

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

***Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: SOBREVIVÊNCIA,
GAMA DE HOSPEDEIRAS E EFEITO DO PRÉ-PLANTIO DE AVEIA E
TRIGO NA OCORRÊNCIA DA DOENÇA.**

TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP
Maio - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

***Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: SOBREVIVÊNCIA,
GAMA DE HOSPEDEIRAS E EFEITO DO PRÉ-PLANTIO DE AVEIA E
TRIGO NA OCORRÊNCIA DA DOENÇA.**

TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP
Maio – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Silva Júnior, Tadeu Antônio Fernandes, 1982-
S586c *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*:
sobrevivência, gama de hospedeiras e efeito do pré-plantio
de aveia e trigo na ocorrência da doença / Tadeu Antônio
Fernandes Silva Júnior. - Botucatu : [s.n.], 2011
x, 98 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2010
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Inclui bibliografia.

1. *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*.
2. Feijão. 3. Gama de hospedeiras. 4. Murcha-de-
curtobacterium. 5. *Phaseolus vulgaris*. 6. Sobrevivência.
I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu).
Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

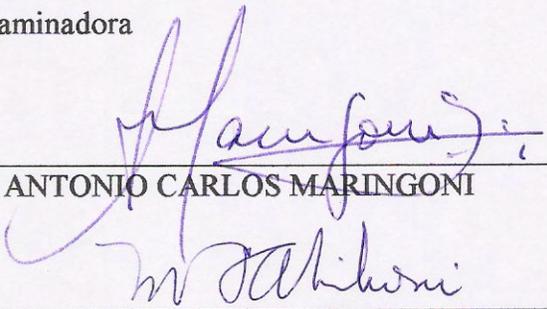
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Curtobacterium flaccumfaciens PV. flaccumfaciens: SOBREVIVÊNCIA,
GAMA DE HOSPEDEIRAS E EFEITO DO PRÉ-PLANTIO DE AVEIA E
TRIGO NA OCORRÊNCIA DA DOENÇA

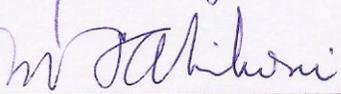
ALUNO: TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

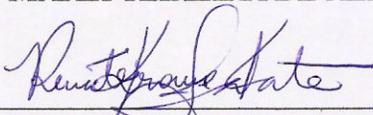
Aprovado pela Comissão Examinadora



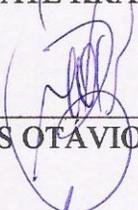
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



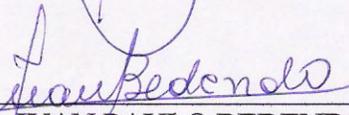
PROF^a DR^a MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF^a DR^a RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM



PROF. DR. IVAN PAULO BEDENDO

Data da Realização: 13 de maio de 2011.

Aos meus pais Mary Neide e Tadeu,

à minha tia Marina e

à toda minha família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus e toda minha família pela minha vida, saúde, apoio e incentivo durante todas as etapas da minha formação.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni pela orientação, amizade e ensinamentos durante toda minha trajetória acadêmica.

A minha querida Dja pelo amor, carinho, amizade, compreensão e ajuda durante toda a realização deste trabalho.

A Adriana Terumi Itako pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório Ronaldo (Genérico), Marcelo, Luís Alfredo (Galak), Lucas, Amanda e Mariane pela amizade.

A Daniela Dinah Helena Costa e Cristiane Di Pieri pelo auxílio técnico e amizade.

Aos meus colegas de Pós-graduação, Ana Carolina Firmino, Diego Zied, Fabrício (Facão), Fabiano (Kioski), Haroldo (Marreco), João Paulo Furlan, Júlio Massahiro, Karina (Babaçú), Karol Dória, Martha Passador, Mônica Fecury, Tatiane Mituti e William Moraes, e aos funcionários do Módulo de Cogumelos, Ivando e Toninho Fogaça, pela amizade.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e à FAPESP pelo auxílio financeiro;

Ao Professor Dr. Rogério Peres Soratto, do Departamento de Produção Vegetal – Setor de Agricultura da FCA/UNESP, pelo fornecimento das sementes das espécies vegetais utilizadas neste estudo.

Aos Professores Edson Luís Furtado, Marcelo Agenor Pavan, Marli Teixeira de Almeida Minhoni e Renate Krause Sakate pelos ensinamentos, e aos demais professores do Setor de Defesa Fitossanitária.

A secretária de Pós-graduação do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas, Rita Matheus, e aos funcionários do Setor de Defesa Fitossanitária e da biblioteca da FCA/UNESP pela colaboração.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
1. RESUMO	01
2. SUMMARY	03
3. INTRODUÇÃO	05
4. REVISÃO DE LITERATURA	08
4.1. Aspectos gerais da cultura do feijoeiro	08
4.2. A murcha-de-curtobacterium do feijoeiro	10
4.3. Características de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e sua gama de espécies hospedeiras	13
4.4. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas com ênfase em bacterioses do feijoeiro	16
Capítulo 1 – Sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em solo e restos de cultura de feijoeiro	22
Capítulo 2 – Efeito do pré-plantio de aveia e trigo na incidência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro	47
Capítulo 3 – Patogenicidade de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> a diferentes espécies vegetais	67
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Período de sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> no solo 1, mantido a 50% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação	43
Período de sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> no solo 1, mantido a 100% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação	43
Período de sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> no solo 2, mantido a 50% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação	44
Período de sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> no solo 2, mantido a 100% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação	44
Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio I ...	45
Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio II ..	46
Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio III .	46
Plantas de feijoeiro e soja inoculadas com <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> a) Sintomas de murcha-de-curtobacterium em plantas de	

feijoeiro cv. Pérola inoculadas por punção de caule; b) Sintomas de necrose de bordos em folíolos de feijoeiro com presença de halo amarelado; c) Sintomas de necrose de bordos de folhas de soja com presença de halo amarelado; e d) folhas de soja com sintomas de necrose do limbo foliar

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Períodos de sobrevivência de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em restos de cultura de feijoeiro, mantidos na superfície do solo e enterrados a 20 cm de profundidade, em três diferentes ensaios	45
Presença de sintomas de necrose em folhas, murcha, e colonização de folhas e caules em diferentes espécies vegetais inoculadas com <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	86

1. RESUMO

A murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é uma das principais doenças bacterianas da cultura do feijoeiro, acarretando grandes perdas na produção dessa cultura. Até o momento existem poucas informações sobre os diferentes nichos de sobrevivência desta bactéria e de sua gama de hospedeiras. Em vista disso, este trabalho teve por objetivos principais verificar a capacidade de sobrevivência saprofítica de Cff em restos de cultura de feijoeiro mantidos na superfície do solo e enterrados à 20 cm de profundidade; a influência da temperatura, umidade e do tipo de solo no período de sobrevivência da bactéria em solo; determinar a gama de hospedeiras de Cff inoculadas artificialmente, tanto por ferimento no caule, como por aspersão de suspensão bacteriana na parte aérea das plantas; a capacidade de colonização de Cff do rizoplane de plantas de aveia e trigo; e o efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da murcha-de-curtobacterium. Quanto à capacidade de sobrevivência de Cff em restos de cultura de feijoeiro, foi demonstrado que a bactéria possui menor capacidade de sobrevivência quando os restos vegetais são incorporados ao solo e também em épocas com maiores índices de precipitação e temperaturas mais altas. O período de sobrevivência do patógeno nos restos culturais de feijoeiro mantidos na superfície do solo variou entre 165 e 240 dias e nos restos

vegetais enterrados a 20 cm de profundidade, o período de sobrevivência foi inferior a 30 dias. Quanto à sobrevivência de Cff na forma de células livres no solo, foi verificado que a temperatura, a umidade e o tipo do solo têm influencia na capacidade de sobrevivência da bactéria. O tempo de sobrevivência de Cff variou entre dois e quinze dias. Das 30 espécies botânicas inoculadas artificialmente com Cff, a bactéria causou lesões na parte aérea de folhas de feijoeiro e soja e colonizou folhas de plantas de trigo e caules e folhas de plantas de soja e trigo. Foi verificado também que Cff não possui a capacidade de colonizar o rizoplane de aveia e trigo, e o pré-plantio dessas gramíneas, antes da instalação da cultura do feijoeiro, não exerceu efeito sobre a ocorrência da murcha-de-curtobacterium.

Palavras-chave: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, feijoeiro, gama de hospedeiras, murcha-de-curtobacterium, *Phaseolus vulgaris*, sobrevivência.

***Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: SURVIVAL, HOST RANGE AND EFFECT OF OAT AND WHEAT PRE-PLANTING ON DISEASE OCURRENCE. Botucatu, 2011. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.**

Author: TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

2. SUMMARY

Bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is one of the main bacterial diseases affecting bean culture, leading to great losses in its production. So far there is scarce information about the different survival niches and host range of this bacterium. Thus, the present study had as major aims to verify Cff capability of saprophytically surviving in bean debris kept on the soil surface and buried at 20 cm depth; to assess the influence of temperature, humidity and soil type on the survival period of this bacterium in soil; to determine the host range for artificially inoculated Cff, either through stem injury or through bacterial sprinkling onto the shoot of plants; to verify Cff capability of colonizing the rhizoplane of oat and wheat plants; and to assess the effect of oat and wheat pre-planting on

the occurrence of bean bacterial wilt. Cff had decreased capability of surviving in bean debris when the latter were incorporated into the soil and during periods of higher rainfall rates and temperatures. The pathogen survival period in bean culture remnants kept on the soil surface ranged from 165 and 240 days, while in plant debris buried at 20 cm depth the survival period was inferior to 45 days. The survival capability of Cff as free cells in soil was influenced by temperature, humidity and soil type. Cff survival time varied between two and fifteen days. Of 30 plant species artificially inoculated with Cff, bean and soy shoot had lesions caused by the bacterium which endophytically colonized wheat leaves and soy and wheat stem and leaves. Cff was also shown to have no capability of colonizing oat and wheat rhizoplane while the pre-planting of these grass plants, before bean culture establishment, had no effect on the occurrence of bean bacterial wilt.

Keywords: bean, bean bacterial wilt, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, host range, *Phaseolus vulgaris*, survival.

3. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de elevado valor protéico, consumida por milhões de pessoas em todo mundo, servindo como fonte básica de proteínas na dieta de muitos países em desenvolvimento, como o Brasil (Broughton et al., 2003; Graham et al., 2003). De acordo com a FAO (2009), a produção dessa cultura na safra 2009 foi de mais de 19 milhões de toneladas em todo o mundo, ocupando uma área superior a 25 milhões de hectares.

A cultura do feijoeiro pode ser comprometida devido à ocorrência de várias doenças que ocasionam perdas significativas na produção, dentre as quais se destaca a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins e Jones (Cff). No território brasileiro, a doença foi inicialmente relatada em lavouras de feijão no Estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1997) e, atualmente, pode ser encontrada também no Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Santa Catarina (Leite Jr. et al., 2001; Uesugi et al., 2003; Theodoro & Maringoni, 2006; Deuner et al., 2006; Miranda Filho et al., 2008; Theodoro et al., 2010).

Até o momento existem poucos trabalhos na literatura sobre os diferentes nichos de sobrevivência de Cff, o que dificulta o planejamento de controle adequado

a ser implantado no cultivo do feijoeiro. No campo, têm-se observado uma maior frequência de plantas de feijoeiro com sintomas de *murcha-de-curtobacterium* quando a cultura é instalada após o cultivo de inverno com aveia no sistema de plantio direto (A. C. Maringoni, informação pessoal). Trabalhos realizados no exterior mostram que após o cultivo de trigo, por dois anos consecutivos, houve a sobrevivência de inóculo suficiente de Cff para causar infecção em plantas de feijoeiro, quando a cultura foi instalada em área rotacionada com essa gramínea (Harverson et al., 2005). Segundo Miranda Filho & Pereira (2006), esta bactéria foi capaz de persistir no solo e sobreviver por dez meses.

Bactérias fitopatogênicas apresentam diversos nichos de sobrevivência, como epifíticas na filosfera de plantas hospedeiras, saprofiticamente no solo, em resíduos de plantas doentes ou em material de plantio (Goto, 1992) e ainda em associação com plantas daninhas ou na rizosfera de outras plantas cultivadas (Pérombelon & Kelman, 1980). No caso de bactérias que causam enfermidades em espécies botânicas de interesse econômico, Schuster & Coyne (1974) consideram geralmente que elas podem sobreviver, dependendo da espécie considerada, associadas às sementes ou partes propagativas, em restos de cultura, de forma livre no solo como populações residentes, na superfície ou no interior de plantas cultivadas e/ou plantas daninhas. Os principais fatores que afetam a sobrevivência de fitobactérias são: temperatura, umidade, aeração, características químicas, físicas e biológicas do solo e o órgão da planta que a bactéria está infectando (De Boer, 1982).

Representantes do gênero *Curtobacterium* apresentam forma endofítica em várias espécies vegetais, muitas vezes atuando como agente de biocontrole de doenças bacterianas. Há relatos da colonização endofítica de *C. luteum* em tubérculos de batata (Sturz & Matheson, 1996) e *C. flaccumfaciens* em trevo (Sturs et al., 1997), em citros (Araújo et al., 2002), em pinus (Bent & Chanway, 1998), em milho e sorgo (Zinniel et al., 2002) e em inhame (Tor et al., 1992).

O presente trabalho teve por objetivos avaliar: a capacidade de sobrevivência de Cff em restos de cultura de feijoeiro mantidos na superfície do solo e enterrados a 20 cm de profundidade, em diferentes épocas de cultivo de feijoeiro; a capacidade de sobrevivência da bactéria em dois tipos de solo, mantidos a diferentes temperaturas e condições de umidade; verificar a gama de hospedeiras de Cff, através da inoculação de

diferentes espécies botânicas com este patógeno; e o efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro.

Para tanto, o trabalho foi dividido em três capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e restos de cultura de feijoeiro”, redigido conforme as normas do periódico “Plant Disease”; o segundo capítulo foi intitulado “Efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro”, redigido conforme as normas do periódico “Tropical Plant Pathology”; e o terceiro capítulo foi intitulado “Patogenicidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a diferentes espécies vegetais”, redigido segundo as normas do periódico “European Journal of Plant Pathology”.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Aspectos gerais da cultura do feijoeiro comum

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em diversos sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, tanto por pequenos como por grandes produtores. O grão é um componente importante em dietas de combate à fome e à desnutrição e está presente na cultura de nosso país. O feijão é uma importante fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação oxidante que podem reduzir a incidência de doenças (Embrapa, 2005).

Essa leguminosa é a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies de *Phaseolus*, de acordo com estatísticas da FAO, publicadas em 2009, a produção mundial de feijão situa-se ao redor de 19,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 25,2 milhões de hectares. Os cinco maiores países produtores dessa leguminosa são o Brasil (3,5 milhões de toneladas), Myanmar (2,5 milhões de toneladas), Índia (2,3 milhões de toneladas), China (1,5 milhões de toneladas) e Estados Unidos (1,1 milhões de toneladas), sendo responsáveis por 56% da produção mundial. As

Américas respondem por 40,8% do consumo mundial, seguidas pela Ásia (37,9%), África (18,0%), Europa (3,2%) e Oceania (0,1%). Os países em desenvolvimento são responsáveis por 86,7% do consumo mundial.

No Brasil, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, na safra 2008/2009, a região Sul foi a maior produtora da cultura com 1,03 milhões de toneladas de grãos produzidas em uma área superior a 870 mil hectares. A segunda região brasileira maior produtora é a Sudeste com 950 mil toneladas em uma área de mais de 630 mil hectares. A região Nordeste ocupa a terceira posição com 900 mil toneladas produzidas em uma área superior a dois milhões de hectares. A região Centro-Oeste é a quarta maior produtora com 473.000 toneladas em uma área de 285.000 hectares, e a região Norte produziu 141.000 toneladas de feijão em uma área de 167.000 hectares. Em termos de rendimento por unidade de área cultivada, a região Centro-Oeste apresenta o maior rendimento com 1,66 ton./ha, seguida da região Sudeste (1,49 ton./ha), Sul (1,17 ton./ha), Norte (0,84 ton./ha) e Nordeste (0,41 ton./ha) (CONAB, 2010).

A produtividade brasileira é baixa e isto se deve à predominância do cultivo em áreas com condições de solo e clima inadequados às cultivares disponíveis, visando à subsistência, sem uso de tecnologias agronômicas adequadas. Um progresso nos índices de produtividade tem sido alcançado a partir do uso de irrigação, do correto preparo e adubação do solo e da utilização de medidas fitossanitárias, como seleção de sementes, uso de cultivares resistentes às doenças e rotação de culturas (Vieira, 1998; Zucareli, 2005).

O feijoeiro comum apresenta uma ampla adaptação edafoclimática permitindo o seu cultivo no Brasil durante o ano todo. A cultura pode ser explorada em três épocas diferentes: a safra “das águas”, cujo plantio é feito entre agosto e dezembro, com predominância na Região Sul; a safra “das secas”, realizada durante os meses de janeiro a abril, abrangendo todos os estados produtores; e a safra de inverno, realizada entre maio e agosto na região Centro-Oeste (Embrapa, 2005).

4.2. A murcha-de-curtobacterium do feijoeiro

Muitas das perdas de produtividade da cultura do feijoeiro são devidas à ocorrência de doenças provocadas por patógenos de diferentes naturezas. De acordo com Saettler (1991), os principais patógenos bacterianos que incidem sobre o feijoeiro e que causam perdas significativas na produção são: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young et al., *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, agente causal da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro.

A murcha-de-curtobacterium foi relatada pela primeira vez nos E.U.A., em Dakota do Sul, por Hedges, em 1922, causando perdas de aproximadamente 90% na produtividade das plantas de feijoeiro afetadas. Nos anos seguintes, a doença foi descrita em outras localidades, como os estados norte-americanos de Michigan, Virgínia, Maryland, Montana e no Distrito de Colúmbia, além de outros países, como Alemanha e França (Hedges, 1926). Segundo a CABI (2010), há relatos da ocorrência de Cff também na Austrália, Bélgica, Canadá, Colômbia, Espanha, Grécia, Hungria, Ilhas Maurício, Itália, Polônia, Quênia, Romênia, Rússia, Tunísia, Turquia, Ucrânia e Venezuela.

No Brasil, essa doença foi relatada pela primeira vez em lavouras de feijão do Estado de São Paulo, em 1995, (Maringoni & Rosa, 1997), e já se encontra presente em outros estados brasileiros, como Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Santa Catarina (Leite Jr. et al., 2001; Uesugi et al., 2003; Theodoro & Maringoni, 2006; Deuner et al., 2006; Miranda Filho et al., 2008; Theodoro et al., 2010).

Conforme Harverson et al. (2005), nos anos de 2003 e 2004 foram constatadas infecções de Cff em alguns campos destinados à produção de sementes em Nebraska, EUA, onde epidemias da murcha-de-curtobacterium não tinham sido observadas há mais de 40 anos. No Canadá havia a descrição da ocorrência de Cff em feijoeiro desde 1947, entretanto, essa doença não tinha sido constatada na região sudoeste de Ontário e sendo observada apenas em 2002 (Hsieh et al., 2002). Em 2001, González et al. (2005) descreveram surtos epidêmicos da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro cultivar Donna, na região

Sudoeste da Espanha, sendo até então considerada doença causada por patógeno quarentenário.

