7 = 2187$ raças diferentes. A ocorrência, no Brasil, de raças diferentes comparadas com as dos E.U.A. é uma consequência natural, baseada no fato de que sistemas genéticos de interação hospedeiro/parasita evoluem juntamente (BERGAMIN FILHO e KIMATI, 1978). Isto é devido a que as condições ambientes e as cultivares diferenciais, provenientes do norte dos E.U.A., são diferentes das cultivares comerciais brasileiras.

Os resultados da Tabela 2 confirmam essa afirmação, já que dos 31 isolados, 30 podem ser classificados como dez novas raças.

É discutível, porém, se o número de cultivares diferenciais e o critério de avaliação são adequados, pois, do ponto de vista prático, o número possível de raças diferenciáveis é muito elevado.

Mesmo em sistemas hospedeiro-parasita, nos quais estudos genéticos estão mais avançados, como são os casos da batata/*Phytophthora infestans* e trigo/*Puccinia graminis tritici*, há recomendações (VAN DER PLANK, 1968) no sentido de que

somente os genes com resistência vertical forte sejam utilizados para diferenciação de raças do patógeno. No caso da soja, faltam estudos sobre a genética da resistência a raças de *P. glycinea*, excessão feita para as raças R1 e R2 (MUKHERJEE *et alii*, 1964), e não existem evidências diretas sobre a qualidade desses genes de resistência, se fortes ou fracos.

Há indicações que os genes de resistência de algumas cultivares diferenciais, como Acme, Harosoy e Lindarin, são fracos.

O fato de existirem, no Brasil, raças do patógeno com genes de virulência a algumas diferenciais americanas (Tabela 4), aliado a que essas diferenciais nunca foram cultivadas aqui, parece indicar que os genes de resistência das diferenciais Acme, Harosoy e Lindarin são fracos e os de Chippe wa, Merit e Norchief são fortes, conforme a conceituação de VAN DER PLANK (1968).

Assim sendo, as cultivares portadoras de genes fracos seriam desaconselhadas como diferenciais de raças.

Por outro lado, existe a possibilidade de que os genótipos das diferenciais Acme, Harosoy e Lindarin, suscetíveis à maioria dos isolados brasileiros, tenham alguma semelhança com os das cultivares comerciais brasileiras, pelo menos no que respeita à genes de resistência. Isto faria com que fossem selecionadas raças com genes de virulência para aquelas diferenciais. Essa hipótese, à luz dos resultados obtidos, parece não ser correta, devido a que as raças encontradas no Bra

sil são diferentes das dos E.U.A.

Existe, ainda, uma terceira probabilidade, qual seja a de que essas diferenciais não possuem genes de resistência, já que são suscetíveis tanto no Brasil quanto nos E.U.A. (Tabelas 1 e 4).

O critério de avaliação, baseado em três tipos de infecção parece não ser o mais apropriado, uma vez que a reação intermediária (I) está muito mais próxima da reação resistente (R) do que da suscetível (S), possibilitando, por vezes, dúvidas. Assim foi no caso do trabalho de FETT (1977) que, pesquisando raças em 16 isolados, ficou indeciso em designar três deles como membros de três novas raças.

Se forem reduzidos os índices de reação de três para dois, considerando-se apenas R e S, isto é, considerando-se toda a leitura I como R, o número de raças constatado no Brasil diminui para seis, e não há qualquer alteração na tabela e no número de raças propostos por CROSS *et alii* (1966) (Tabela 1). Além disso, após a mudança, três das raças novas encontradas aqui seriam idênticas a três das raças norte-americanas, o que diminuiria o número total de raças de *P. glycinea* e viria ao encontro da hipótese, anteriormente apresentada, de que os genótipos das diferenciais sejam semelhantes com os das cultivares comerciais do Brasil.

Com base nas considerações apresentadas, parece que o sistema adotado por CROSS *et alii* (1966), seguido no presente trabalho, não é o mais adequado, havendo necessidade de

estudos mais profundos visando a possibilidade de reduzir não só, o número das diferenciais como também os tipos de reação para apenas dois (R e S).

Da observação da tabela 5, a raça R13 é a mais comum.

O maior número de constatações desta raça foi no Rio Grande do Sul, talvez por ser o Estado onde o cultivo da soja é mais antigo, embora a amostra proveniente de Passo Fundo, município tradicional com plantador de soja, seja da raça R12. Além disso, das 11 raças determinadas, cinco ocorrem naquele Estado.

No Paraná há muita variação, tanto das raças como dos locais. Isto pode ser explicado pela diversidade de origem das sementes. Praticamente em todos esses locais foram utilizadas sementes provenientes de diversas regiões gaúchas, quando da implantação definitiva da soja no Estado. Situação semelhante ocorre com os demais municípios amostrados, dos outros Estados.

