

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

***Curto bacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: ASPECTOS
EPIDEMIOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA**

RICARDO MARCELO GONÇALVES

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

BOTUCATU-SP
Dezembro, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

***Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: ASPECTOS
EPIDEMIOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA**

RICARDO MARCELO GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Co-orientador: Dr. Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior

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

BOTUCATU-SP
Dezembro, 2015

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

G635c Gonçalves, Ricardo Marcelo, 1985-
 Curtobacterium flaccumfaciens PV. *flaccumfaciens*: aspectos epidemiológicos e variabilidade genética / Ricardo Marcelo Gonçalves. - Botucatu : [s.n.], 2015
 vi, 141 f. : fots. color.; grafs. color., ils. color., tabs.

 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015
 Orientador: Antonio Carlos Maringoni
 Coorientador: Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior
 Inclui bibliografia

 1. Feijão comum - Resistência a doenças e pragas. 2. Bactérias. 3. Nicho (Ecologia). 4. Genética bacteriana. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Silva Júnior, Tadeu Antônio Fernandes da. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

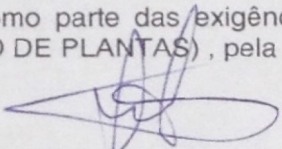
TÍTULO: *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA

AUTOR: RICARDO MARCELO GONÇALVES

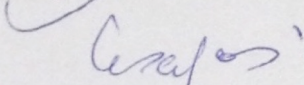
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

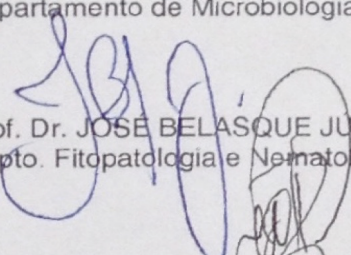
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI

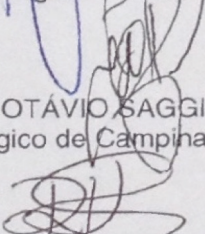
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI

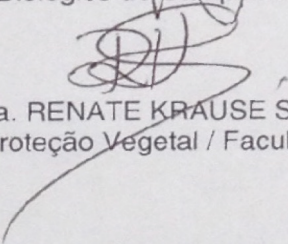
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu


Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

Depo. Fitopatologia e Nematologia - ESALQ USP


Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM

Instituto Biológico de Campinas


Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Data da realização: 15 de dezembro de 2015.

À todos agricultores batalhadores de feijoeiro que nos nutrem diariamente,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, pela oferta e infraestrutura deste curso;

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Maringoni pela orientação, ensinamentos, confiança, paciência e dedicação;

À Dra. Marie-Agnès Jacques pela oportunidade, financiamento e sugestões nos trabalhos desenvolvidos no INRA-França;

À Dra. Perrine Portier pela co-orientação nos trabalhos desenvolvidos no INRA-França, excelente recepção e acolhida, ensinamentos, correções e paciência;

Ao Dr. Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior pela co-orientação na UNESP, auxílio no delineamento e condução dos experimentos;

Ao Me. Carlos André Schipanski pela parceria entre a UNESP e a Fundação ABC, contribuindo com o delineamento, condução dos experimentos, além do apoio financeiro para a pesquisa;

À Professora Dra. Renate Krause Sakate pelos ensinamentos, apoio e licença para uso de seu laboratório;

Aos Professores do Departamento de Proteção Vegetal que fizeram jus de suas profissões e muito contribuíram para minha formação profissional;

Aos pesquisadores e funcionários do INRA-França Dra. Armelle Darrasse, Cécile Dutrieux, Géraldine Taghouti, Karine Durand, Martial Briand, Sophie Bonneau, Nicolas Chen, Dra. Marion Le Saux, Dr. Tristan Boureau, Dr. Matthieu Barret, Anne Preveaux e Chrystelle Brin que muito me ajudaram na pesquisa e possibilitaram-me excelente estadia na França;

Aos pesquisadores e professores Dr. Eduardo Bagagli, Dr. José Belasque Júnior e Dr. Luís Otávio Saggion Berian por aceitarem compor a banca de defesa e contribuírem com o trabalho;

Ao José Marcelo Soman que muito contribuiu com a montagem, condução de experimentos e dúvidas laboratoriais;

Ao Me. Lincom Koguishí pelo auxílio na instalação, condução e avaliações dos experimentos no Paraná;

À Ma. Adriana Micheli pelo auxílio na aquisição dos reagentes;

Aos colegas de Pós-Graduação Ronaldo Caravieri de Souza Filho, Maysa Souza Areas, João Cesar da Silva, Julio Cesar da Silva, Tatiana Mituti, Milena Leite de Oliveira e Monika Fecury pela convivência agradabilíssima e muita ajuda com os experimentos;

Ao assistente operacional Paulo Roberto Rodrigues pela ajuda e convivência;

Aos funcionários Samuel Thomaz da Silva, Adriana de Oliveira Mariano e Nivaldo Antonio Diez pela convivência e ajuda ao solucionar dúvidas com documentações;

A todos que trabalham na Seção Técnica de Pós-Graduação da FCA/UNESP pelo auxílio com toda parte burocrática de documentação;

Aos funcionários da biblioteca Airtton, Denise, Nilson e a Ana que tornaram o momento de estudo ainda mais agradável com gentilezas e atenção;

À minha esposa Taísa G. G. L. Gonçalves que sempre compreendeu meus objetivos e nunca fez com que eu desanimasse, ao contrário, me ensina diariamente a encarar a vida com outro olhar;

Aos meus pais Cláudio e Aparecida, e sogros José e Ana pelos incentivos constantes;

À Albina Zuntini e Bety Gonçalves Kiyomura por sempre me apoiarem nos estudos;

Ao curso de inglês “MyEnglishOnline” e apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pela concessão de bolsa de estudos no Brasil e para realização do doutorado sanduíche;

Aos auxílios financeiros da Fundação ABC e do IRHS-INRA-Beaucouzé (Institut National de Recherche Agronomique-França) para a pesquisa;

À CIRM-CFBP (Collection for plant-associated bacteria, IRHS-INRA) por ceder os isolados bacterianos para a pesquisa.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1 Importância da cultura do feijoeiro comum	8
4.2 Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro.....	10
4.3 Sintomatologia.....	12
4.4 Epidemiologia.....	13
4.5 Controle da doença	18
4.6 Taxonomia e variabilidade genética de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	22
CAPÍTULO 1: “Hospedeiras alternativas de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> sob condições controladas e de campo”	38
CAPÍTULO 2: “Influência de forrageiras de inverno na ocorrência de murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro sob condições de campo”	63
CAPÍTULO 3: “Sobrevivência de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> como células livres no solo”	84
CAPÍTULO 4: “Genetic diversity of <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> by MLSA”	110
5. CONCLUSÕES.....	141

1. RESUMO

Uma das principais doenças bacterianas que acomete a cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil é a murcha-de-curtobacterium, causa por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Até o momento são escassas as informações a respeito da sobrevivência da bactéria no cultivo do feijoeiro, fato que pode interferir no manejo e controle da doença, além de informações a respeito da variabilidade genética da bactéria. Assim, esta pesquisa teve por objetivos analisar o potencial de algumas coberturas de inverno como hospedeiras alternativas de Cff, avaliar o efeito destas culturas aplicadas em sistema de rotação com o feijoeiro na incidência e severidade da doença, avaliar o comportamento de genótipos de feijoeiro que melhor se adaptam à doença em regiões do estado do Paraná, verificar a sobrevivência de Cff como células livres no solo e analisar a variabilidade genética da bactéria pela técnica de análise por sequências multilocus (MLSA). Foi observado que Cff pôde colonizar epifiticamente ou endofiticamente a aveia preta, trigo, aveia branca, cevada, azevém e canola. Os cultivos prévios da aveia preta e do trigo propiciaram o aumento da incidência e severidade da doença no feijoeiro, bem como redução no peso médio de 100 grãos. A produtividade média do feijoeiro teve uma redução de 50,64% em uma área com maior intensidade da doença, com parâmetros agronômicos (número de

vagens/planta, número de grãos/planta, peso dos grãos/planta e peso de 100 grãos), menores no local com maior incidência da doença. O cultivo prévio do milho e da soja propiciaram redução da incidência de Cff e aumento na produtividade do feijoeiro. As cultivares IPR Juriti e IPR Tuiuiú apresentaram maior nível de resistência à doença e foram as mais produtivas no Paraná. Houve diferença do período de sobrevivência como células livres entre isolados de Cff no solo (22 a 34 dias) e entre diferentes solos (30 a 94 dias). A sobrevivência no solo sob condições de campo variou de 34 a 80 dias, sendo observada a influência da temperatura e umidade no período de sobrevivência a campo. A técnica molecular empregada para detecção de Cff diretamente do solo possibilitou detecções em concentrações mínimas de 5×10^5 a 5×10^6 UFC/g de solo, sendo que Cff não foi detectada nos solos dos ensaios de campo conduzidos em 2012 e 2013, no Paraná. O estudo de MLSA com seis genes *housekeeping* evidenciou grande diversidade genética entre isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* coletados de diferentes países e hospedeiros, possivelmente devido recombinações e seleção purificadora durante o processo evolutivo da espécie; foi observado que não há correlação entre classificação filogenética com o local e hospedeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, murcha-de-curtobacterium, nichos ecológicos, sobrevivência, MLSA.

***Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: EPIDEMIOLOGICAL FEATURES AND GENETIC VARIABILITY. Botucatu, 2015. 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.**

Author: RICARDO MARCELO GONÇALVES

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

Co-adviser: TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

2. SUMMARY

One of the most important diseases of common bean in Brazil is the bacterial wilt, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Until now, there is no much knowledge about how this bacterium survives on common bean, fact that could interfere with the disease management, besides of information about genetic variability of the bacterium. In this work we studied the potential of some winter crops as alternative hosts of Cff; the effect of these crops in the incidence and severity of bacterial wilt in rotation with common bean; detection of common bean cultivars with resistance levels to Cff in regions of Paraná State; study the survival of Cff as free cells in the soil; and assess the genetic variability of the bacterium by multilocus sequence analysis (MLSA). Cff colonized epiphytically and

endophytically black oat, wheat, white oat, barley, ryegrass and canola. The previous crop of black oat and wheat increased the incidence and severity of bacterial wilt and reduced the average weight of 100 grains. The average production of common bean decreased 50,64% in area with higher intensity of disease, with reduction of number of pods/plant, number of grains/plant, weigh of grains/plant and weigh of 100 bean grains. The previous crop of corn and soybean reduced the Cff incidence and increased the bean production. The cultivars IPR Juriti and IPR Tuiuiú shown greater level of resistance for bacterial wilt and were more productive in Paraná State. Cff strains showed different survival periods in the soil (22 to 34 days) and was influenced by the soil type (30 to 94 days). For the field experiments, the survival of Cff varied from 34 to 80 days, being influenced by the temperature and moisture. The molecular technique employed to detect Cff directly from soil enabled detection in concentrations ranging from 5×10^5 to 5×10^6 CFU/g of soil and Cff was not detected on field assays in 2012 and 2013, in Paraná State. The study of MLSA with six housekeeping genes revealed large genetic diversity between strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* from different countries and hosts, possibly due recombinations and purifying selection during the evolutive process of the specie; no correlation between phylogenetic classification with local and host of origin were observed.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, bean bacterial wilt, ecological niches, resistance, survival, MLSA.

3. INTRODUÇÃO

O Brasil foi classificado na safra de 2013 como o terceiro maior produtor mundial de feijão, superado apenas por Myanmar e Índia, e seguido pelo México e República Unida da Tanzânia (FAO, 2015). O grão de feijão é um importante alimento proteico na dieta humana, com potencial para prevenir algumas enfermidades tais como osteoporose (DAWSON-HUGHES et al., 1990) e hipertensão (APPEL et al., 1997).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser cultivado ao longo de quase todo ano no Brasil e nas mais diversas condições edafoclimáticas presentes, fato que pode contribuir no aumento da incidência de várias doenças, que podem comprometer de forma significativa a produção. Dentre as de origem bacteriana, pode-se destacar a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* [Hedges] Collins e Jones. O quadro sintomatológico da doença caracteriza-se pelo aparecimento inicial de mosaicos cloróticos foliares, podendo progredir para necroses foliares acompanhadas por murcha da parte aérea, refletindo em redução do desenvolvimento da planta e da produtividade, podendo em muitos casos, levar a planta à morte.

Com relação aos aspectos epidemiológicos de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), trata-se de uma bactéria que pode ser transmitida por

sementes e capaz de sobreviver em diversas espécies de plantas pertencentes à família Fabaceae. Cff foi detectada na cultura do feijão em rotação com outras culturas como soja, trigo, milho, girassol e alfafa, levantando-se a hipótese da sobrevivência de Cff (HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011). Observações à campo têm mostrado que a incidência da doença é maior após a instalação da cultura de feijoeiro em áreas com cultivos prévios de aveia, porém não há constatação científica (MARINGONI; A. C., comunicação pessoal). Também carece estudos de outras hospedeiras alternativas para Cff, principalmente as empregadas em rotação com feijoeiro no Brasil, focando a colonização epifítica ou endofítica da bactéria.

No solo, sob condição de campo, Cff é capaz de sobreviver por pelo menos dois invernos entre a cultura do feijão rotacionada com trigo (EPPO/CABI) e em restos culturais infectados no solo por períodos que variaram de 30 a 240 dias (SILVA JÚNIOR et al., 2012b). Deve-se salientar a potencial capacidade de sobrevivência da bactéria no solo, porém há poucas informações que abordem a sobrevivência da bactéria como células livres no solo.

Com o uso de ferramentas moleculares para análise de ácidos nucleicos, a compreensão da diversidade genética de Cff pode ser melhor elucidada e contribuir para novos avanços das pesquisas, principalmente na obtenção de cultivares de feijoeiro com resistência à doença. Alguns estudos de diversidade genética com Cff já foram realizados empregando-se as técnicas AFLP, rep-PCR e PFGE, conseguindo-se agrupar os isolados por diferenças fenotípicas, genotípicas e correlacionar os devidos patovares. Porém com o uso da técnica de análise de sequências multilocus (MLSA) não há nenhum estudo, sendo que esta técnica atualmente é uma das mais recomendadas para este tipo de pesquisa.

O manejo da doença está embasado na aquisição de sementes saudáveis e/ou certificadas, rotação de culturas por 2-3 anos, incorporação dos restos culturais, eliminação de plantas voluntárias em plantios sucessivos, observação prévia do histórico da ocorrência da doença em novas áreas de plantio e, principalmente, o uso de cultivares resistentes (HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011). Assim, faz-se necessário o estudo do comportamento de diferentes genótipos de feijoeiro resistentes à doença e adaptados para diferentes regiões do país.

Com isso, o objetivo geral do trabalho foi o de fornecer maior subsídio sobre os aspectos epidemiológicos da murcha-de-curtobacterium no feijoeiro comum e sobre a diversidade genética do agente causal. Sendo os objetivos específicos o de verificar a influência das coberturas de inverno, aveia preta, aveia branca, trigo, cevada, azevém, canola e nabo na sobrevivência epifítica ou endofítica da bactéria Cff como potencial de inóculo para a cultura do feijão, avaliar a reação de cultivares de feijão comum quanto a resistência à doença no Paraná, avaliar a sobrevivência da bactéria como célula livre no solo e avaliar a diversidade genética de isolados de Cff de diferentes regiões e hospedeiros com a técnica molecular MLSA. O trabalho foi dividido em quatro capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas e de campo”, o segundo capítulo intitulado “Influência de forrageiras de inverno na ocorrência de murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro sob condições de campo”, o terceiro capítulo intitulado “Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres no solo” e o quarto capítulo intitulado “Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* by MLSA”.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Importância da cultura do feijoeiro comum

O gênero *Phaseolus* pertence a subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales* e família *Fabaceae* (CRONQUIST, 1988). Apresenta centro de origem no continente Americano, com cerca de 55 espécies, sendo cinco cultivadas: *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* e *P. acutifolius* var. *latifolius* (SANTOS; GAVILANES, 2008). Destas, a mais cultivada é o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), que constitui um importante alimento na dieta humana, como fonte de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante (ABREU, 2005). Além de ser um alimento rico em termos nutricionais, a cultura do feijoeiro apresenta alta relevância socioeconômica no Brasil, empregando um elevado número de trabalhadores ao longo do ciclo da cultura. Estima-se que no estado de Minas Gerais são empregados cerca de 7 milhões de trabalhadores durante o ciclo de produção, envolvendo aproximadamente 295 mil produtores (ABREU, 2005).

A ingestão do feijão comum pode ser uma alternativa mais barata para substituição de proteína de origem animal, com potencial de ser usada no mundo inteiro. O grão de feijão seco apresenta em média de 20-25% do peso em proteína (HAYTOWITZ; MATTHEWS, 1986). Estudos mostraram que a ingestão de feijão tem potencial de reduzir a

concentração de colesterol sérico, melhorar muitos aspectos do estado diabético, fornecer benefícios metabólicos que ajudam no controle do peso (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999). Os minerais nesta leguminosa estão prontamente disponíveis, são importantes na redução dos riscos de osteoporose (DAWSON-HUGHES et al., 1990) e hipertensão (APPEL et al., 1997).

O Brasil foi classificado como o terceiro maior produtor mundial de feijão na safra de 2013, superado por Myanmar e Índia, e seguido pelo México e República Unida da Tanzânia, entre outros (FAO, 2015). O grão foi classificado como a 19ª *commodity* mais produzida em 2012, no Brasil (FAO, 2014). A semeadura do feijão no Brasil pode ser realizada em três períodos diferentes: 1ª safra ou das “águas” que compreende os meses de setembro a novembro; 2ª safra, da “seca” ou safrinha que ocorre de janeiro a março e a 3ª safra ou de outono-inverno entre os meses de maio a julho (SILVA, 2003). Na safra 2013/14 a área total com a cultura foi de 3,366 milhões de hectares, sendo 1,180; 1,507 e 0,679 milhões de hectares, respectivamente para 1ª, 2ª e 3ª safra (CONAB, 2015). A produção na safra 2013/14 foi de 3,454 milhões de toneladas, sendo 1,259; 1,332 e 0,863 milhões de toneladas, respectivamente na 1ª, 2ª e 3ª safra (CONAB, 2015). Com relação a 1ª safra (2013/2014), a área com o cultivo do feijoeiro foi de 1,17 milhões de hectares e produtividade média de 1.093 Kg/ha. Na 2ª safra, a área ocupada com a cultura foi de 1,49 milhões de hectares, com o Estado do Paraná como o principal produtor. Já na 3ª safra, a área foi de 676,8 mil hectares e produtividade de 1.354 Kg/ha (CONAB, 2015).

A rotação com uma cultura de inverno pode beneficiar o plantio sucessivo por alterar as características físicas do solo, aumentar a cobertura remanescente sob a superfície, contribuindo com menor infestação de plantas daninhas, reduzir a erosão e manter a umidade (BALBINOT JUNIOR et al., 2009). Dados mostram que a cultura do feijão apresentou maior rendimento quando implantada bienalmente na mesma área, em sucessão com arroz/calopogônio e arroz, e menor quando em sucessão com o milho (SILVEIRA et al., 2001). Outro estudo avaliou a interferência na produtividade do preparo do solo e da rotação de cultura, sendo as melhores opções feijão rotacionado com milho em sistema de semeadura convencional e com soja na semeadura direta (ALMEIDA et al., 2008).

O feijoeiro comum pode ser cultivado ao longo de quase todo ano no país e nos mais diversos ecossistemas presentes devido à ampla adaptação edafoclimática,

além de ser uma planta exigente em nutrientes, sensível aos fatores climáticos e muito suscetível a pragas e doenças. Para contornar estes fatores deletérios na produtividade, devem-se adotar tecnologias como cultivares melhoradas, preparo adequado do solo, adubação equilibrada, técnicas avançadas de irrigação e controle de pragas, plantas daninhas e doenças (ZUCARELI, 2005).

Dentre as principais doenças de origem fúngicas que acometem a cultura, destacam-se: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*); mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*); mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*); podridão radicular seca (*Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*); ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e mela (*Thanatephorus cucumeris*). Dentre as viroses podemos destacar: mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*-BGMV); mosaico comum (*Bean common mosaic virus* – BCMV); mosaico rugoso (*Bean rugose mosaic virus* – BRMV) e mosaico amarelo (*Bean yellow mosaic virus* – BYMV). Enquanto que dentre as doenças de origem bacteriana destacam-se: crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*); murcha-de-curtobacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) e crestamento bacteriano aureolado (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*). Em outros países também já foi relatada a mancha marrom bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) (HALL, 1991; DALLA PRIA; SILVA, 2010).

4.2 Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro

O agente causal desta doença é *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* [Hedges] Collins e Jones, pertencente ao Domínio Bacteria, Classe Actinobacteria, Subclasse Actinobacteridae, Ordem Actinomycetales, Subordem Micrococccineae, Família Microbacteriaceae. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) é Gram-positiva, formato bastonete, coloniza vasos de xilema, possui mobilidade por um a três flagelos polares ou subpolares, aeróbica obrigatória, não esporulante, com formação celular simples ou aos pares e tamanho oscilando de 0,6-3,0 X 0,3-0,5 µm (VALENTINI et al., 2010).

Quando em meio de cultura contendo extrato de levedura-glicose-ágar, as colônias de Cff apresentam-se como ligeiramente convexas, normalmente com a coloração

amarela brilhante, circulares e com os bordos lisos, sem viscosidade e semifluidas, sendo que a coloração pode variar para laranja, rosa ou púrpura. A bactéria apresenta reações negativas para solubilização em hidróxido de potássio a 3%, fermentação da glicose, redução de nitrato e urease, produção de indol, produção de ácido a partir de inulina, eritritol e manitol. Cff apresenta reações positivas para catalase, hidrólise da gelatina, hidrólise da caseína, produção de ácidos a partir de manose, maltose e inositol, e tolerância ao cloreto de sódio com crescimento em meios de cultura suplementados com 7-9% (BRADBURY, 1986).

Seu primeiro relato mundial foi em 1920, no estado da Dakota do Sul, EUA, onde foi responsável pela morte de cerca de 90% das plantas em uma lavoura de feijoeiro (HEDGES, 1922). Nos anos subsequentes, foi considerada uma das principais doenças da cultura, causando perdas totais de produção em alguns anos (HEDGES, 1926). Após o primeiro relato, Cff continua presente em diferentes regiões geográficas do mundo, tais como África (ex. República da Maurícia e Tunísia), América do Norte, Central e do Sul (ex. EUA, México e Brasil, respectivamente), Europa (ex. Romênia) e Oceânia (ex. Austrália) (EPPO, 2014). A bactéria foi isolada das sementes de feijoeiro da França e da Alemanha (HEDGES, 1926). No ano de 2005, a bactéria foi detectada em *Phaseolus vulgaris* na região sudeste da Espanha (GONZÁLEZ; TELLO; RODICIO, 2005). Os últimos relatos da presença bacteriana foram na Alemanha e no Irã (SAMMER; REIHER, 2012; OSDAGHI et al., 2014). Na Bélgica, Bulgária, Grécia, Hungria, Polônia, Turquia, França e Ucrânia, a bactéria não se estabeleceu, sendo agora países considerados ausentes de Cff (EPPO, 2014). Em países da região Mediterrânea e Européia a bactéria é considerada praga quarentenária A2, estando sujeita a regulações fitossanitárias (EPPO, 2011). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 1995, no município de Itaporanga, Estado de São Paulo, em plantas de feijoeiro da cultivar Carioca (MARINGONI; ROSA, 1997). Em 2002, Leite Junior et al. detectaram Cff nos estados do Paraná e Santa Catarina. No ano seguinte, a bactéria foi descrita nos estados de Goiás e Distrito Federal (UESUGI; FREITAS; MENEZES, 2003).

Para isolamento de Cff de sementes, trabalho desenvolvido por Moraes et al. (2010) avaliaram a eficiência de dois meios de cultura para o isolamento bacteriano, MSCFF (MARINGONI; CAMARA; SOUZA, 2006) e CNS modificado (BEHLAU; NUNES; LEITE JUNIOR, 2006). Colônias típicas de Cff foram observadas em ambos os meios de cultura, porém em MSCFF a partir de 72 h após repicagem, já era possível observar colônias

de Cff, em contrapartida em CNS modificado só foi possível após 144 h de incubação, mostrando maior rapidez no crescimento de Cff em MSCFF (MORAES et al., 2010). Maringoni e Camara (2006) confirmaram a eficiência do meio de cultura semi-seletivo MSCFF em mais 30 amostras de lotes de sementes de feijão naturalmente infectadas, inferindo que o meio de cultura foi capaz de detectar Cff nas sementes de forma qualitativa e quantitativa, porém para uso rotineiro os autores recomendam a avaliação qualitativa.

A detecção de Cff com uso de iniciadores específicos pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) já foi otimizada. Os pares de iniciadores *CF4* e *CF5* amplificam um fragmento de DNA de 198 pb (GUIMARÃES et al., 2001) e os iniciadores *CffFOR2* e *CffREV4* amplificam um fragmento de DNA de 306 pb (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002). Souza, Maringoni e Krause-Sakate (2006), avaliaram a eficiência dos primers em detectar isolados de Cff, destacando-se pela especificidade os *primers* desenvolvidos por Tegli, Sereni e Surico (2002), pois dois isolados de Cff de feijoeiro não foram amplificados com os *primers CF4* e *CF5*.

4.3 Sintomatologia

No campo os sintomas podem aparecer em manchas ou “reboleiras”, sendo possível também detectar plantas infectadas isoladas na lavoura (THEODORO; MARINGONI, 2010). Os sintomas no campo caracterizam-se por murcha e flacidez dos folíolos durante os períodos mais quentes e secos do dia (SAETTLER, 1991), observando-se uma tendência dos folíolos tornarem-se flácidos durante o dia e permanecerem túrgidos durante a noite (MARINGONI; ROSA, 1997). A perda de turgescência dos tecidos se deve ao fato da bactéria colonizar os vasos do xilema, chegando a obstruí-los pelo elevado número populacional bacteriano ou degenerá-los (HEDGES, 1922).

A planta apresenta amarelecimento, também conhecido por mosaico que pode progredir para lesões necróticas, com reduzido desenvolvimento do porte da planta ou nanismo, com consequente redução na produtividade, além da permanência de murcha da parte aérea, podendo levar a planta à morte (THEODORO; MARINGONI, 2010). Na mesma planta, é possível observar folhas totalmente murchas e necrosadas em contraste com folhas saudáveis, enquanto que os vasos do xilema geralmente não adquirem coloração escura, sintoma característico de algumas doenças vasculares (THEODORO; MARINGONI, 2010). Nas

sementes de coloração clara os sintomas são caracterizados pela coloração amarela, sendo que na maioria das vezes, nenhum sintoma visível pode ser detectado (THEODORO; MARINGONI, 2010). As sementes infectadas também podem adquirir as colorações laranja ou púrpura e tornarem-se enrugadas (VALENTINI et al., 2010).

A severidade da doença e a mortalidade das plantas são geralmente maiores quando a incidência ocorre em plantas jovens ou aquelas com infecção já pela semente. Plântulas são geralmente o estágio de maior suscetibilidade, sendo que se a infecção ocorrer nas plântulas com altura em torno de 5-8 cm, dificilmente chegarão ao final do ciclo ou produzirão. Sintomas em plantas infectadas tardiamente são menos pronunciados, sendo que a doença se desenvolve e progride mais lentamente (HARVESON, URREA, SCHWARTZ, 2011).

Análise ultraestrutural sob microscopia eletrônica de transmissão demonstrou alterações morfológicas nos vasos do xilema de feijoeiro resistente à doença, semelhantes às tiloses, que são barreiras morfológicas induzidas pela planta para tentar conter a colonização bacteriana para outros órgãos e também observou-se a formação de massa fibrilar ao redor das células bacterianas, responsáveis pela formação de aglutinações entre elas. Em contrapartida, observou-se um grande número de bactérias nos vasos do xilema em cultivares suscetíveis (SOUZA et al., 2006; SOUZA; MARINGONI, 2008).

Maringoni (2003) demonstrou que plantas infectadas com a bactéria apresentam redução da massa aérea e dos teores de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio), sendo que cultivares resistentes à doença (IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Akytã) apresentam maiores quantidades de macronutrientes em comparação às cultivares suscetíveis (Pérola e IAC Carioca).