Os sintomas da doença em feijoeiro consistem em plantas amarelcidas, murchas e/ou com folhas flácidas durante períodos secos e quentes. A ocorrência da doença em plântulas pode levar à formação de plantas subdesenvolvidas ou causar a sua morte antes mesmo da formação do primeiro par de folhas. A murcha é resultado do bloqueio do movimento da água no sistema vascular da planta, causado pelas células bacterianas. A disseminação da bactéria por água de irrigação foi demonstrada sob condições de casa-de-vegetação em feijoeiro, porém, em campo esse resultado não foi observado. A bactéria penetra por ferimentos nas raízes, causados pelas práticas de cultivo, através dos cotilédones de sementes no processo de germinação e por ferimentos no caule, folhas e vagens (Schuster, 1959; Rickard & Walker, 1965).

Thomas & Graham (1952) notaram a presença de Cff patogênico a plantas de feijoeiro aparentemente saudáveis, representando um problema sério no controle desta doença, sendo este fato relacionado a um período de baixas temperaturas. Rickard & Walker (1965) constataram que a melhor temperatura para a expressão de sintomas da murcha-de-curtobacterium em plantas de feijoeiro foi 28°C.

O monitoramento da população epifítica de Cff, em folíolos de cultivares suscetíveis e resistentes de feijoeiro, foi realizado por Schuster et al. (1982). Esses autores constataram um aumento na população bacteriana sobre a cultivar suscetível e um decréscimo nessa população, nas folhas de cultivares resistentes nas avaliações realizadas aos três e sete dias após a inoculação. Esse fato sugere a possibilidade da bactéria sobreviver na superfície de folhas e ser disseminada por respingos de água de chuva ou de irrigação, de uma planta a outra ou de uma folha a outra.

Em estudos realizados sob condições controladas, não foram constatadas interações entre a presença de *Meloidogyne incognita* (raça 2) e a infecção das cultivares de feijoeiro IAPAR 16 e Pérola (Salgado et al., 2007). Não há relatos da penetração por estômatos, hidatódios ou aberturas naturais na parte aérea ou subterrânea da planta de feijão (Hedges, 1926; Burker & Seliskar, 1957; Schuster, 1959; Rickard & Walker, 1965). Após a penetração, a bactéria coloniza os vasos do xilema, ocasionando os sintomas de murcha (Dinesen, 1978). De acordo com Chavarro et al. (1985), em sementes a bactéria fica

alojada nas células paliçádicas que formam a testa; sob condições de inoculação artificial, foi constatada a transmissão de 51,4% a 52,5% em sementes de feijoeiro, além de efeito negativo sobre a germinação.

Chavarro et al. (1985) observaram acúmulo de células bacterianas nos vasos do xilema de feijoeiros infectados por Cff e, conseqüentemente, redução do transporte de água e nutrientes para a parte aérea das plantas e menor área foliar e matéria seca.

Arcila & Trujillo (1990) constataram Cff em sementes de feijão-caupí na Venezuela. Plantas de feijão-caupí inoculadas com o isolado de Cff obtido a partir das sementes apresentaram sintomas de flacidez nas folhas, 48 horas após a inoculação. Após 5-7 dias da inoculação, as plantas apresentaram murchamento total. Os mesmos sintomas foram observados em *Phaseolus lunatus*, porém não foram observados em plantas de sorgo e milho inoculadas com Cff.

Schuster & Smith (1983) comentam que Cff entra no sistema vascular das sementes em desenvolvimento, através do hilo, e forma uma massa de células bacterianas no tegumento. A infecção da plântula, durante a germinação, pode ocorrer por ferimentos da radícula provocados pelo atrito com a casca. Embriões de sementes infectadas possuem células bacterianas ao seu redor que podem promover a infecção do epicótilo e hipocótilo.

O controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro está fundamentado no uso de sementes sadias, rotação de culturas e cultivares resistentes (Hall, 1991). O emprego de sementes sadias, visto que este patógeno sobrevive e é transmitido por sementes (Saettler & Perry, 1972), tem sido adotado em alguns países, via certificação sanitária. Esta medida foi tão eficaz que durante vinte anos a murcha-de-curtobacterium não tinha sido constatada em áreas de produção de Dakota do Norte, em Minnessota, E.U.A., sendo Cff isolada de sementes utilizadas em campos de cultivo daquela região apenas em 1994 (Venette et al., 1995).

Na literatura internacional diversos trabalhos indicam a ocorrência de níveis de resistência em algumas cultivares e linhagens de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium. Entre elas destacam-se: G.N. Emerson (Coyne & Schuster, 1974), G-12/965, G-16/965 e G-10/968 (Phang et al., 1974) e Rositsa (Karkmkova & Boyadzhiev, 1984). Chavarro et al. (1985), na Colômbia, inoculando os genótipos de feijoeiro PI 136677, PI 204600 e Porrillo Sintetico com a mistura de três isolados de Cff provenientes de *Zornia glaba*, sob condições de campo, constataram que o Porrillo Sintetico apresentou maior nível de

resistência à murcha-de-curtobacterium quando comparado com os genótipos PI 136677 e PI 204600. Hsieh et al. (2005) analisaram a resistência de 124 acessos de feijoeiro comum, através de inoculação no hilo e imersão das sementes em suspensão bacteriana de isolados com colorações variantes amarelo e laranja por uma hora. Como resultado observaram que a linhagem L02E317, a cultivar Resolute e as linhagens Pinto L02B662 e 9995-2a foram altamente resistentes a ambas as variantes do patógeno, com índices zero de severidade da doença em uma escala de notas variando entre zero a cinco.

Trabalhos recentes desenvolvidos no Brasil, avaliando 40 cultivares de feijoeiro através de inoculação em separado de dois isolados de Cff, evidenciaram a presença de resistência a murcha-de-curtobacterium apenas nas cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã e IAC Carioca Pyatã. Essas cultivares exibiram menores índices de sintomas e menor redução no desenvolvimento da parte aérea quando comparada com as cultivares mais suscetíveis (Maringoni, 2002).

Theodoro et al. (2007) analisaram a reação de 73 cultivares de feijoeiro, coletadas em Santa Catarina, à murcha-de-curtobacterium e identificaram as cultivares Mouro Piratuba (grupo de coloração variada) e Vagem Amarela (grupo preto) como fontes de resistência à murcha-de-curtobacterium.

A avaliação da reação de 333 genótipos do banco de germoplasma de feijoeiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) à Cff, realizada por Souza et al. (2006), demonstrou que cerca de 18% dos genótipos de feijoeiros testados foram classificados como altamente resistentes e moderadamente resistentes, e poderão ser utilizados no programa de melhoramento genético do feijoeiro como fonte de genes para resistência a Cff.

4.3. Características de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e sua gama de espécies hospedeiras

Cff é um procarioto pertencente ao Reino Bacteria, Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Microbacteriaceae (Duarte, 2009). Quando da sua descrição no ano de 1922 por Hedges (1922), a bactéria foi denominada *Bacterium flaccumfaciens*, e posteriormente, foi denominada de *Phytomonas flaccumfaciens* (Hedges) Bergey et al. 1923, *Pseudomonas flaccumfaciens* (Hedges) Stevens 1925,

Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges) Dowson 1942, *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson 1942; *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson 1942 e, finalmente, foi classificada como *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collin & Jones 1983, através do perfil eletroforético (Bradbury, 1986).

A espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* apresenta especialização a nível de espécie hospedeira, sendo classificadas em patovares. Isolados patogênicos ao feijoeiro e à soja são denominados Cff. Quando patogênicos à beterraba, recebem o nome de *C. flaccumfaciens* pv. *betae*. Quando são patogênicos ao bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*) e à tulipa (*Tulipa generiana*), duas plantas ornamentais, são identificados como *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, respectivamente (Bradbury, 1986).

Cff é uma bactéria aeróbia, Gram-positiva, móvel por um ou mais flagelos polares ou subpolares. Apresenta-se na forma de bastonetes retos ou levemente curvados, em sua maioria individual, mas podendo estar arranjados em forma de V, Y ou em paralelo, com colônias brilhantes, circulares, de borda lisa, sem viscosidade, semi-fluida, com coloração amarela, laranja ou rosa, medindo 1 a 4 mm de diâmetro, em 3 a 4 dias de cultivo em meio nutriente-glicose-ágar. Tem crescimento ótimo na temperatura entre 24 - 27°C. As espécies são negativas para os testes de solubilidade em hidróxido de potássio a 3%, oxidação/fermentação da glicose, redução de nitrato, urease, produção de indol, podridão em discos de batata, tirosinase, vermelho de metila, sendo tolerante ao cloreto de sódio a 7 e 9%, catalase positiva, produção gás sulfídrico a partir de cisteína e ácidos a partir de adonitol, amido, inositol, glicerol, glicose, melizitose, maltose e sacarose (Bradbury, 1986).

Isolados de Cff apresentam variabilidade quanto à coloração das colônias como: amarelas, laranjas e róseas e também podem produzir pigmentos extracelulares de cor azul a púrpura em meio de cultura (Collins & Jones, 1983; Bradbury, 1986). A coloração das colônias está relacionada à temperatura de incubação e a fatores nutricionais, principalmente a concentração de tiamina no meio de cultura (Schuster et al., 1959).

Em 1975, em Iowa, E.U.A., foi relatada a presença de manchas necróticas em folhas de soja que se destacavam e que davam a aparência esburacada. Plantas de soja doentes não exibiam sintomas de murcha. Essa doença foi denominada de "tan spot".

Inoculações em feijoeiro e soja com isolados de Cff provenientes dessas plantas manifestaram sintomas de mancha e de murcha em feijoeiro, independente da origem dos isolados, e sintomas de mancha foliar em plantas de soja (Dunleavy, 1983).

Outras espécies botânicas têm sido descritas como hospedeiras de Cff. Hedges (1926) evidenciou, através de inoculação artificial, a suscetibilidade da soja cultivar Ito San a isolados da bactéria provenientes de plantas de feijoeiro. Schuster & Sayre (1967) inocularam um isolado de Cff obtido de sementes de feijoeiro, e constataram que a soja cultivar Bansei, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, ervilha cultivares Alaska e Perfection, *Dolichos lablab*, *Phaseolus radiatus*, *P. lathyroides*, *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. calcaratus* e *P. acutifolius* foram suscetíveis a esse isolado, evidenciando sintomas de murcha.

Torres et al. (1982) descreveram, pela primeira vez, na América Latina (Colômbia), a presença de Cff patogênica a *Zornia* spp. (leguminosa forrageira). Chavarro et al. (1985) constataram que isolados bacterianos provenientes de *Zornia* spp. foram patogênicos ao feijoeiro, quando submetidos à inoculação artificial.

Visando avaliar o comportamento de 20 cultivares de soja perante um isolado de Cff proveniente de feijoeiro, Maringoni & Souza (2003) observaram baixos níveis de severidade da doença, independente do método de inoculação utilizado.

Na Austrália, Wood & Easdown (1990) constataram a presença de Cff em *Vigna radiata* e *V. unguiculata* e verificaram que isolados bacterianos procedentes dessas plantas foram patogênicos ao feijoeiro e à soja. Arcila & Trujillo (1990) identificaram Cff em sementes de feijão-caupí na Venezuela. Plantas de feijão-caupí inoculadas com um isolado de Cff obtido a partir das sementes apresentaram sintomas de flacidez nas folhas após 48 horas da inoculação. Após 5-7 dias da inoculação, as plantas apresentaram murchamento total. Os mesmos sintomas foram observados em feijoeiro e em *P. lunatus*. Plantas de sorgo e milho inoculadas com Cff não apresentaram sintomas de doença.

Além das espécies já citadas como hospedeiras de Cff, também são citadas *Lablab purpureus*, *Phaseolus coccineus*, *Vigna angularis*, *V. unguiculata*, todas pertencentes à família Fabaceae. O milho tem sido relatado como sendo suscetível à bactéria em inoculação artificial (Bradbury, 1986).

4.4. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas com ênfase em bacterioses do feijoeiro

Bactérias fitopatogênicas que incitam enfermidades em plantas de interesse econômico podem sobreviver, dependendo da espécie considerada, associada às sementes ou partes propagativas, em órgãos vegetais infectados, em restos de cultura, no solo como populações residentes e/ou na superfície ou no interior de plantas cultivadas ou de plantas daninhas (Schuster & Coyne, 1974). A capacidade de sobrevivência de fitobactérias é afetada por diversos fatores, como temperatura, umidade, pH, aeração, características químicas, físicas e biológicas do solo. Em geral, bactérias fitopatogênicas sobrevivem no solo a uma faixa de temperatura que varia entre 20 a 37°C (De Boer, 1982).

De acordo com Buddenhagen (1965), quando bactérias fitopatogênicas estão presentes na forma de células livres no solo, elas podem ser classificadas em três grupos distintos. No primeiro grupo encontram-se as bactérias denominadas “residentes” capazes de se reproduzir no solo e de colonizar raízes de plantas epifitamente. Esse grupo é constituído pelo gênero *Pectobacterium*, incitador de doenças de podridão-mole em diversas espécies vegetais. No segundo grupo estão as bactérias denominadas de “residentes visitantes”, cuja população declina gradualmente no solo e sua capacidade de sobrevivência por longos períodos é dependente da presença de plantas hospedeiras. A população bacteriana aumenta ou diminui de acordo com as práticas de manejo empregadas no campo de cultivo. Neste segundo grupo, estão *Ralstonia solanacearum* raça 1 e *Rhizobium* spp. O terceiro grupo é formado pelas bactérias denominadas de “residentes transitantes”, onde a fase de solo é muito rápida, não contribuindo para a perpetuação do patógeno. A maioria das fitobactérias encontra-se neste grupo, como os gêneros *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, as erwinias não-pectinolíticas e as demais raças de *Ralstonia solanacearum*.

Uma das explicações para a baixa capacidade de sobrevivência da maioria das bactérias fitopatogênicas no solo, além da não produção de endósporos, é a alta inibição exercida pela microbiota antagônica, constituída por muitas actinobactérias, fungos e outras bactérias. A alta produção de antibióticos por esses antagonistas no solo é apontada como a principal forma de inibição no desenvolvimento de populações elevadas de bactérias fitopatogênicas. A adição de matéria orgânica ao solo tende a aumentar o número de

microrganismos antagonistas, acelerando a redução das populações bacterianas (Patrick, 1954; Brian, 1957; Schuster & Coyne, 1974).

A mineralogia do solo também pode exercer influência sobre a capacidade de sobrevivência de muitas bactérias fitopatogênicas. Hattori (1973), trabalhando com solo em condições de baixa umidade, observou uma maior sobrevivência de bactérias Gram-negativas no interior dos agregados de argila em comparação à superfície dos mesmos. Este fato foi atribuído à maior disponibilidade de água no interior desses agregados. Esta observação pode indicar uma menor capacidade de sobrevivência bacteriana em solos arenosos com baixa formação de agregados, em comparação a solos de textura mais pesada com maior formação dos mesmos.

Marshall (1971) demonstrou que em suspensões aquosas, os agregados de argila formam um envelope ao redor das células bacterianas, como conseqüência da atração eletrostática entre os grupos carregados nas superfícies da argila e das bactérias. Esse envoltório formado pode proteger as células bacterianas durante os períodos de dessecação e reidratação do solo.

As bactérias patogênicas ao feijoeiro, incluindo Cff, não estão adaptadas para a sobrevivência na natureza fora de tecidos de plantas. Elas sobrevivem entre cultivos em agregados dentro ou sobre tecidos secos de plantas ou como residentes em sítios protegidos de plantas sadias ou partes destas. Nestes locais, as células bacterianas presentes no interior destes resíduos encontram-se em estado hipobiótico e, provavelmente, estão protegidas da ação do ambiente pelas massas de células bacterianas e do hospedeiro mortas ao seu redor e por produtos da interação entre patógeno e hospedeiro (Schuster & Coyne, 1977).

A sobrevivência da maioria das bactérias fitopatogênicas é favorecida quando os resíduos da cultura infectados com o patógeno são mantidos na superfície do solo. Neste caso, o período de sobrevivência da bactéria é maior em comparação aos restos culturais incorporados no solo a 20 cm de profundidade, indicando que a bactéria sobrevive melhor em condições secas. Se os tecidos infectados secos, onde as bactérias fitopatogênicas sobrevivem, forem umedecidos, como ocorre nos restos culturais incorporados ao solo, sendo expostos à decomposição microbiana, é esperado que as células sobreviventes no tecido vegetal sejam degradadas mais rapidamente. As células bacterianas sobreviventes no interior de tecidos

lenhosos, como o caule, estão menos sujeitas à decomposição em comparação àquelas alojadas em tecidos mais tenros, como as folhas (Schuster & Coyne, 1977).

Na literatura existem diversos estudos sobre a capacidade de sobrevivência de dezenas de espécies de bactérias fitopatogênicas. Um dos patógenos mais estudados é *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), agente causal do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, uma das principais doenças da cultura. Observa-se uma diferença na capacidade de sobrevivência de Xap associada a restos culturais de feijoeiro entre os estudos realizados sob condições de clima tropical e de clima temperado. Em ensaio conduzido na Austrália, Wimalajeewa & Nancarrow (1980) observaram que Xap sobreviveu por apenas três semanas nos restos culturais de feijoeiro enterrados a 10-12 cm de profundidade no solo e por até onze semanas nas amostras mantidas na superfície do solo.

Arnaud-Santana et al. (1991), em condições tropicais na República Dominicana, verificaram que o período máximo de sobrevivência de Xap foi de 30 dias nos restos vegetais de feijoeiro infectados incorporados ao solo, e de 150 dias nas amostras mantidas na superfície. Resultados semelhantes foram obtidos recentemente por Torres et al. (2009), no Brasil em estudo visando a sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), realizado no município de Bandeirantes-PR. A bactéria sobreviveu nos folíolos de feijoeiro mantidos na superfície do solo por até 165 dias, e por até 90 dias quando estes foram incorporados ao solo. Resultados concordantes com os de Torres et al. (2009) foram obtidos por Chaves & Granada (1988), na Colômbia, e por Huerta & Rodríguez (1994), no México.

Por outro lado, a capacidade de sobrevivência de Xap associada a restos culturais de feijoeiro aumenta consideravelmente em condições de clima temperado. Trabalhos de Schuster & Coyne (1974), Schuster & Coyne (1975) e Gilbertson et al. (1990), conduzidos nos E.U.A., verificaram que Xap foi capaz de sobreviver durante o inverno de uma estação de cultivo para a outra. Os autores relatam que a bactéria sobreviveu por até quatro meses protegida pelos restos culturais incorporados ao solo e por até 22 meses no material vegetal mantido na superfície do solo. Essas diferenças na capacidade de sobrevivência de Xap entre os estudos realizados em países de clima tropical e temperado estão relacionadas principalmente com as diferenças climáticas e as condições do solo que afetam a taxa de decomposição dos restos de cultura. Altos índices de precipitação associados com

temperaturas mais altas aceleram a decomposição dos restos culturais de feijoeiro (Arnaud-Santana et al., 1991). Por outro lado, em condições de clima mais frio, a taxa de decomposição dos restos culturais é reduzida, ou interrompida temporariamente, permitindo que Xap possa sobreviver por um período de tempo maior (Torres et al., 2009).