Pela tabela 6 não há evidências de genes de resistência nas cultivares comerciais, quando inoculadas com uma série de raças fisiológicas, provavelmente devido a que esses genes de resistência são fracos. Se assim, programas de melhoramento visando resistência a esta doença devem ser encarados no sentido da resistência horizontal.

A observação também permite, juntamente com os

dados da tabela 5, entender a distribuição irregular das raças nas diversas regiões sojícolas, já que as cultivares comerciais utilizadas para cultivo são suscetíveis à maioria delas. Isto é devido, com toda certeza, à origem das sementes provenientes do Rio Grande do Sul e, mais recentemente, do Paraná, já que *P. glycinea* é um patógeno que pode ser transmitido pela semente (KENDRICK e GARDNER, 1921) e (BINS e JARDIM FREIRE, 1971). Evidentemente, nos Estados onde a cultura ainda não é tradicional, ou seja, onde o cultivo ainda é relativamente recente, como ocorre nos Estados de MG, GO e RO, não se pode esperar grande diversidade de raças ocorrendo presentemente. Nestes, foram apenas amostrados os municípios onde há áreas com experimentação e lavoura.

Segundo STAKMAN e HARRAR (1957, p.146) o termo raça fisiológica significa um biótipo ou um grupo de biótipos, os quais podem ser distinguidos, com razoável certeza e facilidade, por caracteres fisiológicos, incluindo patogenicidade. Pela observação dos resultados apresentados na tabela 7, quando foram usados diversos isolados pertencentes à mesma raça R13, constata-se que há diferentes reações para uma mesma cultivar. Estes resultados mostram a complexidade de um trabalho desta natureza. STAKMAN e CHRISTENSEN (1960) afirmam que um dos principais obstáculos para a produção e manutenção de cultivares resistentes é a multiplicidade de raças fisiológicas aliada ao número de hospedeiros diferenciais que possam vir a ser constatados. Esta afirmação vem em favor da recomendação

diminuição do número de cultivares diferenciais.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. A bactéria *Pseudomonas glycinea* Coerper está presente em todas as regiões sojícolas do Brasil;
2. O patógeno apresenta grande variabilidade, tendo sido detectadas dez novas raças fisiológicas, além da raça R6;
3. A cultivar Chippewa pode ser recomendada como fonte de resistência ao crestamento bacteriano da soja;
4. A raça R13, a mais comum no Brasil, é composta por vários biótipos diferenciáveis por reações em cultivares comerciais brasileiras;
5. Nenhuma cultivar comercial, das 16 testadas, possui resistência a todas as raças; e

6. A linhagem Pel 71017 apresenta resistência à maioria dos biótipos da raça R13.

8. SUMMARY

In order to determine races of *Pseudomonas glycinea* Coerper, thirty one isolates of the pathogen were evaluated. These isolates were taken from samples collected in six counties in the State of Rio Grande do Sul, eight in Paraná, one in São Paulo, one in Mato Grosso do Sul, one in Goiás, one in Rondônia, and one in Distrito Federal. All the pathogenic isolates producing green fluorescent pigment in King B medium and negative oxidase reaction were inoculated on seven differential soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars (Acme, Chipewa, Flambeau, Harosoy, Lindarim, Merit and Norchief). Three reaction classes were considered: susceptible (S), intermediate (I), and resistant (R). Besides race R6, which has already been described in United States, ten new races were detected. To each race, a capital R followed by numbers from 8 to 17, was attributed. The race R13 was the most common one.

The reactions of eight races were tested on 16

comercial cultivars but none of them was resistant to all these races. It was possible to separate by their pathogenicity, seven race R13 isolates, by inoculating them on 13 comercial cultivars and the line Pel 71017. Particularly the line Pel 71017 was resistant to six of these isolates.

9. LITERATURA CITADA

- ATHOW, K.L., 1970. Melhoramento para resistência às doenças.
In: I Simpósio Brasileiro da Soja. Campinas, SP. 9p.
- BERGAMIN FILHO, A. e H. KIMATI, 1978. Variedades resistentes.
In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia. 2ª edição.
Piracicaba, SP., Editora Agronômica Ceres, 1º volume, p.
297-324.
- BINS, E. e J.R. JARDIM FREIRE, 1971. Transmissibilidade de
bactérias fitopatogênicas nas sementes de soja [*Glycine*
max (L.) Merrill]. Agronomia Sulriograndense. Porto Ale
gre, RS. 5:19-24.
- BITANCOURT, A.A., 1934. Relação das doenças e fungos paras_i
tas observados na Seção de Fitopatologia durante os anos
de 1931 e 1932. Arq. Instituto Biológico. São Paulo, SP.
5:185-196.
- BRADBURY, J.F., 1970. Isolation and preliminary study of bac
teria from plants. Review of Plant Pathology. England.
49:213-218.