4.4 Epidemiologia

Fitobactérias podem sobreviver de estação para estação, para maioria das culturas anuais, em sementes ou órgãos propagativos, nos restos culturais infectados, em hospedeiros alternativos (também epifiticamente ou endofiticamente) ou no solo (LEBEN, 1981; VIDAVER; LAMBRECHT, 2004). Algumas fitobactérias podem sobreviver na água e outras, com sucesso, em objetos inertes, além da capacidade de sobreviverem sobre ou dentro

de insetos (VIDAVER; LAMBRECHT, 2004). No caso, Cff não apresenta nenhum vetor associado ao seu patossistema.

Em 1926, observou-se que a bactéria Cff pode ocorrer naturalmente em *Phaseolus vulgaris* e em *Phaseolus lunatus*, enquanto que inoculação artificial na cultivar Ito San de soja (*Glycine max*) foi capaz de causar doença (HEDGES, 1926).

Schuster, Smith e Smith (1982) avaliaram a população epifítica de Cff em folhas de feijoeiros suscetíveis e resistentes à doença. Verificaram que a população bacteriana aumentou nas folhas da cultivar suscetível e reduziu na resistente, em avaliações realizadas de 3-7 dias após a inoculação.

As condições ideais de temperatura para o desenvolvimento de Cff oscilam de 24 a 27 °C, sendo limitante em 37 °C (THEODORO; MARINGONI, 2010). O agente causal pode ser transmitido por sementes (SAETTLER; PERRY, 1972), é capaz de sobreviver em restos culturais ou em plantas daninhas (SAETTLER, 1991). Há duas formas da bactéria ser veiculada por sementes, a primeira sistêmica, interna ou infectando e a segunda superficial ou infestando (EPPO, 2011). Na primeira forma a bactéria pode ficar alojada nas células paliçádicas que formam a testa, sendo responsável pela transmissão de 51,4% a 52,5% de Cff em sementes de feijoeiro sob inoculação artificial, além de interferir de forma negativa na germinação das mesmas (CHAVARRO; LOPEZ; LEME, 1985). Outro trabalho também avaliou a transmissão de Cff da planta para sementes e observaram que a porcentagem de transmissão oscilou entre cultivares, sendo de 5,5-14,8% em resistentes e superou os 70% em cultivares suscetíveis (CAMARA; VIGO; MARINGONI, 2009).

A segunda forma é superficial ou infestando, caracterizada pelo desenvolvimento de uma pequena quantidade bacteriana próxima ao hilo (HEDGES, 1926). Infecções iniciais ocorrem quando a bactéria atinge o sistema vascular da planta, através do movimento das bactérias das sementes infectadas/infestadas ou ferimentos na parte aérea da planta, sendo incomum ocorrer infecções pelos estômatos (SAETTLER, 1991).

Foi observada que a infecção das sementes em desenvolvimento se origina pelo hilo, formando uma massa bacteriana que coloniza o tegumento. Durante a germinação, a infecção da plântula pode ocorrer por ferimentos radiculares provocados pelo atrito com as partículas de solo. Os embriões das sementes infectadas apresentam células

bacterianas ao seu redor que podem promover a infecção do epicótilo e do hipocótilo (SCHUSTER; SMITH, 1983).

Resultados revelaram que 62,2% das amostras de sementes de feijoeiro comum dos grupos preto e carioca, coletadas em municípios do Estado de Santa Catarina, eram portadoras da bactéria, salientando a importância das sementes como fonte de inóculo inicial (HERBES et al., 2008).

Em 1975, no Estado de Iowa (EUA), Cff foi relatada causando uma nova doença em soja, denominada *bacterial tan spot*. Os sintomas ocorrem nas folhas, não sendo observados nos caules e nas vagens. Isolados provenientes da soja e do feijão foram testados em inoculações cruzadas, sendo que todos isolados causaram manchas e murchas nas folhas de feijão e apenas isolados de soja foram capazes de causar manchas nas folhas da própria cultura. De 20 cultivares de soja testados, oito foram resistentes e 12 foram moderadamente suscetíveis (DUNLEAVY, 1983). Experimentos mostraram que o máximo de perda de produção a campo em cultivares suscetíveis de soja pode chegar a 18,8%, sendo que a média de redução foi de 12,5% (DUNLEAVY, 1984). Cff também foi relatada na cultura da soja na Alemanha, sendo os sintomas caracterizados por manchas cloróticas nas folhas, que secam e adquirem a coloração marrom, sendo que plântulas podem morrer quando infecções ocorrem precocemente e, em poucos casos, podem causar murchas (SAMMER; REIHER, 2012). Cff foi detectada em complexo com *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* a campo, identidade realizada por sequenciamento da região 16S do rDNA, infecção artificial e reisolamento em plantas de soja e feijão (SAMMER; REIHER, 2012). Na cultura da soja no Brasil, Cff teve a primeira constatação a campo na safra 2011/2012, causando doença nas folhas em plantios comerciais e experimentais de soja no Estado do Paraná (SOARES et al, 2013).

Outras plantas podem ser hospedeiras de Cff, como feijão-mungo (*Vigna radiata*) (TRIPEPI; GEORGE, 1991), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (WOOD; EASDOWN, 1990) e *Vigna mungo* (SCHWARTZ et al., 2005). De acordo com Huang et al. (2009), citam também como hospedeiras as espécies *V. angularis*, *P. coccineous*, *P. lunatus*, *V. sesquipedalis* e *Dolichos lablab*. Schuster e Sayre (1967) observaram que um isolado de coloração púrpura de Cff foi patogênico à ervilha (*Pisum sativum*), *Lupinus polyphyllus*, *V. cylindrina*, *P. calcaratus*, *P. Lathyroides* e *P. acutifolius*. Os autores destacam que há

diferença de reação varietal com certas espécies hospedeiras suscetíveis, verificando que as sementes podem descolorir no gênero *Phaseolus*, nas espécies *P. vulgaris*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*. Cff também foi capaz de sobreviver em plantas não hospedeiras como *Amaranthus retroflexus* e *Chenopodium album* (SCHUSTER, 1959).

Silva Júnior et al. (2012a) avaliaram a patogenicidade de um isolado de Cff em diversas espécies vegetais, dentre elas o feijoeiro, sendo os sintomas caracterizados por necrose circundada por um halo amarelo, localizados nas extremidades dos folíolos. Já em plantas de soja inoculadas por pulverização na parte aérea, os sintomas também foram de necroses circundadas por um halo amarelo nas extremidades foliares e necrose com halo amarelo na parte central do limbo foliar, tendo aspecto áspero. A bactéria colonizou de forma endofítica as hastes de plantas de trigo inoculadas por ferimento na haste ou pulverização da parte aérea.

C. flaccumfaciens já foi recuperada da filosfera do trigo em duas safras consecutivas, tanto em experimento conduzido em casa de vegetação como a campo (LEGARD et al., 1994). Harveson, Urrea e Schwartz (2011) observaram a presença da bactéria na cultura do feijão em rotação com outras culturas como soja, trigo, milho, girassol e alfafa, sendo que esses isolados foram encontrados em associação com outras bactérias fitopatogênicas, levantando-se a hipótese de sobrevivência de Cff nos restos culturais das outras culturas mencionadas anteriormente. *C. flaccumfaciens* já foi relatada colonizando de forma epifítica o amendoim (JACOBS; SUDIN, 2001) e *C. herbarum* em gramíneas (BEHRENDT et al., 2002). Observações à campo no Brasil têm mostrado que a incidência da doença é maior após a instalação do cultivo de feijoeiro em áreas com cultivos prévios de aveia, porém não há constatação científica (MARINGONI, A. C.; comunicação pessoal).

C. flaccumfaciens já foi relatada colonizando de forma endofítica plantas de citros (ARAUJO et al., 2002). Segundo Belmonte (2009), isolado endofítico de *C. flaccumfaciens* de citros não foi patogênico ao feijoeiro. Bactérias endofíticas podem ser definidas como aquelas com capacidade de colonizar os órgãos internos do tecido vegetal, sem exteriorizar nenhum sintoma ou efeito negativo para planta colonizada (HOLLIDAY, 1989; SCHULZ; BOYLE, 2006). Espaços intercelulares e vasos do xilema são os locais mais comumente relatados para bactérias endofíticas (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; SPRENT; JAMES, 1995). Na literatura encontra-se mais citações do gênero *Curtobacterium*

colonizando de forma endofítica outras plantas, por exemplo, *C. luteum* em batata (STURZ; MATHESON, 1996); *C. flaccumfaciens* em trevo (STURZ et al., 1997); pinus (BENT; CHANWAY, 1998); sorgo, milho (ZINNEIL et al., 2002) e inhame (TOR; MANTTELL; AINSWORTH, 1992).

Trabalho recente salientou a importância da rotação de cultura do feijoeiro com outras espécies não pertencentes à família Fabaceae no Irã, pois Cff foi capaz de colonizar as espécies *V. unguiculata*, *P. lunatus*, *V. radiata*, *P. sativum*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum*, *G. max*, *Vicia faba* e *Vicia villosa* (OSDAGHI et al., 2015).

O solo constitui um dos maiores reservatórios de biodiversidade de microrganismos, podendo ser encontrado centenas de milhares de táxons em um único grama de solo (FIERER; LENNON, 2011; ROUSK et al., 2010). A maioria das bactérias fitopatogênicas apresenta dificuldade em sobreviver no solo, fato que pode ser explicado por geralmente não produzirem estruturas de resistência como endósporos e pelo efeito antagônico que muitos microrganismos exercem, produzindo substâncias como os antibióticos que inibem o crescimento de outras espécies. Solos enriquecidos com matéria orgânica tendem a aumentar o número de microrganismos antagonistas (BRIAN, 1957; PATRICK, 1954; SCHUSTER E COYNE, 1974).

A composição textural do solo também pode interferir na sobrevivência das bactérias. Hattori (1973) observou que em solo argiloso com baixa umidade, bactérias Gram negativas sobreviveram por mais tempo nos agregados das argilas em comparação com a superfície. Os autores supõem que a bactéria sobreviveu por maior tempo nos agregados argilosos pela maior disponibilidade de água, fato que pode ajudar a explicar a baixa sobrevivência em solos arenosos, em que praticamente não há formação de agregados. Marshall (1971) analisou que os agregados argilosos formam um envelope ao redor das células bacterianas, devido a atração eletrostática entre os grupos carregados na superfície da argila e das bactérias. Esse invólucro pode proteger a bactéria da dessecação e reidratação do solo.

Há três possibilidades de fitobactérias sobreviverem no solo, a primeira relaciona-se ao estado hipobiótico, em que a mesma torna-se menos suscetível aos agentes degradantes do meio, a segunda refere-se à sobrevivência na rizosfera de plantas hospedeiras ou não da fitobactéria (LEBEN, 1981). Como exceção, há uma terceira forma em

que algumas fitobactérias podem permanecer em estágio viável, mas não culturável (viable but non culturable - VBNC), em que a célula bacteriana permanece viável porém incapaz de crescer em meio de cultura não seletivo em quantidade suficiente para detecção visual, sendo o caso de *Ralstonia solanacearum*, mecanismo que permite a viabilidade por um longo tempo em estado dormente para bactérias não esporulantes (GREY; STECK, 2001). O período de sobrevivência pode ser influenciado por fatores bióticos, tais como a grande biodiversidade de microrganismos presentes, além dos fatores abióticos, como umidade, temperatura, pH, aeração, além das características químico-físicas do solo (LENNON et al., 2012; DE BOER, 1982).

Cff é resistente a secagem, podendo permanecer viável por 24 anos em sementes armazenadas a temperatura ambiente (BURKHOLDER, 1945); no campo pode sobreviver no solo por pelo menos dois invernos na cultura de feijão; a bactéria pode infectar na ausência de chuva, sendo incomum a infecção pelos estômatos (EPPO/CABI). Trabalho mostrou que Cff pode sobreviver por até 240 dias nos restos culturais de feijoeiro na superfície do solo, porém o período de sobrevivência reduziu para 30 dias quando restos de cultura foram incorporados a 20 cm de profundidade (SILVA JÚNIOR et al., 2012b). Cff pode sobreviver por dois anos associada a sementes no solo ou mais se as condições de armazenamento forem ótimas (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002). A bactéria também foi capaz de sobreviver em condições controladas, permanecendo viável e causando sintomas, por aproximadamente 700 dias (22 meses) em solo de cerrado coletado de um plantio de feijoeiro naturalmente infestado (MIRANDA FILHO, 2010).

Analisando-se o que foi exposto, observa-se que carecem informações científicas sobre aspectos epidemiológicos de Cff para a cultura do feijoeiro nas condições do Brasil, desde seu comportamento epi ou endofítico em culturas rotacionadas com o feijoeiro, bem como o solo como fonte de inóculo de células livres de Cff para plantios posteriores.

4.5 Controle da doença

O controle da doença está embasado na aquisição de sementes sadias, rotação de culturas por 2-3 anos, incorporação dos restos culturais, eliminação de plantas voluntárias em plantios sucessivos, observar o histórico de ocorrência da doença em novas área antes do plantio e uso de cultivares resistentes (SAETTLER, 1991; MARINGONI, 2002;

MARINGONI; CAMARA, 2006; THEODORO; MARINGONI, 2010; HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011). Até o momento, não há conhecimento de nenhum método químico eficaz em controlar a doença.

Com relação a influência da adubação na incidência da doença, Theodoro e Maringoni (2006b) observaram que cinco doses diferentes de cloreto de potássio (135,0; 112,5; 90,0; 67,5 e 45,0 Kg/ha), não interferiram na incidência da doença. Porém, com relação à adubação nitrogenada na forma de uréia, em experimento conduzido em casa de vegetação com a dose 50% acima do recomendado para a cultura, essa dose influenciou positivamente o progresso da doença para a cultivar IAC Carioca Pyatã, aumentou a quantidade de N na parte aérea e não interferiu no peso da matéria seca das plantas (THEODORO; MARINGONI, 2006a). Ou seja, a fertilidade do solo deve ser corrigida pela adubação embasada na análise de solo e recomendações para a cultura, evitando-se sobremaneira a adubação nitrogenada (THEODORO; MARINGONI, 2006a).

Rodrigues, Silva Júnior e Maringoni (2006) avaliaram em casa de vegetação a interferência do lodo de esgoto na severidade da doença na cultivar Pérola, verificando-se que não houve redução na severidade e que concentrações de lodo de esgoto superiores a 5% (p:v) foram fitotóxicos ao feijoeiro, reduzindo a massa seca da parte aérea.

Outra pesquisa desenvolvida em casa de vegetação foi o uso de indutor de resistência para controle da doença. O indutor avaliado foi acibenzolar-S-methyl, nas cultivares IAC Carioca, IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã, o qual foi ineficiente para o controle da doença na cultivar suscetível (IAC Carioca), como também para promover o incremento dos níveis de resistência nas outras duas cultivares resistentes (SOARES; MARINGONI; LIMA, 2004).

Estefani, Miranda Filho e Uesugi (2007) avaliaram a eficiência da quimioterapia (sulfato de cobre + oxitetraciclina) e termoterapia na erradicação de Cff da semente. Observaram-se que períodos de embebição em água superiores a 1 h afetaram negativamente a qualidade fisiológica das sementes. O tratamento químico com a maior concentração foi eficiente para eliminação das bactérias naturalmente contaminadas nas sementes, enquanto que em sementes inoculadas artificialmente o produto não se mostrou efetivo, além de promover redução da qualidade fisiológica das sementes. Tratamento térmico

com as sementes previamente embebidas por 2 h em água, apesar de redução da qualidade fisiológica, apresentaram redução das células bacterianas presentes nas sementes.

O controle biológico para o tratamento de sementes de feijoeiro com Cff foi avaliado utilizando-se embebição das sementes em suspensão de *Pantoea agglomerans*, ajustada a 3×10^8 UFC/mL, por 1 h, ou aplicando-se no solo 24 h após a semeadura de sementes de feijoeiro, previamente inoculadas com Cff, observando-se que *P. agglomerans* não interferiu na germinação das sementes e que este controle biológico pode ser uma alternativa, sendo necessários mais estudos para uso da técnica a campo (HSIEH; HUANG; ERICKSON, 2005). Outro microrganismo avaliado foi *Rhizobium leguminosarum* para biocontrole da bactéria em sementes, apresentando redução da incidência e severidade da doença e aumento da emergência e peso de plântulas, empregando-se sementes artificialmente inoculadas ou sementes coletadas no campo sem sintomas visíveis ou com sintomas leves, 1 a 25% das sementes com descoloração amarela (HUANG; ERICKSON; HSIEH, 2007). Também avaliaram-se o tratamento de sementes de feijoeiro com *Bacillus subtilis* para inibir Cff sob diferentes temperaturas e foi observado que na presença da maior temperatura (30 °C), houve maior colonização da planta tanto por Cff como pelo antagonista, porém a redução da doença obtida com o tratamento de sementes foi semelhante nas temperaturas testadas (variando de 71 a 75%) (MARTINS et al., 2014).

Outra forma de controlar a doença é com o emprego de cultivares resistentes. Várias pesquisas já foram desenvolvidas no Brasil com o objetivo de identificar cultivares com moderados a altos níveis de resistência à murcha-de-curtobacterium, dentre eles pode-se destacar o IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã, Mouro Piratuba, Vagem amarela, IAPAR 31, IAPAR MD 841, Santa Fé, Roxinho, Roxinho Antigo, Roxão de Caxo, Roxão e Trilha de Ferro, Ouro Branco, IPA 9, Vermelho Desconhecido e Ovo de Codorna Tyunaga (BEHLAU; LEITE JUNIOR, 2002; CAMARA; VIGO; MARINGONI, 2009; MARINGONI, 2002; THEODORO; HERBES; MARINGONI, 2007; THEODORO; MARINGONI, 2010). Triagem da resistência genética de 333 acessos de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, aliada com observação dos vasos do xilema sob microscopia eletrônica de varredura, possibilitou agrupar os genótipos de feijoeiro em quatro grupos de resistência, sendo 8,7% altamente resistentes; 3,9% resistentes; 5% moderadamente resistentes e 81% suscetíveis; sendo que 18%, desde altamente a

moderadamente resistentes, poderão ser úteis para programas de melhoramento genético (SOUZA et al., 2006).

Foi avaliada no Canadá a resistência de 124 acessos de feijoeiro comum quanto a inoculação de Cff, identificando-se as linhagens L02E317, Resolute, L02B662 e 999S-2A com alta resistência à bactéria. Com isso, há no banco de germoplasma de feijoeiro canadense cultivares e linhagens resistentes a Cff que constituem fontes de resistência para programas de melhoramento genético do feijoeiro à isolados amarelos e alaranjados de Cff (HSIEH et al., 2005).

Analisaram-se 467 acessos de genótipos de feijoeiro comum quanto a resistência para bactéria Cff, com o intuito de desenvolver uma cultivar resistente para os EUA. Apenas um genótipo mostrou-se resistente a doença, denominado PI 325691, originário da região sul de Tzitzio, Michoacán, México, porém o tamanho do seu grão é pequeno comparado com os padrões comerciais, havendo necessidade de vários cruzamentos para transferir a resistência à doença para cultivares com tamanho de grão aceitável comercialmente (URREA; HARVESON, 2014).

Avaliaram-se a reação de 20 cultivares de soja [EMBRAPA 46, EMBRAPA 47, EMBRAPA 48, EMBRAPA 58, EMBRAPA 59, EMBRAPA 60, EMBRAPA 61, EMBRAPA 62, BRS 66, BRS 132, BRS 133, BRS 134, BRS 135, BRS 136, BRS 155, BRS 156, BRS 157, IAC/BR-21, MG/BR-46 (Conquista) e MG/BR-48 (Garimpo RCH)] à inoculação de Cff isolado de feijoeiro, sob condições controladas. Os autores observaram baixo nível de severidade da doença nas cultivares de soja, independentemente do método de inoculação empregado (MARINGONI; SOUZA, 2003).

A resistência de 19 cultivares de soja também foi avaliada sob condição de casa de vegetação à mancha bacteriana marrom, com o isolado CFF 4 (BRS 133, BRS 184, BRS 232, BRS 257, BRS 262, BRS 282, BRS 284, BRS 317, BRS 361, BRS 295RR, BRS 316RR, BRS 334RR, BRS 359RR, BRS 360RR, BMX Potencia RR, BMX Apolo RR, NA 5909RG, NS 5858RR, Vmax RR (NK 7059RR)). Os autores salientam que nenhuma cultivar avaliada foi resistente, sendo a minoria moderadamente resistente e a maioria suscetível à doença (BRACALE; SOARES, 2014).

4.6 Taxonomia e variabilidade genética de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os objetivos da taxonomia são de classificar, nomear e identificar os organismos. Atualmente o objetivo da taxonomia também reflete o histórico evolucionário do organismo. As características fenotípicas mostraram-se inadequadas porque elas podem ser compartilhadas por organismos não relacionados. Hoje as espécies bacterianas são definidas baseadas em similaridades genotípicas entre isolados. O conceito de espécie bacteriana pode ser definido como um grupo de isolados que compartilham similaridades genotípicas e fenotípicas comuns (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). Em outras palavras, espécie é um grupo de isolados que apresentam aproximadamente 70% ou mais de similaridade DNA-DNA e com 5 °C ou menos na variação da temperatura de desnaturação (ΔT_m) (MARTENS et al., 2008).

Na descrição da doença em 1920, a bactéria recebeu a denominação de *Bacterium flaccumfaciens* (HEDGES, 1922). De acordo com Coelho et al. (2004), posteriormente recebeu uma série de denominações diferentes, sendo *Phytomonas flaccumfaciens*, *Pseudomonas flaccumfaciens*, *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens*. Após receber esta série de sinônimos, baseando-se em estudos de perfis de proteínas celulares através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a bactéria foi reclassificada para o gênero *Curtobacterium*, denominando-se *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (HEDGES, 1922) Collins; Jones, 1983.

Técnicas moleculares provaram-se precisas e confiáveis para identificação de espécies. Sequenciamento da região 16S do rDNA é preciso para identificação de gênero bacteriano (DRANCOURT et al., 2000; HARMSSEN; KARCH, 2004; JANDA; ABBOTT, 2007) e análise de sequências multilocus (MLSA) é suficientemente preciso para identificar espécies (NASER et al., 2005; BRADY et al., 2008).

Dentre os seres vivos, os microrganismos apresentam elevada variabilidade genética. Aliada com o uso de ferramentas moleculares para análise de ácidos nucleicos, esta compreensão da diversidade pode ser melhor elucidada e contribuir para novos avanços das pesquisas, principalmente na obtenção de cultivares de feijoeiro com resistência à doença.

Análise da variabilidade genética do gene 16S rDNA tem sido largamente utilizada. Este gene é bastante utilizado em estudos taxonômicos e de variabilidade genética em bactérias por possuir múltiplas cópias que não codificam proteínas, por ser muito conservado, estar presente em todos os organismos e apresentar um tamanho suficiente para análises filogenéticas (WOESE, 1987; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Após amplificação e sequenciamento do gene, o mesmo pode ser analisado por grau de similaridade em diferentes bancos gênicos, permitindo a identificação dos isolados ao nível de gênero e, possivelmente, ao nível de espécie (CHÈNEBY et al., 2000).

A técnica de análise de sequências multilocus (MLSA) tem se mostrado eficaz e útil para tipificação de grande número de microrganismos envolvendo estudos de populações, delineamento de espécie e atribuição de espécie correta para isolados, permitindo elucidação das relações genômicas a nível inter e intraespecífico (MAIDEN et al., 1998; SPRATT, 1999). O método consiste na análise de vários genes conservados no genoma denominados *housekeeping* (MAIDEN et al., 1998; COOPER; FEIL, 2004; DELAMUTA et al., 2012). Estes genes estão envolvidos na produção de proteínas, responsáveis pela manutenção das funções metabólicas vitais, sendo produzidos em taxas constantes (ALMEIDA et al., 2010). Ou seja, MLSA baseia-se na comparação de sequências de vários genes que codificam proteínas conservadas e podem determinar a diversidade e relação filogenética entre táxons, usando dendrogramas construídos a partir dos dados das sequências (ALMEIDA et al., 2010). Há três principais abordagens para construção dos dendrogramas ou árvores filogenéticas: distância matriz, parcimônia máxima e probabilidade máxima. Estes são baseados em modelos evolucionários que definem probabilidades para a transição de um nucleotídeo para o outro (HARAYAMA; KASAI, 2006).

O método é uma versão atualizada da eletroforese enzimática multilocus (*multilocus enzyme electrophoresis* – MLEE), com variações nos genes *housekeeping* na base de diferenciação da mobilidade eletroforética das proteínas (SELANDER et al., 1986). Um dos problemas mais significativos das técnicas baseadas em eletroforese em gel, tais como AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) é a dificuldade de comparação dos resultados entre laboratórios (COOPER; FEIL, 2004). O nível de discriminação da técnica MLSA depende do número e tipo de genes utilizados, do comprimento dos fragmentos e do grau de diversidade

na amostra sendo caracterizada. Zeigler (2003) demonstrou que há boa correlação entre MLSA e hibridização DNA-DNA, possibilitando o uso de MLSA para identificação de espécies bacterianas.

A técnica MLSA tem sido amplamente utilizada em filogenia, epidemiologia, relações evolucionárias e taxonomia (melhorando as classificações). Sua maior vantagem consiste nos resultados de sequenciamento, que são portáteis e não ambíguos, possibilitando a troca de informações via internet (SPRATT, 1999). A análise de 4-8 genes *housekeeping* é suficiente para subdivisão da maioria das espécies bacterianas (COOPER; FEIL, 2004). MLSA permite conduzir estudos epidemiológicos para monitorar epidemias (SPRATT, 1999).

MLSA tem sido utilizado em diferentes contextos. Por exemplo, isolados não patogênicos de *Clavibacter michiganensis* foram claramente separados de outras subespécies e de isolados patogênicos empregando-se os genes *housekeeping atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppK*, *recA* e *rpoD* (JACQUES et al., 2012). MLSA mostrou-se ser prático e seguro para identificação e classificação do gênero *Ensifer*, quando comparado com o gene 16S rDNA e hibridização DNA-DNA (MARTENS et al., 2008). MLSA mostrou-se altamente reprodutível associado ao baixo custo e rápida identificação de todas espécies de *Enterococcus* (NASER et al., 2005). MLSA possibilitou a caracterização da diversidade genética entre populações de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, coletadas durante 11 anos (TANCOS; LANGE; SMART, 2015).

Segundo Belmonte (2009), o sequenciamento da região 16S rDNA possibilitou o agrupamento dos isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros separadamente das demais espécies analisadas. O autor inferiu que os isolados endofíticos de citros apresentaram genótipos divergentes, sugerindo que estes isolados poderiam pertencer a uma nova espécie ou subespécie de *Curtobacterium*.

Guimarães et al. (2003) caracterizaram diferentes patovares de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* por AFLP, rep-PCR e PFGE, inferindo que todos os isolados foram corretamente atribuídos os patovares utilizando a digestão de macrorestrição com as enzimas *HindIII* e *XbaI* em conjunto com PFGE. O padrão de bandas gerado pela PFGE não somente confirmou as classificações de patovares atuais dentro de *C.*

flaccumfaciens, como também eles identificaram subgrupos com patovares *flaccumfaciens*, *oortii* e *poinsettiae*.

Diferentes isolados de Cff nos EUA, inclusive de hospedeiros alternativos, apresentaram diversidade fenotípica e genotípica quando estudados por AFLP, PFGE e rep-PCR, sendo que as três técnicas mostraram grande grau de heterogeneidade na população, porém não houve congruência na formação dos agrupamentos. A análise de composição de grupos do conjunto de resultados possibilitou a construção de dois grupos distintos, sendo que os autores sugerem a utilização de isolados de ambos os grupos para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e em programas de melhoramento para a seleção de cultivares resistentes (AGARKOVA et al., 2012).

No Brasil, a variabilidade dos isolados de Cff foi analisada pela técnica da rep-PCR com os iniciadores REP, ERIC e BOX, os quais mostraram-se geneticamente heterogêneos, porém também não houve congruência com relação aos agrupamentos formados com relação ao local de origem dos isolados (SOUZA; MARINGONI; KRAUSE-SAKATE, 2006).