Leben (1981) e Chavez & Granada (1988) comentam que a água é fundamental para a inativação de bactérias fitopatogênicas no interior de restos culturais por outros microrganismos. Nas regiões tropicais e subtropicais, a maior taxa de decomposição de restos de cultura está associada à intensa atividade de muitas bactérias invasoras do solo, que utilizam os restos vegetais como fonte de energia, fundamentais para a sua sobrevivência.

Chavez & Granada (1988) relatam que a sobrevivência de Xap pode ser afetada pela microbiota do solo, uma vez que a competição por nutrientes constitui um dos principais componentes da interação entre microrganismos no solo. As condições de umidade do solo incrementam a atividade de outros microrganismos e Xap, por ser uma bactéria transitante no solo, é incapaz de competir com esses microrganismos, perdendo rapidamente sua viabilidade quando os restos culturais são incorporados ao solo.

Muitos autores preconizam a necessidade de remoção dos restos culturais infectados da superfície do solo ou a incorporação destes ao solo, juntamente com a adoção de rotação de culturas com espécies vegetais não-hospedeiras do patógeno para minimizar os riscos de infecção do novo cultivo. Essas práticas são altamente recomendáveis, principalmente no Brasil, uma vez que em muitas áreas de produção de feijão é comum a realização de dois cultivos sucessivos, nos períodos de chuva (setembro/dezembro) e de seca (janeiro/abril) (Torres et al., 2009). Nos campos de cultivo com o sistema de plantio direto, a rotação de culturas torna-se ainda mais importante, uma vez que a palhada de cultivos anteriores é mantida na superfície do solo, o que pelos resultados dos estudos envolvendo a sobrevivência de Xap, pode favorecer a sobrevivência da bactéria e o aparecimento de epidemias da doença nos cultivos subseqüentes.

Na literatura internacional existem poucos trabalhos sobre os possíveis nichos de sobrevivência de Cff. Talvez o primeiro estudo envolvendo a sobrevivência de Cff seja o de Burkholder (1945), onde o autor verificou que a bactéria sobreviveu por 25 anos em sementes infectadas e armazenadas a temperatura ambiente, sob condições de laboratório.

De acordo com Saettler (1991), Cff não é capaz de sobreviver por grandes períodos no solo, mas pode se tornar fonte de inóculo para cultivos subseqüentes através de restos de cultura infestados ou sobrevivendo em plantas daninhas hospedeiras. A infecção inicia-se a partir da penetração do patógeno nos tecidos do hospedeiro, deslocando-se ao sistema vascular do mesmo. Conforme Harverson et al. (2005), a sobrevivência de Cff no solo é baixa, ou seja, por períodos relativamente curtos. Entretanto, Miranda Filho & Pereira (2006) constataram que esta bactéria foi capaz de persistir no solo, proveniente de áreas onde ocorreu a doença, e sobreviver por dez meses.

Embora a maioria das bactérias fitopatogênicas não possua grande capacidade de sobrevivência saprofítica em solos, sob condições de campo, muitas evidências apontam para a associação desses procaríotos com diferentes órgãos de plantas, como raízes, brotações, folhas e superfícies de sementes. Essas populações bacterianas podem se tornar uma fonte de inóculo primário para muitas doenças de etiologia bacteriana (Schuster & Coyne, 1977).

Ercolani et al. (1974) recuperaram o agente causal da mancha marrom do feijoeiro, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, da superfície de folhas sadias de ervilhaca e associaram epidemias da doença em campos de cultivo de feijoeiro com a sobrevivência epifítica da bactéria nesta leguminosa. Haas (1972), através de inoculações artificiais de Xapf em feijoeiro, observou a sobrevivência do patógeno na superfície de folhas primárias das plantas. Entretanto, a população bacteriana diminuiu rapidamente na superfície de folhas unifoliadas inoculadas. No caso da espécie *C. flaccumfaciens*, há relatos de sua sobrevivência epifítica em folhas de amendoim (Jacobs & Sudin, 2001) e de *C. herbarum* em folhas de gramíneas (Behrendt et al., 2002).

Algumas espécies do gênero *Curtobacterium* apresentam forma endofítica em várias espécies vegetais, muitas vezes atuando como agentes de biocontrole de doenças bacterianas. Há relatos da sobrevivência endofítica de *C. luteum* em tubérculos de batata (Sturz & Matheson, 1996) e de *C. flaccumfaciens* em trevo (Sturz et al., 1997), em citros (Araújo et al., 2002), em pinus (Bent & Chanway, 1998), em milho e sorgo (Zinniel et al., 2002) e em inhame (Tor et al., 1992). Segundo Belmonte (2009), isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros não foram patogênicos ao feijoeiro.

Observações de campo há várias safras e anos, têm evidenciado maior incidência de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro em áreas previamente cultivadas com aveia (A. C. Maringoni, informação pessoal). Não se tem o conhecimento científico sobre os mecanismos em que a aveia atua no aumento da incidência de plantas de feijoeiro doentes no campo. Outros dados de literatura, do exterior, mostram também que após o cultivo de trigo, por dois anos, houve a sobrevivência de inóculo suficiente de Cff para causar infecção em plantas de feijoeiro, quando a cultura foi instalada na área rotacionada com o trigo (Harverson et al., 2005).

CAPÍTULO 1

“Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.
flaccumfaciens em solo e restos de cultura de feijoeiro”

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e restos de cultura de feijoeiro

T. A. F SILVA JR., A. C. MARINGONI, D. R. NEGRÃO, A. T. ITAKO e J. M. SOMAN, Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP, Caixa Postal 237, 18.603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Estudos foram desenvolvidos para se determinar a capacidade de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo na forma de células livres, sob condições de laboratório, e em restos culturais de feijoeiro infectados mantidos na superfície do solo e incorporados a 20 cm de profundidade, em três ensaios realizados durante os anos de 2008 e 2009, sob condições de campo. No solo, a bactéria sobreviveu por um período que variou entre 2 e 16 dias, sendo influenciada pelo tipo de solo, umidade, e pela temperatura de incubação das amostras. Nos ensaios em campo, as condições climáticas e a incorporação dos restos culturais de feijoeiro infectados ao solo influenciaram o período de sobrevivência da bactéria. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sobreviveu por até 240 dias nos restos culturais de feijoeiro mantidos na superfície do solo, e por até 30 dias, nas amostras incorporadas a 20 cm de profundidade. A presença de restos culturais de feijoeiro infectados com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em campos de cultivo de feijoeiro pode ser uma importante fonte de inóculo para a ocorrência de epidemias de murcha-de-curtobacterium, sendo recomendada a incorporação desses restos culturais, e a adoção de rotação de cultura com espécies vegetais não-hospedeiras do patógeno.

ABSTRACT

Studies were developed to determine *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* capability of surviving in soil, under laboratory conditions, and in bean debris kept on the soil surface and incorporated at 20 cm depth in three assays carried out during 2008 and 2009 under field conditions. In soil, the bacterium survived from 2 to 16 days and this period was influenced by the soil type, the humidity and the incubation temperature of samples. In field assays, climate conditions and incorporation of infected bean debris into the soil influenced the bacterium survival period. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* survived for up to 240 days in bean culture remnants kept on the soil surface and for up to 30 days in samples incorporated at 20 cm depth. The presence of bean debris infected with *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean culture fields can be an important inoculum source for the occurrence of bean bacterial wilt epidemics; thus, the incorporation of these culture debris into the soil is recommended, as well as the adoption of culture rotation with plant species that are not hosts of this pathogen.

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de elevado valor protéico, consumida por milhões de pessoas em todo mundo, servindo como fonte básica de proteínas na dieta de muitos países em desenvolvimento, como o Brasil (3, 14).

A cultura do feijoeiro pode ser comprometida devido à ocorrência de várias doenças que ocasionam perdas significativas na produção. Os principais patógenos bacterianos que incidem sobre a cultura são: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al., *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, *P. syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young et al. e *Curtobacterium*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, agente causal da murcha-de-curtobacterium (25).

A murcha-de-curtobacterium foi relatada pela primeira vez nos E.U.A., em Dakota do Sul, por Hedges, em 1922, causando perdas de aproximadamente 90% na produtividade das plantas de feijoeiro afetadas. Nos anos seguintes, a doença foi descrita em outras localidades, como os estados norte-americanos de Michigan, Virginia, Maryland, Montana e no Distrito de Colúmbia, além de outros países, como Alemanha e França (16). Atualmente, a doença já se encontra disseminada na Austrália, Bélgica, Canadá, Colômbia, Espanha, Grécia, Hungria, Ilhas Maurício, Itália, Polônia, Quênia, Romênia, Rússia, Tunísia, Turquia, Ucrânia e Venezuela (7). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em lavouras de feijão do Estado de São Paulo, em 1995, (21), e atualmente está presente em outros estados brasileiros (12, 19, 30, 31, 33).

Bactérias fitopatogênicas que incitam enfermidades em plantas de interesse econômico podem sobreviver, dependendo da espécie considerada, associada às sementes ou partes propagativas, em órgãos vegetais infectados, em restos de cultura, no solo como populações residentes e na superfície ou no interior de plantas cultivadas ou de plantas daninhas (27). A capacidade de sobrevivência de fitobactérias é afetada por diversos fatores, tais como temperatura, umidade, pH, aeração, características químicas, físicas e biológicas do solo. Em geral, bactérias fitopatogênicas sobrevivem no solo a uma faixa de temperatura que varia entre 20 e 37°C (11).

As bactérias patogênicas ao feijoeiro, incluindo *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, não estão adaptadas para a sobrevivência na natureza fora de tecidos de plantas. Elas sobrevivem entre cultivos na forma de agregados presentes dentro e/ou sobre tecidos vegetais

secos ou como residentes em sítios protegidos associados às plantas saudias ou partes da planta. As células bacterianas presentes no interior destes resíduos se encontram em estado hipobiótico e, provavelmente, estão protegidas da ação do ambiente pelas massas de células bacterianas e do hospedeiro mortas ao seu redor e por produtos da interação entre patógeno e hospedeiro (29).

Existem relatos da sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em folhas herbarizadas de feijoeiro por até cinco anos (5) e em associação com sementes de feijoeiro, em condições de laboratório, por até 24 anos (6). Na literatura internacional existem diversos trabalhos visando entender melhor como bactérias fitopatogênicas sobrevivem, mas muito pouco se sabe sobre os nichos de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Em vista disso, o propósito deste estudo foi 1) avaliar a capacidade de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em associação com restos de cultura de feijoeiro, e verificar a influência de diferentes condições ambientais e da incorporação desses restos culturais ao solo no período de sobrevivência da bactéria; e 2) verificar a sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* na forma de células livres em dois tipos de solo e a diferentes condições de temperatura e umidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado bacteriano e patogenicidade. Inicialmente, foram selecionados sete isolados mutantes de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* resistentes a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina, conforme (34), obtidos a partir do isolado Feij-2634, pertencente à coleção do Laboratório de Fitobacteriologia da FCA/UNESP. Para a obtenção do mutante empregou-se o meio de cultura

nutriente-ágar (26) contendo 5 g.L^{-1} de sacarose (NSA). Os isolados foram preservados por liofilização e em tubos de ensaio contendo meio NSA acrescido de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e óleo mineral esterilizado.

Para o teste de patogenicidade, plantas de feijoeiro cv. Pérola, suscetível a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, foram obtidas em vasos contendo um volume aproximado de 2 L de substrato autoclavado constituído da mistura de terra, esterco de curral curtido e areia grossa lavada na proporção de 1:1:1, acrescido de 0,6 kg de sulfato de amônio, 1,7 kg de superfosfato simples, 0,6 kg de cloreto de potássio e 0,8 kg de calcário dolomítico para cada m^3 da mistura. Essa formulação de substrato também foi utilizada para os demais ensaios. Em cada vaso foram mantidas três plantas e, aos dez dias após a emergência, foram inoculadas por ferimento no caule com os isolados mutantes de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (20). No tratamento testemunha, as plantas de feijoeiro foram injuriadas com agulha molhada em água destilada esterilizada. Foram utilizadas cinco repetições para cada isolado, totalizando 15 plantas de feijoeiro inoculadas. As plantas foram mantidas sob condição de casa de vegetação, com temperatura variando entre 22 e 30°C . A severidade da doença foi avaliada 21 dias após a inoculação atribuindo-se notas que variaram de 0 a 9 (20), sendo o isolado Feij. 2634-4 selecionado para os ensaios de sobrevivência.

Sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo como células livres. Foram utilizados dois tipos de solo. O solo 1 foi um Nitossolo vermelho, de textura argilosa (matéria orgânica 26 g.dm^{-3} , pH 4,3), e o solo 2 foi um Latossolo vermelho, de textura média (matéria orgânica 15 g.dm^{-3} , pH 4,1). Os dois solos foram peneirados, separadamente, em peneira de malha 8 (2,8 mm de abertura) e secos em condições de casa de vegetação durante cinco dias.

Após a secagem, copos de poliestireno de 200 mL de capacidade foram enchidos, separadamente, com 150 g de cada tipo de solo.

Para a infestação dos solos, o isolado mutante Feij. 2634-4 foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultura NSA, seguido de incubação a 28°C por 72 h. Após a incubação obteve-se a suspensão bacteriana que foi ajustada por colorimetria ($A_{540\text{nm}} = 0,1$) à concentração de 10^8 ufc.mL⁻¹. Os copos contendo as amostras dos solos receberam volumes de suspensão bacteriana e de água destilada suficientes para que os seus teores de umidade fossem elevados para 50 e 100% da capacidade de campo. Após a infestação, os copos foram vedados com papel alumínio e pesados. As amostras de solo infestadas foram incubadas em estufas bacteriológicas, mantidas a 20, 25 e 30°C.

A cada três dias, todos os copos foram pesados e a quantidade de água evaporada foi repostada com o auxílio de uma micropipeta. Foram montadas amostras suficientes para se verificar a sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo durante 30 dias. Diariamente, o solo de quatro copos incubados, nas três diferentes temperaturas, foi transferido separadamente para beakers de 2.000 mL de capacidade, previamente autoclavados, formando-se três amostras compostas de 600 g. Essas amostras foram homogeneizadas individualmente com o auxílio de um bastão de vidro flambado. Vinte e cinco gramas de solo de cada amostra foram transferidas para frascos de 1.000 mL de capacidade contendo 250 mL de água destilada e esterilizada. Os frascos foram agitados a 200 rpm, em mesa agitadora, durante 1 h, a 25°C. Após agitação, foram mantidos em repouso durante 30 minutos, para sedimentação. O sobrenadante de cada uma das suspensões obtidas foi diluído (10^0 a 10^{-3}) e 100 µL dessas suspensões foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura semi-seletivo para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* – SSMCFF

(22) modificado, constituído do meio NSA, acrescido, após a autoclavagem, de vermelho do Congo ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$), leite em pó desnatado (5 g.L^{-1}), chlorothalonil ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), tiofanato metílico ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$) e rifampicina ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), e espalhadas na superfície do meio com alça de Drigalski flambada. Para cada diluição foram semeadas quatro placas de Petri contendo o meio de cultura semi-seletivo. As placas foram incubadas a 28°C , durante 72 h.

As colônias desenvolvidas na superfície do meio com características culturais semelhantes ao do isolado mutante Feij 2634-4 foram quantificadas, e os dados obtidos transformados em \log_{10} do número de UFC.g de solo⁻¹. De cada tratamento, foram selecionadas seis colônias com características típicas de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, que foram preservadas em tubos de ensaio contendo óleo mineral esterilizado e por liofilização e submetidas à coloração diferencial de Gram, crescimento em meio de cultura nutriente-sacarose-ágar contendo 7% de NaCl, patogenicidade em plantas de feijoeiro cv. Pérola e caracterização pelo método Biolog[®]/Microlog (8).

Sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em restos de cultura de feijoeiro em condições de campo. Três experimentos foram conduzidos na Fazenda Experimental Lageado, da FCA/UNESP ($22^{\circ}50'40.48''\text{S}$, $48^{\circ}26'08.17''\text{O}$, elevação 807 m), em uma área com um Latossolo vermelho, textura média, durante os anos de 2008 a 2009. O primeiro ensaio foi instalado em 21/02/2008, o segundo ensaio em 26/11/2008 e o terceiro ensaio em 20/07/2009. Plantas de feijoeiro cv. Pérola, conduzidas em vasos, com 10 dias de emergência, foram inoculadas com o isolado mutante Feij. 2634-4 (20). Trinta dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e secas em estufa com circulação de ar forçada a 30°C , durante sete dias. Três plantas inteiras foram transferidas para sacolas de nylon medindo 20 x 30 cm (9). As

sacolas foram amarradas pela boca com fitilhos plásticos e permaneceram na superfície do solo e enterradas a uma profundidade de 20 cm. Foram preparadas quatro repetições (R1, R2, R3 e R4) com amostras suficientes para análise durante 12 meses.

Quinzenalmente as sacolas foram removidas ao acaso (quatro da superfície e quatro do interior do solo) e amostras do material vegetal foram retiradas, pesadas e trituradas em solução salina tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 esterilizada. Para cada grama de material vegetal foram adicionados 10 mL de solução salina tampão fosfato para trituração em equipamento tipo “Turrax”. A suspensão obtida de cada amostra foi diluída em série (10^0 a 10^{-4}) e semeada em estrias na superfície do meio de cultura semi-seletivo para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* – SSMCFF (22) modificado. Para cada uma das diluições foram semeadas quatro placas de Petri, seguidas de incubação a 28°C durante 96 h.

De cada amostragem realizada, colônias bacterianas com características morfológicas e culturais semelhantes às do isolado Feij-2634-4 foram multiplicadas, purificadas e submetidas à coloração diferencial de Gram, crescimento em meio de cultura nutriente-sacarose-ágar contendo 7% de NaCl, patogenicidade em plantas de feijoeiro cv. Pérola e caracterização pelo método Biolog[®]/Microlog (8).

Foi realizada uma avaliação qualitativa da presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nas amostras coletadas (32). A amostra foi considerada portadora de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* quando pelo menos uma colônia da bactéria foi isolada. Não havendo o isolamento da bactéria em pelo menos duas amostragens subseqüentes (30 dias), o período de sobrevivência da mesma foi considerado como sendo o da última amostragem com crescimento da bactéria.

Os dados climáticos do período foram obtidos de uma estação meteorológica, localizada a aproximadamente 300 m do ensaio (temperaturas mínima, média e máxima e a precipitação).