- BRASIL. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, 1978 .
Resultados de Pesquisa de Soja. Londrina, PR. 234p.
- CHAMBERLAIN, D.W., 1951. Resistance to Bacterial Blight in Soybeans. Phytopathology. Minnesota, USA. 41:6 (Abstr.).
- CHAMBERLAIN, D.W., 1952. A halo-producing strain of *Pseudomonas glycinea*. Phytopathology. Minnesota, USA. 42:299-300.
- CHAMBERLAIN, D.W., 1953. Disease reaction in relation to inoculum dilution in bacterial blight of soybean. Phytopathology. Minnesota, USA. 43:468 (Abstr.).
- CHAND, J.N. e J.G. WALKER, 1964. Relation of age of leaf and varietal resistance to bacterial multiplication in cucumber inoculated with *Pseudomonas lachrymans*. Phytopathology. Minnesota, USA. 54:49-50.
- CLINTON, G.P., 1916. Notes on plant diseases of Connecticut. Connecticut Agr. Expt. Sta. Ann. Rpt. 1915. p.444-446.
- COERPER, F.M., 1919. Bacterial blight of soybean. Journal of Agricultural Research. Washington, D.C., USA. 18: 179-193.
- CROSS, J.E. e B.W. KENNEDY, 1964. Variability in pathogenicity in *Pseudomonas glycinea*. Phytopathology. Minnesota, USA. 54:890 (Abstr.).
- CROSS, J.E., B.W. KENNEDY, J.W. LAMBERT e R.L. COOPER, 1966. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. Plant Disease Report. Maryland, USA. 50:557-560.

- FERREIRA, L.P., 1971. Nota prvia sobre a ocorrncia de doenas em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] no Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Piracicaba, SP. 4:7-9.
- FERREIRA, L.P., 1973. As principais doenas da soja. Atualidades Agronmicas. So Paulo, SP. 4:54-61.
- FERREIRA, L.P., 1975. Pesquisa de fontes de resistncia ao cretamento bacteriano da soja (*Pseudomonas glycinea* Coerper). In: III Reunio Conjunta de Pesquisa de Soja RS/SC. Porto Alegre, RS. 6p.
- FETT, W.F., 1977. Occurrence of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in Wisconsin and presence of a bacterial agglutinating factor in soybean. Wisconsin, WI, University of Wisconsin. 119p. (Tese de Mestrado).
- HEALD, F.D., 1906. New and little-known plant diseases in Nebraska. Science. Washington, D.C., USA. 23:624.
- JARDIM FREIRE, J.R., 1962. O fogo selvagem, o cretamento e a pstula bacteriana da soja. Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 30p. (Tese de Livre Docncia).
- JOHNSON, A.G. e F.M. COERPER, 1917. A Bacterial Blight of soybean. Phytopathology. Minnesota, USA. 1:65 (Abstr.).
- KENDRICK, J.B. e M.W. GARDNER, 1921. Seed transmission of soybean bacterial blight. Phytopathology. Minnesota, USA. 11:340-342.

- KENNEDY, B.W. e J.E. CROSS, 1966. Inoculation procedures for comparing reaction of soybeans to bacterial blight. Plant Disease Reporter. Maryland, USA. 50:560-565.
- KENNEDY, B.W. e T.W. MEW, 1971. Relationship of postinoculation humidity to bacterial leaf development on soybean. Phytopathology. Minnesota, USA. 61:879-880.
- KING, E.O., M.K. WARD e D.E. RANEY, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. lab. & Clin. Med. Atlanta, GA., USA. 44:301-307.
- KIRÁLY, Z., Z. KLEMENT, F. SOLYMOSY e J. VÖRÖS, 1974. Methods in Plant Pathology. New York, Elsevier Scientific Publishing Company. 509p.
- LEHMAN, P.S., C.C. MACHADO e M.T. TARRAGÕ, 1976. Frequência e severidade de doenças da soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fitopatologia Brasileira. Piracicaba, SP. 1:183-193.
- MUKHERJEE, D., J.W. LAMBERT, R.L. COOPER e B.W. KENNEDY, 1966. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybeans (*Glycine max* L.). Crop Science. Madison, USA. 6:324-326.
- SCHUCK, E., 1973. Ocorrência de bacteriose em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] no Rio Grande do Sul. Agronomia Sulrio grandense. 9:27-32.
- STAKMAN, E.C. e J.C. HARRAR, 1957. Principles of Plant Pathology. New York, The Ronald Company. 581p.

STAKMAN, E.C. e J.J. CHRISTENSEN, 1960. The problem of breeding resistant varieties. In: HORSFALL, J.G. e A.E. DIMOND, ed. Plant Pathology. New York, Academic Press, III volume, p.567-624.

VAN DER PLANK, J.E., 1968. Disease Resistance in Plants. New York and London, Academic Press. 206p.

WOLF, F.A., 1920. Bacterial blight of soybean. Phytopathology. Minnesota, USA. 10:119-132.