O primeiro estudo utilizando a técnica MLSA foi com organismos pertencentes a Vibrionaceae e foi apontado ser mais discriminatório entre espécies do que sequências 16S do rDNA (THOMPSON et al., 2005). Para bactérias pertencentes à família Microbacteriaceae, os genes conservados da subunidade B da DNA girase (*gyrB*), subunidade B da RNA-polimerase (*rpoB*), recombinase A (*recA*) e polifosfatase quinase (*ppK*) mostraram-se eficientes para agrupamento de diferentes gêneros e até para sugestão de uma nova classificação de isolado (RICHERT et al., 2007).

Desta forma, o estudo da diversidade genética de isolados de Cff originários de diferentes locais e hospedeiros pode contribuir com avanços em outras áreas, tais como para o melhoramento genético da cultura. Até o momento não há estudos da diversidade genética de Cff empregando-se a técnica de MLSA, sendo que esta é uma das mais indicadas para este tipo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. F. B. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais. **Embrapa Arroz e Feijão**, n. 6, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/index.htm>>. Acesso em: ago. 2012.
- AGARKOVA, I. V.; LAMBRECHT, P. A.; VIDAVER, A. K.; HARVESON, R. M. Genetic diversity among *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* populations in the American High Plains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 788-801, 2012.
- ALMEIDA, N. F.; SHUANGCHUN, Y.; CAI, R.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. **Phytopathology**, v. 100, p. 208-215, 2010.
- ALMEIDA, V. P.; ALVES, M. C.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, S. A. Rotação de culturas e propriedades físicas e químicas em latossolo vermelho de cerrado sob prepare convencional e semeadura direta em adoção. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 1227-1237, 2008.
- ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 464S-474S, 1999.
- APPEL, L. J.; MOORE, T. J.; OBARZANEK, E. et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1117-1124, 1997.
- ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W., JR.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AND AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- BALBINOT JUNIOR, A. A.; MORAES, A.; VEIGA, M.; PELISSARI, A.; DIECKOW, J.; CARVALHO, P. C. F. Desempenho da cultura do feijão após diferentes formas de uso do solo no inverno. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2340-2346, 2009.
- BEHLAU, F.; LEITE JUNIOR, R. P. Reação de genótipos de feijoeiro à murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Universidade Estadual de Maringá – PR, 2002.

BEHLAU, F.; NUNES, L. M.; LEITE JR., R. P. Semi-selective medium for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and on bean seeds. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 394-396, 2006.

BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SCHUMANN, P.; NAUMANN, D.; SUZUKI, K. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and 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**, v. 52, 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**, v. 44, p. 980-988, 1998.

BRACALE, M. F.; SOARES, R. M. Resistência de cultivares de soja a mancha bacteriana marrom, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: IX JORNADA ACADEMICA DA EMBRAPA SOJA – Resumos expandidos, Documentos 352, Londrina/PR, julho 2014.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, Oxfordshire, UK, 1986, 332pp.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; VANCANNEY, M.; SWINGS, J.; COUTINHO, T. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 447-460, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF : Mapa/ACS, 2009. 200p.

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.

BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogen causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, v. 35, p. 743-744, 1945.

CAMARA, R. C.; VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C. Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, p. 549-554, 2009.

CHAVARRO, C. A.; LOPEZ, G. C. A.; LEME, J. M. Características y patogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) dows agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto en el rendimiento de *Z. glabra* ciat 7847 y *Phaseolus vulgaris*. **Acta Agronomica**, v. 35, p. 64-79, 1985.

CHÈNEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HÉNAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, p. 121-128, 2000.

COELHO, M. V. S.; GUIMARÃES, P. M.; MARQUES, A. S. A.; MARTINS, O. M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, murcha bacteriana do feijoeiro e da soja: alto risco de disseminação no Brasil. Embrapa, Brasília, Brasil, 9 p., 2004 (Comunicado técnico, 117).

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**, v. 129, p. 3545-3548, 1983.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos – safra 2013/14**, n. 10 – Décimo levantamento, p. 1-85. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_07_09_09_36_57_10_levantamento_de_graos_julho_2014.pdf>. Acesso em: nov. 2015.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **TRENDS in Microbiology**, v. 12, p. 373-377, 2004.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 555 p., 1988.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. Cultura do feijão: doenças e controle. Ponta Grossa, UEPG, 454 p., 2010.

DAWSON-HUGHES, B.; DALLAL, G. E.; KRALL, E. A.; SADOWSKI, L.; SAHYOUN, N.; TANNENBAUM, S. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 878–883, 1990.

DE BOER, S. H., 1982. Survival of phytopathogenic bacteria. In: Mount M.S., Lacy G.H. (eds). **PHYTOPATHOGENIC PROKARYOTES**, pp. 285-305. Academic Press, New York, USA.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 2, p. 698-710, 2012.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.; GAYRAL, J. P. ; RAOULT, D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623-3630, 2000.

DUARTE DE MORAES, M. H.; FRARES, V. C.; OTTONI, J. R.; BALANI, D. M.; VAZ MONDO, V. H.; MENTEN, J. O. M. Avaliação de dois meios de cultura semi-seletivos para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 385-389, 2010.

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

DUNLEAVY, J. M. Yield losses in soybeans caused by bacterial tan spot. **Plant Disease**, v. 6, p. 774-776, 1984.

EPPO/CABI. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. EPPO Data sheets on quarantine pests. Prepared by CABI and EPPO for the EU under contract 90/399003.

EPPO. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. OEPP/EPPO Bulletin, v. 41, p.320-328, 2011.

EPPO. 2014. PQR-EPPO database on quarantine pests (available online). Disponível em: <<http://www.eppo.int>>. Acesso em: ago. 2014.

ESTEFANI, R. C. C.; MIRANDA FILHO, R. J.; UESUGI, C. H. Tratamentos térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade fisiológica das sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 434-438, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT, Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: ago. 2014.

FIERER, N.; LENNON, J. T. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 439–448, 2011.

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

GREY, B. E.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3866-3872, 2001.

GUIMARÃES, P. M.; PALMANO, S.; SMITH, J. J.; GROSSI DE SÁ, M. F.; SADDLER, G. S. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 1-10, 2001.

GUIMARÃES, P. M.; SMITH, J. J.; PALMANO, S.; SADDLER, G. S. Characterisation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 817-825, 2003.

HALL, R. Compendium of bean diseases. APS Press, St. Paul, 73 p., 1991.

HARAYAMA, S.; KASAI, H. Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In: STACKEBRANDT, E. **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. Berlin: Springer, 2006. p. 105-139.

HARMSSEN, D.; KARCH, H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. **ASM News**, v. 70, p. 19-24, 2004.

HARVESON, R. M.; URREA, C. A.; SCHWARTZ, H. F. Bacterial wilt of dry beans in Western Nebraska. Lincoln Extension: University of Nebraska, **Institute of Agriculture and Natural Resources**, Revised 2011. Disponível em:
<<http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf>> Acesso em: ago. 2012.

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

HAYTOWITZ, D. B.; MATTHEWS, R. H. Legumes and legume products. Washington, DC: US Department of Agriculture, 1986: p. 1-156.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by bacterium *flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, v. 60, p. 433-434, 1922.

HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccum-fasciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, v. 16, p. 1-22, 1926.

HERBES, D. H.; THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C.; PIVA, C. A.; ABREU, L. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p. 153-156, 2008.

HOLLIDAY, P. (1989). A Dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press, Cambridge.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. **Journal Phytopathology**, v. 153, p. 608-614, 2005.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; MÜNDEL, H. H.; CONNER, R. L.; ERICKSON, R. S.; BALASUBRAMANIAN. Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal Phytopathology**, v. 153, p. 245-249, 2005.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F.; CONNER, R. L.; BALASUBRAMANIAN, P. M. Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, p. 290-300, 2009.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, 26: 1055-1061, 2007.

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

JACQUES, M. A.; DURAND, K.; ORGEUR, G. ; BALIDAS, S. ; FRICOT, C. ; BONNEAU, S. ; QUILLÉVÉRÉ, A. ; AUDUSSEAU, C. ; OLIVIER, V. ; GRIMAULT, V. ; MATHIS, R. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8388-8402, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2761-2764, 2007.

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

LEGARD, D. E.; MCQUILKEN, M. P.; WHIPPS, J. M.; FENLON, J. S.; FERMOR, T. R.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J.; LYNCH, J. M. Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 50, p. 87-101, 1994.

LEITE JUNIOR, R. P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S. R.; BIANCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 303-304, 2002.

LENNON, J. T.; AANDERUD, Z. T.; LEHMKUHL, B. K.; SCHOOLMASTER JR., D. R. Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. **Ecology**, v. 93, p. 1867-1879, 2012.

MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MARINGONI, A. C. Alterações nos teores de macronutrientes em plantas de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27: 217-222, 2003.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 451-455, 2006.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C.; SOUZA, V. L. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 117-124, 2006.

MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*Curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 157-162, 2002.

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

MARINGONI, A. C.; SOUZA, E. L. C. Reação de cultivares de soja e isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, proveniente de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, 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.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. ; DE VOS, P. ; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies : a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTINS, S. J.; MEDEIROS, F. H. V.; SOUZA, R. M.; VILELA, L. A. F. Is *curtobacterium* wilt biocontrol temperature dependet? **Acta Scientiarum**, v. 36, p. 409-415, 2014.

MIRANDA FILHO, R. J. **Etiologia, epidemiologia e fisiologia da murcha de *Curtobacterium***. 2010. 107 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2010. Cap. 3. Disponível em: <

http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=6323>. Acesso em: 27 jan. 2015.

MORAES, M. H. D.; FRARE, V. C.; OTTONI, J. R.; BALANI, D. M.; VAZ MONDO, V. H.; MENTEN, J. O. M. Avaliação de dois meios de cultura semi-seletivos para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 385-389, 2010.

NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, v. 151, p. 2141-2150, 2005.

OSDAGHI, E.; SARDROOD, B. P.; BAVI, M.; OGHAN, N. A.; KIMIAEI, S.; HADIAN, S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing cowpea bacterial wilt in Iran. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p. 653-656, 2014.

OSDAGHI, E.; TAGHAVI, S. M.; FAZLIARAB, A.; ELAHIFARD, E.; LAMICHHANE, J. R. Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: an emerging pathogen in Iran. **Crop Protection**, v. 78, p. 185-192, 2015.

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

REINHOLD-HUREK, B., AND HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 29-54, 1998.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoD*, *recA* and *ppK* and 16SrRNA genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 102-108, 2007.

RODRIGUES, R. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; MARINGONI, A. C. Efeito da aplicação de lodo de esgoto na severidade da murcha de *Curtobacterium* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 82-84, 2006.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.

ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 4, p. 1340-1351, 2010.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: Hall, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1991, p. 29-32.

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

SAMMER, U. F.; REIHER, K. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Germany – A threat for farming. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 314-316, 2012.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. UFV, 2008. Cap. 3, p. 41-65.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. (2006) What are endophytes? Microbial Root Endophytes (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds), pp. 1–13. Springer-Verlag, Berlin.

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

SCHUSTER, M. L.; Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Report**, v. 43, p. 25-32, 1959.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae. **Phytopathology**, v. 57, 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**, v. 7, p. 209-212, 1982.

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

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; HALL, R.; FORSTER, R. L. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 873–884, 1986.

SILVA, C. C. Cultivo do Feijoeiro Comum. **Embrapa Arroz e Feijão**, n. 2, 2003. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/plantio.htm>>. Acesso em: ago. 2012.

- SILVA JÚNIOR, T. A. F.; ITAKO, A. T.; NEGRÃO, D. R.; MARINGONI, A. C. Pathogenicity of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* to several plant species. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 427-430, 2012a.
- SILVA JÚNIOR, T. A. F.; NEGRÃO, D. R.; ITAKO, A. T.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 331-337, 2012b.
- SILVEIRA, P. M.; SILVA, O. F.; STONE, L. F.; SILVA, J. G. Efeitos do preparo do solo, plantio direto e de rotações de culturas sobre o rendimento e a economicidade do feijoeiro irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 257-263, 2001.
- SOARES, R. M.; FANTINATO, G. G. P.; DARBEN, L. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; SEIXAS, C. D. S.; CARNEIRO, G. E. S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 452-454, 2013.
- SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Ineficiência de acilbenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 373-377, 2004.
- SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C. Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 318-320, 2008.
- SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 339-344, 2006.
- SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 170-176, 2006.
- SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.
- SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 312-316, 1999.
- SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. 1995. N₂-fixation by endophytic bacteria: Questions of entry and operation. Pages 15-30 in: *Azospirillum* VI and Related Microorganisms. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, 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**, v. 184, p. 265-271, 1996.

TANCOS, M. A.; LANGE, H. W. ; SMART, C. D. Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. **Phytopathology**, v. 105, p. 169-179, 2015.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337, 2002.

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**, v. 31, p. 1333-1339, 2007.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Efeito de doses de nitrogênio na severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 131-138, 2006a.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Efeito de doses de potássio na severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 139-146, 2006b.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-*Curtobacterium*. In: PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Paraná: UEPG, 2010. Cap. 2, p. 23-30.

THOMPSON, F. L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107-5115, 2005.

THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J.; Genomic diversity amongs *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 520-538, 2001.

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

TRIPEPI, R. R.; GEORGE, M. W. Identification of bacteria infecting seedlings of mung bean used in rooting bioassays. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 80-84, 1991.

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

URREA, C. A; HARVESON, R. M. Identification of Sources of Bacterial Wilt Resistance in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Disease**, v. 98, p. 973–976, 2014.

VALENTINI, G.; GUIDOLIN, A. F.; BALDISSERA, J. N. C.; COIMBRA, J. L. M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Revista Biotemas**, v. 23, p. 1-8, 2010.

VIDAVER, A. K.; LAMBRECHT, P. A (2004). Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.

WOOD, B. A.; EASDOWN, W. J. A new disease of mung bean and cowpea for Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 19, p. 16-21, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1893-1900, 2003.

ZINNEIL, D.; LAMBRECHT, P.; HARIS, B.; FRENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68, 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. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

CAPÍTULO 1

“Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas e de campo”

Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas e de campo.

RESUMO

Dentre as formas em que fitobactérias podem sobreviver de estação para estação, pode-se citar hospedeiras alternativas, que constituem importante fonte de inóculo para plantios posteriores. Esta pesquisa objetivou avaliar possíveis hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) dentre as principais culturas de inverno utilizadas em sistema de rotação com o feijoeiro comum no Paraná. Foram analisadas as forrageiras de inverno trigo, aveia branca, aveia preta, cevada, azevém, canola e nabo forrageiro, sob condições controladas e de campo. A bactéria apresentou capacidade de sobreviver epifiticamente em todas forrageiras avaliadas, sob condições de casa de vegetação e também sob condição de campo, exceto o nabo forrageiro. Cff colonizou endofiticamente o trigo, cevada, azevém, aveia branca e preta sob condições controladas e todas forrageiras, exceto o nabo forrageiro, a campo. Todos os isolados confirmados como sendo Cff foram patogênicos ao feijoeiro. Deve-se evitar o cultivo prévio de trigo, cevada, azevém, aveia branca, aveia preta e canola ao de feijoeiro, pois Cff sobreviveu de forma endofítica e epifítica nessas espécies vegetais, que servem para a manutenção do inóculo no campo.

Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* under field and controlled conditions.

ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria can survive from seasons associated with alternative hosts, which can be an important source of inoculum for subsequent planting. The aim of this research was to analyze alternative hosts for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) among the main winter crops rotated with common bean in Paraná State. The winter crops wheat, black oat, white oat, barley, ryegrass, canola and radish were analyzed under field and controlled conditions for epiphytic and endophytic survival of Cff. The bacterium survived epiphytically in all the winter crops, under field and controlled conditions, except in radish. Cff colonized endophytically wheat, barley, ryegrass, white and black oat under controlled conditions and all the winter crops, except radish, under field conditions. All Cff strains were pathogenic to the common bean. The previous crop of wheat, barley, ryegrass, white oat, black oat and canola should be avoided before the common bean, because Cff survived both endophytically and epiphytically on these plant species, increasing the Cff inoculum in the field.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta centro de origem o continente Americano e está adaptado a uma grande variedade edafoclimática, pode ser cultivado ao longo de quase todo ano no Brasil, fato que contribui para o aumento da incidência de pragas e doenças. Dentre as doenças de origem bacteriana, destaca-se a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins e Jones. Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1920, no estado da Dakota do Sul, EUA (HEDGES, 1922) e no Brasil em 1995, no estado de São Paulo (MARINGONI; ROSA, 1997). Atualmente encontra-se distribuída pelos estados do Paraná, Santa Catarina (LEITE JUNIOR et al., 2002), Goiás e Distrito Federal (UESUGI; FREITAS; MENEZES, 2003).

Os sintomas da doença podem surgir de forma localizada ou em “reboleiras”, sendo possível a observação a campo de plantas sintomáticas isoladas (THEODORO; MARINGONI, 2010). Os sintomas iniciais surgem como amarelecimento foliar, os quais podem progredir para lesões necróticas. O sintoma clássico da doença é a murcha da parte aérea, fato que colaborou com a nomenclatura da doença, e é causado pela elevada colonização dos vasos do xilema por Cff, chegando a obstruí-los ou degenerá-los. Este quadro sintomatológico pode afetar o desenvolvimento e arquitetura da planta, as quais tendem a ficar com redução no porte e na produtividade (THEODORO; MARINGONI, 2010).

Fitobactérias podem sobreviver em culturas anuais de estação para estação de plantio em sementes, órgãos propagativos, restos culturais infectados, em hospedeiros alternativos, como células livres no solo ou em vetores (LEBEN, 1981; VIDAVER; LAMBRECHT, 2004). Cff pode ser transmitida por sementes (SAETTLER;

PERRY, 1972) e é capaz de sobreviver em restos culturais ou em hospedeiras alternativas (SAETTLER, 1991). Dentre as hospedeiras já descritas para Cff pode-se citar *Glycine max* (HEDGES, 1926; DUNLEAVY, 1983; SAMMER; REIHER, 2012; SOARES et al., 2013), *Vigna* sp. (SCHUSTER; SAYRE, 1967; WOOD; EASDOWN, 1990; TRIPEPI; GEORGE, 1991; SCHWARTZ et al., 2005; HUANG et al., 2009), *Phaseolus* sp. (SCHUSTER; SAYRE, 1967; HUANG et al., 2009), *Dolichos lablab* (HUANG et al., 2009), *Lupinus polyphyllus*, *Pisum sativum* (SCHUSTER; SAYRE, 1967), *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* (SCHUSTER, 1959), *Triticum aestivum* (SILVA JÚNIOR, 2011), *Cicer arietinum*, *Vicia faba* e *Lens culinaris* (OSDAGHI et al., 2015). Observações à campo evidenciam que a incidência da doença foi maior após a instalação da cultura de feijoeiro em áreas com cultivos prévios de aveia, porém sem constatação científica (THEODORO; MARINGONI, 2010).

Dentre os métodos de controle da doença a adoção da rotação de cultura e uso de sementes fiscalizadas em muitas regiões de cultivo do feijoeiro, contribuíram para erradicar ou manter Cff em populações baixas que não causassem danos significativos. Porém, áreas com quase 25 anos sem constatação da bactéria, voltaram a ter reincidência nos EUA (HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011). Com isso, evidencia-se a importância do conhecimento dos aspectos epidemiológicos do patógeno para contribuir com o manejo da doença. Neste sentido há falta de informações para Cff, sendo o objetivo desta pesquisa avaliar possíveis hospedeiras alternativas para a bactéria, dentre as principais espécies vegetais usadas como coberturas de inverno adotadas em sistema de rotação com a cultura do feijoeiro no Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas

Foram conduzidos dois ensaios em casa de vegetação no Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, Botucatu/SP. Foram avaliadas as forrageiras de inverno: nabo (*Raphanus sativus* L.), canola (*Brassica napus* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), as cultivares IPR126 e Agro Ijuí de aveia branca (*Avena sativa* L.), as cultivares Topázio, TBio Tibagi e BRS328 de trigo (*Triticum aestivum* L.). Cada forrageira foi semeada em vasos de cinco litros de capacidade com solo autoclavado na proporção 1:1:1 (areia, solo argiloso de barranco e substrato comercial). O isolado de Cff utilizado foi o 2628A, resistente a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina. Para inoculação foi ajustada uma suspensão bacteriana em tampão fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,0, na concentração de 10^8 UFC/mL. Foram avaliadas duas formas de inoculação: a) adicionando-se 300 mL da suspensão bacteriana por vaso na semeadura das forrageiras (T1) e b) adicionando-se 300 mL de suspensão bacteriana ao substrato de cada vaso 20 dias após a semeadura (DAS), com cortes prévios do sistema radicular (T2). Como controle para os tratamentos T1 e T2, as plantas receberam 300 mL de água destilada esterilizada ao invés da suspensão bacteriana. O experimento foi conduzido com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um vaso contendo três plantas ou perfilhos cada.

A avaliação ocorreu aproximadamente 75 dias após a semeadura (DAS), em que toda a parte aérea das plantas de cada vaso foi coletada separadamente,

fragmentada em pedaços com aproximadamente 2 cm de comprimento e homogeneizados. Para cada tratamento, a bactéria foi isolada de forma epifítica e endofítica.

O isolamento epifítico foi realizado em 10 g de cada forrageira, acrescentado 100 mL de PBS, permanecendo sob agitação de 250 rpm/30 min. Transcorrido este tempo, realizaram-se diluições seriadas de 10^0 a 10^{-4} de cada suspensão, seguido por plaqueamento de 100 μ L em meio de cultura (3 placas/diluição/repetição). No ensaio I foi utilizado o meio de cultura MSCFF (MARINGONI; CAMARA; SOUZA, 2006), sendo que após a observação do crescimento de colônias suspeitas de Cff, as mesmas foram repicadas para nutriente sacarose ágar (NSA) acrescido de 7% de NaCl. No ensaio II foi utilizado o meio de cultura NSA acrescido de 100 μ g.mL⁻¹ de rifampicina e 50 μ g.mL⁻¹ de tiofanato metílico e 50 μ g.mL⁻¹ de clorotalonil (Figura 1).

No isolamento endofítico também foram utilizados 10g de fragmentos de cada forrageira por amostra, porém as mesmas foram desinfestadas superficialmente antes do processamento. Os fragmentos permaneceram por 30 s em álcool 70%; 1 min em hipoclorito de sódio a 2%; seguido por três enxágues sucessivos em água destilada e esterilizada. Alíquota da água do último enxágue foi plaqueada em triplicata em meio de cultura nutriente ágar para aferição do processo de desinfestação. Em seguida, as amostras foram transferidas em PBS esterilizado, na proporção de 1:10 (p/v) e trituradas em “Turrax”. Cada amostra foi diluída em série (10^0 a 10^{-4}) e 100 μ L de cada diluição foi plaqueado como descrito para o processo anterior. As placas permaneceram incubadas em B.O.D. à 28 °C, por 120 horas. No ensaio I houve isolamento epifítico e endofítico, enquanto no ensaio II realizou-se apenas isolamento endofítico.

A avaliação prévia consistiu na observação de colônias de Cff no meio de cultura e/ou contagem das mesmas. Após a avaliação das características culturais típicas de Cff, realizaram-se amostragens de colônias para cada forrageira e as mesmas foram identificadas pela técnica da PCR, com os iniciadores específicos para Cff, *Cff*FOR2 (5'- GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC -3') e *Cff*REV4 (5'- GAT GTT CCC GGT GTT CAG -3') (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002). Para tanto, o DNA total de cada isolado foi extraído ajustando-se uma suspensão a 10^8 UFC/mL e submetendo-se a 95 °C/15 min, seguido por resfriamento rápido em gelo. Cada reação da PCR foi carregada com 12,5 µL, sendo 6,25 µL GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 0,25 µL de cada iniciador, 4,25 µL de água MiliQ e 1,5 µL de DNA. A PCR foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf, USA) e o programa da PCR empregado foi de 94 °C por 3 min, para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C (anelamento) por 45 s, 72 °C (extensão) por 30 s. Finalmente as reações foram incubadas por 10 min a 72 °C. Os DNAs amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal, a 6 V/cm² em gel constituído de agarose à 1% (p/v) com tampão TBE 1X (90 mM Tris; pH 8,3; 90 mM de ácido bórico e 0,1 mM EDTA), acrescido do corante Neotaq Brilliant Green Plus (7 µL/100 mL). Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP, CA).

Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições de campo.

Foram realizados dois ensaios para avaliar as hospedeiras alternativas de Cff a campo, um no ano de 2012 e outro em 2013. O ensaio de 2012 foi conduzido nos municípios de Tibagi e Ponta Grossa/Paraná, ambas as áreas com histórico da ocorrência da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro. Em cada município, a área foi subdividida em blocos

casualizados com oito repetições de 16 X 20 m e com três tratamentos, sendo a semeadura das forrageiras de inverno aveia preta e trigo e o tratamento pousio (ausência de cultivo). A semeadura em Ponta Grossa ocorreu em 14/05/2012 e em Tibagi, no dia 18/05/2012, sendo que em ambas as áreas não houve adubação do solo. Foi utilizada a semeadora modelo SHM 15/17 (SEMEATO), com 17 linhas de plantio espaçadas 17 cm. As sementes das forrageiras foram tratadas com o inseticida sistêmico do grupo dos neonicotinóides (CRUISER-Syngenta), na concentração de 150 mL/100 Kg de sementes. No dia 27/06/2012 houve uma única aplicação de herbicida seletivo e sistêmico do grupo químico das sulfoniluréias (Ally-DuPont), na concentração de 4g/ha.

Foram realizadas duas amostragens das forrageiras para avaliação da presença de Cff, sendo a primeira 105 dias após a semeadura (DAS), com as plantas em estágio fenológico de enchimento de grãos e a segunda com 135 DAS, com as plantas no final do ciclo, próximo a maturação, com dessecamento prévio. As coletas constituíram-se por amostras compostas/tratamento, em que cada amostra composta foi formada pela coleta de cinco amostras simples (parte aérea de três perfilhos), em pontos distintos. O ensaio de 2013 foi conduzido no município de Ponta Grossa, em área com histórico da ocorrência da doença. A área foi subdividida em três blocos com cultivo prévio (semeadura em 18/12/2012) de feijão cultivar Andorinha, soja cultivar SYN1163RR e milho híbrido Fórmula TL. Após colheita (feijão, milho e soja), em cada bloco foram semeadas sete forrageiras de inverno: trigo cultivar CD 108 (densidade 140 Kg/ha), aveia branca cultivar IPR 126 (densidade 60 Kg/ha), aveia preta cultivar Agro Coxilha (densidade 50 Kg/ha), cevada cultivar BRS Cauê (densidade 110 Kg/ha), azevém cultivar Barjumbo (densidade 50 Kg/ha), canola híbrido Hyola 61 (densidade 6 Kg/ha), nabo (densidade 15 Kg/ha) e o pousio (ausência de cultivo), sendo portanto formado

por 24 tratamentos em parcelas de 5 X 30 m. A semeadura das forrageiras de inverno foi realizada no dia 15/05/2013, da mesma forma que no ensaio 2012, com espaçamento entre linhas de 17 cm. Após aproximadamente 30 dias, foi aplicado uma única vez o herbicida seletivo e sistêmico do grupo químico das sulfoniluréias. Foram realizadas quatro amostragens das forrageiras para análise da presença de Cff (60, 90, 115 e 145 DAS), seguindo mesma metodologia de coleta dos ensaios de 2012.

Foram realizados isolamentos epifíticos e endofíticos para detecção de Cff, similar a metodologia utilizada anteriormente para os ensaios em casa de vegetação. Porém, para o isolamento epifítico, foi utilizado apenas o meio de cultura semi-seletivo MSCFF (MARINGONI; CAMARA; SOUZA, 2006), com cinco repetições. As placas foram incubadas a 28 °C, por 120 h, para avaliação do crescimento bacteriano. Para o isolamento endofítico também foram utilizados 10 g de cada forrageira fragmentadas, com desinfestação superficial. Alíquota da água do último enxágue foi plaqueada em triplicata em meio de cultura NA para aferição do processo de desinfestação. Em seguida, as amostras foram transferidas em PBS na proporção de 1:10 (p/v) e trituradas em equipamento tipo “Turrax”. Os processos de diluições seriadas, plaqueamento, incubação e avaliação foram os mesmos descritos anteriormente.