RESULTADOS

Sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo como células livres. O período de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo como células livres foi influenciado pela temperatura de incubação das amostras, e por fatores do solo, ou seja, tipo e umidade deste. A bactéria sobreviveu por um período de até 16 dias no solo 1, e por até 9 dias no solo 2 (Figuras 1, 2, 3 e 4). Independente do tipo de solo e do teor de umidade houve um período maior de sobrevivência na temperatura de 20°C, intermediária a 25°C e um menor período de sobrevivência a 30°C. Já para o teor de umidade, constatou-se maior período de sobrevivência da bactéria quando o solo foi mantido a 50% da sua capacidade de campo, sendo para o solo 1 entre 8 e 16 dias, e para o solo 2, entre 5 e 9 dias (Figuras 1 e 3).

Sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em restos de cultura de feijoeiro em condições de campo. O período de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nos restos culturais de feijoeiro infectados mantidos na superfície do solo e enterrados a 20 cm de profundidade, nos três ensaios realizados, estão representados na Tabela 1. Nos restos culturais de feijoeiro enterrados a 20 cm de profundidade, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sobreviveu por até 30 dias nos ensaios I e III, e por menos de 15 dias no ensaio

II. Nas amostras vegetais mantidas na superfície do solo, a bactéria sobreviveu por 240 dias no ensaio I, 195 dias no ensaio II e 165 dias no ensaio III.

Os dados climáticos durante a realização dos três ensaios estão representados nas Figuras 5, 6 e 7. Durante os primeiros 15 dias após a instalação dos ensaios, os níveis de precipitação foram de 48,2 mm no ensaio I, 40,8 mm no ensaio II, e 3,8 mm no ensaio III. Nos primeiros 30 dias de duração dos ensaios I e III, os níveis de precipitação foram de 176,9 mm e 91,9 mm, respectivamente. Nos primeiros 165 dias da instalação dos ensaios, os índices de precipitação durante o ensaio I foram de 358 mm, 849,9 mm durante o ensaio II e 1.012 mm no ensaio III. Comparando-se os primeiros 195 dias dos ensaios I e II, a precipitação foi de 459 mm no ensaio I e 871,5 mm no ensaio II.

As temperaturas máximas e mínimas médias nos primeiros 15 dias da instalação dos ensaios foram de 28,0°C e 19,2°C no ensaio I, 29,0°C e 16,4°C no ensaio II, e 24,6°C e 13,8°C no ensaio III. Nos primeiros 30 dias de duração dos ensaios I e III, essas temperaturas foram de 26,7°C e 18,3°C, e 23,7°C e 13,7°C, respectivamente. As temperaturas máximas e mínimas médias durante os primeiros 165 dias dos três ensaios foram de 25,1°C e 15,6°C no ensaio I, 27,6°C e 17,8°C no ensaio II e 26,6°C e 16,8°C no ensaio III. Para os primeiros 195 dias dos ensaios I e II, essas temperaturas foram de 25,2°C e 15,5°C e 27,0°C e 17,1°C, respectivamente.

DISCUSSÃO

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* apresentou uma capacidade baixa de sobrevivência na forma de células livres no solo. Ademais, este período de sobrevivência foi influenciado pelo tipo de solo, seu teor de umidade e pela temperatura de incubação das amostras. Quando no solo, esta bactéria pode ser considerada uma “residente transitante”, pois a sua fase no solo é muito rápida, não contribuindo para a sua perpetuação (4). Uma das explicações para a baixa capacidade de sobrevivência da maioria das bactérias fitopatogênicas no solo, incluindo *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, além da não produção de esporos de resistência, é a inibição elevada exercida pela microbiota antagonista, constituída por muitas actinobactérias, fungos e outras bactérias. A produção elevada de antibióticos por esses antagonistas é apontada como a principal forma de inibição no desenvolvimento de populações elevadas de bactérias fitopatogênicas. A adição de matéria orgânica ao solo tende a aumentar o número de microrganismos antagonistas, acelerando ainda mais a redução das populações bacterianas (2, 24, 27). A população de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nos solos utilizados neste estudo foi reduzida mais rapidamente nas amostras mantidas a 100% de capacidade de campo, e incubadas nas temperaturas mais elevadas. Este fato possivelmente está relacionado a uma maior atividade da microbiota antagonista nestas condições.

Apesar da população inicial de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo 2 ser superior à do solo 1 no dia da instalação dos ensaios, o período de sobrevivência foi menor no solo 2. A mineralogia do solo pode influenciar a capacidade de sobrevivência de muitas bactérias (15). Esse autor, trabalhando com solo em condições de umidade baixa, observou sobrevivência maior de bactérias no interior de agregados de argila em comparação à

superfície dos mesmos. Este fato foi atribuído à maior disponibilidade de água no interior desses agregados. Esta observação pode indicar uma menor capacidade de sobrevivência bacteriana em solos arenosos com baixa formação de agregados, em comparação a solos de textura mais pesada, como os argilosos, com maior formação dos mesmos. Os agregados de argila formam um envelope ao redor das células bacterianas, como consequência da atração eletrostática entre os grupos carregados nas superfícies da argila e das bactérias. Esse envoltório pode proteger as células bacterianas durante os períodos de dessecação e reidratação do solo (23).

Nos ensaios envolvendo a sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* associada a restos culturais de feijoeiro, o período de sobrevivência da bactéria nas amostras mantidas na superfície do solo variou entre 165 e 240 dias (Tabela 1). A análise dos dados climáticos coletados durante a realização desses ensaios demonstrou que os níveis de precipitação influenciaram na capacidade de sobrevivência da bactéria (Figuras 5, 6, e 7). A maior precipitação durante o ensaio III foi determinante para a menor capacidade de sobrevivência da bactéria, uma vez que os restos culturais de feijoeiro mantidos na superfície do solo devem ter sido degradados mais rapidamente.

O teor de água afeta de modo direto e/ou indireto a viabilidade de bactérias fitopatogênicas no interior de restos culturais infectados presentes nos solos. Nas regiões tropicais e subtropicais, a maior taxa de decomposição de restos de cultura está associada à intensa atividade de muitas bactérias invasoras do solo, que utilizam os restos vegetais como fonte de energia base, fundamentais para a sua sobrevivência (10, 18). As diferenças de temperatura ocorridas durante os três ensaios foram muito pequenas e, possivelmente, tiveram

pouca influência sobre o período de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no interior dos restos culturais de feijoeiro.

Nos restos culturais de feijoeiro infectados incorporados ao solo a 20 cm de profundidade, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sobreviveu por um período inferior a 15 dias até 30 dias (Tabela 1). Apesar da precipitação e da temperatura durante os primeiros 15 dias dos ensaios I e II serem parecidas (Figuras 5 e 6), *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sobreviveu por menos de 15 dias no ensaio II e por até 30 dias nos ensaios I e III.

A sobrevivência da maioria das bactérias fitopatogênicas é favorecida quando os resíduos da cultura infectados com o patógeno são mantidos na superfície do solo. Na literatura existem diversos trabalhos envolvendo a capacidade de sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, agentes causais do crestamento comum do feijoeiro. O período de sobrevivência dessas bactérias foi maior em folíolos de feijoeiro mantidos na superfície do solo, em comparação com os restos culturais incorporados (1, 10, 17, 32). A maioria das bactérias fitopatogênicas sobrevive melhor em condições secas, ou seja, quando os restos culturais são mantidos na superfície do solo. Nessas condições, as células bacterianas encontram-se em estado hipobiótico, e estão protegidas da ação do ambiente pelas massas de células bacterianas e do hospedeiro mortas ao seu redor e por produtos da interação entre patógeno e hospedeiro. Se os tecidos forem umedecidos, como ocorre quando os restos culturais são umedecidos ou incorporados ao solo, sendo expostos à decomposição microbiana, é esperado que as células sobreviventes no tecido vegetal sejam degradadas mais rapidamente. As células bacterianas sobreviventes no interior de tecidos vegetais, como o caule, estão menos sujeitas à decomposição em comparação àquelas alojadas em tecidos mais tenros, como as folhas por exemplo (29).

A capacidade de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas aumenta consideravelmente em condições de clima temperado. Trabalhos conduzidos nos E.U.A. demonstraram que *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi capaz de sobreviver de uma estação de cultivo para outra durante o inverno. Os autores relatam que a bactéria sobreviveu por até 4 meses protegida pelos restos culturais incorporados ao solo e por até 22 meses no material vegetal mantido na superfície do solo (13, 27, 28). Em estudo realizado no Brasil, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sobreviveu associada a folíolos de feijoeiro mantidos na superfície do solo por no máximo 180 dias, e por até 90 dias nos restos culturais incorporados a 15 cm de profundidade (32). Essas diferenças na capacidade de sobrevivência de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* entre os estudos realizados em países de clima tropical e temperado estão relacionadas principalmente com as diferenças climáticas e as condições do solo que afetam a taxa de decomposição dos restos de cultura.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, fica evidente a necessidade de incorporação dos restos culturais de feijoeiro ao solo, juntamente com a adoção de rotação de culturas com espécies vegetais não-hospedeiras do patógeno, para diminuir ou minimizar os riscos de inóculo primário de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Essas práticas são altamente recomendáveis em países de clima tropical, como o Brasil, onde em muitas áreas de produção de feijão é comum a realização de dois cultivos sucessivos, nos períodos de chuva (setembro/dezembro) e de seca (janeiro/abril), e em países de clima temperado, onde o período de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas é maior, favorecido pela ocorrência de temperaturas mais baixas. Nos campos de cultivo com o sistema de plantio direto, no Brasil, a rotação de culturas se torna ainda mais importante, uma vez que a palhada de cultivos anteriores é mantida na superfície do solo, o que favorece a sobrevivência de *C.*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*, e pode servir de inóculo primário para a epidemia da doença.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arnaud-Santana, E. and Pena-Matos, E. 1991. Longevity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. Plant Dis. 75: 952-953.
2. Brian, P. W. 1957. The ecological significance of antibiotic production. Pages. 168-188 in: Microbiological ecology, 7th Symp. Soc. Gen. Microb. R. E. O. WILLIAMS and, C. SPENCER, Cambridge University Press, Cambridge.
3. Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant Soil. 252: 55-128.

4. Buddenhagen, I. W. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Pages 269-284 in: Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. K. F. Baker and W. C. Snyder. Murray, London.
5. Burkholder, W. H. 1930. The bacterial diseases of the bean: a comparative study. Mem. Corn. Agric. Exp. Stat., New York, n. 127.
6. Burkholder, W. H. 1945. The longevity of the pathogens causing the wilt of the common bean. *Phytopathology*. 35: 743-744.
7. CABI. 2010. Distribution maps of plant diseases. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Map 370, 6th ed. April 2010, <http://www.cabi.org>.
8. Câmara, R. C., Vigo, S. C. and Maringoni, A. C. 2009. Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar. *J. Plant Pathol.* 91: 549-554.
9. Casa, R. T., Reis, E. M. and Zambolim, L. 2003. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. *Fitop. Bras.* 28: 355-361.

10. Chávez, C. L. and Granada, G. A. 1988. Supervivencia de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, agente causal de la bacteriosis del frijol, bajo condiciones del Valle del Cauca, Colombia. Fitop. Colomb. 12: 9-14.
11. De Boer, S. H. 1982. Survival of phytopathogenic bacteria. Páginas. Pages 285-305 in: Phytopathogenic prokaryotes. M. S. Mount and G. H. Lacy, eds. Academic Press, New York.
12. Deuner, C. C., Barbosa, J. F., Souza, R. M. and Machado, J. C. 2006. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro no estado de Minas Gerais. Fitop. Bras., supl. 31: S194.
13. Gilbertson, R. L., Rand, R. E. and Hagedorn, D. J. 1990. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolitic strains of *X. campestris* in bean debris. Plant Dis. 74: 322-327.
14. Graham, P. H., Rosas, J. C., Estevez de Jensen, C., Peralta, E., Tlustý, B., Acosta-Gallegos, J. and Arraes Pereira, P. A. 2003. Addressing edaphic constraints to bean production: the Bean/Cowpea CRSP Project in perspective. Field Crops Res. 82: 179-192.
15. Hattori, T. 1973. Microbial life in the soil: an introduction. Dekker, New York, NY.

16. Hedges, F. 1926. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges). Including comparisons with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology* 16: 1-22.
17. Huerta, L. M. and Rodríguez, M. L. M. 1994. Supervivencia del agente causal del tizon común del frijol (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E. F. Sm.) Down., an suelo y an la rizosfera de algunas malezas an chapingo edo. de México. *Rev. Chap. Protec. Veg.* 1: 29-33.
18. Leben, C. 1981. How plant-pathogenic bacteria survive. *Plant Dis.* 65: 633-637.
19. Leite Júnior, R. P., Meneguim, L., Behlau, F., Rodrigues, S. R. and Bianchini, A. 2001. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. *Fitop. Bras.* 26: 303-304.
20. Maringoni, A. C. 2002 Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. *Fitop. Bras.* 27: 161-166.
21. Maringoni, A. C. and Rosa, E. F. 1997. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. *Summa Phytop.* 23: 160-162.
22. Maringoni, A. C., Camara, R. C. and Souza, V. L. 2006. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. *Seed Sci. Tech.* 34: 117-124.

23. Marshall, K. C. 1971. Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. Páginas: 409-445 in: Soil Biochemistry. A. D. MCLAREN & J. J. SKUJINS, Dekker, New York.
24. Patrick, Z. A. 1954. The antibiotic activity of soil microorganisms as related to bacterial plant pathogens. Can. J. Bot. 32: 705-735.
25. Saettler, A. W. 1991. Diseases caused by bacteria. Pages 29-32 in: Compendium of bean diseases. R. Hall. APS Press, St. Paul.
26. Schaad, N., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul.
27. Schuster, M. L. and Coyne, D. P. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. Ann. Rev. Phyt. 12: 199-221.
28. Schuster, M. L. and Coyne, D. P. 1975. Survival factors of plant pathogenic bacteria. Res. Bull., n. 268, Univ. Neb. Linc. Agric. Exp. St., Lincoln.
29. Schuster, M. L. and Coyne, D. P. 1977. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). Fitop. Bras. 2: 117-130.

30. Theodoro, G.F. and Maringoni, A.C. 2006. Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Summa Phytop. 32: 34-41.
31. Theodoro, G. F., Maringoni, A. C., Chumpati, A. A., Correia, H. C., Theodoro, J. V. C. and Nogueira, R. J. 2010. Ocorrência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em Mato Grosso do Sul. Trop. Plant Path., supl. 35: S163.
32. Torres, J. P., Maringoni, A. C. and Silva Jr., T. A. F. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. J. Plant Path. 91: 195-198.
33. Uesugi, C. F., Freitas, M. A. and Menezes, J. R. 2003. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Goiás e no Distrito Federal. Fitop. Bras., supl. 28: S324.
34. Weller, D. M. and Saettler, A. W. 1978. Rifampicin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: tools for field study of bean blight bacteria. Phytopathology. 68: 778-781.

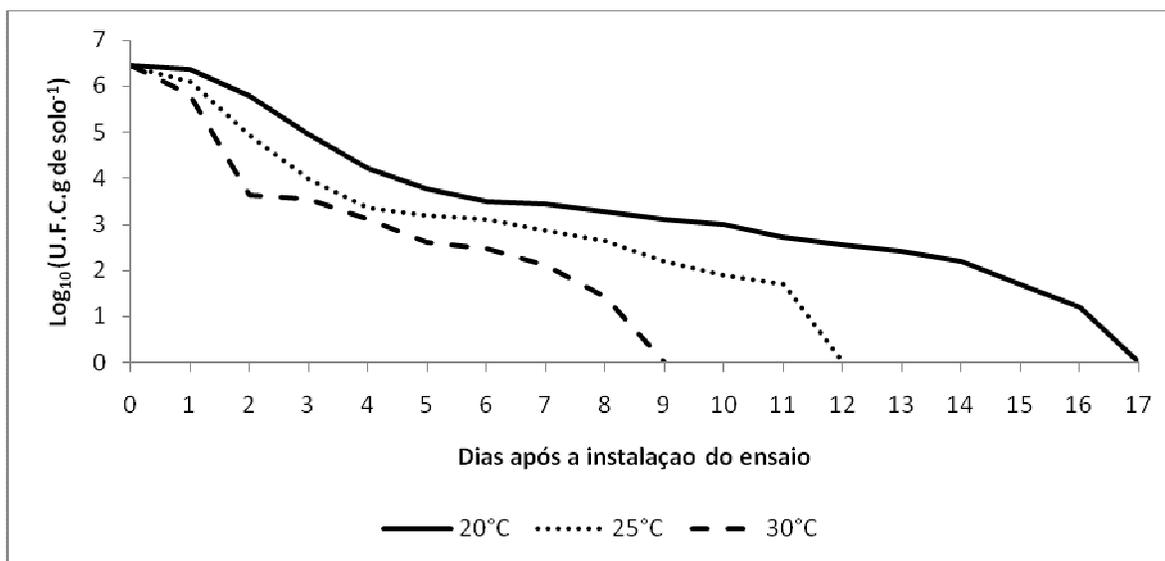


Figura 1. Período de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo 1, mantido a 50% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação.

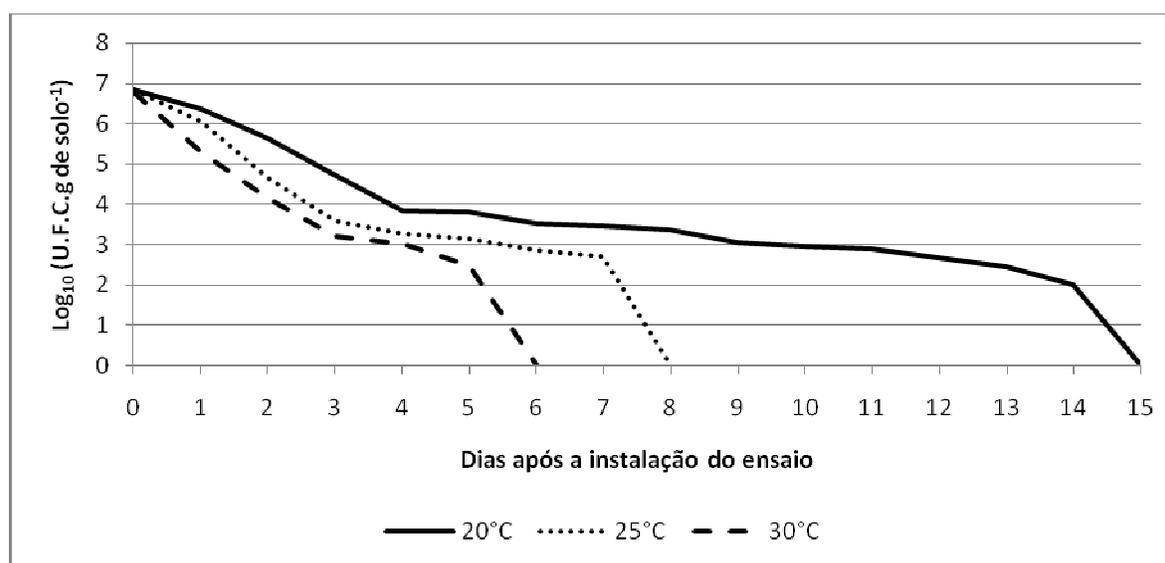


Figura 2. Período de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo 1, mantido a 100% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação.