Transcorrido o período de incubação, colônias suspeitas de Cff crescidas no meio de cultura semi-seletivo MSCFF foram repicadas para NSA + 7% de NaCl (máximo de 18 colônias/parcela). Após incubação por mais seis dias, colônias que apresentaram crescimento, foram estocadas em Nutriente Líquido (crescimento por 24h) e acrescido de Glicerol (700 µL : 300 µL, respectivamente) em freezer a -80 °C.

Os isolados suspeitos de serem Cff foram purificados através da repicagem sucessiva de colônias isoladas e identificados por coloração diferencial de Gram e pela técnica molecular da PCR. Os isolados gram positivos, tiveram o DNA genômico extraído e identificação pela PCR da mesma forma que a metodologia utilizada para os ensaios em casa de vegetação.

Os isolados bacterianos confirmados como Cff pelas técnicas anteriores foram submetidos ao teste de patogenicidade em casa de vegetação. Foi utilizado o cultivar Pérola de feijoeiro, em vasos de três litros de capacidade (solo autoclavado na proporção de 1:1:1 de areia, solo argiloso de barranco e substrato comercial Bioplant) sendo que para cada isolado foram inoculadas três plantas por vaso, com idade do primeiro trifólio totalmente aberto. A inoculação foi realizada por duas punções de agulha entomológica molhada em cada isolado em meio de cultura NSA, na região compreendida entre os cotilédones e as folhas primárias. A avaliação foi realizada aproximadamente 30 dias após a inoculação, observando-se ausência ou presença de sintomas típicos de *murcha-de-curtobacterium*. Após avaliação, foram selecionadas algumas plantas, levando-se em consideração em abranger todas as espécies vegetais de origem do isolado, para reisolamento bacteriano. O reisolamento foi realizado como descrito anteriormente para o isolamento endofítico, porém diretamente em meio de cultura NSA + 7% NaCl. A confirmação dos reisolados foi de forma visual, observando-se as características da colônia (coloração, crescimento e formato) e morfologia celular (coloração diferencial de gram).

RESULTADOS

Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas.

Os meios de cultura MSCFF e NSA acrescido de antibiótico e fungicidas foram eficientes para isolamento e detecção de colônias suspeitas de Cff (Figura 1). No ensaio I com inoculação no momento da semeadura (T1), Cff foi detectada colonizando de forma epifítica em azevém, aveia preta, aveia branca IPR 126 e nas cultivares de trigo T-Bio Tibagi e BRS 328; de forma endofítica em azevém, aveia preta e a cultivar T-Bio Tibagi de trigo (Tabela 1). Por inoculação com ferimentos radiculares (T2), Cff foi detectada de forma epifítica em nabo, canola, cevada, azevém, aveia preta, aveia branca (cultivares IPR 126 e Agro Ijuí) e endofiticamente apenas no azevém (Tabela 1).

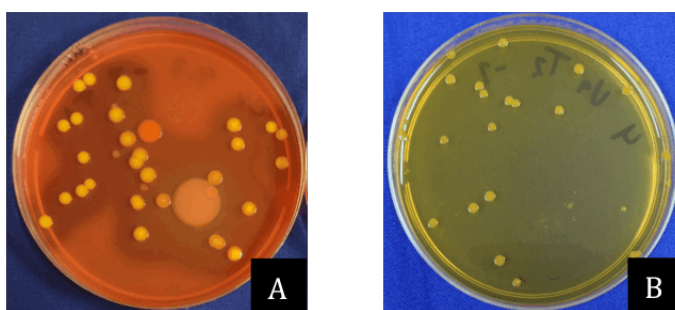


Figura 1. Meios de cultura utilizados para isolamento de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* das forrageiras de inverno em casa de vegetação, na ilustração o cultivar Barjumbo de azevém. A: meio de cultura MSCFF e B: meio de cultura NSA acrescido de rifampicina, tiofanato metílico e clorotalonil.

Tabela 1. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no ensaio I em casa de vegetação com as forrageiras de inverno

	Inoculação na semente				Inoculação com corte de raiz			
	Epifítica		Endofítica		Epifítica		Endofítica	
	A*	B**	A	B	A	B	A	B
Nabo forrageiro (<i>Raphanus sativus</i>)	—***	—	—	—	4/1	3/2	—	—
Canola (<i>Brassica napus</i>)	—	—	—	—	4/1	2/1	—	—
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	—	—	—	—	4/1	6/6	—	—
Azevém (<i>Lolium multiflorum</i>)	4/4	22/22	4/4	15/14	4/3	18/10	4/1	11/5
Aveia branca (<i>Avena sativa</i>)								
cv. IPR 126	4/1	6/2	—	—	4/1	5/3	—	—
cv. Agro Ijuí	—	—	—	—	4/1	3/1	—	—
Aveia preta (<i>Avena strigosa</i>)	4/1	6/1	4/1	2/1	4/1	6/6	—	—
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)								
cv. Topázio	—	—	—	—	—	—	—	—
cv. T Bio Tibagi	4/2	8/3	4/1	6/6	—	—	—	—
cv. BRS 328	4/4	18/18	—	—	—	—	—	—

* Número de repetição/número de repetição com Cff.

** Número de colônias analisadas/número de colônias com PCR positiva para Cff.

*** Não detectada.

No ensaio II, em que foi realizado apenas isolamento endofítico, com inoculação na semente (T1), Cff foi detectada e quantificada em: azevém, aveia branca cv. IPR 126 e trigo cv. T-Bio Tibagi (Tabela 2). No tratamento por inoculação com ferimentos radiculares (T2), Cff foi detectada e quantificada em: cevada, azevém e aveia branca cv. IPR 126 e Agro Ijuí (Tabela 2).

Tabela 2. Detecção e quantificação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nas forrageiras de inverno no ensaio II em casa de vegetação (apenas isolamento endofítico).

	Inoculação na semente		Inoculação com corte de raiz	
	A*	B**	A	B
Nabo forrageiro (<i>Raphanus sativus</i>)	—***	—	—	—
Canola (<i>Brassica napus</i>)	—	—	—	—
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	—	—	—	—
Azevém (<i>Lolium multiflorum</i>)	4/4	1.93x10 ⁵	4/4	8.03x10 ⁴
Aveia branca (<i>Avena sativa</i>)				
cv. IPR 126	4/2	1.28x10 ⁵	4/1	1.20x10 ⁴
cv. Agro Ijuí	—	—	4/1	1.60x10 ⁴
Aveia preta (<i>Avena strigosa</i>)	—	—	—	—
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)				
cv. Topázio	—	—	—	—
cv. T-Bio Tibagi	4/1	1.70x10 ⁴	—	—
cv. BRS 328	—	—	—	—

* A= número de repetições/número de repetições com Cff.

** B= UFC de Cff/g tecido.

*** —= não detectada.

Observou-se que a concentração da bactéria de forma endofítica nas forrageiras tende a manter-se variando de 10⁴ a 10⁵ UFC/g de tecido vegetal (Tabela 2). A bactéria foi detectada em todas repetições de azevém cultivar Barjumbo, em ambas metodologias utilizadas na inoculação.

Hospedeiras alternativas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a campo

Nas duas amostragens realizadas nos ensaios de 2012, Cff colonizou de forma epifítica e endofítica plantas de trigo e aveia preta, ou seja, sem apresentação de qualquer sintomatologia nessas plantas (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Isolamento de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* da aveia preta nos ensaios de 2012 à campo.

Local	Repetição	1ª Coleta		2ª Coleta
		Epifítico	Endofítico	Endofítico
Tibagi/PR	1	1/1*	17/17	7/5
	2	4/2	12/12	-**
	3	-	11/10	6/3
	4	-	12/12	-
	5	4/4	10/10	5/1
	6	1/1	6/5	-
	7	1/1	3/2	7/5
	8	4/3	4/4	-
Total		15/12	75/72	25/14
Ponta Grossa/PR	1	-	3/0	8/5
	2	-	8/0	2/0
	3	2/0	7/0	2/0
	4	1/0	-	-
	5	3/0	-	6/5
	6	9/0	3/0	-
	7	9/1	3/0	3/1
	8	2/0	1/1	-
Total		26/1	25/1	21/11

* Número de colônias suspeitas de Cff/número de colônias com PCR positiva para Cff.

** Não detectada.

Tabela 4. Isolamento de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* do trigo nos ensaios de 2012 à campo.

Local	Repetição	1ª Coleta		2ª Coleta
		Epifítico	Endofítico	Endofítico
Tibagi/PR	1	4/2*	-**	2/1
	2	8/7	8/6	-
	3	3/3	6/6	8/0
	4	2/2	1/1	-
	5	3/3	2/2	6/0
	6	1/1	11/11	-
	7	-	-	4/0
	8	1/1	2/0	-
Total		22/19	28/26	20/1
Ponta Grossa/PR	1	3/3	5/0	3/1
	2	2/0	-	-
	3	3/0	-	5/1
	4	5/0	4/0	-
	5	-	2/0	5/0
	6	-	-	-
	7	9/0	7/0	-
	8	3/0	5/0	-
Total		25/3	23/0	13/2

*Número de colônias suspeitas de Cff/número de colônias com PCR positiva para Cff.

** Não detectada.

Todas colônias suspeitas de serem Cff pelas características de crescimento nos meios de cultura semi-seletivos MSCFF e repicagem para NSA + 7% NaCl, com bastonetes Gram positivos, foram confirmados pela PCR, com os *primers* específicos, com amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 306 pb (Figura 2).

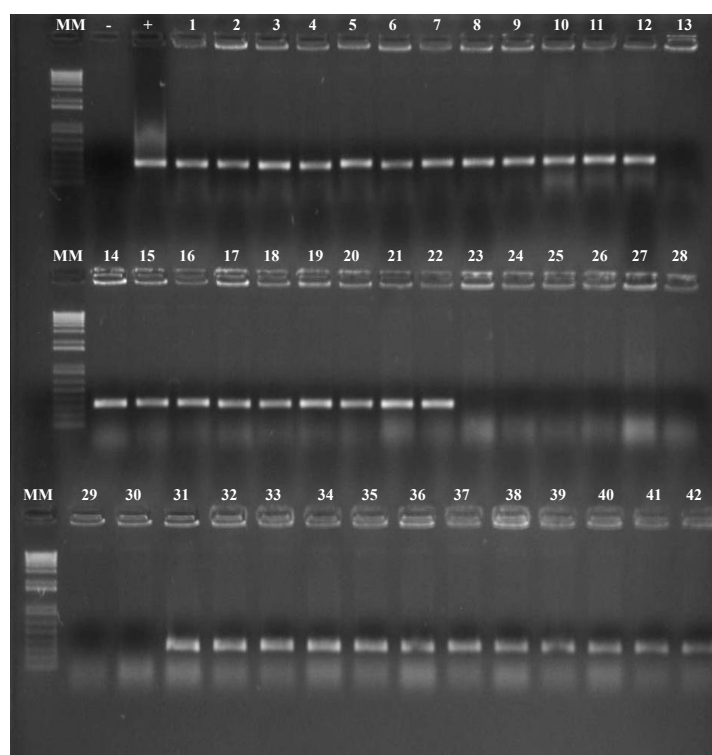


Figura 2. Gel de agarose à 1% com produto da PCR (306 pb) com os primers específicos para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de DNA extraído de colônias suspeitas de isolamento endofítico da aveia preta. Na figura, (MM): marcador molecular de 1 Kb plus (Invitrogen); (- e +): respectivamente os controles negativo e positivo; de 1 a 11: referente a repetição 2 (Tibagi/PR); 12 a 22: referente a repetição 3 (Tibagi/PR); 23 a 30: referente a repetição 3 (Ponta Grossa/PR) e 31 a 42: referente a repetição 4 (Tibagi/PR).

No ensaio de 2013, Cff foi recuperada levando-se em consideração os restos culturais do plantio anterior (feijão, soja e milho) como fonte de inóculo de Cff para as sete forrageiras de inverno, de forma epifítica e endofítica (Tabela 5 a 7). As colônias suspeitas foram confirmadas como Cff de forma epifítica e endofítica pelos meios de cultura semi-seletivos, coloração de Gram e PCR com *primers* específicos nas forrageiras trigo, aveia branca, aveia preta, cevada, azevém e canola. Destacam-se as sucessões feijão/nabo, soja/nabo, milho/canola e milho/nabo em que Cff não foi detectada tanto epifiticamente como

endofiticamente. Em ambos os ensaios de 2012 e 2013, todos os isolados selecionados com PCR positivas foram patogênicos ao feijoeiro cultivar Pérola em inoculação realizada sob condição de casa de vegetação (Figura 3). O total de PCR realizado nos ensaios de 2012 e 2013 foi de aproximadamente 1600 reações de amplificações.

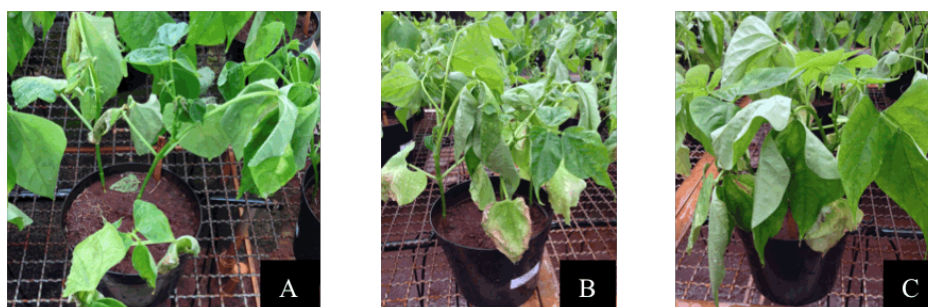


Figura 3. Teste de patogenicidade em casa de vegetação com isolados endofíticos das forrageiras de inverno do ensaio de 2013 na cultivar Pérola de feijoeiro comum. A: isolado do trigo, B: isolada da aveia branca e C: isolado da aveia preta.

Tabela 5. Recuperação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no ensaio de 2013, em diferentes forrageiras em área previamente cultivada com feijoeiro, Ponta Grossa/PR.

Cultura/ Forrageira	60 DAS*	90 DAS		115 DAS		145 DAS	
	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico
Feijão/pousio	6/6**	-***	10/8	-	10/8	-	12/8
Feijão/trigo	4/3	18/6	15/13	3/3	17/16	12/7	10/4
Feijão/aveia branca	6/6	24/20	24/21	15/15	10/7	9/6	6/3
Feijão/aveia preta	6/2	18/3	24/3	10/1	18/11	11/5	11/3
Feijão/cevada	3/0	7/0	10/5	4/4	17/4	12/8	10/5
Feijão/azevém	5/0	18/4	18/16	1/0	18/18	11/10	4/1
Feijão/canola	6/0	11/1	0/0	0/0	1/1	4/0	2/0
Feijão/nabo	2/0	3/0	3/0	0/0	0/0	0/0	5/0

* Dias após a semeadura.

** Número de colônias suspeitas de Cff/número de colônias com PCR positivo para Cff.

*** Não realizado.

Tabela 6. Recuperação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no ensaio de 2013 em diferentes forrageiras em área previamente cultivada com soja, Ponta Grossa/PR.

Cultura/ Forrageira	60 DAS	90 DAS		115 DAS		145 DAS	
	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico
Soja/pousio	3/0*	-**	10/2	-	8/1	-	8/3
Soja/trigo	3/0	13/2	14/1	5/0	11/9	9/4	9/0
Soja/aveia branca	5/1	17/0	18/0	15/0	18/0	10/3	0/0
Soja/aveia preta	6/0	18/0	17/0	18/2	18/5	9/3	11/0
Soja/cevada	6/0	17/1	11/5	5/0	18/9	8/0	11/1
Soja/azevém	6/0	1/0	1/1	2/1	2/0	8/3	8/1
Soja/canola	6/0	11/1	7/2	0/0	0/0	1/0	6/1
Soja/nabo	1/0	5/0	1/0	0/0	0/0	0/0	11/0

* Dias após a semeadura.

** Número de colônias suspeitas de Cff/número de colônias com PCR positivo para Cff.

*** Não realizado.

Tabela 7. Recuperação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no ensaio de 2013 em diferentes forrageiras em área previamente cultivada com milho, Ponta Grossa/PR.

Cultura/Forrageira	60 DAS	90 DAS		115 DAS		145 DAS	
	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico
Milho/pousio	6/0*	-**	11/0	-	7/1	-	12/0
Milho/trigo	6/0	17/0	11/0	4/0	18/6	0/0	6/0
Milho/aveia branca	6/0	6/0	11/0	2/0	18/0	7/2	6/3
Milho/aveia preta	6/0	17/0	11/0	18/0	12/0	11/2	6/1
Milho/cevada	6/0	4/0	12/0	2/0	18/0	7/1	8/1
Milho/azevém	6/0	4/1	8/0	1/0	2/0	7/1	1/0
Milho/canola	6/0	11/0	0/0	0/0	0/0	9/0	4/0
Milho/nabo	0/0	2/0	0/0	0/0	0/0	1/0	5/0

* Dias após a semeadura.

** Número de colônias suspeitas de Cff/número de colônias com PCR positivo para Cff.

*** Não realizado.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui observados fornecem subsídios que ajudam a explicar as observações iniciais de que a incidência da murcha-de-curtobacterium tende a ser maior após sucessão com o cultivo da aveia. Cff sobreviveu de forma epifítica e endofítica na aveia branca e na aveia preta em ensaios conduzidos a campo e sob condições controladas (Tabelas 1, 2 e 3). Outra cultura em que Cff foi detectada colonizando tanto epifiticamente como endofiticamente foi a de trigo, em ensaios desenvolvidos em casa de vegetação e a campo. A cultura do trigo já havia sido descrita com capacidade de abrigar *C. flaccumfaciens* na filosfera (LEGARD et al., 1994) ou Cff endofiticamente nas hastes (SILVA JÚNIOR et al., 2012a). Harveson, Urrea e Schwartz (2011) também detectaram Cff na cultura do feijoeiro em rotação com o trigo, levantando-se a hipótese da sobrevivência nesta cultura além da soja, milho, girassol e alfafa. A detecção da bactéria pela PCR foi maior no ensaio de Tibagi do que em Ponta Grossa, tanto na aveia preta como em trigo devido a ocorrência anterior de epidemia da doença com maior intensidade.

Até o momento a maioria das espécies vegetais relatadas como hospedeiras alternativas para Cff pertencem à família Fabaceae (BRADBURY, 1986). Este é o primeiro relato da ocorrência de Cff nas monocotiledôneas aveia preta, aveia branca e trigo no Brasil, em ensaios conduzidos sob condições controladas e a campo. A bactéria foi detectada nos ensaios em casa de vegetação colonizando as cultivares de aveia branca (IPR 126 e Agro Ijuí). Com relação ao trigo, a detecção na cultivar T-Bio Tibagi foi epifítica e endofítica, sendo que no cultivar BRS 328 apenas na forma epifítica. As cultivares de trigo utilizados na presente pesquisa e por Silva Júnior (2011) foram as mesmas e ambos os trabalhos mostram a capacidade de Cff colonizar as plantas, porém as cultivares de aveia foram diferentes e no

trabalho de Silva Júnior (2011) a bactéria não foi detectada de forma endofítica, evidenciando uma possível diferença de comportamento entre genótipos das coberturas de inverno.

Com relação ao efeito das rotações de cultura feijão, milho e soja, observou-se uma menor presença ou quase ausência de Cff nas forrageiras de inverno quando empregou-se o plantio prévio do híbrido Fórmula TL de milho e a cultivar SYN1163RR de soja (Tabelas 5, 6 e 7), apesar de estudos mostrarem a capacidade da bactéria causar doença na soja no Brasil (SOARES et al., 2013). Trabalhos mostram que pode haver diferentes níveis de resistência entre cultivares de soja para Cff, desde suscetíveis (BRACALE; SOARES, 2014) até com elevados níveis de resistência (MARINGONI; SOUZA, 2003). Fato que pode explicar porque a incidência foi menor quando o feijão foi rotacionado com a cultivar SYN1163RR de soja, bem como pela possibilidade de diferença de agressividade entre os isolados de Cff. Destaca-se que ambos cultivos prévios de milho e soja quando antecederam ao nabo forrageiro e canola, Cff não foi detectada colonizando as forrageiras, sendo uma alternativa para manejo da doença (Tabelas 5, 6 e 7),

Além das forrageiras aveia branca, aveia preta e trigo, Cff também foi detectada colonizando endofiticamente a cevada e o azevém. Quando analisada a colonização epifítica, verificou-se que todas forrageiras possibilitaram a sobrevivência da bactéria, sendo menos frequente na canola e no nabo, no qual Cff só foi detectada sob condição controlada. Porém a campo, a sobrevivência endofítica tem maior impacto como fonte de inóculo pelo fato da bactéria estar protegida no interior do tecido vegetal, sofrendo menor ação dos fatores abióticos, por exemplo umidade e temperatura, e bióticos, por exemplo antibióticos produzidos por microrganismos decompositores, possibilitando maior período de sobrevivência em estado hipobiótico.

O sistema de plantio direto, muito utilizado na região sul do Brasil, traz muitos benefícios agronômicos e conservacionistas, porém em termos fitopatológicos, pode contribuir com o agravamento de alguns patossistemas. Neste estudo, foi verificado que algumas das principais culturas adotadas em sistema de rotação de inverno com o feijoeiro no Paraná, podem abrigar Cff de forma epifítica ou endofítica no tecido vegetal, funcionando como fonte de inóculo para plantios posteriores de feijoeiro. Uma alternativa seria a incorporação dos restos culturais, pois Cff sobreviveu nos restos culturais do feijoeiro mantidos na superfície do solo por até 240 dias e apenas por 30 dias, quando os restos culturais foram mantidos a 20 cm de profundidade no solo (SILVA JÚNIOR et al., 2012b).

Como demonstrado anteriormente, Cff apresenta capacidade de sobreviver nas culturas de inverno como trigo, aveia branca, aveia preta, azevém, cevada e canola. Como tais culturas podem funcionar como fonte de inóculo para plantios posteriores de feijoeiro comum, para auxiliar no manejo da doença, deve-se priorizar outros cultivos não hospedeiros da bactéria Cff em rotação com o feijoeiro, principalmente onde aplica-se o sistema de plantio direto, destacando-se as sucessões feijão/nabo forrageiro, milho/nabo forrageiro, soja/nabo forrageiro e milho/canola, em que Cff não foi detectada nesses sistemas de plantios.

REFERÊNCIAS

- BRACALE, M. F.; SOARES, R. M. Resistência de cultivares de soja a mancha bacteriana marrom, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: **IX Jornada Acadêmica da Embrapa Soja – Resumos expandidos**, Documentos 352, Londrina/PR, julho 2014.
- BRADBURY, J. F., 1986. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, Oxfordshire, UK, 332pp.
- 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**, v. 129, p. 3545-3548, 1983.
- DUNLEAVY, J. M. Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 473-476, 1983.
- HARVESON, R. M.; URREA, C. A.; SCHWARTZ, H. F. Bacterial wilt of dry beans in Western Nebraska. Lincoln Extension: University of Nebraska, **Institute of Agriculture and Natural Resources**, Revised 2011. Disponível em: <<http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf>> Acesso em: ago. 2012.
- HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by bacterium *flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, v. 60, n. 1425, p. 433-434, 1922.
- HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccum-fasciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, v. 16, p. 1-22, 1926.
- HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F.; CONNER, R. L.; BALASUBRAMANIAN, P. M. Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, p. 290-300, 2009.
- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.
- LEGARD, D. E.; MCQUILKEN, M. P.; WHIPPS, J. M.; FENLON, J. S.; FERMOR, T. R.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J.; LYNCH, J. M. Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 50, p. 87-101, 1994.
- LEITE JÚNIOR, R. P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S. R.; BIANCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 303-304, 2002.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C.; SOUZA, V. L. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 117-124, 2006.

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

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

OSDAGHI, E.; TAGHAVI, S. M.; FAZLIARAB, A.; ELAHIFARD, E.; LAMICHHANE, J. R. Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: an emerging bacterial pathogen in Iran, **Crop Protection**, v. 78, p. 185-192, 2015.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: Hall, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1991, p. 29-32.

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

SAMMER, U. F.; REIHER, K. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Germany – A threat for farming. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 314-316, 2012.

SCHUSTER, M. L.; Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Report**, v. 43, p. 25-32, 1959.

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

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; HALL, R.; FORSTER, R. L. 2005. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: sobrevivência, gama de hospedeiras e efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da doença. 2011. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Proteção de Plantas, Fca-unesp, Botucatu, 2011. Cap. 1. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bla/33004064034P1/2011/silvajunior_taf_dr_botfca.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2012.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; ITAKO, A. T.; NEGRÃO, D. R.; MARINGONI, A. C. Pathogenicity of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* to several plant species. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 427-430, 2012a.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; NEGRÃO, D. R.; ITAKO, A. T.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 331-337, 2012b.

SOARES, R. M.; FANTINATO, G. G. P.; DARBEN, L. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; SEIXAS, C. D. S.; CARNEIRO, G. E. S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil, **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 452-454, 2013.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337, 2002.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-Curtobacterium. In: PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Paraná: UEPG, 2010. Cap. 2, p. 23-30.

TRIEPEL, R. R.; GEORGE, M. W. Identification of bacteria infecting seedlings of mung bean used in rooting bioassays. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 80-84, 1991.

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

VIDAVER, A. K.; LAMBRECHT, P. A (2004). Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.

WOOD, B. A.; EASDOWN, W. J. A new disease of mung bean and cowpea for Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 19, p. 16-21, 1990.

CAPÍTULO 2

**“Influência de forrageiras de inverno na ocorrência de
murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro
sob condições de campo”**

Influência de forrageiras de inverno na ocorrência de murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro sob condições de campo.

RESUMO

Dentre as principais doenças bacterianas que acometem o feijoeiro comum no Brasil pode-se citar a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). O manejo desta doença está embasado no uso de sementes sadias, rotação de cultura e uso de cultivares resistentes. Com isso, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito das principais forrageiras de inverno na incidência da murcha-de-curtobacterium e o comportamento de genótipos de feijoeiro no Paraná. No ensaio de 2012, as coberturas de inverno aveia preta e o trigo propiciaram aumento da incidência e severidade da doença, redução do peso médio de 100 grãos e da produtividade do feijoeiro. No ensaio de 2013, foi observado que as rotações com milho e soja reduziram a incidência da doença e consequentemente, aumento da produtividade média do feijoeiro. Na área com maior intensidade da murcha-de-curtobacterium, houve redução de aproximadamente 50% da produtividade do feijoeiro. Além da produtividade, os parâmetros agronômicos número de vagens/planta, número de grãos/planta, peso dos grãos/planta e peso de 100 grãos foram menores na área com maior incidência da doença. As cultivares IPR Juriti e IPR Tuiuiú foram as mais produtivas e apresentaram os melhores níveis de resistência à doença, sob condições de campo.

Influence of winter crops for bacterial wilt occurrence on common bean under field conditions.

ABSTRACT

Bacterial wilt, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is one of the main diseases for common bean in Brazil. The control of this disease is based by using certified seeds, crop rotation system and genetic resistant cultivars. The aims of this research were to assess the effect of winter crops in the incidence of bacterial wilt and behavior of common bean cultivars in Paraná State. In 2012 experiments, black oat and wheat increased the incidence and severity of bacterial wilt and reduced the average weight of 100 grains and bean production. In 2013 experiments, corn and soybean rotated with common bean decreased the disease incidence and consequently, increased the average production of common bean. In the area with largest intensity of bacterial wilt, there was reduction of approximately 50% in bean production. Besides the agronomic parameters number of pods per plant, number of grains per plant, weight of grains per plant and weigh of 100 grains were smallest in the area with largest intensity of disease. IPR Juriti and IPR Tuiuiú cultivars were more productive and shown higher resistance levels for the disease, under field conditions.

INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser cultivado em climas tropical, subtropical ou temperado, porém é muito sensível às condições extremas de temperatura e umidade, apresentando temperatura média ótima para o desenvolvimento entre 18 a 22 °C, sendo crítico acima de 30 °C e ideal de 100 mm de chuva por mês bem distribuídos (IBGE, 2004). A cultura apresenta grande importância alimentar e socioeconômica para o país, devido principalmente ao elevado número de mão de obra exigido durante o ciclo da cultura.

No censo agropecuário de 2006, foi observado que se emprega baixo nível tecnológico no cultivo de feijão no Brasil, sendo que 88% das sementes utilizadas são comuns e apenas 11% dos agricultores utilizaram sementes certificadas. Apenas 2,6% cultivam sob sistema de irrigação, 60% dos agricultores adubaram a lavoura e a aplicação de agrotóxicos foi realizada em 29,7% das propriedades (IBGE, 2012). Isto pode agravar o quadro fitopatológico das lavouras, dentre as quais destaca-se a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), a qual é transmitida por sementes (SAETTLER, 1991).

O manejo da doença está embasado na aquisição de sementes isentas do patógeno, de preferência certificadas, rotação com cultura não hospedeira da bactéria por um período de 2 a 3 anos, incorporação dos restos culturais, eliminação de plantas voluntárias em plantios sucessivos, observação do histórico da ocorrência da doença em novas áreas de plantio e uso de cultivares resistentes (SAETTLER, 1991; MARINGONI, 2002; MARINGONI; CAMARA, 2006; THEODORO; MARINGONI, 2010; HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011; SILVA JÚNIOR et al., 2012b).

A rotação de cultura pode beneficiar o plantio posterior pois melhora as características físicas do solo, aumenta a cobertura residual na superfície do solo, que contribui para menor infestação de plantas daninhas, redução da erosão e manutenção da umidade (BALBINOT JUNIOR et al., 2009), além de interferir diretamente no ciclo de vida dos patógenos, na fase de sobrevivência. Observações a campo destacam que a incidência da doença é maior quando o feijoeiro é cultivado em sucessão com aveia, porém sem constatação científica. Pesquisa realizada em Nebraska, EUA, demonstrou que a quantidade de inóculo de Cff remanescente no cultivo do trigo foi suficiente para causar infecções em cultivos posteriores de feijão (HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011). Ambas culturas são utilizadas em sistema de rotação com feijoeiro em algumas regiões do Brasil, como por exemplo no Estado do Paraná. Assim, torna-se necessária a melhor compreensão do efeito das principais culturas utilizadas em sistema de rotação com feijoeiro como fonte de inóculo de Cff.

Pesquisa desenvolvida para avaliar a resistência genética de cultivares de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, indicou que o mesmo genótipo pode apresentar comportamento diferenciado, devido principalmente às diferentes condições edafoclimáticas e variabilidade do patógeno (SOUZA et al., 2006). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das principais culturas rotacionadas com o feijoeiro no comportamento de genótipos de feijão comum a campo, com relação a murcha-de-curtobacterium no Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios para avaliação da influência de culturas de inverno em sistema de rotação com o feijoeiro comum em relação a Cff foram instalados em 2012 e 2013. Ambas as áreas apresentavam histórico de murcha-de-curtobacterium. Em 2012, foram utilizadas duas áreas experimentais, uma localizada no município de Tibagi e a outra em Ponta Grossa/Paraná. Cada área foi dividida em blocos casualizados contendo três tratamentos (aveia preta, trigo e pousio) com 16 x 20 m, com quatro repetições (Figura 1). Após colheita das culturas de inverno, realizou-se a semeadura de dez genótipos de feijoeiro comum em cada parcela (Pérola, Bola Cheia, BRS Campeiro, BRS Estilo, IPR Campos Gerais, IPR Juriti, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, IPR Uirapuru e IPR 139), conduzidos sob o sistema de plantio direto. Os dez genótipos de feijoeiro foram semeados em sentido transversal ao das forrageiras de inverno, constituindo 120 parcelas (dez genótipos semeados nos tratamentos aveia preta, trigo e pousio; com quatro repetições). Cada parcela foi composta por 2 m de largura x 16 m de comprimento, sendo que cada genótipo de feijoeiro foi semeado em cinco linhas de cultivo espaçadas 0,4 m e dois metros de bordadura entre cada parcela (Figura 1). O controle fitossanitário da cultura, com enfoque a plantas daninhas, doenças fúngicas e pragas foi realizado com agrotóxico registrado para a cultura, conforme empregado em cultivos comerciais de feijoeiro.

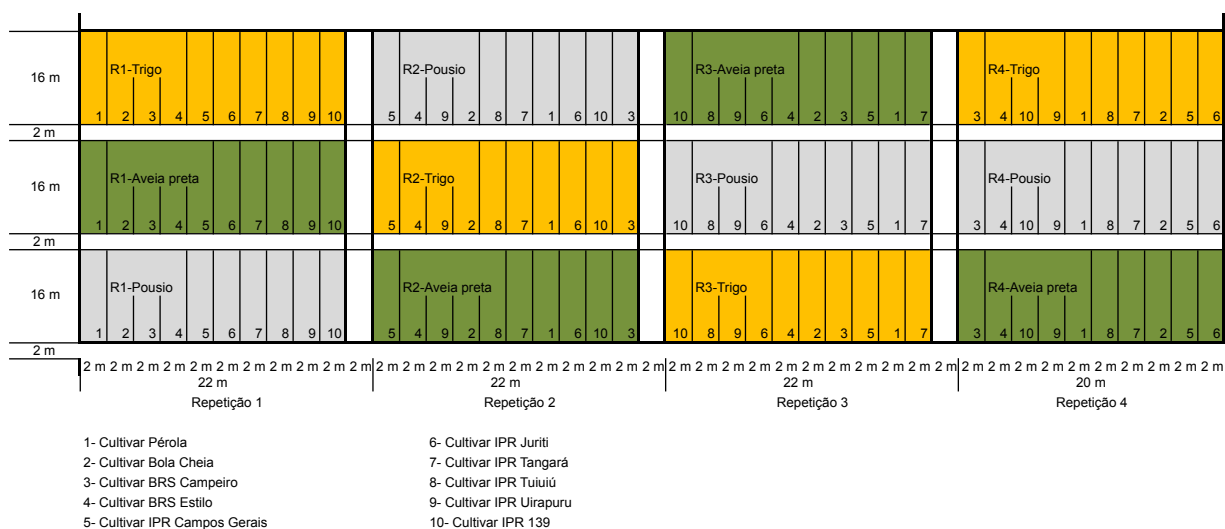


Figura 1. Esboço ilustrativo da condução dos ensaios de 2012 sobre rotação de forrageiras aveia preta e trigo e comportamento de cultivares de feijoeiro nos municípios de Tibagi e Ponta Grossa/Paraná.

No ano de 2013, o ensaio foi conduzido no município de Ponta Grossa/PR. A área experimental foi dividida inicialmente em três blocos com cultivo de feijão, soja e milho (Figura 2, identificado como Primeiro plantio). Após colheita destas culturas, realizou-se a semeadura a lanço em cada bloco de: trigo, aveia branca, aveia preta, cevada, azevém, canola, nabo e o pousio (sem cultivo) (Figura 2, identificado como Segundo plantio). Após colheita das culturas de inverno, semeou-se três cultivares de feijão (BRS Estilo, IPR 139 e IPR Juriti), soja e milho em cada bloco (Figura 2, identificado como Terceiro plantio). Cada cultivar de feijoeiro foi semeada em parcelas com cinco linhas de cinco metros de comprimento e espaçadas 0,4 m entre si (Figura 2, Terceiro plantio). O manejo da cultura do feijão foi o mesmo do ensaio de 2012. Foram avaliados 72 parcelas de feijoeiro (três cultivares de feijoeiro X sete forrageiras de inverno + pousio X três rotações).

Segundo plantio	Primeiro plantio														
	MILHO					SOJA					FEIJÃO				
	1 m														
	5 m	Nabo													
	2 m	Rastro													
	5 m	Canola													
	5 m	Azevém													
	2 m	Rastro													
	5 m	Cevada													
	5 m	Aveia Preta													
	2 m	Rastro													
	5 m	Aveia Branca													
	5 m	Trigo													
	2 m	Rastro													
	5 m	Pousio													
	Terceiro plantio														
1 m	Milho	Soja	Estilo	IPR 139 Feijão	IPR Juriti	Milho	Soja	Estilo	IPR 139 Feijão	IPR Juriti	Milho	Soja	Estilo	IPR 139 Feijão	IPR Juriti

Figura 2. Esboço ilustrativo da condução do ensaio de 2013 sobre rotação de culturas e comportamento de três cultivares de feijoeiro no município de Ponta Grossa/Paraná.

No ensaio de 2012, foram realizadas três avaliações da severidade da murcha-de-curtobacterium, sendo a primeira com 45 dias após a semeadura (DAS), a segunda 60 DAS e a terceira 80 DAS. No ensaio de 2013, foi realizada apenas uma avaliação com 82 DAS, em que mais de 50% das plantas encontravam-se no estágio fenológico R7. As cultivares de feijoeiro foram avaliadas segundo a severidade de murcha-de-curtobacterium conforme a escala de notas empregada por Maringoni (2002), sendo: nota 0 = sem sintomas da doença; nota 1 = sintoma de mosaico nas folhas; nota 2 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); nota 5 = aproximadamente 25% de folhas apresentam murchas e amarelecimento; nota 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; nota 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e ou morte da planta. Em cada avaliação da doença, procedeu-se amostragens de plantas sintomáticas para isolamento bacteriano em meio de cultura MSCFF (MARINGONI;

CAMARA, 2006), repicagem para NSA + 7% de NaCl e identificação dos isolados suspeitos de Cff pela PCR com os iniciadores específicos (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002).

Para análise foram utilizados os índices da área abaixo da curva de progresso da incidência de plantas doentes (AACPIPD) e área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). No ensaio de 2012 foram avaliados os seguintes parâmetros agronômicos: número de vagens, número de grãos por planta, peso total dos grãos por planta, peso de 100 grãos e a produtividade de cada cultivar foi estimada pela pesagem dos grãos colhidos nas parcelas. No ensaio de 2013, foi avaliada apenas a produtividade. No ensaio de 2012 os valores de AACPIPD e AACPSD foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial e comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade com o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002). Para classificação dos genótipos de feijoeiro quanto a reação à murcha-de-curtobacterium, adotou-se os mesmos critérios utilizados por Maringoni et al. (2015), em que padronizou-se a AACPD da cultivar Pérola como referência e classificou-se como genótipos resistentes (R) quando a AACPD for menor que 50%, moderadamente resistente (MR) com valores de AACPD entre 50-60% e suscetível (S) quando a AACPD for superior a 60% da cultivar Pérola. No ensaio de 2013, foram utilizados os dados da porcentagem de plantas doentes em relação ao estande inicial, pois foi realizada apenas uma avaliação.

RESULTADOS

Tanto a aveia preta quanto o trigo propiciaram aumento nos valores da área abaixo da curva de progresso da incidência de plantas doentes (AACPIPD) e área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) no ensaio conduzido em Tibagi,

em 2012. Observa-se que os valores da AACPIPD e AACPSD foram aproximadamente duas vezes a mais para o trigo e aveia preta quando comparado com o do pousio (Tabela 1). Porém, essas diferenças não foram observadas para o ensaio conduzido em Ponta Grossa, no ano de 2012, em que houve menor intensidade da murcha-de-curtobacterium (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do pré-plantio das forrageiras de inverno na área abaixo da curva do progresso da incidência de plantas com murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro em Tibagi e Ponta Grossa, PR, 2012.

Cultivar	Incidência		Severidade		Reação
	Tibagi	Ponta Grossa	Tibagi	Ponta Grossa	
Pérola	769,82 aA*	88,66 aB	573,02 aA	75,42 aB	S*
Bola Cheia	670,40 bA	77,82 aB	488,09 bA	69,34 aB	S
BRS Campeiro	192,32 eA	14,22 bB	95,43 dA	10,72 bA	R
BRS Estilo	325,81 dA	46,57 bB	215,35 cA	40,71 bB	MR
IPR Campos Gerais	553,98 cA	91,85 aB	403,02 bA	84,69 aB	S
IPR Juriti	95,65 eA	22,57 bA	34,99 dA	18,06 bA	R
IPR Tangará	127,60 eA	15,80 bB	71,25 dA	11,68 bA	R
IPR Tuiuiú	186,91 eA	32,14 bB	102,60 dA	22,88 bA	R
IPR Uirapuru	367,31 dA	114,12 aB	223,75 cA	96,74 aB	MR
IPR 139	809,73 aA	187,55 aB	556,22 aA	164,47 aB	S
Cobertura	Tibagi	Ponta Grossa	Tibagi	Ponta Grossa	
Pousio	192,74 bA	57,37 aB	157,75 bA	48,92 aB	
Aveia preta	540,58 aA	86,39 aB	327,61 aA	74,96 aB	
Trigo	496,54 aA	63,63 aB	343,75 aA	54,53 aB	
C.V. (%)	48,36		62,32		

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da coluna e letras maiúsculas no sentido da linha.

** S= suscetível/MR= moderadamente resistente/R= resistente.

Em 2013, no ensaio conduzido em Ponta Grossa não foi observada diferença na incidência de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro quando se empregou o plantio prévio das diferentes forrageiras. Porém, maior incidência da doença foi obtida com o cultivo prévio de aveia preta, canola e trigo (Tabela 2). O cultivo anterior a das forrageiras

com soja e milho propiciaram menor incidência da murcha-de-curtobacterium quando comparado com o cultivo de feijoeiro (Tabela 3).

Tabela 2. Incidência da murcha-de-curtobacterium em três cultivares de feijoeiro sob sistema de rotação com sete forrageiras e o pousio no ano de 2013, Ponta Grossa, PR.

Cobertura	Cultivar			Média
	BRS Estilo	IPR 139	IPR Juriti	
Aveia branca	4,43	6,26	1,70	4,13* a
Aveia preta	3,96	12,12	3,23	6,43 a
Azevém	1,64	8,41	4,17	4,74 a
Canola	4,77	6,96	6,47	6,06 a
Cevada	3,10	9,13	1,99	4,74 a
Nabo	3,21	2,71	4,18	3,37 a
Pousio	1,35	4,19	2,04	2,53 a
Trigo	3,73	14,49	2,10	6,77 a
Média	3,27 B	8,03 A	3,23 B	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da coluna e letras maiúsculas no sentido da linha.

C.V. (%) = 28,38

* para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X+1}$

Tabela 3. Efeito da rotação feijão, milho e soja nos parâmetros agronômicos incidência de plantas doentes e produtividade na média de três cultivares de feijoeiro em Ponta Grossa, PR, 2013.

Parâmetro	Rotação		
	Feijão	Milho	Soja
Incidência de plantas doentes (%)	8,05 A	2,53 B	3,96 B
Produtividade (Kg/parcela)	3,00 B	3,78 A	3,68 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras maiúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da linha.

Com relação à reação das diferentes cultivares de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, nos ensaios conduzidos em 2012, observa-se que independente do sistema de avaliação da doença adotado (incidência ou severidade) pôde-se constatar maiores níveis de resistência nas cultivares BRS Campeiro, BRS Estilo, IPR Juriti, IPR Tangará, IPR Tuiuiú,

IPR Uirapuru (Tabela 1). Para o ensaio conduzido em 2013, também as cultivares BRS Estilo e IPR Juriti apresentaram menor incidência da doença comparada à IPR 139 (Tabela 2).

Para os parâmetros agronômicos avaliados (número de vagens por planta, número de grãos por planta, peso de grãos por planta, peso de 100 grãos e produtividade), nos ensaios conduzidos em 2012, observa-se diferenças entre as cultivares nos dois locais, exceção feita para número de grãos por planta e produtividade no ensaio de Ponta Grossa (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Comparação entre parâmetros, cultivares e coberturas avaliados nos ensaios conduzidos em Tibagi e Ponta Grossa, PR, 2012.

Cultivar	Número de vagens/planta		Número de grãos/planta	
	Tibagi	Ponta Grossa	Tibagi	Ponta Grossa
Pérola	7,58 bB	11,78 bA	20,14 cB	43,52 aA
Bola Cheia	8,88 bA	9,72 bA	31,20 bB	42,54 aA
BRS Campeiro	10,33 aA	10,64 bA	28,79 bB	41,20 aA
BRS Estilo	12,17 aA	13,04 aA	39,61 aB	52,50 aA
IPR Campos Gerais	9,06 bA	10,79 bA	28,46 bB	46,27 aA
IPR Juriti	12,26 aA	8,90 bB	36,16 aA	32,82 aA
IPR Tangará	10,66 aA	11,26 bA	33,66 aB	48,38 aA
IPR Tuiuiú	10,66 aA	9,49 bA	38,59 aA	43,76 aA
IPR Uirapuru	12,52 aA	10,84 bA	46,59 aA	47,79 aA
IPR 139	9,95 bB	15,56 aA	24,25 cB	49,61 aA
Cobertura				
Pousio	10,70 aA	10,29 aA	33,40 aA	42,59 aA
Aveia preta	10,74 aA	12,03 aA	33,97 aA	46,65 aA
Trigo	9,77 aA	11,29 aA	30,86 aA	45,27 aA
C.V. (%)	12,32		16,10	

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da coluna e letras maiúsculas no sentido da linha.

Tabela 5. Comparação entre parâmetros, cultivares e coberturas avaliados nos ensaios conduzidos em Tibagi e Ponta Grossa, PR, 2012.

Cultivar	Peso de grãos/planta (g)		Peso de 100 grãos (g)		Produtividade (Kg/parcela)	
	Tibagi	Ponta Grossa	Tibagi	Ponta Grossa	Tibagi	Ponta Grossa
Pérola	4,56 bB*	13,62 aA	17,03 bB	29,95 aA	1,68 cB	7,43 aA
Bola Cheia	7,38 aB	13,16 aA	18,16 bB	29,93 aA	2,27 cB	6,63 aA
BRS Campeiro	6,90 aB	12,39 bA	21,41 aB	29,91 aA	4,06 bB	6,75 aA
BRS Estilo	9,16 aB	15,49 aA	21,31 aB	28,56 bA	3,01 cB	7,15 aA
IPR Campos Gerais	5,58 bB	12,57 bA	17,23 bB	27,45 bA	2,76 cB	7,54 aA
IPR Juriti	8,07 aA	8,93 cA	20,99 aB	27,48 bA	5,20 aB	7,26 aA
IPR Tangará	8,27 aB	15,68 aA	22,53 aB	32,03 aA	4,54 bB	6,98 aA
IPR Tuiuiú	7,29 aB	11,23 bA	17,22 bB	26,30 bA	5,40 aB	6,81 aA
IPR Uirapuru	9,08 aB	12,08 bA	17,16 bB	25,41 bA	3,80 bB	6,45 aA
IPR 139	5,22 bB	14,59 aA	16,53 bB	27,51 bA	1,80 cB	6,89 aA
Cobertura						
Pousio		9,98 a		24,82 a	3,98 aB	6,93 aA
Aveia preta		10,25 a		22,80 b	3,07 bB	7,08 aA
Trigo		9,96 a		23,50 b	3,30 bB	6,96 aA
C.V. (%)		32,52		12,79		26,12

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da coluna e letras maiúsculas no sentido da linha.

No ensaio conduzido em 2013, Ponta Grossa, notou-se que a cultivar BRS Estilo foi a mais produtiva (Tabela 6). O número de vagens por planta, número de grãos por planta e peso de grãos por planta de feijoeiro não foram afetados com o cultivo prévio de aveia preta e trigo (Tabelas 4 e 5). O peso de 100 grãos em ambos locais e produtividade, em Tibagi, foram menores na presença do cultivo prévio de aveia preta e trigo, quando comparado ao pousio (Tabela 5). As sete forrageiras de inverno empregadas no ensaio conduzido em 2013, não afetaram a produtividade do feijoeiro (Tabela 6).

Na presença de maior intensidade da doença (incidência ou severidade) nota-se efeito negativo direto na produção das plantas de feijoeiro, fato esse

constatado nas comparações dos ensaios de Tibagi e Ponta Grossa, conduzidos em 2012 (Tabela 7).

Tabela 6. Produtividade (Kg/parcela) dos cultivares de feijoeiro sob sistema de rotação com sete forrageiras e pousio no ano de 2013, Ponta Grossa, PR.

Cobertura/cultivar	BRS Estilo	IPR 139	IPR Juriti	Média
Aveia branca	4,03	3,37	3,67	3,69 a
Aveia preta	3,93	3,47	3,37	3,59 a
Azevém	4,07	3,63	3,13	3,61 a
Canola	3,47	3,47	3,03	3,32 a
Cevada	3,90	3,30	2,93	3,38 a
Nabo	3,67	3,53	3,00	3,40 a
Pousio	3,70	3,63	3,37	3,57 a
Trigo	3,67	3,00	3,33	3,33 a
Média	3,80 A	3,43 B	3,23 B	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da coluna e letras maiúsculas no sentido da linha.

C.V. (%) = 10,87

Tabela 7. Comparação entre vários parâmetros de doença e produção avaliados nos ensaios conduzidos em Tibagi e Ponta Grossa, PR, 2012.

Parâmetros	Tibagi	Ponta Grossa	Diferença (%)
AACPIPD [*]	409,95 A	69,13 B	493,01
AACPSD ^{**}	276,37 A	59,47 B	364,70
Número de vagens/planta	10,41 B	11,20 A	-9,09
Número de grãos/planta	32,74 B	44,84 A	-26,67
Peso de grãos/planta	7,15 B	12,98 A	-44,92
Peso de 100 grãos	18,96 B	28,45 A	-33,36
Produtividade (Kg/parcela)	3,45 B	6,99 A	-50,64

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras maiúsculas se referem a comparação entre médias no sentido da linha.

^{*}AACPIPD= área abaixo da curva de progresso da incidência de plantas doentes;

^{**}AACPSD= área abaixo da curva de progresso da severidade da doença.

DISCUSSÃO

A rotação de cultura pode beneficiar o plantio sucessivo pois altera as características físicas do solo, aumenta a cobertura remanescente na superfície, que contribui

com menor infestação de plantas daninhas, reduz a erosão e mantem a umidade do solo (BALBINOT JUNIOR et al., 2009). Apesar de se conhecer que Cff coloniza o milho (HARVESON; URREA; SCHWARTZ, 2011) e a soja (DUNLEAVY, 1983), no presente estudo, utilizando-se a cultivar de soja SYN1163RR e milho híbrido Fórmula TL, Cff não foi isolada destas duas culturas. Como demonstrado por Maringoni e Souza (2003), o isolado de Cff de feijoeiro apresentou baixa agressividade em 20 cultivares de soja. Também foi observado que o emprego destas duas culturas em sistema de rotação com o feijoeiro possibilitou redução da incidência da doença e aumento da produtividade da cultura (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com Almeida et al. (2008) que avaliaram a interferência do preparo do solo e da rotação de cultura na produtividade do feijoeiro, sendo que as melhores opções foram rotação com milho, no sistema de semeadura convencional, e com soja, na semeadura direta (ALMEIDA et al., 2008).

As forrageiras aveia preta e trigo quando em plantio que antecederam ao de feijoeiro, propiciaram aumento na intensidade da murcha-de-curtobacterium (Tabela 1) e redução do peso médio de 100 grãos de diferentes cultivares de feijoeiro (Tabela 5) em relação ao pousio. Cff já foi detectada colonizando ambas as culturas (aveia preta e trigo), tanto de forma epifítica como endofítica, não exteriorizando nenhum tipo de sintomas nessas forrageiras (GONÇALVES et al., 2013). Silva Júnior (2011) observou que Cff colonizou de forma endofítica folhas e caules de trigo, porém não detectou nenhum efeito do pré-plantio das forrageiras de inverno (aveia e trigo) na incidência de murcha-de-curtobacterium no feijoeiro, sob condições de vaso. A cultivar de trigo utilizado tanto por Silva Júnior (2011) como no presente trabalho foi a CD 108, porém foram testadas cultivares diferentes de aveia. Uma

possível explicação desses resultados discordantes pode ser que haja diferença de colonização entre isolados de Cff e cultivares dessas gramíneas.

No ensaio de 2013, não foi observada diferença no efeito da rotação com as diferentes culturas de inverno na incidência da murcha-de-curtobacterium e na produtividade do feijoeiro (Tabelas 2 e 6). Este fato pode ter ocorrido devido a baixa ocorrência da murcha-de-curtobacterium na área de Ponta Grossa, já observada no ensaio de 2012, sendo que a área de Tibagi teve uma redução de 50,64% na média de produtividade dos feijoeiros com maior intensidade da doença (Tabela 7). Além da produtividade, todos demais parâmetros agronômicos avaliados como número de vagens por planta, número de grãos por planta, peso dos grãos por planta e peso de 100 grãos foram menores na área de Tibagi (Tabela 7).

Estudos para avaliar o comportamento de genótipos nacionais de feijoeiro a Cff são recentes (MARINGONI, 2002) e não abrangem todas as diferentes condições edafoclimáticas de cultivo do feijoeiro. Com relação a reação dos genótipos de feijoeiro a essa doença no Paraná, foi observado que os cultivares IPR Tangará e IPR 139, respectivamente classificados como resistente e suscetível, apresentaram comportamento semelhante em avaliação sob condições controladas (MARINGONI et al., 2015), porém os genótipos BRS Campeiro, BRS Estilo, IPR Juriti, IPR Uirapuru e IPR Tuiuiú foram classificados como resistentes, em condições de campo, diferente das observações de Maringoni et al. (2015) que os consideraram suscetíveis, sob condições de inoculação artificial.

O comportamento diferente dos genótipos de feijoeiro pode estar associado com a variabilidade do patógeno, podendo apresentar diferentes níveis de

agressividade (RAVA; COSTA; ZIMMERMANN, 2006). Outra explicação pode ser dada pela possível diferença climática entre os experimentos, como demonstrada a forte influência da temperatura no comportamento dos genótipos, sendo que sob temperaturas elevadas, genótipos resistentes tornaram-se suscetíveis ou induziram a expressão precoce de sintomas da doença (COYNE; SCHUSTER; YOUNG, 1965; COYNE; SCHUSTER; ESTES, 1966).

Além de classificados como resistentes, as cultivares IPR Juriti e IPR Tuiuiú foram as mais produtivas em Tibagi, PR (Tabelas 1 e 5). As cultivares BRS Estilo e IPR Uirapuru apesar de serem moderadamente resistentes à doença, apresentaram média de produtividade inferior às demais cultivares IPR Juriti e IPR Tuiuiú (Tabelas 1 e 5). No ensaio conduzido em 2013, observou-se maior incidência da doença na cultivar IPR 139 e menor incidência na BRS Estilo (Tabela 2) isso resultou, respectivamente, em menor e maior produtividade dessas cultivares (Tabela 6). O comportamento das cultivares pode estar relacionada com os mecanismos de resistência da planta, como já foi observada a formação de tiloses e presença de fibrilas ao redor das células bacterianas, dificultando a multiplicação e colonização dos vasos de xilema, não exteriorizando os sintomas típicos da doença (MARINGONI, 2002; SOUZA et al., 2006; SOUZA; MARINGONI, 2008). Com base nos resultados aqui observados, ficou evidente que quanto maior a intensidade da doença maior foi o comprometimento na produtividade do feijoeiro, as culturas de inverno aveia preta e trigo interferiram indiretamente de forma negativa na produtividade do feijoeiro por possibilitar a manutenção do inóculo de Cff, em condições de epidemia mais severa da *murcha-de-curtobacterium*, as cultivares IPR Juriti e IPR Tuiuiú, que possuem maiores níveis de resistência à doença, também foram as mais produtivas e as rotações com milho e soja

reduziram a incidência da murcha-de-curtobacterium e propiciaram maiores produtividades em cultivares de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. P.; ALVES, M. C.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, S. A. Rotação de culturas e propriedades físicas e químicas em latossolo vermelho de cerrado sob prepare convencional e semeadura direta em adoção. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 1227-1237, 2008.
- BALBINOT JUNIOR., A. A.; MORAES, A.; VEIGA, M.; PELISSARI, A.; DIECKOW, J.; CARVALHO, P. C. F. Desempenho da cultura do feijão após diferentes formas de uso do solo no inverno. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2340-2346, 2009.
- COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L.; ESTES, L. W. Effect of maturity and environment on the genetic control or reaction to wilt bacterium in *Phaseolus vulgaris* L. **American Society for Horticultural Science**, v. 88, p. 393-399, 1966.
- COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L.; YOUNG, J. O. A genetic study of bacterial wilt (*Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*) tolerance in *Phaseolus vulgaris* crosses and the development of tolerance to two bacterial diseases. **American Society for Horticultural Science**, v. 87, p. 279-285, 1965.
- DUNLEAVY, J. M. Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 473-476, 1983.
- GONÇALVES, R. M.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOUZA FILHO, R. C.; MARINGONI, A. C. Preliminary report of epiphytic and endophytic colonization of black oat (*Avena strigosa*) and wheat (*Triticum aestivum*) by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. S4.69-S4.77, 2013.
- HARVESON, R. M.; URREA, C. A.; SCHWARTZ, H. F. **Bacterial wilt of dry beans in Western Nebraska**. Lincoln Extension: University of Nebraska, **Institute of Agriculture and Natural Resources**, Revised 2011. Disponível em: <<http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf>> Acesso em: ago. 2012.
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006, Rio de Janeiro, 2012.
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores Agropecuários 1996-2003, Rio de Janeiro, n.3, 68 p., 2004.
- MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 451-455, 2006.
- MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 157-162, 2002.