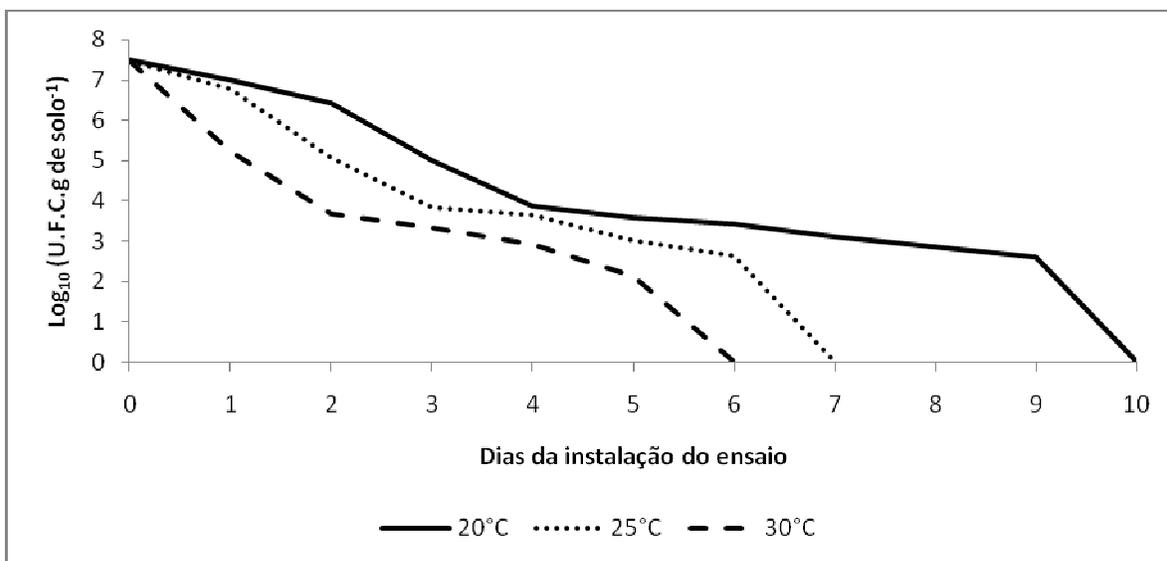


Figura 3. Período de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo 2, mantido a 50% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação.

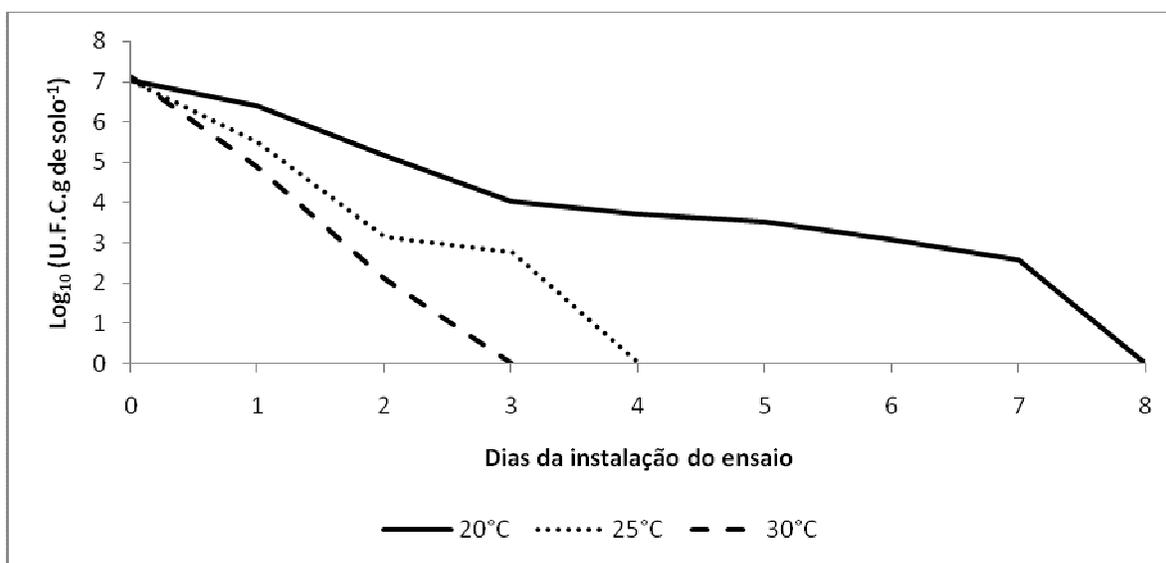


Figura 4. Período de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo 2, mantido a 100% da capacidade de campo, em três temperaturas de incubação.

Tabela 1. Períodos de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em restos de cultura de feijoeiro, mantidos na superfície do solo e enterrados a 20 cm de profundidade, em três diferentes ensaios.

Ensaio	Período de sobrevivência de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (em dias)	
	Superfície do solo	20 cm de profundidade
I	240	30
II	195	< 15
III	165	30

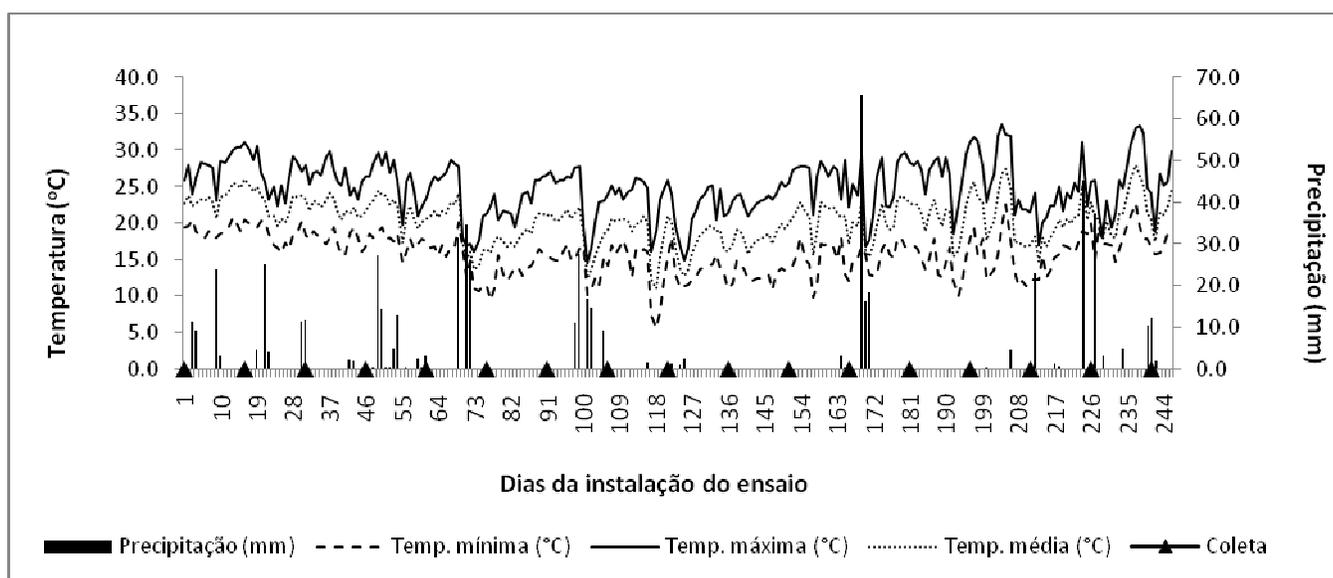


Figura 5. Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio I.

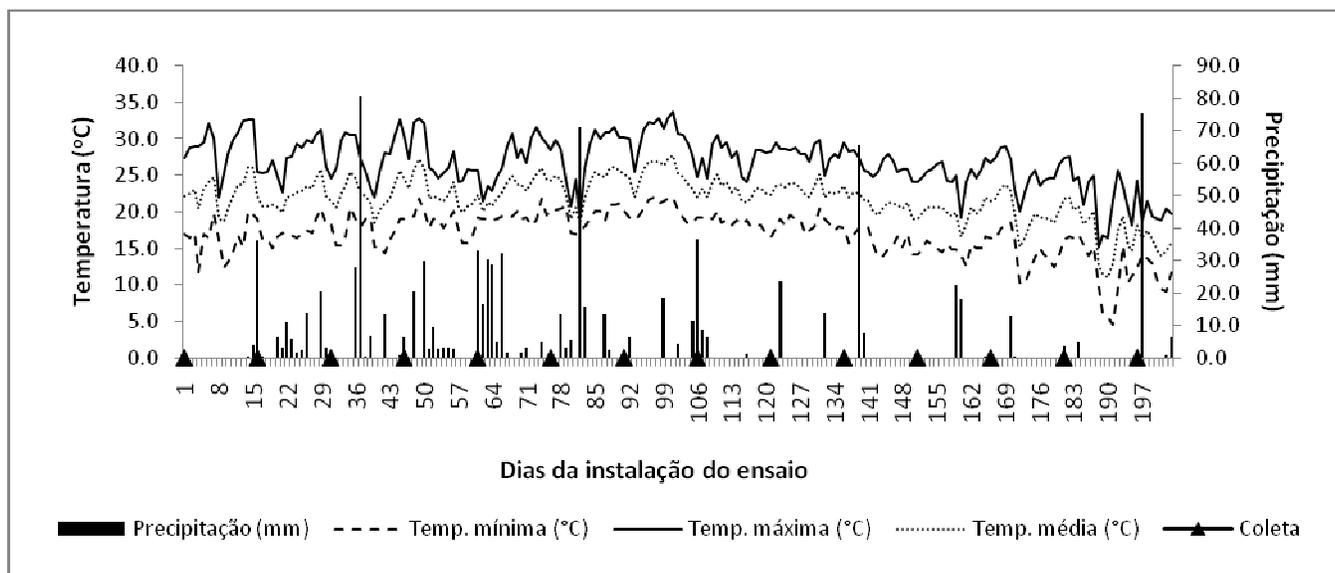


Figura 6. Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio II.

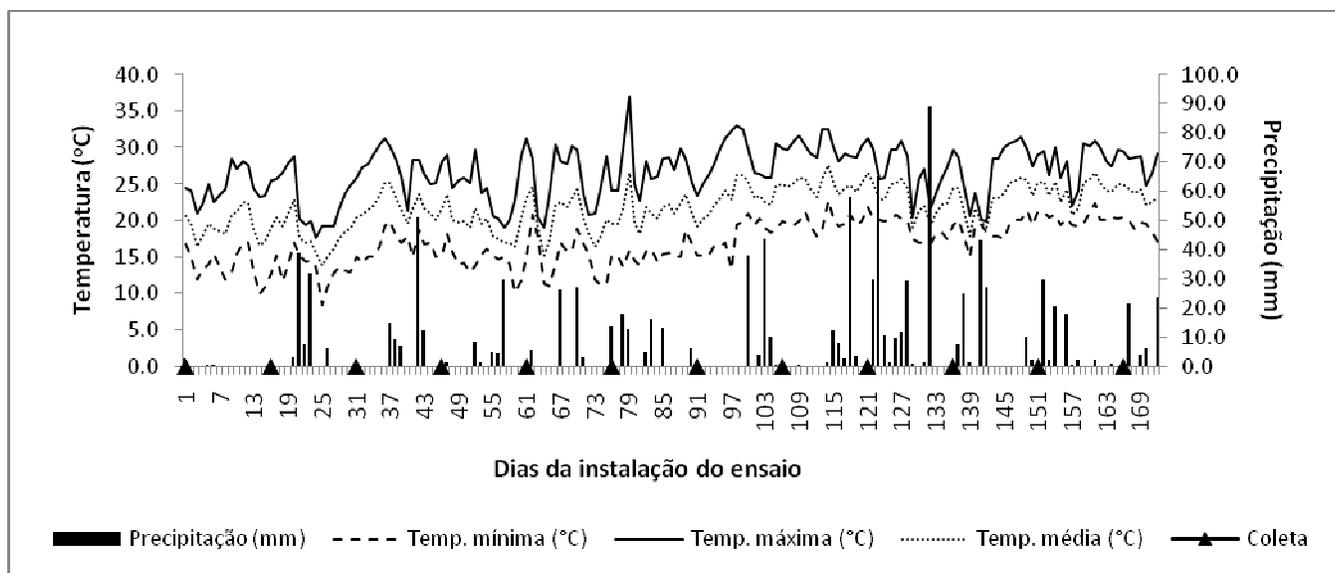


Figura 7. Dados de precipitação (mm), temperatura máxima, média e mínima (°C), e épocas de coleta dos restos culturais de feijoeiro no campo, para o ensaio III.

CAPÍTULO 2

“Efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da
murcha-de-curtobacterium do feijoeiro”

Efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro

Tadeu A. F. da Silva Jr., Antonio C. Maringoni, Adriana T. Itako e Djanira R. Negrão

Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Caixa Postal 237, 18.603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Ensaio durante os anos de 2008 e 2009 foram desenvolvidos para se verificar a capacidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizar endofiticamente a parte aérea e o rizoplane de plântulas de aveia e trigo, e determinar a influência do pré-plantio dessas gramíneas no aumento da incidência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não foi capaz de colonizar o rizoplane de plântulas de aveia e trigo com 15 dias de idade, obtidas a partir de sementes inoculadas com a bactéria, e cultivadas em tubos de ensaio contendo Phytigel[®]-água, em condições de B.O.D. Nos ensaios desenvolvidos em campo, onde plantas de feijoeiro cv. Pérola foram cultivadas após o plantio de aveia e trigo, não foi verificada a colonização endofítica de folhas e raízes de plantas dessas gramíneas por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. As plantas de feijoeiro cultivadas após a dessecação das gramíneas não desenvolveram sintomas de murcha-de-curtobacterium, 40 dias após a semeadura, como também não foi evidenciada a colonização endofítica dessas plantas pela bactéria.

Palavras-chave: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Phaseolus vulgaris*, *Avena sativa*, *Triticum sativum*.

ABSTRACT

During 2008 and 2009, assays were developed to verify *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* capability of endophytically colonizing the shoot and the rhizoplane of oat and wheat seedlings, as well as to determine the influence of pre-planting such grass plants on the increase in bean bacterial wilt incidence. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* was not capable of colonizing the rhizoplane of 15-day-old wheat and oat seedlings obtained from seeds inoculated with this bacterium and cultivated in test tubes containing Phytigel[®]-water under B.O.D. conditions. During field assays, in which bean plants cv. Pérola were cultivated after oat and wheat planting, endophytic colonization of the leaves and roots of such plants by *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* was not observed. Bean plants cultivated after desiccation did not develop bean bacterial wilt symptoms at 40 days after sowing; in addition, endophytic colonization of these plants by the studied bacterium was not evidenced.

Keywords: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Phaseolus vulgaris*, *Avena sativa*, *Triticum sativum*.

INTRODUÇÃO

A murcha-de-curtobacterium do feijoeiro, incitada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, é uma das principais doenças bacterianas que incidem sobre a cultura do feijoeiro comum (Saettler, 1991). Essa doença foi descrita pela primeira vez nos E.U.A., em Dakota do Sul, por Hedges, em 1922, causando perdas de aproximadamente 90% na produtividade das plantas de feijoeiro afetadas (Hedges, 1926). No Brasil, a doença foi descrita em 1995, em campos de cultivo de feijoeiro no estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1997), e já está presente em outros estados brasileiros (Leite Jr. et al., 2001; Uesugi et al., 2003; Theodoro & Maringoni, 2006; Deuner et al., 2006; Theodoro et al., 2010). Atualmente, a doença já se encontra disseminada na Austrália, Bélgica, Canadá, Colômbia, Espanha, Grécia, Hungria, Ilhas Maurício, Itália, Polônia, Quênia, Romênia, Rússia, Tunísia, Turquia, Ucrânia e Venezuela (CABI, 2010).

Os sintomas típicos da doença em feijoeiro consistem em plantas amarelcidas, murchas, escurecimento vascular e morte da parte aérea (Saettler, 1991). A ocorrência da doença em plântulas pode levar à formação de plantas subdesenvolvidas ou causar a sua morte antes mesmo da formação do primeiro par de folhas. A bactéria penetra por ferimentos nas raízes, causados pelas práticas de cultivo, através dos cotilédones de sementes durante o processo de germinação e por ferimentos no caule, folhas e vagens (Schuster, 1959; Rickard & Walker, 1965; Dinensen, 1978).

Observações em campos de produção de feijão no Brasil há várias safras e anos, têm evidenciado maior incidência da murcha-de-curtobacterium em áreas agrícolas previamente cultivadas com aveia durante o inverno (A. C. Maringoni, informação pessoal). Estudo

desenvolvido por Harverson et al. (2005), em Nebraska, E.U.A., demonstrou que após o cultivo de trigo, houve a sobrevivência de inóculo suficiente de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* para causar infecção em plantas de feijoeiro cultivadas posteriormente.

Até o momento, não se tem o conhecimento científico sobre os mecanismos em que a aveia e o trigo atuam no aumento da incidência de plantas de feijoeiro doentes no campo. Uma possibilidade para este fato possa ser a colonização da rizosfera e do rizoplano dessas gramíneas por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

A rizosfera pode ser definida como a região do solo altamente influenciada pelas raízes das plantas, através da exsudação de substâncias que promovem ou inibem a atividade microbiana. Ela é um ambiente formado pela própria planta, onde microrganismos patogênicos e benéficos constituem uma grande força influente no desenvolvimento da planta e de sua sanidade (Curl, 1982; Lynch, 1990; Ryan et al., 2008). Muitos patógenos de solo causadores de podridões radiculares e de colo, murchas, e “damping-off” de plantas de importância agrícola, podem habitar a rizosfera e o rizoplano de diversas espécies vegetais, e são um dos fatores mais limitantes à produção de inúmeras culturas (Weller et al., 2002).

Neste estudo, objetivou-se verificar a colonização endofítica da parte aérea e do rizoplano de plantas de aveia e trigo por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, e compreender o papel do plantio dessas gramíneas, antes do cultivo do feijoeiro, no aumento da incidência da murcha-de-curtobacterium.

MATERIAIS E MÉTODOS

Visualização *in vitro* da colonização do rizoplano de aveia e de trigo por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Sementes de aveia cv. IAC 7 e trigo cv. Cooditec 108 foram desinfestadas superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio a 2%, durante cinco minutos, e três lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Para a inoculação das sementes foi empregado o isolado Feij. 2634-4 de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, mutante resistente a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina e patogênico ao feijoeiro, pertence à coleção do Laboratório de Fitobacteriologia da FCA/UNESP.

O isolado foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultura semi-seletivo para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* - SSMCFE (Maringoni et al., 2006) modificado, constituído pelo meio de cultura nutriente-ágar (Schaad et al., 2001) contendo 5 g.L⁻¹ de sacarose (NSA), acrescido, após a autoclavagem, de vermelho do Congo (0,05 g.L⁻¹), leite em pó (5 g.L⁻¹), chlorothalonil (0,01 g.L⁻¹), tiofanato metílico (0,01 g.L⁻¹) e rifampicina (0,01 g.L⁻¹), seguido de incubação a 28°C por 72 h. Uma suspensão bacteriana do isolado Feij. 2634-4 foi obtida em água destilada esterilizada através de colorimetria ($A_{540nm} = 0,1$), à concentração de 10⁸ ufc.mL⁻¹.