MARINGONI, A. C.; ISHISZUKA, M. S.; SILVA, A. P.; SOMAN, J. M.; MOURA, M. F.; SANTOS, R. L.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; FONSECA JÚNIOR, N. S. Reaction and colonization of common bean genotypes by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Crop Society of Plant Breeding**, v. 15, p. 87-93, 2015.

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

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Fatores que afetam a reação de plantas de feijoeiro comum a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, p. 70-78, 2006.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: Hall, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1991, p. 29-32.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: sobrevivência, gama de hospedeiras e efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da doença. 2011. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Proteção de Plantas, Fca-unesp, Botucatu, 2011. Cap. 1. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bla/33004064034P1/2011/silvajunior_taf_dr_botfca.pdf>. Acesso em: ago. 2012.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; NEGRÃO, D. R.; ITAKO, A. T.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 331-337, 2012b.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C. Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 318-320, 2008.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 339-344, 2006.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337, 2002.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-Curtobacterium. In: PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Paraná: UEPG, 2010. Cap. 2, p. 23-30.

CAPÍTULO 3

**“Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.
flaccumfaciens como células livres no solo”**

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres no solo.

RESUMO

O feijoeiro comum apresenta elevada importância alimentar e socioeconômica no Brasil. Dentre as doenças que podem acometer esta cultura destaca-se a murcha-de-curtobacterium, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Na literatura, há poucos estudos abordando a sobrevivência desta bactéria no solo. Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar o período de sobrevivência de diferentes isolados de Cff como células livres no solo, em diferentes tipos de solo sob condição controlada e a campo. Foi observada diferença no período de sobrevivência entre isolados de Cff (22 a 34 dias) e entre diferentes solos (30 a 94 dias). Sob condição de campo, o período de sobrevivência variou de 34 a 80 dias, sendo observada a influência dos fatores climáticos temperatura e umidade. A padronização da técnica molecular para extração de DNA visando a detecção de Cff diretamente das amostras de solo infestadas possibilitou detectar a concentração mínima de 5×10^5 a 5×10^6 UFC/g de solo e não houve detecção de Cff nas amostras de solo provenientes das áreas de campo, com histórico da ocorrência da doença. Com estes resultados, destaca-se a potencial capacidade de sobrevivência de Cff como células livres no solo, podendo contribuir com a adoção de novas estratégias de manejo da doença.

Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* as free cells in the soil.

ABSTRACT

The common bean has high feed and socioeconomic importance in Brazil. Bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is one of the main diseases for this crop and there are few studies about the survival of this bacterium in the soil. The aims of this research were to assess the survival period of different strains of Cff as free cells on soil, in different soils under field and controlled conditions. In the controlled experiments, different periods of survival were observed among strains (22 to 34 days) and soil types (30 to 94 days). Under field conditions, the survival period ranged from 34 to 80 days, being influenced by temperature and soil moisture. The standardization of molecular technique for DNA extraction aiming Cff detection directly from infested soil samples allowed to detect a minimum concentration of 5×10^5 to 5×10^6 CFU/g of soil, and there was no detection of Cff in the soil samples from the field areas with historic of disease occurrence. With these results, stands out the potential survivability of Cff as free cells in the soil, contributing for the adoption of new management strategies for bean bacterial wilt.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum é um importante componente na dieta humana, rico em nutrientes, fibras e importante fonte proteica de alta qualidade. Estudos mostraram que a ingestão do grão tem potencial de reduzir a concentração de colesterol sérico, melhorar em muitos aspectos o estado diabético, fornecer benefícios metabólicos que ajudam no controle do peso (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999). Os minerais nesta leguminosa estão prontamente disponíveis, os quais são importantes na redução dos riscos de osteoporose (DAWSON-HUGHES et al., 1990) e hipertensão (APPEL et al., 1997).

O Brasil foi classificado como o terceiro maior produtor mundial de feijão, superado por Myanmar e Índia, e seguido por México e República Unida da Tanzânia (FAO, 2015). Dentre as doenças bacterianas que podem incidir na cultura, destaca-se a murcha-de-curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), que desde sua primeira detecção em 1920 nos EUA, continua presente em diferentes regiões geográficas do mundo. Os últimos relatos da presença bacteriana foram na Alemanha e no Irã (SAMMER; REIHER, 2012; OSDAGHI et al., 2014).

Os sintomas da murcha-de-curtobacterium caracterizam-se por amarelecimento dos folíolos ou mosaicos progredindo para lesões necróticas, desenvolvimento reduzido da planta ou nanismo que resulta em queda de produtividade, além de murcha da parte aérea devido a degradação dos vasos do xilema pelo patógeno (THEODORO; MARINGONI, 2010).

Bactérias fitopatogênicas, na maioria das culturas anuais, podem sobreviver de estação para estação em sementes ou partes propagativas, em restos culturais infectados e/ou em hospedeiras alternativas (LEBEN, 1981; VIDAVER; LAMBRECHT, 2004). Algumas fitobactérias podem sobreviver na água, em objetos inertes, em insetos

vetores ou no solo (VIDAVER; LAMBRECHT, 2004). Há duas maneiras de fitobactérias sobreviverem no solo, a primeira relaciona-se ao estado hipobiótico celular, em que a mesma torna-se menos sensível aos agentes degradantes. A segunda refere-se à sobrevivência na rizosfera de plantas hospedeiras ou não da fitobactéria (LEBEN, 1981). O período de sobrevivência pode ser influenciado por fatores bióticos, tais como a grande biodiversidade de microrganismos presentes, além dos fatores abióticos, como umidade, temperatura, pH, aeração, características químicas, físicas e biológicas do solo (LENNON et al., 2012; DE BOER, 1982). Como observado na literatura, Cff apresenta potencial de sobreviver no solo. Atualmente carecem estudos que abordem a avaliação do período de sobrevivência de Cff como células livres no solo sob condição de campo, se há interferência do tipo de solo e entre isolados. Este estudo pode contribuir significativamente na adoção de medidas de manejo para reduzir o inóculo primário do patógeno em campo.

Isto posto, os objetivos deste trabalho foram: a) analisar a dinâmica populacional de isolados de Cff como células livres no solo sob condição controlada, b) analisar a dinâmica populacional de Cff como células livres em solos com diferentes composições químicas e estruturais sob condição controlada e, c) analisar a dinâmica populacional de Cff como células livres no solo sob condição de campo, correlacionando com os dados meteorológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Sobrevivência de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres em solo sob condições controladas

Foram utilizados cinco isolados de Cff pertencentes à coleção de Bactérias Fitopatogênicas da FCA/UNESP Botucatu/SP, identificados como 2500C, 2628A, 2716C, 2772C e 2913A. Os isolados selecionados possuíam resistência a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina e foram patogênicos ao feijoeiro (SILVA JÚNIOR et al., 2012). Cento e cinquenta gramas de solo seco peneirado (peneira de 8 mesh) foram transferidos para copos de poliestireno de 200 mL de capacidade (solo 1 nas Tabelas 1 e 2). O solo dos copos foi infestado com 40 mL de suspensão bacteriana (10⁸ UFC.mL⁻¹; OD₅₅₀=0,14), separadamente para cada isolado, elevando-se a umidade para aproximadamente 20% da capacidade de campo. Os copos foram vedados com papel alumínio e acondicionados em estufa incubadora tipo B.O.D. a 20 °C.

Para a determinação da população inicial de Cff no dia da instalação do ensaio, o solo de três copos infestados com cada isolado foi transferido para beakers esterilizados de 1.000 mL, homogeneizado, obtendo-se cinco amostras compostas para cada isolado. As avaliações foram realizadas a cada dois dias. Dez gramas de cada amostra composta foram transferidas para frascos contendo 90 mL de tampão fosfato salino a 0,01M e pH 7,0 (PBS), seguidos de agitação (250 rpm/30 min.) e repouso (30 min.). Os sobrenadantes das amostras foram diluídos em série (10⁰ a 10⁻³) e 100 µL das diluições foram transferidos para meio de cultura nutriente sacarose ágar modificado [20 g/L de nutriente ágar (Merck, USA) e 5 g/L de sacarose (Sigma, USA)] acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina, 50 µg.mL⁻¹ de tiofanato metílico e 50 µg.mL⁻¹ de clorotalonil, em triplicata, seguido de incubação (28

°C/72 h). Junto com cada avaliação, também foram obtidas as umidades de cinco amostras compostas, para manutenção do teor de umidade entre 15-23%. As avaliações consistiram da contagem de unidades formadoras de colônias por repetição, os quais foram transformados em unidades formadoras de colônias por grama de solo, plotados em gráfico para construção da curva de sobrevivência de cada isolado.

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em seis solos diferentes sob condições controladas

Foram utilizados seis solos peneirados (peneira de 8 mesh) coletados em diferentes locais: de 1 a 4 solos coletados no município de Botucatu/SP, 5- solo coletado em Tibagi/PR e 6- solo coletado em Ponta Grossa/PR. Os solos permaneceram por sete dias em ambiente protegido para secarem. O solo 1 foi o mesmo utilizado para os demais ensaios de estudo de sobrevivência a campo. Estes solos foram submetidos à análise estrutural e química como demonstrado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Análise estrutural de seis diferentes tipos de solos utilizados para análise da sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, sob condições controladas.

Solo	Local	Areia			Argila	Silte	Textura do Solo
		Grossa	Fina	Total			
		(g/Kg)					
1	Botucatu	374	459	833	139	28	Arenosa
2	Botucatu	97	196	293	519	188	Argilosa
3	Botucatu	21	114	135	557	308	Argilosa
4	Botucatu	20	96	116	492	392	Argilosa
5	Tibagi	12	42	54	438	508	Argilosa
6	Ponta Grossa	185	381	567	332	101	Média

Tabela 2. Análise química dos demais componentes dos seis diferentes solos utilizados no experimento para avaliar a sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Solo	pH	MO	P _{resina}	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³				mg/dm ³								
1	5,30	11	7	19	1,3	21	5	28	47	59	5	0,52	1,4	30	4,4	1,2
2	4,38	20	14	68	4,9	19	10	33	101	33	8	0,64	12,3	25	50,0	1,4
3	5,51	27	87	38	6,9	66	32	105	143	73	3	0,42	13,7	27	102,6	5,4
4	5,75	29	35	22	7,8	97	37	142	164	86	3	0,46	17,4	16	106,7	5,0
5	5,75	35	93	30	5,0	83	43	131	161	81	3	0,52	1,6	23	7,2	3,6
6	5,07	30	50	36	4,7	41	14	60	96	62	3	0,42	1,0	44	5,3	2,8

Cento e cinquenta gramas de cada solo foram transferidos para copos de poliestireno de 200 mL de capacidade. O solo foi infestado, separadamente, com 40 mL de suspensão bacteriana (10^8 ufc.mL⁻¹; OD₅₅₀=0,14) com o isolado 2628A (isolado que sobreviveu por maior período no ensaio anterior), elevando a umidade para aproximadamente 20% da capacidade de campo. Os copos foram vedados com papel alumínio e acondicionados em estufa incubadora para B.O.D. a 20 °C. Para determinação da população bacteriana inicial nos seis diferentes solos no dia da instalação do ensaio, três copos do mesmo solo foram transferidos para beakers de 1.000 mL esterilizados, homogeneizado, totalizando seis amostras compostas.

As avaliações foram feitas a cada dois dias, em que dez gramas de cada amostra composta que foram transferidos para frascos contendo 90 mL de tampão PBS, seguidos de agitação (250 rpm/30 min.) e repouso (30 min.). Os sobrenadantes das amostras foram diluídos em série (10^0 a 10^{-3}) e 100 µL de cada diluição foram transferidos para meio de cultura NSA modificado, em triplicata, seguido de incubação (28 °C/72 h). Junto com cada avaliação, também foram determinadas as umidades das seis amostras compostas de solo, para

manutenção da umidade nos recipientes entre 15-25%. As avaliações consistiram da contagem de unidades formadoras de colônias, os quais foram transformados em unidades formadoras de colônias por grama de solo, plotados em gráfico para construção da curva de sobrevivência de cada isolado.

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condição de campo.

Os experimentos foram conduzidos no departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP-Botucatu/SP, em que quadrados de madeira com 30 cm de lado foram distribuídos em uma área contendo Latossolo vermelho, textura arenosa, sem cultivo agrícola anterior com feijão (solo 1, Tabelas 1 e 2). O solo dos quadrados foi infestado com 500 mL de suspensão bacteriana (10^8 ufc.mL⁻¹; OD₅₅₀=0,14) do isolado 2628A (isolado que sobreviveu por maior período sob condição controlada), resistente a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina e patogênico ao feijoeiro. Foram instalados três ensaios sendo: ensaio I em 16/05/2013, ensaio II em 20/12/2013 e ensaio III em 22/07/2014.

Após a infestação, com auxílio de pedaços de tubos de PVC (3 cm de comprimento x 5 cm de diâmetro), cinco amostras simples de solo foram retiradas de cada quadrado, obtendo-se uma amostra composta homogênea. Em cada avaliação, o solo de três quadrados foi amostrado, sendo realizadas a cada quatro dias. Foram montadas amostras suficientes para avaliar a sobrevivência de Cff para mais de 120 dias. Dez gramas de cada amostra composta foram transferidos para frascos contendo 100 mL de tampão PBS, seguidos de agitação (250 rpm/30 min.) e repouso (30 min.). O sobrenadante das amostras foi diluído em série (10^0 a 10^{-3}) e 100 µL foram transferidos para meio de cultura NSA modificado em triplicata, seguido de incubação (28 °C/72 h).

As avaliações consistiram da contagem de unidades formadoras de colônias por placa até a não detecção de Cff, e os dados transformados em unidades por grama de solo. Aliada a cada avaliação, foi determinada a umidade do solo para posterior correlação com a população bacteriana, bem como com os dados climáticos (precipitação e temperatura) fornecidos por estação meteorológica instalada a 200 m do local.

Em todos ensaios de sobrevivência de Cff como células livres no solo, além da observação do crescimento bacteriano em meio de cultura, colônias suspeitas de Cff foram selecionadas e identificadas por PCR com os *primers* específicos CffFOR2 (5'- GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC-3') e CffREV4 (5'-GAT GTT CCC GGT GTT CAG-3') (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002) para Cff. O DNA foi extraído para cada isolado separadamente, ajustando-se 200 µL de suspensão bacteriana para aproximadamente 10⁸ UFC/mL em água destilada esterilizada, seguida por 15 min a 95 °C, posterior transferência para gelo por 5 min, centrifugação a 10.000 rpm/3 min e transferência do sobrenadante para novos microtubos. As condições de PCR foram feitas conforme Tegli, Sereni e Surico (2002).

Deteção molecular de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo.

Inicialmente, a padronização da técnica foi realizada para verificar a sensibilidade do método. Amostras do solo 1 (Tabelas 1 e 2) foram infestadas com o isolado 2634-4 de Cff, de forma que o mesmo apresentasse diluições seriadas de 10⁰ a 5x10⁶ UFC/g de solo. Após infestação do solo, o DNA total das amostras foi extraído conforme o protocolo do “Kit PowerLyser Power Soil” (MO BIO Laboratories, USA).

Após extração do DNA total do solo, os mesmos foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* específicos CffFOR2 e CffREV4

(TEGLI; SERENI; SURICO, 2002). Cada reação da PCR foi constituída por um volume final de 12,5 μL , contendo 6,25 μL de Gotaq Green Master Mix Kit (Promega, Madison, WI), concentração de 0,5 μM de cada *primer*, 1,5 μL de DNA (5 a 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e o volume final foi ajustado com Reagent Grade Water. O programa de amplificação foi de desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 62 °C por 45 s e extensão dos *primers* a 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 5 min. Após amplificação em termociclador, as amostras foram visualizadas em eletroforese de gel a 1,0% de agarose. Os géis foram corados com Brilliant Green Plus DNA Stain (Neotaq, NeoBio, Brasil) e submetidos em contraste com luz ultra violeta para visualização e posterior captura das imagens no equipamento L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Em 2012, 96 amostras de solo foram coletadas em duas áreas experimentais em Tibagi e Ponta Grossa/PR, em que foram semeados cultivares de feijoeiro em sucessão com trigo, aveia preta e pousio no inverno. Já em 2013, foram realizadas quatro coletas de solo em Ponta Grossa/PR, em uma área que foi semeada apenas com três cultivares de feijoeiro em sucessão a sete forrageiras de inverno e pousio, totalizando 96 amostras. Nas áreas em que as amostras de solo foram coletadas havia o histórico da ocorrência da *murcha-de-curtobacterium* em feijoeiro.

As amostras compostas consistiram por cinco amostras simples retiradas em zigue-zague, com trado de 5-10 cm de profundidade. A terra coletada foi homogeneizada, peneirada (peneira de 8 mesh) e amostras delas foram armazenadas a -20 °C até a extração de DNA. O DNA total de cada amostra foi extraído com o “Kit PowerLyser Power Soil” (MO BIO Laboratories, USA), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

RESULTADOS

Sobrevivência de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres no solo, sob condições controladas.

Houve diferença no período de sobrevivência entre os isolados de Cff sob condição controlada. O período de sobrevivência variou de 22 a 34 dias (Figura 1). O isolado com menor período de sobrevivência foi 2716C e o com maior período de sobrevivência foi 2628A. Os demais isolados sobreviveram por períodos variados de 24 a 32 dias, nas condições de incubação a 20 °C.

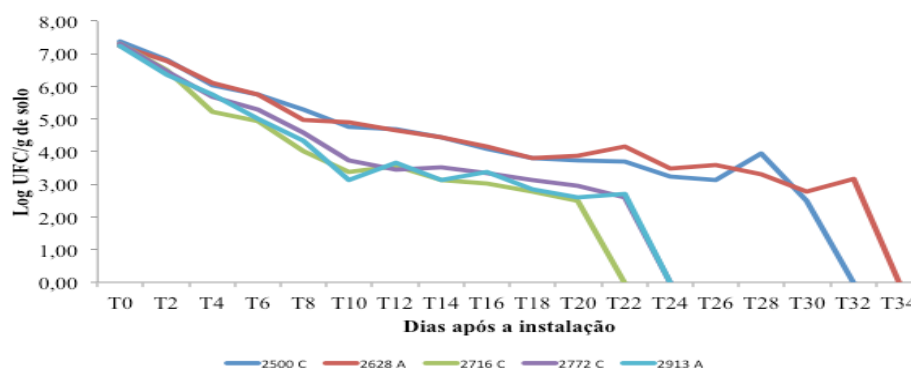


Figura 1. Período de sobrevivência de cinco isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições controladas e temperatura constante de 20 °C.

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres em diferentes tipos de solo sob condições controladas.

Houve diferença no período de sobrevivência do isolado 2628A de Cff nos diferentes tipos de solos (Figura 2). O período variou de 30 dias (solo 2) a 94 dias (solo 4) após a infestação do solo. A porcentagem de umidade do solo variou de 15 a 22%, sendo realizada uma correção no teor de umidade do solo 40 dias após a infestação, elevando-a para próximo de 20%.

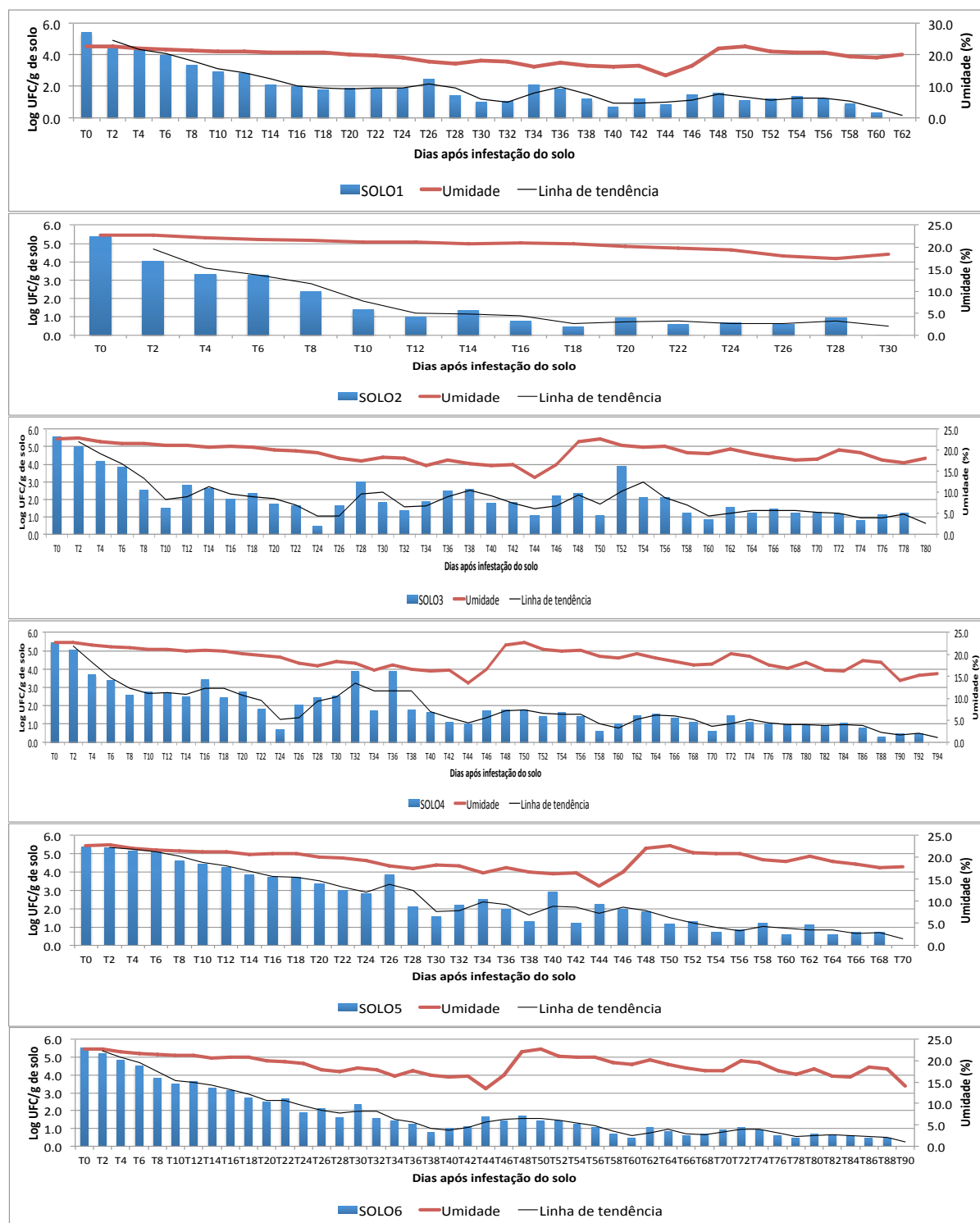


Figura 2. Quantidade de células bacterianas do isolado 2628A de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* recuperadas em diferentes tipos de solo, amostrados em intervalos de dois dias após a infestação e correlacionando o teor de umidade.

Sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob condições de campo.

O período de sobrevivência de Cff como células livres no solo foi de 46 dias, 34 dias e 80 dias, respectivamente para os ensaios I, II e III (Figura 3). Os dados meteorológicos durante os três ensaios estão na Figura 4. Durante os 15 primeiros dias após a instalação dos ensaios, o acumulado de precipitações foi de 90,4 mm; 70,9 mm e 12,9 mm nos ensaios I, II e III, respectivamente. Nos 30 primeiros dias o acumulado no ensaio I foi de 133,3 mm; no ensaio II de 112,5 mm e no ensaio III de 22,8 mm. Após 45 dias, 205,8 mm e 58,1 mm nos ensaios I e III, respectivamente. No ensaio III o acumulado aos 60 dias foi de 72,3 mm e aos 75 dias 134,0 mm. A média das temperaturas mínimas e máximas após 15 dias da instalação dos ensaios foram 16,6 °C/21,4 °C; 20,0 °C/30,1 °C e 11,7 °C/24,2 °C; respectivamente nos ensaios I, II e III. Após 30 dias da instalação as médias foram 15,5 °C/21,8 °C no ensaio I; 19,5 °C/30,2 °C no ensaio II e 11,0 °C/24,9 °C no ensaio III. Aos 45 dias 14,9 °C/21,6 °C e 11,3 °C/25,9 °C, respectivamente nos ensaios I e III. No ensaio III as médias foram 11,7 °C/26,7 °C aos 60 dias e 11,7 °C/26,6 °C aos 75 dias após a instalação.

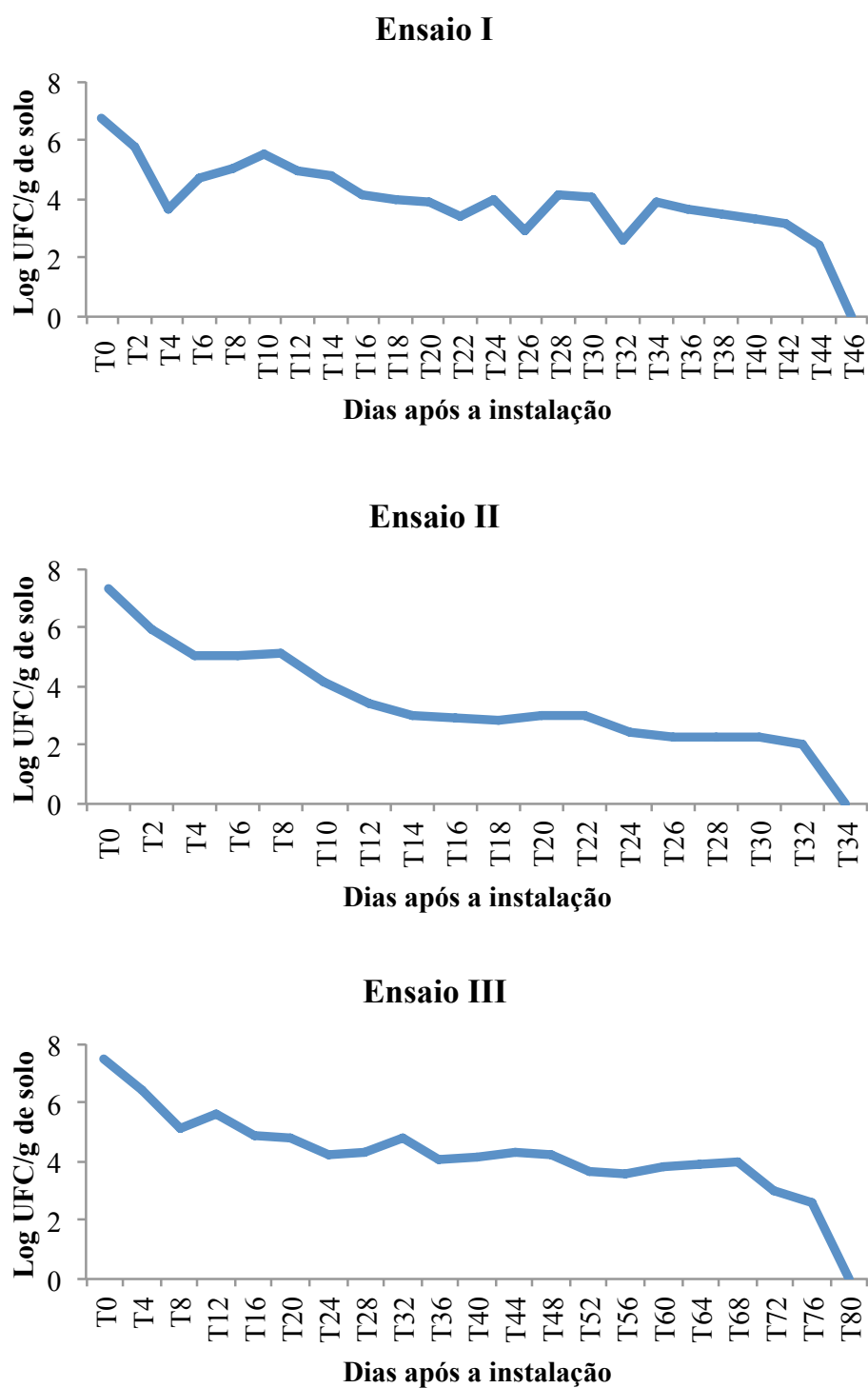


Figura 3. Período de sobrevivência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como células livres no solo sob condições de campo.