As sementes de aveia e trigo desinfestadas foram imersas na suspensão bacteriana durante 30 minutos, coadas e distribuídas sobre papel toalha esterilizado para a remoção do excesso de inóculo. Sementes de aveia e trigo desinfestadas e embebidas em água destilada esterilizada por 30 min e secas em papel toalha esterilizado serviram como testemunha. A seguir, para se constatar a presença da bactéria, dez sementes de cada gramínea foram

transferidas para meio semi-seletivo SSMCFF modificado contendo $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e incubou-se a 28°C por 72 h.

Duzentas sementes individualizadas de cada gramínea (inoculadas e não-inoculadas com a bactéria) foram transferidas para tubos de ensaio contendo Phytigel[®]-água a 0,8% (Queiroz et al., 2006) e submetidas à incubação em câmara tipo B.O.D. a 25°C , sob fotoperíodo de 12 h. Quinze dias após a emergência das plântulas, foi avaliada em microscópio estereoscópico, a presença de turbidez de aspecto leitoso ao longo das raízes das gramíneas, evidência de colonização pela bactéria (Queiroz et al, 2006). Também foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas de cada gramínea, assim como o número total de plantas com colonização do rizoplano pela bactéria.

Efeito do plantio de aveia e de trigo na ocorrência de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro.

Foram desenvolvidos dois ensaios durante os anos de 2008 e 2009. Para o ensaio I, conduzido em 2008, caixas de cimento de 30 L de capacidade foram preenchidas com um Latossolo vermelho, de textura média, sem cultivo agrícola anterior. O solo foi peneirado e foi realizada calagem com calcário dolomítico para elevar a saturação das bases até 70%, conforme a análise de solo. Trinta dias após a calagem, durante o mês de julho de 2008, foram instalados os seguintes tratamentos: 1) Solo sem infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e não semeado com aveia ou trigo; 2) Solo sem infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e semeado com trigo cultivar Coodetec 108; 3) Solo sem infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e semeado com aveia cultivar IAC 107; 4) Solo com infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e não semeado com aveia ou trigo; 5) Solo

com infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e semeado com trigo cultivar Coodetec 108; e 6) Solo com infestação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e semeado com aveia cultivar IAC 107. Nos tratamentos onde se efetuou o plantio de aveia ou trigo, foram semeadas 30 sementes das gramíneas por repetição. Foram utilizadas oito repetições para cada tratamento, distribuídas em blocos ao acaso na área experimental.

Para a infestação do solo das caixas, foi preparada uma suspensão bacteriana do isolado Feij. 2634-4 à concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. Nos tratamentos 4, 5 e 6 foi realizada a rega de um litro da suspensão bacteriana em cada caixa. Nos tratamentos 1, 2 e 3, que não receberam a infestação com a bactéria, foi efetuada a rega de um litro de água destilada. Logo após a instalação do ensaio, para comprovar a presença da bactéria no solo dos tratamentos 4, 5 e 6, 50 g de solo de cada repetição foram coletados, constituindo uma amostra composta de 400 g. Vinte e cinco gramas das amostras compostas foram processadas e analisadas conforme Silva Júnior et al. (2009). Foram selecionadas 15 colônias bacterianas, cinco de cada tratamento, com características culturais semelhantes ao do isolado Feij. 2634-4, e preservadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura NSA com 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina acrescidos de óleo mineral esterilizado, e submetidas aos testes de reação diferencial de Gram, crescimento em meio de cultura nutriente-sacarose-ágar contendo 7% de NaCl, patogenicidade em plantas de feijoeiro cv. Pérola e caracterização pelo método Biolog[®]/Microlog (Câmara et al., 2009).

Cinquenta dias após a instalação do ensaio, folhas e raízes de plantas de aveia e trigo dos tratamentos 2, 3, 5 e 6 foram coletadas de cada uma das repetições, e procedeu-se ao isolamento endofítico de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em meio SSMCFF modificado. Dez gramas de folhas frescas e raízes foram amostrada separadamente, desinfestadas conforme

Zinniel et al. (2002), e trituradas em solução salina tampão fosfato esterilizada 0,01M, pH 7,2, na proporção 1:10 (p/v), em aparelho homogeneizador tipo “Turrax”. A suspensão resultante foi diluída em série (10^0 a 10^{-3}) e plaqueada em estrias em meio de cultura SSMCFF modificado. As placas foram incubadas a 28°C por 96 h. e avaliada a presença de colônias bacterianas semelhantes às do isolado Feij. 2634-4 na superfície do meio de cultura. Além das folhas e raízes de aveia e trigo, também foi coletado solo das caixas dos tratamentos 2, 3, 5 e 6, em regiões próximas às raízes das plantas de aveia e trigo, para se verificar a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo da rizosfera dessas gramíneas.

Após a amostragem de folhas, raízes e solo, procedeu-se a aplicação de paraquat a 1%, para a dessecação das plantas de aveia e trigo. Vinte dias após a aplicação do herbicida, as gramíneas dessecadas foram cortadas com auxílio de uma tesoura, previamente flambada para evitar contaminação entre as parcelas, e incorporadas ao solo de suas respectivas caixas. A superfície do solo foi sulcada, adubada conforme a recomendação da análise do solo e semeada com feijão cv. Pérola (20 sementes/caixa). No início do mês de novembro de 2008, 40 dias após a emergência das plantas de feijão, foi realizada a contagem das plantas com e sem sintomas de murcha-de-curtobacterium. Cinco plantas de cada repetição dos tratamentos 4, 5 e 6 foram coletadas para se verificar a possível colonização endofítica por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Caules e pecíolos das plantas coletadas foram desinfestados, segundo Dhingra & Sinclair (1995), trituradas com auxílio de bastão de vidro previamente flambado e semeadas em estrias na superfície do meio de cultura SSMCFF, e incubação das placas de Petri a 28°C por 96 h. Foram coletadas amostras de solo das caixas dos tratamentos 4, 5 e 6 para se verificar a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

(Silva Júnior et al., 2009). Após a avaliação, as plantas de feijoeiro de todas as caixas foram picadas com o auxílio de uma tesoura e incorporadas ao solo.

Para o ensaio II, conduzido em 2009, foi utilizado o solo das caixas empregado no ensaio I. O delineamento experimental e o cronograma de atividades foi o mesmo do ensaio anterior, modificando-se apenas a fonte de inóculo de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo. No final do mês de abril de 2009, vinte sementes de feijoeiro cv. Pérola foram semeadas em cada uma das caixas. Dez dias após a semeadura, as plantas de feijoeiro dos tratamentos 4, 5 e 6 foram inoculadas com o isolado Feij. 2634-4, segundo Maringoni (2002). Nos tratamentos 1, 2 e 3, que não receberam a bactéria, as plantas de feijoeiro foram injuriadas com agulha molhada em água destilada esterilizada.

Trinta dias após a inoculação, as plantas de feijoeiro de todos os tratamentos foram cortadas com uma tesoura flambada e mantidas na superfície do solo de suas caixas. As plantas dos tratamentos 4, 5 e 6 apresentavam sintomas típicos de murcha-de-curtobacterium. No início do mês de agosto de 2009, os restos culturais de feijoeiro mantidos nas caixas foram incorporados ao solo, e procedeu-se o plantio de 30 sementes de aveia e trigo em cada caixa, seguindo-se os tratamentos estabelecidos no ensaio I. No mesmo dia da semeadura das gramíneas, foi realizada a coleta de solo e restos culturais de feijoeiro dos tratamentos 4, 5 e 6 para se verificar a viabilidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, utilizando-se o mesmo procedimento adotado no ensaio I (Silva Júnior et al., 2009), e cinco colônias bacterianas de cada tratamento foram selecionadas para caracterização.

Cinquenta dias após a semeadura das gramíneas, foi realizado o isolamento endofítico de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de folhas e raízes de aveia e trigo, assim como a amostragem de solo dos tratamentos 4, 5 e 6 para se verificar a presença da bactéria. A

metodologia utilizada foi a mesma empregada no ensaio I. As gramíneas foram dessecadas com paraquat a 1%, e 20 dias após a aplicação foram incorporadas ao solo das caixas, e procedeu-se a semeadura de 20 sementes de feijão cv. Pérola em todos os tratamentos. Quarenta dias após a semeadura foi realizada a avaliação das plantas de feijoeiro com e sem sintomas de murcha-de-curtobacterium e plantas dos tratamentos 4, 5 e 6 foram coletadas para se verificar uma possível colonização endofítica pela bactéria, conforme a metodologia descrita no ensaio I.

RESULTADOS

Visualização *in vitro* da colonização do rizoplano de aveia e de trigo por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

As placas de Petri contendo meio de cultura SSMCFE modificado onde foram colocadas as sementes de aveia e trigo inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, apresentaram o desenvolvimento de colônias com características culturais semelhantes ao do isolado Feij. 2634-4 em sua superfície, demonstrando a presença da bactéria nas sementes infestadas, no dia da instalação do ensaio. Nas placas de Petri que receberam as sementes de aveia e trigo embebidas com água destilada esterilizada, não houve a presença de crescimento bacteriano.

A sementes de aveia e trigo infestadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* apresentaram redução em sua porcentagem de germinação. Para as 200 sementes de aveia embebidas em água destilada esterilizada, foram obtidas 178 plântulas, enquanto das 200 sementes de aveia inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, foram obtidas 162

plântulas, redução de 9% na germinação na comparação entre os dois tratamentos. Das 200 sementes de trigo inoculadas com água destilada esterilizada foram obtidas 180 plântulas, e das 200 sementes de trigo inoculadas com a bactéria foram obtidas 172 plântulas, redução de 5,5% na germinação das sementes entre os tratamentos.

O rizoplano das 162 plântulas de aveia e das 172 plântulas de trigo provenientes das sementes infestadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em meio Phytigel[®]-água, não apresentou nenhum tipo de turbidez de aspecto leitoso ao longo das raízes quando visualizadas ao microscópio estereoscópico, em comparação ao tratamento testemunha, conforme a metodologia descrita por Queiroz et al. (2006). De acordo com a metodologia utilizada, foi evidenciado que *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não foi capaz de colonizar o rizoplano de plântulas de aveia e trigo, com 15 dias de idade.

Efeito do plantio de aveia e de trigo na ocorrência de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro

No dia da semeadura da aveia e do trigo foi detectada a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo das caixas dos tratamentos 4, 5 e 6, em ambos os ensaios. Os 30 isolados bacterianos recuperados dos solos desses tratamentos incitaram sintomas de murcha-de-curtobacterium, 21 dias após a inoculação nas plantas de feijoeiro cv. Pérola. Todos os isolados foram identificados como Gram-positivos e apresentaram crescimento em meio de cultura NSA contendo NaCl a 7%. A identificação pelo método Biolog[®]/Microlog resultou em 12 isolados identificados como *Curtobacterium* sp. e 18 isolados identificados como *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Nos dois ensaios não foi verificada a colonização endofítica de folhas e raízes de plantas de aveia e trigo por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. As plantas de feijoeiro cultivadas após a dessecação das gramíneas não desenvolveram sintomas de murcha-de-curtobacterium, 40 dias após a semeadura, como também não foi evidenciada a colonização endofítica dessas plantas pela bactéria. Em ambos os ensaios, não foi possível recuperar células viáveis de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* do solo das caixas dos tratamentos 4, 5 e 6, aos 50 e 90 dias após a instalação dos ensaios.

DISCUSSÃO

Apesar dos relatos do aumento da incidência de murcha-de-curtobacterium do feijoeiro em áreas agrícolas cultivadas anteriormente com aveia e trigo, baseando-se na metodologia utilizada neste estudo, ficou evidente que *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não colonizou o rizoplane e a rizosfera dessas gramíneas. Segundo Goto (1992), a rizosfera de plantas hospedeiras ou não-hospedeiras pode favorecer a atividade bacteriana. O crescimento destas bactérias pode ser estimulado por nutrientes como aminoácidos ou açúcares que são secretados pelas raízes para aumentar sua habilidade de competir com outros microrganismos.

Na rizosfera, muitos fitopatógenos estabelecem uma relação parasítica com o hospedeiro. Nessa região também ocorre uma complexa interação entre a microflora e microfauna constituinte da rizosfera e os fitopatógenos presentes no solo, o que pode influenciar a ocorrência ou não de uma infecção (Raaijmakers et al., 2009). Silva Jr. et al. (2009) constataram que a capacidade de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo é muito baixa, classificando essa bactéria como “residente transitante”,

conforme Buddenhagen (1965). Uma das explicações para esse fato, além da não produção de esporos de resistência, é a alta inibição exercida pela microflora antagonista, constituída por muitos actinobactérias, fungos e outras bactérias. A alta produção de antibióticos por esses antagonistas no solo é apontada como a principal forma de inibição no desenvolvimento de altas populações de bactérias fitopatogênicas (Patrick, 1954; Brian, 1957; Schuster & Coyne, 1974).

Talvez o aumento da incidência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro após o cultivo de gramíneas durante o inverno não esteja relacionado com a capacidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizar a rizosfera ou o rizoplano de aveia e trigo. Uma das principais formas de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas que incitam enfermidades em plantas de interesse econômico é associada a restos culturais infectados mantidos no campo de cultivo (Schuster & Coyne, 1974). A sobrevivência de muitas fitobactérias é favorecida quando os resíduos da cultura infectados com o patógeno são mantidos na superfície do solo. Neste caso, o período de sobrevivência da bactéria é maior em comparação quando os restos culturais são incorporados ao solo. Estudo desenvolvido por Silva Júnior et al. (2010), no Brasil, verificou que *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pôde sobreviver por até 240 dias no interior de restos culturais de feijoeiro mantidos na superfície do solo, e por no máximo 30 dias, em restos culturais de feijoeiro incorporados ao solo. Durante o inverno, onde as temperaturas e os índices de precipitação são mais baixos, o período de sobrevivência da bactéria aumenta, devido a uma menor taxa de decomposição desses restos culturais. A bactéria associada aos restos culturais de feijoeiro poderia sobreviver no campo durante o cultivo de aveia ou trigo e fornecer inóculo suficiente de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* durante o cultivo de feijão na primavera.

Outra possibilidade para explicar a incapacidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizar a rizosfera das plantas de aveia e trigo empregadas neste estudo, seja o solo utilizado. Muitas vezes a microbiota natural presente em um solo pode proteger as plantas cultivadas contra muitos patógenos presentes no solo. Cook et al. (1995) postulam ainda que muitas espécies de plantas tem desenvolvido estratégias de defesa contra patógenos de solo que envolve a estimulação seletiva e a manutenção de populações de microrganismos antagonistas na rizosfera. Talvez a microbiota natural presente no solo utilizado neste estudo tenha exercido um antagonismo muito forte sobre *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, reduzindo rapidamente a sua população e não permitindo a colonização da rizosfera das gramíneas pelo patógeno. Talvez a rizosfera formada pelas cultivares de aveia e trigo empregadas neste trabalho não favoreça a colonização da bactéria, ou o isolado bacteriano utilizado não possua a capacidade de colonizar a rizosfera dessas gramíneas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brian PW (1957) The ecological significance of antibiotic production. In: Williams REO, Spencer CC Microbiological ecology. 7th Symposium of the Society for General Microbiology: Cambridge University Press, Cambridge 7: 168-188.

Buddenhagen IW (1965) Ecology of soil-borne plant pathogens. In: Baker KF, Snyder WC Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control, Murray, London. pp. 269-284.

CABI (2010) Distribution maps of plant diseases. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Map 370, 6th ed. April 2010, <http://www.cabi.org>.

Câmara RC, Vigo SC, Maringoni AC (2009) Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar. Journal of Plant Pathology. 91: 549-554.

Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Bangera G, Kim DS (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 4197-4201.

Curl EA (1982) The rizosphere: relation pathogens behavior and root disease. Plant Disease 66: 624-630.

Deuner CC, Barbosa JF, Souza RM, Machado JC (2006) Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro no estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, supl. 31: 194.

Dhingra OD, Sinclair JB (1995) *Basic Plant Pathology Methods*. Lewis Publishers: Boca Raton, FL.

Dinesen IG (1978) The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plant (*Phaseolus vulgaris*). In: *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, v. 2, Washington. pp: 929-933

Goto M (1992) *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press, San Diego, CA.

Harverson RM, Vidaver AK, Schwartz HF (2005) Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska. *NebGuide*. University of Nebraska-Lincoln, Institute of Agriculture and Natural Resources. <http://www.ianperbs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf>

Hedges F (1926) Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges). Including comparisons with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology* 16: 1-22.

Leite Júnior RP, Meneguim L, Behlau F, Rodrigues SR, Bianchini A (2001) Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira* 26: 303-304.

Lynch J (1990) The rhizosphere. Wiley: London.

Maringoni AC (2002) Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. Fitopatologia Brasileira 27: 161-166.

Maringoni AC, Rosa EF (1997) Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 23: 160-162.

Maringoni AC, Camara RC, Souza VL (2006) Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. Seed and Science Technology 34: 117-124.

Patrick ZA (1954) The antibiotic activity of soil microorganisms as related to bacterial plant pathogens. Canadian Journal of Botany 32: 705-735.

Queiroz BPV, Aguilar-Vildoso CL, Melo IS (2006) Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias. Summa Phytopathologica 32: 95-97.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil 321: 341-361.

Rickard SF, Walker JC (1965) Mode of inoculation and host nutrition in relation to bacterial wilt of bean. *Phytopathology* 55: 174-178.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.

Saettler AW (1991) Diseases caused by bacteria. In: Hall R. *Compendium of bean diseases*. APS Press, St. Paul. pp. 29-32.

Schaad N, Jones JB, Chun W (2001) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul. American Phytopathological Society.

Schuster ML (1959) Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. *Plant Disease Reporter* 43: 27-32.

Schuster ML, Coyne DP (1974) Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 12: 199-221.

Silva Júnior TAF, Maringoni AC, Pieri C, Negrão DR, Itako AT (2009) Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em restos de cultura de feijoeiro no período I. *Tropical Plant Pathology*, supl. 34: S8.

Silva Júnior TAF, Maringoni AC, Negrão DR, Itako AT, Costa DDH (2010) Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo. Summa Phytopathologica, supl. 36: S136.

Theodoro GF, Maringoni, AC (2006) Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Summa Phytopathologica 32: 34-41.

Theodoro GF, Maringoni AC, Chumpati AA, Correia HC, Theodoro JVC, Nogueira, RJ (2010) Ocorrência da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em Mato Grosso do Sul. Tropical Plant Pathology, supl. 35: S163.

Uesugi CF, Freitas MA, Menezes JR (2003) Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Goiás e no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, supl. 28: 324.

Weller DM, Raaijmakers JM, Mecsapden Gardener BB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40: 309-348.

Zinneil D, Lambrecht P, Haris B, Freng Z, Kuczmariski D, Higley P, Barletta RG, Vidaver AK (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 2198-2208.

CAPÍTULO 3

“Patogenicidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.
flaccumfaciens a diferentes espécies vegetais”

Patogenicidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a diferentes espécies vegetais

Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior e Antonio Carlos Maringoni e Adriana Terumi Itako e Djanira Rodrigues Negrão

Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Caixa Postal 237, 18.603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo Plantas de *Arachis hypogaea*, *Avena byzantina*, *A. sativa*, *Brachiaria brizantha*, *B. ruziziensis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis*, *Datura metel*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Glycine max.*, *Ipomoea aristolochiaefolia*, *I. grandifolia*, *I. nil*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Panicum maximum*, *Pennisetum americanum*, *Petunia* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus sativus*, *Ricinus communis*, *Triticum aestivum* e *Zea mays* foram inoculadas com um isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por aspersão na parte aérea e punção no caule. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e avaliadas 21 dias após a inoculação. Plantas de feijoeiro cv. Pérola inoculadas por ferimento no caule apresentaram sintomas típicos de murcha-de-curtobacterium. Plantas de feijoeiro inoculadas por aspersão de suspensão bacteriana na parte aérea desenvolveram sintomas de necrose dos bordos dos folíolos, circundadas por halo amarelado, que progredia em direção ao centro do folíolo. As folhas de plantas de soja inoculadas por aspersão desenvolveram sintomas de necrose dos bordos foliares, circundados por um tênue halo amarelado. Também foi verificada

a presença de lesões necróticas na parte central do limbo, circundadas por halo amarelado, que conferia à folha um aspecto esburacado. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizou endofiticamente caules de trigo inoculados por ferimento, e folhas inoculadas por aspersão. As demais espécies vegetais inoculadas por aspersão de suspensão bacteriana nas folhas ou por punção no caule não desenvolveram sintomas de necrose na parte aérea, murcha, ou colonização endofítica de folhas e caules.

Palavras-chave: hospedeiras, murcha-de-curtobacterium, *Phaseolus vulgaris*, soja, trigo.

Abstract Plants of *Arachis hypogaea*, *Avena byzantina*, *A. sativa*, *Brachiaria brizantha*, *B. ruziziensis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis*, *Datura metel*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Glycine max.*, *Ipomoea aristolochiaefolia*, *I. grandifolia*, *I. nil*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Panicum maximum*, *Pennisetum americanum*, *Petunia* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus sativus*, *Ricinus communis*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* were inoculated with a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolate through sprinkling onto the shoot and stem puncture. The plants were kept under greenhouse conditions and assessed at 21 days after inoculation. Bean plants cv. Pérola inoculated through stem injury developed symptoms typical of bean bacterial wilt. Bean plants inoculated through sprinkling of bacterial suspension onto the shoot developed symptoms of necrosis surrounded by a yellowish halo on the edges of leaflets, progressing towards the leaflet center. Soy leaves inoculated through sprinkling developed symptoms of necrosis surrounded by a slender yellowish halo on the leaflet edges. Necrotic lesions were also present at the central part of the limb and were

surrounded by a yellowish halo, which gave the leaf a bumpy aspect. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* endophytically colonized wheat stems inoculated through injury and leaves inoculated through sprinkling. The remaining plant species inoculated through sprinkling of the bacterial suspension onto leaves or through stem puncture did not develop shoot necrosis symptoms, wilt or endophytic colonization of leaves and stems.

Keywords: bean bacterial wilt, hosts, *Phaseolus vulgaris*, soybean, wheat.

Introdução

A murcha-de-curtobacterium, incitada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins e Jones, é uma das principais doenças bacterianas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), e foi relatada pela primeira vez em 1922, por Hedges, no estado de Dakota do Sul, E.U.A. (Hedges, 1922; Saettler, 1991). Os sintomas típicos da doença em feijoeiro são plantas amarelecidas, murchas, escurecimento vascular e morte da parte aérea (Saettler, 1991). Além do feijoeiro, outras espécies vegetais são relatadas como hospedeiras de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, a maioria pertencente à família Fabaceae (Bradbury, 1986). Em 1975, em Iowa, E.U.A., foi relatada a ocorrência de plantas de soja com manchas necróticas no limbo foliar, de aspecto esburacado. As plantas de soja doentes, entretanto, não apresentavam sintomas de murcha. Essa doença foi denominada de “tan spot”. Inoculações em feijoeiro e soja com isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* provenientes das plantas

de soja infectadas pela bactéria manifestaram sintomas de manchas foliares e de murcha em feijoeiro, e sintomas de mancha foliar em soja (Dunleavy, 1983).

Schuster & Sayre (1967) inocularam *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtido de sementes de feijoeiro, e constataram que a soja cultivar Bansei, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, ervilha cultivares Alaska e Perfection, *Dolichos lablab*, *Phaseolus radiatus*, *P. lathyroides*, *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. calcaratus* e *P. acutifolius* foram suscetíveis à bactéria, evidenciando sintomas de murcha. Torres et al. (1982) relataram pela primeira vez a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* patogênica a *Zornia* spp., na Colômbia. Chavarro et al. (1985) constataram que isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidos de *Zornia* spp. foram patogênicos ao feijoeiro, quando inoculados artificialmente. Wood & Easdown (1990), na Austrália, evidenciaram *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* oriundos de *Vigna radiata* e *V. unguiculata*, foram patogênicos ao feijoeiro e à soja. Arcila & Trujillo (1990) também constataram que *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolada de *V. unguiculata* foram patogênicos ao feijoeiro e não foram patogênicos ao milho e ao sorgo, sob condições de inoculação artificial. Além das espécies já citadas como hospedeiras de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Bradbury (1986), relaciona ainda *Lablab purpureus*, *Phaseolus coccineus*, *Vigna angularis*.

Vários representantes do gênero *Curtobacterium* apresentam colonização endofítica em diversas espécies vegetais. *C. flaccumfaciens* pode colonizar endofiticamente inhame (Tor et al., 1992), trevo (Sturz et al., 1997), pinus (Bent & Chanway, 1998), citros (Araújo et al., 2002), milho e sorgo (Zinniel et al., 2002). *C. luteum* apresenta colonização endofítica em tubérculos de batata (Sturz & Matheson, 1996). No caso de *C. flaccumfaciens*, também há relatos de sua sobrevivência epifítica em folhas de amendoim (Jacobs & Sudin, 2001) e de *C.*

herbarum em folhas de gramíneas (Behrendt et al., 2002). Conforme Belmonte (2009), *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros não são patogênicos ao feijoeiro.

De acordo com Schuster & Coyne (1974; 1977), muitas bactérias fitopatogênicas podem sobreviver entre os ciclos de cultivo em hospedeiros anuais e perenes, muitas vezes sem a presença de sintomas que evidenciem a infecção. Essa forma de sobrevivência pode ser uma importante fonte de inóculo para os cultivos posteriores. Em vista disso, o presente estudo teve por objetivo verificar a patogenicidade de um isolado de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* inoculado artificialmente em diferentes espécies vegetais.

Materiais e métodos

Para o estudo foram utilizadas plantas das espécies *Arachis hypogaea* L. (amendoim cv. IAC 5), *Avena byzantina* K. Koch (aveia amarela cv. São Carlos), *A. sativa* L. (aveia branca cv, IAC 7), *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf (Capim-marandú), *B. ruziziensis* Germain et Evrard (braquiária cv. comum), três espécies do gênero *Chenopodium* (*C. amaranticolor* Coste & A. Reyn, *C. murale* L. e *C. quinoa* Willd), duas espécies do gênero *Crotalaria* (*C. juncea* L. e *C. spectabilis* Roth.), duas espécies do gênero *Datura* (*D. metel* L. e *D. stramonium* L.), *Gomphrena globosa* L., *Glycine max* (L.) Merr. (soja cv. BRS 262), três espécies do gênero *Ipomoea* (*I. aristolochiaefolia* (H.B.K.) Don., *I. grandifolia* (Dammer) O'Donnell e *I. nil* (L.) Roth), três espécies do gênero *Nicotiana* (*N. glutinosa* L., *N. rustica* L. e *N. tabacum* L.), *Panicum maximum* Jacq. (capim-colônia cv. Mombaça), *Pennisetum americanum* (L.) Leake (milheto cv. BNZ), *Petunia* sp., *Phaseolus vulgaris* L. (feijão cv. Pérola), *Portulaca oleracea* L. (beldroega), *Raphanus sativus* L. (nabo forrageiro cv. Comum-

RS), *Ricinus communis* L. (mamona porte baixo cv. IAC 2028), *Triticum aestivum* L. (trigo cv. Cooditec 108), *Zea mays* L. (milho cv. P30K75).

As plantas foram obtidas em vasos de 2 L de capacidade contendo substrato autoclavado constituído de uma mistura de terra, esterco de curral curtido e areia grossa lavada na proporção de 1:1:1, acrescido de 0,6 kg de sulfato de amônio, 1,7 kg de superfosfato simples, 0,6 kg de cloreto de potássio e 0,8 kg de calcário dolomítico para cada m³ da mistura. Os vasos foram mantidos sob condições de casa-de-vegetação e quinze dias após a emergência das plântulas, procedeu-se à inoculação com o isolado Feij. 2634 de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, pertencente à coleção do Laboratório de Fitobacteriologia da FCA/UNESP. O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura (NSA) (3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 15,0 g de ágar, 5,0 g de sacarose e 1 L de água destilada) em estufa bacteriológica por 48h a 28°C.

Foram empregados, separadamente, dois métodos de inoculação (pulverização da parte aérea e punção no caule). No método de pulverização, as plantas foram aspergidas com suspensão bacteriana na concentração de 10⁸ ufc.mL⁻¹, padronizada por colorimetria ($A_{540nm} = 0,1$), nas faces abaxial e adaxial da folhas, até o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram mantidas em condições de câmara úmida 24 h antes e após a inoculação. Plantas do tratamento testemunha foram aspergidas com água destilada na parte aérea. A inoculação por ferimento no caule foi realizada através de punção no caule das plantas com o auxílio de uma agulha entomológica previamente umedecida em cultura bacteriana pura (Maringoni, 2002). Para o tratamento testemunha foi utilizado água destilada, ao invés de inóculo bacteriano. Cada método de inoculação foi representado por cinco vasos, para cada espécie vegetal, cada um contendo três plantas. Para o tratamento testemunha, foi utilizado um vaso contendo três

plantas, para cada espécie vegetal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O experimento foi conduzido durante os meses de agosto e setembro de 2009, e repetido durante os meses de março e abril de 2010.

Após 21 dias, as plantas inoculadas através de pulverização da parte aérea foram avaliadas quanto à presença de manchas necróticas e colonização endofítica nas folhas. A presença de murcha e de colonização endofítica do caule foi avaliada nas plantas inoculadas por ferimento. Amostras de caules e folhas foram processadas conforme Dhingra & Sinclair (1995) e submetidas a isolamento em placas de Petri contendo meio de cultura NSA, e incubadas a 28°C, por 72 h.

Nos isolamentos em que houve o desenvolvimento de colônias bacterianas com características culturais semelhantes ao do isolado Feij. 2634, três isolados bacterianos foram submetidos aos testes de coloração diferencial de Gram, crescimento em meio de cultura NSA contendo 7% de NaCl, patogenicidade em plantas de feijoeiro cv. Pérola e caracterização bioquímica pelo método Biolog[®]/Microlog (Câmara et al., 2009), e preservados em tubos de ensaio contendo óleo mineral esterilizado e liofilização.

Resultados

Os resultados da avaliação realizada nas plantas inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* estão representados na Tabela 1. As plantas de feijoeiro inoculadas com a bactéria por punção no caule desenvolveram sintomas típicos de murcha-de-curtobacterium (Figura 1a). Plantas de feijoeiro inoculadas por aspersão de suspensão bacteriana na parte aérea desenvolveram sintomas de necrose dos bordos dos folíolos, circundadas por um intenso

halo amarelado, que progredia em direção ao centro do folíolo, indicando uma possível penetração da bactéria pelos hidatódios (Figura 1b).

As folhas de plantas de soja inoculadas por aspersão desenvolveram sintomas de necrose dos bordos foliares, circundados por um tênue halo amarelado (Figura 1c). Além desse sintoma, foi verificada a presença de lesões necróticas na parte central do limbo, circundadas por halo amarelado, que conferia à folha um aspecto esburacado (Figura 1d). Apesar das plantas de soja inoculadas com a bactéria através de punção no caule não apresentarem sintomas de murcha, foi possível isolar colônias típicas de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* do caule próximas ao ponto de inoculação, indicando colonização vascular do caule pela bactéria

Plantas de trigo inoculadas por aspersão de suspensão bacteriana de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e por punção no caule não apresentaram sintomas de necrose de folhas ou murcha. Entretanto, isolamentos realizados em folhas e caules de trigo, evidenciaram a presença de colônias bacterianas semelhantes ao do isolado Feij. 2634, indicando a colonização endofítica de folhas e caules de trigo por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. As demais espécies vegetais inoculadas por aspersão de suspensão bacteriana nas folhas ou por punção no caule não desenvolveram sintomas de necrose na parte aérea, murcha ou colonização endofítica de folhas e caules.

Dos isolamentos realizados de folhas e caules de feijoeiro, soja e trigo foram selecionados 18 isolados bacterianos que foram patogênicos ao feijoeiro cultivar Pérola submetidos à inoculação por punção do caule (Maringoni, 2002), aos 21 dias após a inoculação. Os isolados foram identificados como sendo Gram-positivos pelo teste de coloração diferencial de Gram e apresentaram crescimento em meio de cultura NSA acrescido

de NaCl a 7%. A caracterização pelo método Biolog[®]/Microlog resultou em seis isolados sendo identificados como *Curtobacterium* sp., com índices de similaridade variando entre 30,0 e 45,5, e doze isolados sendo caracterizados como *Curtobacterium flaccumfaciens*, com índices de similaridade variando entre 50,1 e 74,5.

Discussão

A sobrevivência de bactérias fitopatogênicas como populações residentes na superfície ou no interior de plantas cultivadas ou daninhas é uma das principais fontes de inóculo para o aparecimento de novas epidemias de doenças bacterianas em campos de cultivo agrícola (Schuster & Coyne, 1974). Segundo Cafati & Saettler (1980), o aumento da população de um patógeno em tecidos suscetíveis e resistentes, sem a presença de evidências da infecção pelo patógeno, pode ter grande importância epidemiológica no aumento de inóculo para disseminações secundárias em campo, e também como nicho de sobrevivência de propágulos de patógenos em condições ambientais desfavoráveis.

Em muitas regiões agrícolas do Brasil, é comum o cultivo de gramíneas durante o inverno, como a aveia e o trigo, e o cultivo de feijoeiro na primavera. Apesar deste estudo não ter evidenciado a capacidade de colonização de plantas de aveia por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, através das metodologias de inoculação utilizadas, foi verificada a capacidade da bactéria colonizar endofiticamente caules e folhas de plantas de trigo inoculadas artificialmente. Esse fato pode sugerir a descoberta de um novo nicho de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, servindo de fonte de inóculo para o aparecimento de novas epidemias de murcha-de-curtobacterium em campos comerciais de feijoeiro, implantados após

o cultivo do trigo. No Brasil, muitas áreas agrícolas onde é realizada a rotação de culturas entre essas gramíneas de inverno e o feijoeiro, adotam o sistema de plantio direto, onde os restos culturais do cultivo anterior são mantidos na superfície do solo, para a formação de uma camada de cobertura morta.

As bactérias patogênicas ao feijoeiro, incluindo *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, não estão adaptadas para a sobrevivência na natureza fora de tecidos de plantas. A viabilidade de inóculo da maioria das fitobacérias é favorecida quando os resíduos culturais infectados com esses patógenos são mantidos na superfície do solo (Schuster & Coyne, 1977). Esse fato é evidenciado no trabalho desenvolvido por Silva Júnior. et al. (2009), onde os autores verificaram que *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pode sobreviver por até oito meses em restos culturais de feijoeiro infectados mantidos na superfície do solo. Esses resíduos vegetais mantidos no campo de cultivo podem ser uma importante fonte de inóculo da bactéria para os cultivos posteriores de feijoeiro.

Estudo realizado por Harverson et al. (2005) demonstrou que após o cultivo de trigo, houve a sobrevivência de inóculo suficiente de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* para causar infecção em plantas de feijoeiro cultivadas posteriormente. Uma possibilidade para o aumento da incidência da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro após o cultivo de trigo seja a permanência de restos culturais dessa gramínea infectados por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* na superfície do solo, servindo como fonte de inóculo para o cultivo posterior de feijoeiro. Até o momento, entretanto, não há relatos, no Brasil, de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizando naturalmente o trigo e nenhuma evidência de porque o plantio de trigo anteriormente ao feijoeiro, aumente a incidência da murcha-de-curtobacterium em campo.

Neste estudo foi verificada a ocorrência de manchas necróticas nos bordos de folíolos de plantas de feijoeiro inoculadas através de aspersão de suspensão bacteriana de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, sugerindo uma possível penetração da bactéria pelos hidatódios. Até o presente momento, não se tinha o conhecimento da capacidade da bactéria infectar plantas de feijoeiro via aberturas naturais. Estudos anteriores, como os de Burker & Seliskar (1957), Schuster (1959) e Rickard & Walker (1965) não evidenciaram a penetração de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por estômatos, hidatódios ou outras aberturas naturais na parte aérea da planta de feijão.

Os sintomas observados em folhas de plantas de soja inoculadas por aspersão de suspensão de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* são muito semelhantes aos da “tan spot” descritos por Dunleavy (1983), em Iowa, em 1975. Entretanto, não havia evidências da capacidade da bactéria colonizar endofiticamente caules de plantas de soja inoculadas artificialmente.

Bradbury (1986) relata que o milho pode ser um hospedeiro de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em inoculações artificiais. Neste estudo, levando-se em consideração as metodologias de inoculação utilizadas, não houve colonização de plantas de milho pela bactéria, resultados que concordam com Arcila & Trujillo (1990).

Muitas plantas cultivadas de importância econômica empregadas neste estudo são utilizadas em sistemas de rotação de cultura com o feijoeiro. Estudos para a descoberta de novos hospedeiros potenciais de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* são importantes para a descobertas de nichos de sobrevivência da bactéria. Apesar de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ser patogênica à soja, no Brasil não existem relatos da ocorrência da “tan spot”. A ocorrência dessa doença parece ter sido um surto epidêmico isolado, sendo que após a sua

constatação, poucos foram os relatos de epidemias de “tan spot” em campos comerciais de soja no mundo.

Algumas plantas daninhas utilizadas neste trabalho são de ocorrência freqüente em áreas de cultivo agrícola no Brasil (Lorenzi, 2008). Apesar de não ter sido demonstrada a colonização dessas plantas por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, há relatos na literatura, de que muitas delas são hospedeiras de bactérias fitopatogênicas, agentes causais de doenças importantes. De acordo com Bradbury (1986) e Malavolta Jr. et al. (2008), *Brachiaria ruziziensis*, *Datura metel*, *Panicum maximum*, *Pennisetum americanum*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus sativus*, *Ricinus communis*, e espécies dos gêneros *Chenopodium* sp., *Crotalaria* sp., *Ipomoea* sp. e *Nicotiana* sp. são hospedeiras de *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia solanacearum*, e de espécies de *Acidovorax* sp., *Pectobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Xanthomonas* sp. Muitos desses relatos, entretanto, foram verificados apenas em condições de inoculação artificial.