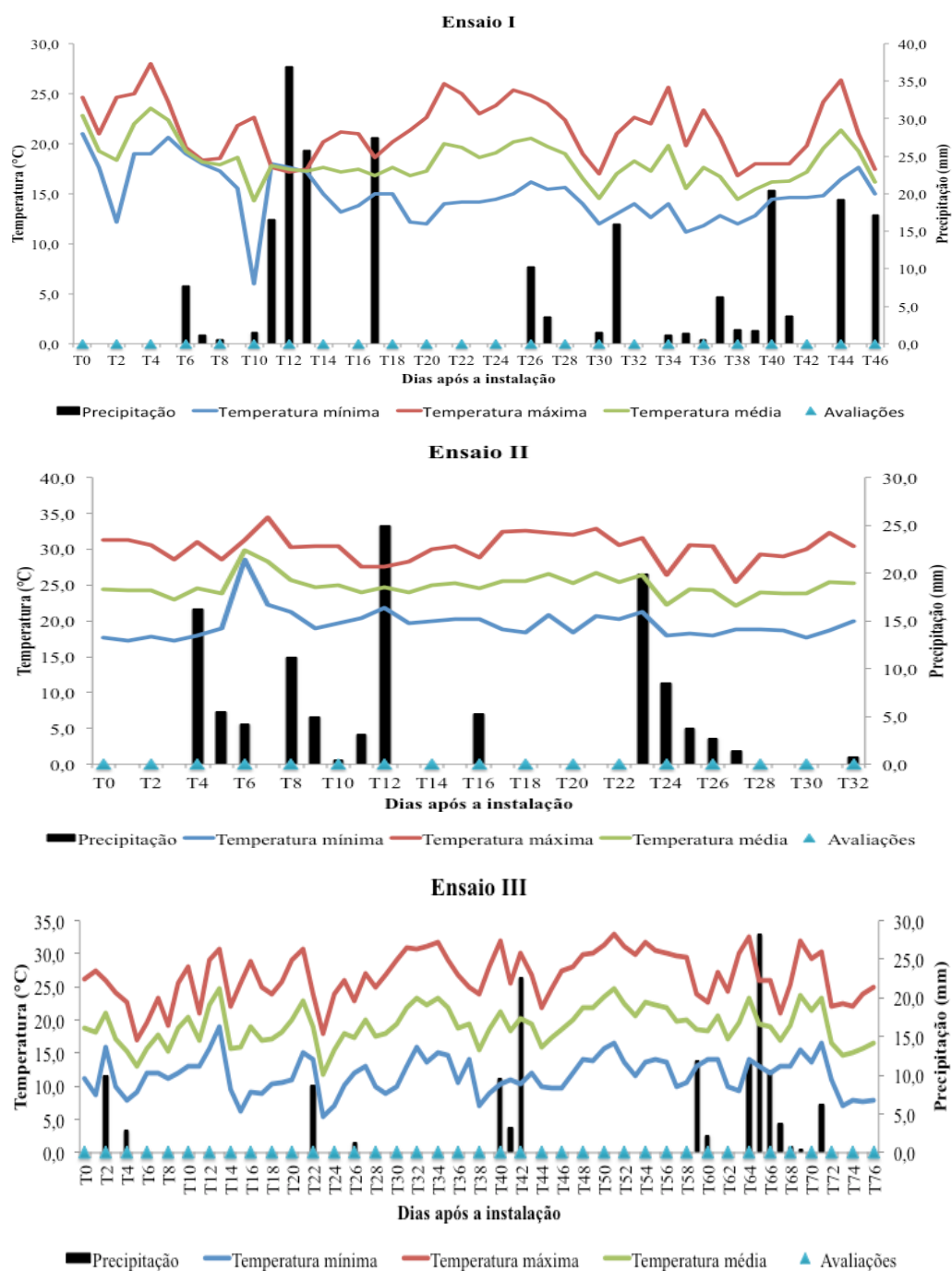


Figura 4. Dados meteorológicos de precipitação (mm), temperaturas mínima, máxima e média (°C) e período em que foram avaliados os solos nos ensaios a campo.

Detecção molecular de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no solo

O kit Mo BIO foi eficaz para extrair o DNA total do solo e com qualidade para possibilitar a amplificação pela PCR de Cff com os *primers* específicos (Figura 5A e 5B, respectivamente). A técnica foi eficaz para detectar a bactéria em concentração mínima que variou de 5×10^5 a 5×10^6 UFC/g de solo (Figura 6). O DNA de Cff não foi detectado pela PCR utilizando-se o kit de extração Mo BIO em nenhuma das 192 amostras de solo coletadas no campo nos anos de 2012 e 2013 (Figuras 7, 8, 9 e 10).

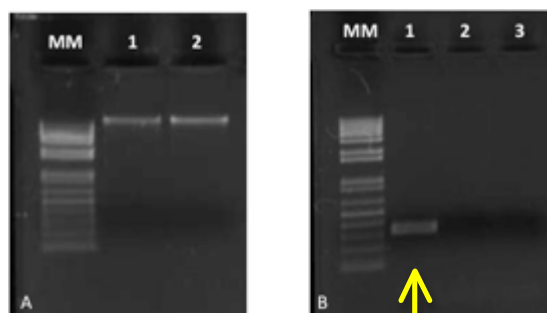


Figura 5. Géis de agarose a 1%. A) 5 µL de DNA total extraído com o kit Mo BIO, sendo MM-Marcador Molecular de 1 Kb plus (Invitrogen), 1- DNA extraído de 250 mg de solo + 50 µL de suspensão bacteriana de Cff ajustada para 10^8 UFC/mL, 2- DNA extraído apenas do solo. B) 5 µL de produto da PCR com as mesmas amostras e 3- controle negativo da PCR (substituição do DNA por água estéril na reação da PCR).



Figura 6. Gel de agarose a 1% com o produto da PCR amplificado com DNA extraído das amostras de solo com o kit Mo BIO, para padronização da técnica. MM-Marcador Molecular de 1Kb plus (Invitrogen), de A a I: diluições seriadas das amostras nas seguintes concentrações em UFC/g de solo A) 0, B) 5×10^6 , C) 5×10^5 , D) 5×10^4 , E) 5×10^3 , F) 5×10^2 , G) 5×10^1 , H) 5, I) apenas solo, J) controle negativo da PCR.

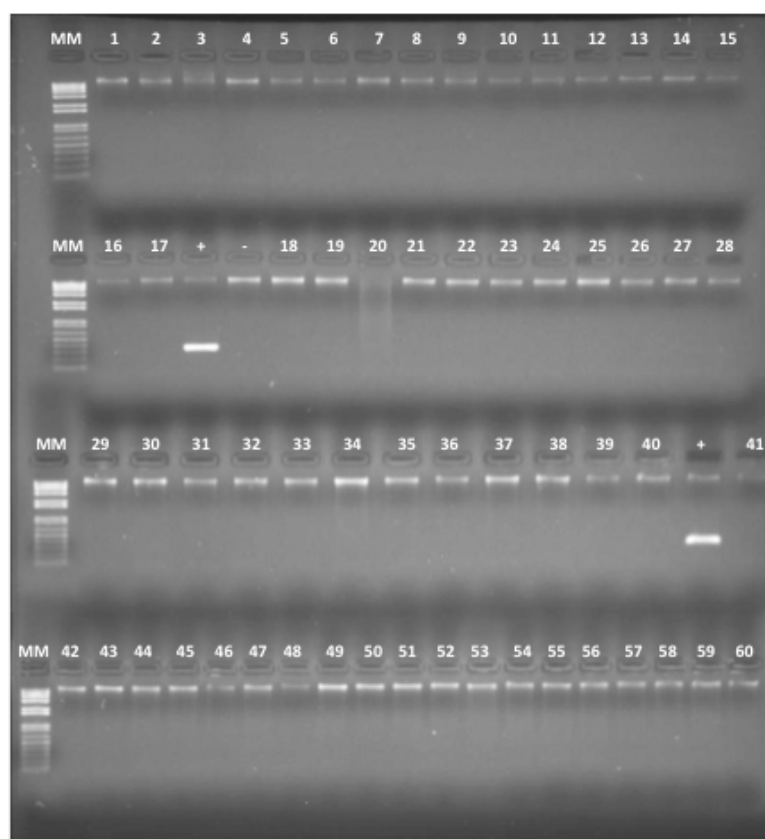


Figura 7. Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para detecção de Cff no solo. MM- Marcador Molecular; I Coleta 2012 - 1- E-R1 AS; 2-PG-R3 TS; 3- E-R2 TS; 4- PG-R4 PC; 5- E-R4 AC; 6- E-R2 AC; 7- PG-R1 PC; 8- E-R1 PS; 9- PG-R2 TS; 10- PG-R3 PS; 11- E-R1 PC; 12- PG-R3 PC; 13- E-R3 TC; 14- E-R4 AC; 15- E-R3 TS; 16- PG-R4 AC; 17- PG-R4 AS; controle positivo (2634-4); controle negativo (água); 18- PG-R2 AS; 19- E-R2 PS; 20- E-R4 PC; 21- E-R1 AC; 22- PG-R2 AC; 23- PG-R1 S; 24- PG-R1 TS; 25- E-R2 PC; 26- PG-R1 TC; 27- E-R2 AS; 28- E-R2 TC; 29- PG-R4 PS; 30- E-R1 TC; 31- PG-R3 TC; 32- E-R1 TS; 33- PG-R4 TC; 34- E-R3 AS; 35- E-R3 AC; 36- PG-R4 TS; 37- E-R3 PS; 38- PG-R3 AC; 39- PG-R2 PS; 40- E-R4 TS; controle positivo (2634-4); 41- PG-R1 AC; 42- PG-R2 PC; 43- E-R4 PS; 44- PG-R1 AS; 45- PG-R3 AS; 46- PG-R2 TC; 47- E-R4 TC; 48- E-R3 PC; II Coleta 2012 - 49- E-R4 TC; 50- E-R2 PS; 51- E-R3 AC; 52- E-R3 PS; 53- E-R3 AS; 54- E-R4 AS; 55- E-R2 AC; 56- E-R2 AS; 57- E-R1 AS; 58- E-R1 AC; 59- E-R4 TS; 60- E-R1 TS. Legendas que representam os campos amostrais: E- Área da Fazenda Estiva; PG- Área de Ponta Grossa; R1/R2/R3/R4- Repetição/área com (C) ou sem (S) inóculo; A- Área com aveia; T- Área com trigo; P- Área com pousio.

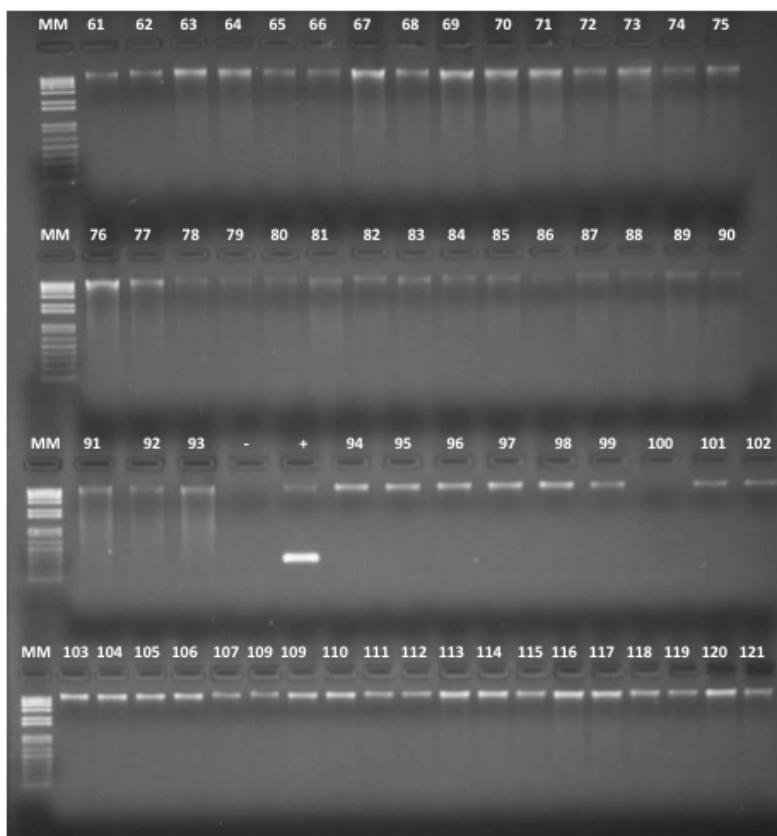


Figura 8. Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para detecção de Cff no solo. MM- Marcador Molecular; 61- E-R2 TS; 62- E-R1 TC; 63- E-R4 PC; 64- E-R2 AS; 65- PG-R2 PC; 66- PG-R1 TC; 67- E-R4 AC; 68- PG-R1 PC; 69- E-R1 PS; 70- E-R2 PC; 71- E-R3 PC; 72- E-R2 TC; 73- E-R3 TS; 74- PG-R2 PS; 75- E-R4 PS; 76- E-R3 TC; 77- PG-R3 AS; 78- PG-R2 AS; 79- PG-R4 AS; 80- PG-R4 AC; 81- PG-R3 PS; 82- PG-R3 AC; 83- PG-R1 PS; 84- PG-R2 TC; 85- PG-R3 PC; 86- PG-R4 TS; 87- PG-R2 TS; 88- PG-R4 PC; 89- PG-R3 TS; 90- PG-R1 TS; 91- PG-R1 AS; 92- PG-R4 PS; 93- PG-R3 TC; controle negativo (água); controle positivo (2634-4); 94- PG-R2 AC; 95- PG-R4 TC; 96- PG-R1 AC; I Coleta 2013, 97- F-aveia preta; 98- M- trigo; 99- M- pousio; 100- F- nabo; 101- S- canola; 102- M- cevada; 103- M- azevém; 104- S- cevada; 105- M- nabo; 106- S- aveia preta; 107- M- canola; 108- F- aveia branca; 109- M- aveia branca; 110- F- azevém; 111- F- canola; 112- S- nabo; 113- S- trigo; 114- F- pousio; 115- M- aveia preta; 116- S- azevém; 117- S- aveia branca; 118- S- pousio; 119- F- trigo; 120- F- cevada; II Coleta 2013, 121- F- aveia preta. Legendas que representam os campos amostrais: E- Área da Fazenda Estiva; PG- Área de Ponta Grossa; R1/R2/R3/R4- Repetição/área com ou sem inóculo; A- Área com aveia; T- Área com trigo; P- Área com pousio; a partir da I coleta de 2013, a nomenclatura citada representa a ordem em que ocorreram os plantios sucessivos antes da cultura do feijão (F- feijão/M- milho/S- soja).

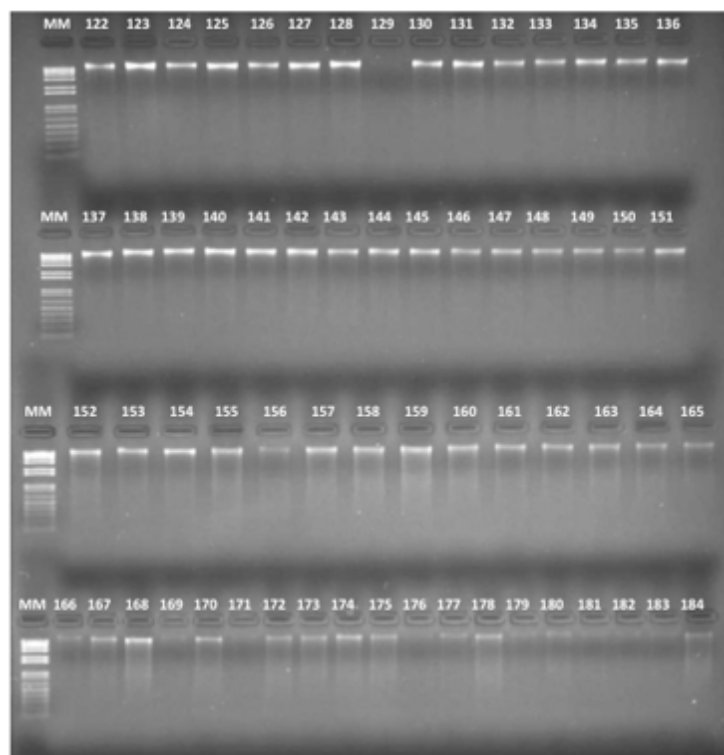


Figura 9. Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para detecção de Cff no solo. MM- Marcador Molecular; 122- M- pousio; 123- S- trigo; 124- S- cevada; 125- S- aveia preta; 126- M- cevada; 127- S- pousio; 128- S- aveia branca; 129- S- azevém; 130- M- azevém; 131- F- cevada; 132- F- canola; 133- M- aveia branca; 134- M- aveia preta; 135- M- trigo; 136- F- pousio; 137- F- aveia branca; 138- F- nabo; 139- S- nabo; 140- F- azevém; 141- S- canola; 142- M- nabo; 143- F- trigo; 144- M- canola; III Coleta 2013, 145- F- canola; 146- S- AVEIA PRETA; 147- F- NABO; 148- S- CANOLA; 149- M- CANOLA; 150- S- aveia branca; 151- F- aveia preta; 152- M- nabo; 153- F- pousio; 154- M- trigo; 155- M- aveia branca; 156- M- pousio; 157- F- trigo; 158- S- azevém; 159- S- trigo; 160- F- azevém; 161- M- azevém; 162- M- aveia preta; 163- F- cevada; 164- M- cevada; 165- S- pousio; 166- F- aveia branca; 167- S- nabo; 168- S- cevada; IV Coleta 2013, 169- F- aveia preta; 170- M- aveia branca; 171- F- aveia branca; 172- F- trigo; 173- F- cevada; 174- S- aveia branca; 175- F- canola; 176- S- aveia preta; 177- M- trigo; 178- F- pousio; 179- S- cevada; 180- F- azevém; 181- F- nabo; 182- M- canola; 183- S- azevém; 184- M- azevém. Legendas que representam os campos amostrais: nomenclatura citada representa a ordem em que ocorreram os plantios sucessivos antes da cultura do feijão (F- feijão/M- milho/S- soja).

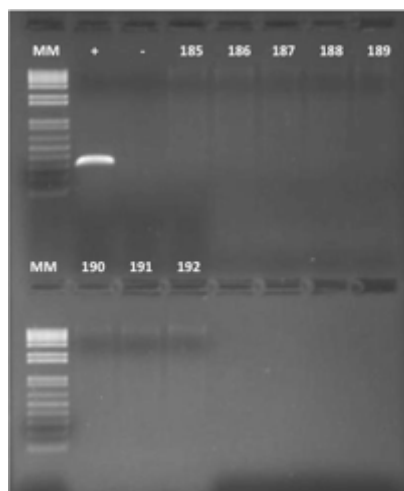


Figura 10. Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para detecção de Cff no solo. MM- Marcador Molecular; controle positivo (2634-4); controle negativo (água); 185- M- pousio; 186- S- nabo; 187- F- nabo; 188- M- aveia preta; 189- S- trigo; 190- S- canola; 191- S- pousio; 192- M- cevada. Legendas que representam os campos amostrais: nomenclatura citada representa a ordem em que ocorreram os plantios sucessivos antes da cultura do feijão (F- feijão/M- milho/S- soja).

DISCUSSÃO

O período de sobrevivência de Cff no solo pode ser influenciado pelo tipo de solo, teor de umidade e a temperatura (SILVA JÚNIOR et al., 2012). Nesse mesmo trabalho os autores inferem que o teor de umidade do solo e a temperatura durante o período de incubação podem favorecer o aumento da população de microrganismos antagonísticos, os quais são responsáveis pela produção de antibióticos que reduzem ou inibem a população de Cff no solo. Os resultados aqui observados evidenciaram que os fatores meteorológicos (precipitação e temperatura) interferiram na sobrevivência de Cff como células livres no solo. Observou-se no ensaio III, em que Cff apresentou maior período de sobrevivência (Figura 3), houve menor precipitação e temperaturas médias mais baixas do que nos outros dois ensaios, provavelmente por desfavorecer as populações microbianas antagonistas do solo, as quais são

responsáveis pela produção de antibióticos (SCHUSTER; COYNE, 1974). A umidade do solo interfere diretamente na microflora antagonista, como protozoários, actinobactérias, bactérias, fungos e nematóides (SCHUSTER; COYNE, 1974). O período de sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em restos culturais no solo foi influenciado pela temperatura, sendo que o aumento deste fator influenciou de forma negativa na população da fitobactéria no solo e também favoreceu a ação antagonista de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Paenibacillus macerans* e *Bacillus megaterium* (SILVA et al., 2012).

Bactérias pertencentes ao gênero *Curtobacterium* normalmente não sobrevivem por longos períodos no solo, como células livres, porém podem tolerar a estação do inverno (SCHUSTER; COYNE, 1974). Como a maioria das fitobactérias, Cff não produz endósporos que é uma estrutura de resistência. Cff é resistente a secagem, podendo permanecer viável por 24 anos, em sementes de feijoeiro armazenadas em laboratório (BURKHOLDER, 1945) e no campo pode sobreviver no solo por pelo menos dois invernos na cultura de feijão (EPPO, 2011). Outro trabalho mostrou que Cff pode sobreviver por até 240 dias nos restos culturais de feijoeiro mantidos na superfície do solo, porém o período de sobrevivência reduziu para 30 dias, quando incorporados a 20 cm de profundidade (SILVA JÚNIOR et al., 2012). A bactéria permaneceu viável e patogênica ao feijoeiro por aproximadamente 700 dias (22 meses) em solo de cerrado coletado de um plantio de feijoeiro naturalmente infestado, armazenados sob condições de casa-de-vegetação (MIRANDA FILHO, 2010). Para o patossistema do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, a bactéria sobreviveu por até 180 dias nos restos

culturais mantidos na superfície do solo e por até 120 dias com incorporação dos restos, com forte influência da umidade no período de sobrevivência (TORRES, 2001).

Neste estudo Cff sobreviveu por maior período no solo 4, classificado como textura argilosa. Estudos evidenciaram que bactérias Gram negativas sobreviveram por maior período de tempo, sob condição de baixa umidade, no interior de agregados argilosos em comparação com a superfície, por causa da maior disponibilidade de água no interior (HATTORI, 1973), fato que pode explicar o menor período de sobrevivência no solo 1, com textura arenosa (Tabela 1 e Figura 2). Há relatos que os agregados de argila formam uma espécie de envelope ao redor das células bacterianas, causada pela atração eletrostática entre os grupos carregados na superfície da argila e as bactérias, protegendo a célula da dessecação e reidratação do solo (MARSHALL, 1971). Solos enriquecidos com matéria orgânica tendem a aumentar o número de microrganismos antagônicos (SCHUSTER; COYNE, 1974), porém neste trabalho não foi possível observar a interferência do teor de matéria orgânica do solo na população de Cff.

Cff não foi detectada nas amostras de solo provenientes de áreas com histórico da ocorrência da murcha-de-curtobacterium pela técnica da PCR utilizando-se o DNA total extraído com o kit comercial (Mo Bio Laboratories), possivelmente pela baixa sensibilidade em conciliar as duas técnicas, extração e a PCR. O kit comercial foi eficiente em extrair DNA de 10^5 a 10^6 células bacterianas totais por g de solo (VISHNIVETSKAYA et al., 2014), semelhante ao observado na presente pesquisa (Figura 6). Como observado nos três ensaios de campo (Figura 3), as populações de Cff reduzem rapidamente e permanecem viáveis em baixas populações no solo, provavelmente em concentrações inferiores ao mínimo necessário para serem detectadas pela PCR.

Baseado nos resultados do presente trabalho, Cff pode sobreviver como células livres viáveis no solo em baixas concentrações, exigindo maior atenção no manejo da murcha-de-curtobacterium na cultura do feijoeiro. Aconselha-se a rotação com cultura não hospedeira da bactéria para minimizar o risco do inóculo primário ou incorporação dos restos culturais do feijoeiro com pousio por pelo menos um ano.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 464S-474S, 1999.
- APPEL, L. J.; MOORE, T. J.; OBARZANEK, E. et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p.1117-1124, 1997.
- BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogen causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, v. 35, p. 743-744, 1945.
- 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**, v. 129, p. 3545-3548, 1983.
- DAWSON-HUGHES, B.; DALLAL, G. E.; KRALL, E. A.; SADOWSKI, L.; SAHYOUN, N.; TANNENBAUM, S. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 878–883, 1990.
- DE BOER S.H., 1982. Survival of phytopathogenic bacteria. In: Mount M.S., Lacy G.H. (eds). *Phytopathogenic prokaryotes*, pp. 285-305. Academic Press, New York, USA.
- EPPO. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. OEPP/EPPO Bulletin, v. 41, p.320-328, 2011.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT, Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 14 out. 2014.
- HATTORI, T. **Microbial life in the soil**: an introduction. New York: Dekker, 1973. 427 p.
- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.
- LENNON, J. T.; AANDERUD, Z. T.; LEHMKUHL, B. K.; SCHOOLMASTER JR., D. R. Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. **Ecology**, v. 93, p. 1867-1879, 2012.
- MARSHALL, K. C. Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. In: MCLAREN, A. D.; SKUJINS, J. J. **Soil biochemistry**, v. 2, p. 409- 445, 1971.
- MIRANDA FILHO, R. J. **Etiologia, epidemiologia e fisiologia da murcha de *Curtobacterium***. 2010. 107 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fitopatologia do Instituto

de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2010. Cap. 3. Disponível em: <
http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=6323>. Acesso
 em: jan. 2015.

OSDAGHI, E., SARDROOD, B. P., BAVI, M., OGHAZ, N. A., KIMIAEI, S., HADIAN, S.
 First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing cowpea bacterial
 wilt in Iran. **Journal of Phytopathology**, doi: 10.1111/jph.12300, 2014.

SAMMER, U. F., REIHER, K. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean
 in Germany – A threat for farming. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 314-316, 2012.

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

SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R.
 Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira.
Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, p. 757-765, 2012.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; NEGRÃO, D. R.; ITAKO, A. T.; SOMAN, J. M.; MARINGONI,
 A. C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop
 debris. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 331-337, 2012.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium*
flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337,
 2002.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-Curtobacterium. In: PRIA, M. D.;
 SILVA, O. C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Paraná: UEPG, 2010. Cap. 2, p. 23-30.

TORRES, J. P. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro: sobrevivência em
 restos de cultura e ocorrência em sementes produzidas no Estado do Paraná. 2001. 68 f.
 Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP,
 Botucatu, 2001.

VIDAVER, A. K.; LAMBRECHT, P. A (2004). Bacteria as plant pathogens. The Plant
 Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; LAYTON, A. C.; LAU, M. C. Y.; CHAUHAN, A.; CHENG, K.
 R.; MEYERS, A. J.; MURPHY, J. R.; ROGERS, A. W.; SAARUNYA, G. S.; WILLIAMS, D.
 E.; PFIFFNER, S. M.; BIGGERSTAFF, J. P.; STACKHOUSE, B. T.; PHELPS, T. J.;
 WHYTE, L.; SAYLER, G. S.; ONSTOTT, T. C. Commercial DNA extraction kits impact
 observed microbial community composition in permafrost samples. **FEMS Microbiology**
Ecology, v. 87, p. 217-230, 2014.

CAPÍTULO 4

“Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* by MLSA”

Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* by MLSA

ABSTRACT

Among the diseases that could incide on common bean, there is the bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. But inside the genus *Curtobacterium* there are more three phytopathogenic pathovars, called *C. f.* pv. *betae*, causing vascular wilt and leaf spot of red beet; *C. f.* pv. *oortii*, causing vascular wilting on leaf and bulb spot on tulip and *C. f.* pv. *poinsettiae*, causing stem canker and leaf spot on *Euphorbia pulcherrima*. The aim of this research was to analyze the genetic diversity of strains belonging to *Curtobacterium flaccumfaciens* from different regions by multilocus sequence analysis (MLSA). Six housekeeping genes were analysed: *atpD*, *dnaK*, *rpoD*, *ppK*, *recA* and *gyrB*. The results shown large diversity between phytopathogenic pathovars of *Curtobacterium flaccumfaciens*; the phylogenetic tree with concatenated six genes shown two polyphyletic and one monophyletic group; the primers CffFOR2 and CffREV4 were specific to detected Cff in three main groups; maybe the strain from *Zantedeschia aethiopica* CFBP3400, need to be reclassified and there isn't correlation between phylogeny and pathogenicity on *Curtobacterium*.