Devido à ampla adaptação edafoclimática do feijoeiro, o seu cultivo no Brasil e em outros países de clima tropical, pode ser realizado durante o ano todo, muitas vezes na forma de cultivos sucessivos, sem a realização de rotação de culturas. Além disso, o feijoeiro pode ser conduzido em associação com outras culturas e altas infestações por plantas daninhas são comuns em muitos campos de cultivo. Muitas dessas plantas daninhas, como também outras plantas cultivadas, como a soja e o trigo, podem ser um nicho de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em campos de cultivo de feijoeiro.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Referências bibliográficas

Araújo, W. L., Marcon, J., Marccheroni, W., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. L., & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial population and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4906-4914.

Arcila, M.S., & Trujillo, G.E. (1990). Identificación de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol (*Vigna unguiculata* (L). Walp. subsp. *unguiculata*). *Agronomia Tropical*, 40, 193-204.

Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., & Suzuky, K.I. (2002). Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere an litter layer after mulching the sward: polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. sp. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1441-1454.

Belmonte, U. C. F. (2009). Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros. Tese, Universidade de São Paulo.

Bent, E., & Chanway, C. P. (1998). The growth-promoting effect of a bacterial endophyte on logpole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *44*, 980-988.

Bradbury, J. F. (1986). Guide to plant pathogenic bacteria. (Farnham House: C.A.B. International).

Burker, D. W., & Seliskar, C. E. (1957). Disease incidence and yields of beans in relation to cultivation injury in North Dakota Colorado. *Plant Disease*, *41*, 483-487.

Cafati, C. R., & Saettler, A. W. (1980). Role of non-host species as alternate inoculum sources of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease*, *64*, 194-196.

Câmara, R. C., Vigo, S. C., & Maringoni, A. C. (2009). Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar. *Journal of Plant Pathology*, *91*, 549-554.

Chavarro, C. A., Lopez, G. C. A., & Lenne, J. M. (1985). Características y pathogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto em el rendimiento de *Z. glaba*. CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. *Acta Agronomica*, *35*, 64-79.

Dhingra; O. D. & Sinclair, J. B. (1985). *Basic Plant Pathology Methods*. (Boca Raton: CRC Press).

Dunleavy, J.M. (1983). Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybeans. *CropScience*, 23, 473-476.

Harverson, R. M., Vidaver, A. K., & Schwartz, H. F. (2005). Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska. NebGuide, University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources. Retrieved June 4, 2007, from <http://www.ianperbs.unl.edu>.

Hedges, F. (1922). A bacterial wilt of the beans caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science*, 55, 433.

Hedges, F. (1926). Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges). Including comparisons with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology*, 16, 1-22.

Jacobs, J. L., & Sundin, G. W. (2001). Effect of solar uv-b radiation on phyllosphere bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5488-5496.

Lorenzi, H. (2008). *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. (Nova Odessa: Plantarum).

Malavolta Jr., V. A., Beriam, L. O. S., Almeida, I. M. G., Rodrigues Neto, J., & Robbs, C. F. (2008). Phytopathogenic bacteria registered in Brazil: an updated list. *Summa Phytopathologica*, 34, special supplement, 1-88.

Maringoni, A. C. (2002). Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curto bacterium. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 161-166.

Rickard, S. F., & Walker, J. C. (1965). Mode of inoculation and host nutrition in relation to bacterial wilt of bean. *Phytopathology*, 55, 174-178.

Saettler, A. W. (1991). Diseases caused by bacteria. (In: HALL. R., Compendium of bean diseases (pp. 29-32). St. Paul: APS Press).

Schuster, M. L. (1959). Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. *Plant Disease Reporter*, 43, 27-32.

Schuster, M. L., & Coyne, D. P. (1974). Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 12, 199-221.

Schuster, M. L., & Coyne, D. P. (1977). Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). *Fitopatologia Brasileira*, 2, 117-130.

Schuster, M. L., & Sayre, R. M. (1967). A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. *Phytopathology*, 57, 1064-1066.

Silva Júnior, T. A. F., Maringoni, A. C., Pieri, C., Negrão, D. R., & Itako, A. T. (2009). Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em restos de cultura de feijoeiro no período I. *Tropical Plant Pathology*, supl. 34, S8.

Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25, 13-19.

Sturz, A. V., & Matheson, B. G. (1996). Population of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia* induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 184, 265-271.

Tor, M., Mantteli, S. H., & Ainsworth, C. (1992). Endophytic bacteria expressing beta glucosidase cause false positive in transformation of *Discoriae* species. *Plant Cell Reports*, 11, 452-456.

Torres, G. C., Lenne, J. M., Victoria, J. I., & Lozano, J. C. (1982). Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. (Annals of the International Conference of Plant Pathogenic, 5, 74-79).

Wood, B. A., & Easdown, W. J. (1990). A new bacterial disease of mung bean and cowpea for Australia. *Australasian Plant Pathology*, 19, 16–21.

Zinneil, D., Lambrecht, P., Haris, B., Freng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2198-2208.

Tabela 1. Presença de sintomas de necrose em folhas, murcha, e colonização de folhas e caules em diferentes espécies vegetais inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Nome científico das espécies vegetais	Inoculação por aspersão de suspensão bacteriana na parte aérea		Inoculação por punção no caule	
	Lesões necróticas nas folhas	Colonização nas folhas	Sintomas de murcha	Colonização no caule
<i>Arachis hypogaea</i>	-	-	-	-
<i>Avena byzantine</i>	-	-	-	-
<i>Avena sativa</i>	-	-	-	-
<i>Brachiaria brizantha</i>	-	-	-	-
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	-	-	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	-	-	-
<i>Chenopodium murale</i>	-	-	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-
<i>Crotalaria juncea</i>	-	-	-	-
<i>Crotalaria spectabilis</i>	-	-	-	-
<i>Datura metel</i>	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	+	+	-	+
<i>Ipomoea aristolochiaefolia</i>	-	-	-	-
<i>Ipomoea grandifolia</i>	-	-	-	-
<i>Ipomoea nil</i>	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	-	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-	-	-
<i>Panicum maximum</i>	-	-	-	-
<i>Pennisetum americanum</i>	-	-	-	-
<i>Petunia</i> sp.	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	+	+	+	+
<i>Portulaca oleracea</i>	-	-	-	-
<i>Raphanus sativus</i>	-	-	-	-
<i>Ricinus communis</i>	-	-	-	-
<i>Triticum aestivum</i>	-	+	-	+
<i>Zea mays</i>	-	-	-	-

+ = presença; - = ausência

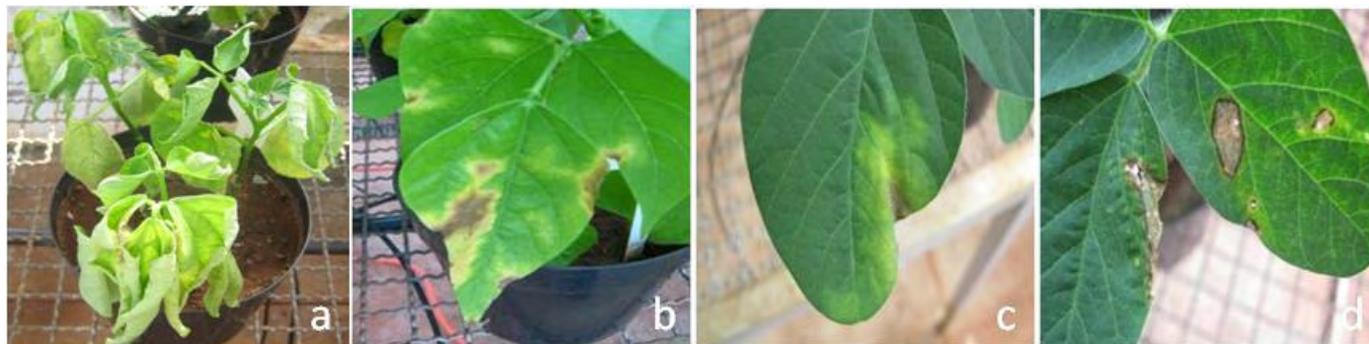


Figura 1. Plantas de feijoeiro e soja inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a) Sintomas de murcha-de-curtobacterium em plantas de feijoeiro cv. Pérola inoculadas por punção de caule; b) Sintomas de necrose de bordos em folíolos de feijoeiro com presença de halo amarelado; c) Sintomas de necrose de bordos de folhas de soja com presença de halo amarelado; e d) folhas de soja com sintomas de necrose do limbo foliar.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho:

a) *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* apresentou capacidade baixa de sobrevivência no solo. O período de sobrevivência da bactéria foi influenciado pelo tipo de solo, seu teor de umidade e temperatura de incubação das amostras. O período de sobrevivência da bactéria variou entre 2 a 16 dias.

b) O período de sobrevivência de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* associada a restos culturais de feijoeiro foi influenciado pela incorporação do material vegetal a 20 cm de profundidade e pelos níveis de precipitação durante a realização dos ensaios. A bactéria sobreviveu entre 165 a 240 dias nos restos culturais mantidos na superfície do solo e por até 30 dias, nas amostras vegetais incorporadas ao solo.

c) *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não foi capaz de colonizar *in vitro* o rizoplano de plântulas de aveia e trigo. Nos experimentos em campo, a bactéria não colonizou endofiticamente plantas de aveia e trigo. As plantas de feijoeiro cultivadas após o plantio dessas gramíneas não apresentaram sintomas de murcha-de-curtobacterium.

d) Nas inoculações artificiais realizadas em condições de casa de vegetação, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi patogênica ao feijoeiro e à soja e colonizou endofiticamente caules e folhas de trigo.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, A. F. B. **Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na Região Sul de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. (Sistemas de produção, n. 6). Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/index.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

ARAÚJO, W.L. et al. Diversity of endophytic bacterial population and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARCILA, M. S.; TRUJILLO, G. E. Identificación de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol (*Vigna unguiculata* (L). Walp. subsp. *unguiculata*). **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 40, p. 193-204, 1990.

ARNAUD-SANTANA, E.; PENA-MATOS, E. Longevity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 9, p. 952-953, 1991.

BEHRENDT, U. et al. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere an litter layer after mulching the sward: polyphasic characterization of

Subtercola pratensis sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. sp. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, n. 5, p.1441-1454, 2002.

BELMONTE, U. C. F. **Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros**. 2009. 67 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effect of a bacterial endophyte on logpole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 10, p. 980-988, 1998.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Wallingford: CAB International, 1986. 322 p.

BRIAN, P. W. The ecological significance of antibiotic production. In: WILLIAMS, R. E. O.; SPENCER, C. C. (Eds.). **Microbiological ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. p. 168-188.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BUDDENHAGEN, I. W. Ecology of soil-borne plant pathogens. In: BAKER, K. F.; SNYDER, W. C. **Ecology of soil-borne plant pathogens: prelude to biological control**. London: Murray, 1965. p. 269-284.

BURKER, D. W.; SELISKAR, C. E. Disease incidence and yields of beans in relation to cultivation injury in North Dakota Colorado. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 41, n. 7, p. 483-487, 1957.

BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogens causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, n. 9, p. 743-744, 1945.

CABI. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 6th ed. Wallingford, 2010. Map 370. Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Curtobacterium_flaccumfaciens/CORBFL_ds.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CHAVARRO, C. A.; LOPEZ, G. C. A.; LENNE, J. M. Características y pathogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto em el rendimiento de *Z. glaba*. CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. **Acta Agronomica**, Palmira, v. 35, n. 2, p. 64-79, 1985.

CHÁVEZ, C. L.; GRANADA, G. A. Supervivencia de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, agente causal de la bacteriosis del frijol, bajo condiciones del Valle del Cauca, Colombia. **Fitopatologia Colombiana**, Palmira, v. 12, n. 1-2, p. 9-14, 1988.

COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. Nov. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, n. 17, p. 3545-3548, 1983.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Feijão total (1ª, 2ª e 3ª safra)**: Brasil, safras 1976/77 a 2009/10. Séries históricas. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 dez. 2010.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. **Euphytica**, Wageningen, v. 23, n. 3, p. 651-656, 1974.

DE BOER, S. H. Survival of phytopathogenic bacteria. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. H. (Eds.). **Phytopathogenic prokaryotes**. New York: Academic Press, 1982. v. 1, p. 285-305.

DEUNER, C. C. et al. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. S194, 2006. Suplemento.

DINESEN, I. G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plant (*Phaseolus vulgaris*). **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, Washington, DC, v. 2, p. 929-933, 1978.

DUARTE, V. Taxonomia atual de bactérias fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, p. 87-109, 2009.

DUNLEAVY, J. M. Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 3, p. 473-476, 1983.

ERCOLANI, G. L. et al. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean on Wisconsin. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 10, p. 1330-1339, 1974.

FAO. **FAOSTAT**: agricultural statistics database. Rome, 2005. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 25 nov. 2009.

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

GONZALEZ, A. J.; TELLO, J. C.; RODICIO, M. R. Bacterial wilt of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in southeastern Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 12, p.1361, 2005.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 324 p.

GRAHAM, P. H. et al. Addressing edaphic constraints to bean production: the Bean/Cowpea CRSP Project in perspective. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 82, n. 2-3, p. 179-192, 2003.

HAAS, J. H. Epiphytic populations of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* "Sanilac". **Proceedings of the Canadian Phytopathological Society**, Ontario, Ontario, v. 39, p. 31, 1972.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1991. 73 p.

HARVERSON, R. M.; VIDAVER, A. K.; SCHWARTZ, H. F. **Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska**. Lincoln: University of Nebraska, Institute of Agriculture and Natural Resources, 2005. Disponível em: <<http://www.ianperbs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2007.

HATTORI, T. **Microbial life in the soil**: an introduction. New York: Dekker, 1973. 427 p.

HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges). Including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 16, n. 1, p. 1-22, 1926.

HSIEH, T. F. et al. Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 4, p. 245-249, 2005.

HSIEH, T.F. et al. First report of bacterial wilt on common bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in western Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. 1275, 2002.

HUERTA, L. M.; RODRÍGUEZ, M. L. M. Supervivencia del agente causal del tizon común del frijol (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E. F. Sm.) Down.,) en suelo y en la rizosfera de algunas malezas en Chapingo edo. de México. **Revista Chapingo**: serie protección vegetal, Chapingo, v. 1, p. 29-33, 1994.

JACOBS, J. L.; SUNDIN, G. W. Effect of solar uv-b radiation on phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 12, p. 5488-5496, 2001.

KARKMKOVA, P.; BOYADZHIEV, K. H. The new garden bean cultivar Rositsa. **Gradinarska i Lozarska Nauka**, Sofia, v. 21, n. 3, p. 40-43, 1984.

LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n. 8, p. 633-637, 1981.

LEITE JÚNIOR, R. P. et al. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 303-304, 2001. Suplemento.

MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. 161-166, 2002.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, n. 2, p. 160-162, 1997.

MARINGONI, A. C.; SOUZA, E. L. C. Reação de cultivares de soja a isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, proveniente de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 6, p. 777-781, 2003.

MARSHALL, K. C. Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. In: MCLAREN, A. D.; SKUJINS, J. J. **Soil biochemistry**. New York: Dekker, 1971. v. 2, p. 409-445.

MIRANDA FILHO, R. J.; NOGUEIRA, L. R.; UESUGI, C. H. Distribuição da murcha de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S91, 2008. Suplemento.

MIRANDA FILHO, R. J.; PEREIRA, I. M. Persistência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo de cerrado cultivado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. S158, 2006. Suplemento.

PATRICK, Z. A. The antibiotic activity of soil microorganisms as related to bacterial plant pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 32, n. 5, p. 705-735, 1954.

PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinias*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 361-387, 1980.

PHANG, P. D.; GUTENMAHER, P.; MOELA, I. Resistance to bacterial rots in some French bean. **Lucrari Stiintifice A**, Bucuresti, v. 17, p. 45-48, 1974.

RICKARD, S. F.; WALKER, J. C. Mode of inoculation and host nutrition in relation to bacterial wilt of bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, n. 5, p. 174-178, 1965.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: APS, 1991. p. 29-32.

SAETTLER, A. W.; PERRY, S. K. Seed-transmitted bacterial diseases in Michigan navy (pea) beans. *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v. 56, n. 16, p. 378-381, 1972.

SALGADO, R. G. D.; MARINGONI, A. C.; WILCKEN, S. R. S. Não-interação entre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 3, p. 202-205, 2007.

SCHUSTER, M. L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 43, n. 2, p. 27-32, 1959.

SCHUSTER, M. L., SMITH, M. L. Seed transmission and pathology of *Corynebacterium flaccumfaciens* in *Phaseolus vulgaris*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 26, p. 37-38, 1983.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. **Survival factors of plant pathogenic bacteria**. n. 268, Lincoln: University Nebraska, Agriculture Experiment Station, 1975. 53 p. Research bulletin.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 199-221, 1974.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 2, n. 7, p. 117-130, 1977.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 10, p. 1064-1066, 1967.

SCHUSTER, M. L.; SMITH, C. C.; SMITH, D. J. Population trends of epiphytic *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum* on leaves of *Phaseolus vulgaris* genotypes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 7, n. 2, p. 209-212, 1982.

SOUZA, V. L. et al. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 339-344, 2006.

STURZ, A. V. et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, n. 1, p. 13-19, 1997.

STURZ, A. V.; MATHESON, B. G. Population of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia* induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.

THEODORO, G. F. et al. Ocorrência da murcha de curtobacterium do feijoeiro, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em Mato Grosso do Sul. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, p. 163, 2010. Suplemento.

THEODORO, G. F.; HERBES, D. H.; MARINGONI, A. C. Fontes de resistência à murcha-de-curtobacterium em cultivares locais de feijoeiro coletadas em Santa Catarina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1333-1339, 2007.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 34-41. 2006.

THOMAS, W. D. Jr.; GRAHAM, R. W.; Bacteria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, n. 3, p. 214, 1952.

TOR, M.; MANTTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing beta glucosidase cause false positive in transformation of *Discoreae* species. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 9, p. 452-456, 1992.

TORRES, G. C. et al. Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. **International Conference of Plant Pathogenic Bacteria**, Dordrecht, v. 5, p. 74-79, 1982.

TORRES, J. P.; MARINGONI, A. C.; SILVA JR., T. A. F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 91, n. 1, p. 195-198, 2009.

UESUGI, C. F.; FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 324, 2003.

VENETTE, J. R.; LAMPRA, R. S.; GROSS, P. L. First report of bean bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* in North Dakota. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 3, p. 966, 1995.

VIERA, J. L. T. M. Produção e comercialização no Brasil. In: ZIMMERMANN, M. J.; RICHA, M.; YAMADA, T. (Eds.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação para a Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 1988. p. 21-36.

WIMALAJEEWA, D. L. S.; NANCARROW, L. F. Survival in soil of bacteria causing common and halo blights of French bean in Victoria. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourne, v. 20, n. 120, p. 102-104, 1980.

WOOD, B. A.; EASDOWN, W.J. A new bacterial disease of Mung bean and Cowpea for Australia. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 16-21, 1990.

ZINNEIL, D. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ZUCARELI, C. **Adubação fosfatada, produção e desempenho em campo de sementes de feijoeiro cv. Carioca Precoce e IAC Carioca Tybatã**. 2005. 183 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.