INTRODUCTION

Brazil occupies the third world position in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production, overcome only by Myanmar and India (FAO, 2015). The common bean could be cultivated almost during the entire year in Brazil. It is cultivated in a large diversity of conditions of weather and soil, therefore subjected to a large numbers of diseases that can cause significant losses. Among them, there is the bacterial wilt disease, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) [Hedges] Collins and Jones. The first report of bacterial wilt disease occurred in South Dakota in 1920, causing losses around 90% of the production (Hedges, 1922), and in the following years, causing total death in crops (Hedges, 1926). The disease is classified as Quarantine for Europe, being subjected to phytosanitary regulations (EPPO, 2011). In Brazil it was classified as Quarantine until 1995, when the disease was first reported (Maringoni and Rosa, 1997). After, it became an emerging problem for common bean in different states like São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal and Goiás (Martins, 2012).

Formerly classified as *Corynebacterium*, the strains responsible for bacterial wilt had been re-classified as *Curtobacterium* (Collins and Jones, 1983). The plant-pathogenic strains of *Curtobacterium* were classified in only one species, named *Curtobacterium flaccumfaciens*. These species was divided in pathovars by a limited number of biochemical and physiological differences as well as by their unique host range (Young et al., 1978).

The other pathovars are *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae* (Keyworth et al.) Collins and Jones 1983 causing vascular wilt and leaf spot of red beet; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* [(Saaltink and Mass Gaesteranus) Collins and Jones

1983] causing vascular wilt on leaf and bulb spot of tulip; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* [(Starr and Pirone) Collins and Jones 1983] causing stem canker and leaf spot of *Euphorbia pulcherrima* (Mishra, 2007); *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *ilicis* [(Mandel et al., 1961) Collins et al., 1982], pathogen of american holly (*Ilex opaca*).

Strains of Cff display a large variability, though molecular approaches will enable us to have better understanding of this diversity. This knowledge could help to obtain bean cultivars resistant to the disease. Some studies were done to investigate the biodiversity among *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* but these studies were not accurate enough. Multilocus sequence analysis (MLSA), based on analysis of five to seven housekeeping genes was proven to be powerful to assess diversity, to be reproducible between laboratories and the results can be kept in databases. For example, this technique was successfully applied for species identification of *Enterococcus* (NASER et al., 2005), identification and classification of *Ensifer* genus (MARTENS et al., 2008), characterization of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* (JACQUES et al., 2012). No MLSA studies were realized so far for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Therefore, the aim of this research is to analyze the genetic diversity *Curtobacterium flaccumfaciens* strains from different regions by MLSA.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Twenty-seven strains from Brazil collection of College of Agronomic Sciences (FCA)-UNESP, Botucatu-SP, Brazil (UNESP) and 79 strains from CIRM-CFBP, French Collection of Plant-associated Bacteria at INRA (Institut National de la Recherche

Agronomique), Beaucoz , France, website: (https://www6.inra.fr/cirm_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria) were analysed (Table 1). Strains were conserved as lyophilized and cultures were stored after reviving in -80  C freezer with 40 % glycerol. The strains were checked for purity by cultivating on LPGA culture medium (3g/L yeast extract; 5 g/L peptone; 5 g/L glucose and 15 g/L agar; pH 7.0) by two days at 25  C.

Table1. List of all strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* belonging to the two collections (CIRM-CFBP-France and UNESP-Brazil) used in this study of genetic diversity, showing respective host of isolation, country and year for each strain.

Code strain	Classification of strain before MLSA	Host	Country	Isolation year
CFBP1003	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP1378	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	1958
CFBP1379	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Germany	1958
CFBP1381	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1959
CFBP1384	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	Netherlands	1967
CFBP1389	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	Hungary	1957
CFBP2402	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i> cv. <i>Rubra</i>	UK	1955
CFBP2403	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	
CFBP3391	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3392	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa</i> sp.	Netherlands	
CFBP3397	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa</i> sp.	Netherlands	1977
CFBP3398	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa</i> sp.	Netherlands	1977
CFBP3399	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa</i> sp.	Netherlands	1987
CFBP3400	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Netherlands	1990
CFBP3401	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	
CFBP3402	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1972
CFBP3403	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1972
CFBP3404	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Brazil	1980
CFBP3405	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		
CFBP3406	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		
CFBP3407	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3408	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3409	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Vigna angularis</i>	USA	1919
CFBP3410	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3411	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Vigna radiata</i>	USA	1934
CFBP3412	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>		USA	

CFBP3413	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>		USA	
CFBP3414	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	
CFBP3415	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	
CFBP3416	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	
CFBP3417	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	1958
CFBP3418	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP3419	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		1954
CFBP3420	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Romania	1965
CFBP3421	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	USA	1923
CFBP3422	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	1956
CFBP3423	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	1957
CFBP3424	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP3425	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP3426	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP3427	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	
CFBP3428	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1954
CFBP3429	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1955
CFBP3430	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>		1955
CFBP3431	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1955
CFBP3432	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	Netherlands	1965
CFBP3433	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	UK	1969
CFBP3434	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	UK	1969
CFBP3435	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	UK	1970
CFBP3436	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	Japan	1972
CFBP3437	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	Japan	1972
CFBP3438	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1958
CFBP3439	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1958
CFBP3440	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1958
CFBP3441	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1959
CFBP3442	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	USA	1958
CFBP3443	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>		1960
CFBP3444	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>		USA	
CFBP3449	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>		USA	
CFBP3452	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	USA	
CFBP3453	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	USA	1923
CFBP3454	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Romania	1965
CFBP3455	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		1954
CFBP3456	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungary	1957
CFBP3457	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Germany	1958
CFBP3459	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Vigna radiata</i>	USA	1934
CFBP3461	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3462	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	

CFBP3484	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3485	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3486	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3487	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3509	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	UK	1955
CFBP3510	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>		USA	
CFBP3511	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	USA	
CFBP3512	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	
CFBP3513	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>		USA	
CFBP6913	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	1996
CFBP6914	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	1996
2634UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	1996
2910UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	2002
3026UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	2006
3171UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	2013
3172UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2012
3173UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena strigosa</i> Schreb.	Brazil	2013
3174UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena strigosa</i> Schreb.	Brazil	2013
3175UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2012
3176UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2012
3177UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena strigosa</i> Schreb.	Brazil	2012
3178UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena strigosa</i> Schreb.	Brazil	2012
3179UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena sativa</i> L.	Brazil	2013
3180UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena sativa</i> L.	Brazil	2013
3181UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Avena sativa</i> L.	Brazil	2013
3183UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Brazil	2013
3184UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Brazil	2013
3185UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Brazil	2013
3186UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Brazil	2013
3187UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Brazil	2013
3188UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Brazil	2013
3189UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Brazil	2013
3190UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Brazil	2013
3191UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Brassica napus</i> L.	Brazil	2013
3192UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Brassica napus</i> L.	Brazil	2013
3193UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2013
3194UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2013
3195UNESP	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	Brazil	2013

Pathogenicity Test with strains from Brazil on common bean

Two different methods of bacterial inoculation were assessed, 1) by two punctures of needle, in the region between cotyledon and first leave, contaminated with each bacterial strain cultivated on agar culture medium (Maringoni, 2002); 2) by submerging the first leave on bacterial suspension adjusted for 10^8 CFU/mL, followed by incubation for 72 h (Darsonval et al., 2009). For each strain and each condition, the tests were performed in one pot containing three plants of Pérola cultivar of common bean. Plants were inoculated when the first true leave was totally formed, approximately 12 days after sowing. As control for both methods of inoculation, the plants were inoculated with autoclaved water instead of bacteria.

Molecular methods

Bacterial cells suspended in sterile water were prepared for PCR by boiling and freezing. For PCR assays we used six primers for housekeeping genes: *recA*, *gyrB*, *ppK*, *atpD*, *dnaK* and *rpoD* (Table 2). The set of primers for *gyrB*, *recA* and *ppK* genes are the same as for *Clavibacter* (Jacques et al., 2012). The primers for *atpD*, *dnaK* and *rpoD* genes needed to be designed for *Curtobacterium*. Each gene region was analyzed from the complete genome of *Curtobacterium* (CFBP3418). Using the software MULTALIN (INRA), some sequences of *Clavibacter* (CFBP2404, CFBP4999 and *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*-NCPBP2581 GenBank accession number: NC020891; *C. m.* subsp. *insidiosus* strain R1-1 GenBank accession number: CP011043) and *Curtobacterium* (CFBP3418 and *C. f.* pv. *betae*-DSM20141 GenBank accession number: AM410869.1, *C. f.* pv. *poinsettiae*-DSM20149 GenBank accession number: AM410867.1, *C. f.* pv. *oortii*-LMG7042 GenBank accession number: KF255551.1) were aligned. Based on the new consensus generated from the

alignment, new sets of primers were designed. The first step to check new primers was to analyse them with Primer-Blast in NCBI to check if there is only one copy on the entire genome of *Curtobacterium*. Secondly, the set of primers was revised if there are more mistakes using designing PCR primers-Online Analysis Tools (molbiol-tools.ca/PCR.htm) and two software Amplifix and Amplify. After design, the best annealing temperature was tested from 72 to 52 °C, in Bio-Rad Gradient Thermocycler.

The PCR reaction was adjusted for a final volume of 50 µL, containing 200 µM deoxynucleoside triphosphate (dNTP); 1,5 mM of MgCl₂; 500 nM for each primer; 0,75 U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega), and 6 µL of boiled cells bacterial suspension. PCR conditions for *recA*, *gyrB* and *ppK* genes were 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30s at 60 °C and 30s at 72 °C, and ended with 7 min at 72 °C. For the other three genes (*dnaK*, *atpD* and *rpoD*), the conditions were the same except for annealing temperature (62 °C) and extension step time (40 s).

Table 2. List of primers for housekeeping genes used for MLSA for *Curtobacterium flaccumfaciens* (PCR and sequencing primers).

Gene	Primer code	Sequence	(°C)***	Product size range	Gene target
<i>dnaK</i>	CffdnaKF2*	5'-GAC CTC GGA ACC ACC AAC TC-3'	62	650-700 bp	chaperone Hsp70
	CffdnaKR*	5'-CGC TGC TTG GCG ATC TTG TC-3'			
<i>atpD</i>	CffatpDF*	5'-AAG CGG AAG ATG TTG TCG AT-3'	62	700-750 bp	ATP synthase beta subunit
	CffatpDR*	5'-GAC ATC GAG TTC CCC CAC GAC-3'			
<i>rpoD</i>	CffrpoDF*	5'-TCG AGT TCG AGA TCG ACA AG-3'	62	850-900 bp	RNA polymerase
	CffrpoDR*	5'-CCG ATC AGG CCG ATG TTC G-3'			
<i>gyrB</i>	gyrB-F18**	5'-GGC GTC GGC AGC TCC GTC GTG AA-3'	60	900-950 bp	DNA gyrase subunit B
	gyrB-R29**	5'-GGC AGT CCT TGA GCT TGC CAG G-3'			
<i>recA</i>	recA-F**	5'-ACC GCG CTC GCA CAG ATC GAC C-3'	60	700-750 bp	recombinase A
	recA-R**	5'-GCC ATC TTG TTC TTG ACG ACC TTG AC-3'			
<i>ppK</i>	ppk-F**	5'-GAG ACC GAG ACC CTC ATC CAG-3'	60	600-700 bp	Polyphosphate kinase
	ppk-R**	5'-CCC GTC CCG ATG TGG CTG TAG TG-3'			

* Set of primers designed during this study; ** Set of primers used for *Clavibacter* (Jacques et al., 2012); *** Annealing temperature.

Some strains had their identity confirmed by sequencing the 16S rRNA gene using A1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3') and B6 (5'-TTG CGG GAC TTA ACC CAA CAT-3') primers (Manceau and Horvais, 1997). PCR was performed with a final volume of 50 μ L with 1X GoTaq buffer (Promega), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 0,4 μ M for each primer, and 1,25U GoldStar Taq DNA polymerase (Eurogentec, Belgium). The amplification program was done with initial denaturation at 92 °C for 2 min, 35 cycles of 92 °C, annealing at 52 °C for 45 s and extension to 72 °C for 1 min, following for final extension at 72 °C for 5 min.

Before sending for sequencing, all PCR products were checked by horizontal gel electrophoresis at 6 V/cm² in 1.5% agarose gel (wt/v) in 1% TAE buffer (0.04 M Tris-Acetate, 0.001 MEDTA, pH 8.0). After the gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/L) and visualized under UV light (Transilluminator Bio-Vision 1000, 302 nm wavelength) photographed and fingerprints were compared visually with the overview gels. The genetic sequencing was done directly from the PCR products and realized at GenoScreen (Lille, France).

The set of primers *Cff*FOR2- 5'GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC -3' and *Cff*REV4- 5'GAT GTT CCC GGT GTT CAG -3' (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002) was checked for accuracy to detect only *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* for all strains analyzed in this study. The PCR reaction was the same of others housekeeping genes for *Curtobacterium*, and the program as follow: initial denaturation at 94 °C for 3min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 62 °C for 45 s and 72 °C for 30 s, after final extension at 72 °C for 5 min. The positive result of this PCR consists in a single band at 306 bp.

Sequence analysis

The first step to analyse sequences is to create for each strain from forward and reverse sequences the final consensus sequence using Geneious Pro 4.8.5 software, allowing to edit and to assemble the sequences. Following this step, the sequences were aligned and trimmed at the ends using BioEdit software version 7.0.9.0. After, the phylogenetic trees for each gene and for all genes using concatenated data, were constructed with software MEGA 5.1, using the Maximum Likelihood and Neighbor Joining with 1000 bootstrap replicates. Concatenated sequences were edited following alphabetic order, ending in 3478 bp (bp 1 to 480 for *atpD*, 481 to 957 for *dnaK*, 958 to 1676 for *gyrB*, 1677 to 2221 for *ppK*, 2222 to 2815 for *recA* and 2816 to 3478 for *rpoD*). To choose the better substitution model for each and concatenated gene, some parameters were analyzed: BIC score (Bayesian Information Criterion), AIC value (Akaike Information Criterion), maximum likelihood value (InL) and number of parameters (including branch lengths), using MEGA 5.1 software.

Some others parameters were used for data analysis, like haplotype numbers (Hap), haplotype diversity values (Hd), nucleotidic diversities (θ_π and θ_w), and neutrality were estimated (Tajima's D and Fu and Li's D and F) for each gene using the DNA Sequence Polymorphism software (version 5.10.01), wherein condition of neutrality evolutionary forces operating on particular gene expected "0"; positive values for diversifying genes and negative under conditions of purifying selection.

The Nei-Gojobori Test was performed to check the synonymous/nonsynonymous substitution, using MEGA 5.1 (HA: $dN < dS$, purifying selection). Identification of potential recombinant sequences and likely parental sequences was performed using RDP version 4.46.0.1 with a set of seven nonparametric detection methods:

RDP, GENECONV, MAXCHI, CHIMAERA, BOOTSCAN, SISCAN and 3SEQ. Recombinant events were accepted when detected by at least three different methods. Split decomposition analysis was performed with SplitsTree4 (version 4.13.1), allowing to construct a tree-like network structure if conflicting phylogeny signals are detected in the data set.

MLST analysis: each strain received a number that represent alleles. Strains received the same number when showing the same sequence for one gene. Each strain was characterized by an allele sequence that represents the sequence type (ST). For this process online MLST Data Analysis was used (<http://pubmlst.org/cgi-bin/mlstanalyse.pl?site=pubmlst>). STs were analyzed into clonal complexes by online software eBURST V3. The program identified strains that share one or two alleles.

RESULTS

16S rDNA sequencing

The three strains that were sequenced for 16S rRNA, were confirmed to belong to the species *Curtobacterium flaccumfaciens* with high scores (Table 3).

Table 3. Confirmation of identity of some strains suspected to be *Curtobacterium* by sequencing 16S rRNA gene.

Strain Code	Result of NCBI Blast			Results of rdp Blast		
	Identification	Total score	Query coverage (%)	Maximum identification	Identification	Accession number
CFBP 2403	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1456	100	99	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209
CFBP 3400	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1777	100	100	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209
CFBP 3408	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1753	100	100	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209

Housekeeping gene sequencing

From all strains analyzed in this study, 22 showed absence of PCR product for some gene, as display in Table 4. For strains without PCR product, the test was done at least twice.

Table 4. List of 105 strains used in this study of genetic diversity showing the result of PCR tests for indicated primers.

Code strain	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>ppK</i>	<i>recA</i>	<i>rpoD</i>
CFBP1003	+	+	+	+	+	+
CFBP1378	+	+	+	+	+	+
CFBP1379	+	+	+	+	+	+
CFBP1381	+	+	+	+	+	+
CFBP1384	+	+	+	+	+	+
CFBP1389	+	+	+	+	+	+
CFBP2402	+	+	+	+	+	+
CFBP2403	+	+	+	+	+	+
CFBP3391	+	+	+	+	+	+
CFBP3392	+	+	+	+	+	+
CFBP3397	+	+	+	+	+	+
CFBP3398	+	+	+	+	+	+
CFBP3399	+	+	+	+	+	+
CFBP3400	+	+	+	+	+	+
CFBP3401	+	+	+	+	+	+
CFBP3402	+	+	+	+	+	+
CFBP3403	+	+	+	+	+	+
CFBP3404	+	+	+	+	+	+
CFBP3405	-	+	+	+	+	-
CFBP3406	+	+	+	+	+	+
CFBP3407	+	+	+	+	+	+
CFBP3408	+	+	+	-	+	+
CFBP3409	+	+	+	+	+	+
CFBP3410	+	+	+	+	+	+
CFBP3411	+	+	+	+	+	+
CFBP3412	+	+	+	+	+	+
CFBP3413	+	+	-	+	+	+
CFBP3414	+	+	+	+	+	+
CFBP3415	+	+	+	+	+	+
CFBP3416	+	+	+	+	+	+
CFBP3417	+	+	+	+	+	+
CFBP3418	+	+	+	+	+	+
CFBP3419	+	+	+	+	+	+
CFBP3420	+	+	+	+	+	+
CFBP3421	-	-	+	-	+	-
CFBP3422	+	+	+	+	+	+
CFBP3423	+	+	+	+	+	+
CFBP3424	+	+	+	+	+	+
CFBP3425	+	+	+	+	+	+
CFBP3426	-	-	+	+	+	-
CFBP3427	+	+	+	+	+	+
CFBP3428	+	+	+	+	+	-
CFBP3429	-	-	+	+	+	-
CFBP3430	+	+	+	+	+	+
CFBP3431	+	+	+	+	+	+
CFBP3432	+	+	+	+	+	+
CFBP3433	+	+	+	+	+	+
CFBP3434	-	-	+	+	+	-

CFBP3435	+	+	+	+	+	+
CFBP3436	+	+	+	+	+	+
CFBP3437	+	+	+	+	+	+
CFBP3438	+	+	+	+	+	+
CFBP3439	+	+	+	+	+	+
CFBP3440	+	+	+	+	+	+
CFBP3441	+	+	+	+	+	+
CFBP3442	+	+	+	+	+	+
CFBP3443	+	+	+	+	+	+
CFBP3444	+	+	+	+	+	+
CFBP3449	+	+	+	+	+	-
CFBP3452	-	+	+	+	+	-
CFBP3453	-	-	+	-	+	-
CFBP3454	-	+	-	+	+	-
CFBP3455	+	+	+	+	+	+
CFBP3456	-	+	+	+	+	+
CFBP3457	+	+	+	+	+	+
CFBP3459	+	+	+	+	+	+
CFBP3461	+	+	+	+	+	+
CFBP3462	-	+	-	+	+	-
CFBP3484	+	+	+	+	+	+
CFBP3485	+	+	+	+	+	+
CFBP3486	+	+	+	+	+	+
CFBP3487	+	+	+	+	+	+
CFBP3509	+	+	+	+	+	+
CFBP3510	-	-	+	+	+	-
CFBP3511	-	-	-	+	+	-
CFBP3512	-	-	+	+	+	-
CFBP3513	+	+	+	+	+	+
CFBP6913	-	+	+	+	+	-
CFBP6914	-	-	+	+	+	-
2634UNESP	+	+	+	+	+	+
2910UNESP	+	+	+	+	+	+
3026UNESP	+	+	+	+	+	+
3171UNESP	-	+	+	+	+	-
3172UNESP	+	+	+	+	+	+
3173UNESP	+	+	+	+	+	+
3174UNESP	-	-	-	+	-	-
3175UNESP	+	+	+	+	+	+
3176UNESP	+	+	+	+	+	+
3177UNESP	+	+	+	+	+	+
3178UNESP	+	+	+	+	+	+
3179UNESP	+	+	+	+	+	+
3180UNESP	+	+	+	+	+	+
3181UNESP	+	+	+	+	+	+
3183UNESP	+	+	+	+	+	+
3184UNESP	+	+	+	+	+	+
3185UNESP	+	+	+	+	+	+
3186UNESP	+	+	+	+	+	+
3187UNESP	+	+	+	+	+	+
3188UNESP	+	+	+	+	+	+
3189UNESP	+	+	+	+	+	+
3190UNESP	+	+	+	+	+	+
3191UNESP	+	+	+	+	+	+
3192UNESP	-	+	-	+	+	+
3193UNESP	+	+	+	+	+	+
3194UNESP	+	+	+	+	+	+
3195UNESP	+	+	+	+	+	+

Pathogenicity tests

All brazilian strains tested for pathogenicity inoculated by puncture of needle showed typical symptoms of the bacterial wilt of common bean. The symptoms caused by suspension inoculation were observed only for five strains (3171UNESP, 3172UNESP, 3174UNESP, 3178UNESP and 3191UNESP). These were the five most aggressive strains when inoculated by puncture of needle, causing the total plants death (Figure 1).

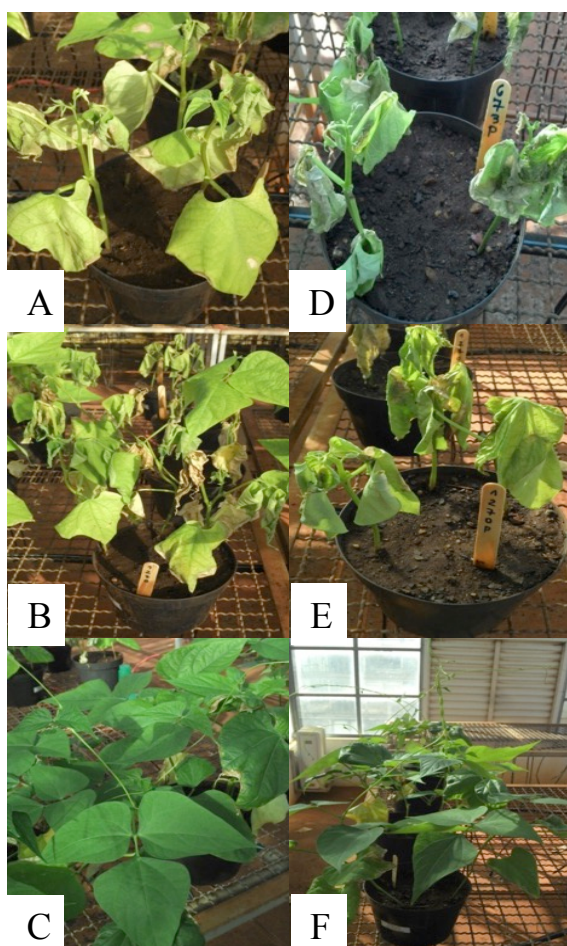


Figure 1. Pathogenicity test in greenhouse with plants Pérola cultivar of common bean, inoculated by leaf dipping in bacterial suspension (A,B and C) and inoculation with puncture of needle (D, E and F). Plants A and D were inoculated with 3191UNESP strain, B and E with 3171UNESP strain, C and F with water.

***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* specific PCR**

The set of primers published by Tegli, Sereni and Surico (2002) was able to detect all strains of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* used in this study, except for two false negative (strains CFBP3422 and CFBP3486) and one false positive (strain CFBP3401) previously classified as *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*.

Phylogenetic tree

We used three parameters to select the best model of nucleotide substitution for Maximum likelihood analysis (BIC: Bayesian Information Criterion, AICc: Akaike Information Criterion and *InL*: maximum likelihood value) (Table 5). However, these phylogenetic trees were supported by low values of bootstrap. All strains were grouped in only one monophyletic group for concatenated tree (data not shown), indicating that this type of analysis may not be relevant in this case.

Table 5. Parameters used to select the best-fit substitution model for Maximum likelihood.

Gene	Model	Parameters	BIC	AICc	<i>InL</i>
atpD	T92+I*	188	4238,27	2597,52	-1109,98
dnaK	T92+G**	206	5258,68	3451,12	-1518,67
gyrB	GTR+G+I***	211	7885,50	5942,29	-2759,54
ppK	T92+G+I	213	6165,86	4258,85	-1915,63
recA	T92+G+I	215	5868,30	3924,13	-1746,32
rpoD	T92+G	184	5100,21	3441,91	-1536,40
concat	GTR+G+I	181	25111,50	23189,21	-11413,50

*T92: Tamura 3-parameter; I: sites evolutionary invariable

**G: Gamma distribution

***GTR: General Time Reversible

The analysis of phylogenetic tree formed by concatenated six housekeeping genes using maximum likelihood and Jukes Cantor model showed a phylogenetic tree constituted by three main groups supported by high bootstrap values (Figure 2). The first group contained strains of *C. f. pv. poinsettiae* and *C. f. pv. flaccumfaciens*, the second group contained only strains of *C. f. pv. flaccumfaciens* including the type strain and the third group contains strains of *C. f. pv. betae*, *C. f. pv. oortii* and *C. f. pv. flaccumfaciens*. The strain CFBP3400 formed a group outside of *Curtobacterium flaccumfaciens*. Altogether, the genetic diversity within *Curtobacterium flaccumfaciens* strains was high, as indicated by the number of polymorphism in the analyzed loci (706 polymorphic sites per 3483 total of sites and overall nucleotide diversity of 0,02037). High level of polymorphism also was indicated by the percentage of polymorphism sites, being 15.34, 20.09, 28.26, 24.73, 17.18, 15.23 and 20.27 for *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppK*, *recA*, *rpoD* and concatenated genes, respectively (Table 6).

Table 6. Sequence variation at the six housekeeping loci among strains of *Curtobacterium*.

Locus	No. of sequences	No. of sites ^a	GC%	S ^b	Hap ^c	Hd ^d	θ ^e	θ _w ^f	Tajima's D ^g	Fu and Li's D ^g	Fu's F ^g
<i>atpD</i>	94	489	0,660	75	23	0,911	0,00906	0,02998	-2,37774	-7,16569	-5,181
<i>dnaK</i>	103	468	0,671	94	39	0,943	0,01787	0,03857	-1,97686	-3,11581	-10,811
<i>gyrB</i>	102	729	0,646	206	47	0,97	0,0332	0,05445	-1,60801	-5,86244	-2,352
<i>ppK</i>	106	546	0,664	135	41	0,955	0,02663	0,04748	-1,63021	-5,33582	-4,202
<i>recA</i>	107	588	0,677	101	47	0,971	0,01555	0,03275	-1,97555	-4,96026	-17,503
<i>rpoD</i>	92	663	0,657	101	24	0,892	0,01237	0,02991	-2,05335	-6,14391	-1,156
Concat (h)	87	3483	0,661	706	49	0,975	0,02037	0,04024	-1,90096	-5,46121	3,812

^a represent number of analyzed sites

^b number of polymorphism (segregating) sites

^c number of haplotypes

^d haplotype (gene) diversity

^e level of nucleotide diversity

^f level of nucleotide diversity from S

^g represent the results of neutrality testes performed using the method of Tajima, Fu and Li, Fu's F

^h data of six housekeeping genes concatenated

The phylogenetic trees constructed with ML algorithm for each housekeeping gene did not show the same evolutionary history. Only the tree formed with *gyrB* sequences showed grouping similar with concatenated genes, phylogenetic tree divided in three main groups supported by significant bootstrap values and with the same distribution of strains. Both analyses ML and NJ showed nodes supported by low values. The results of Shimodera-Hasegawa test performed for each gene sequence and concatenated sequences of genes (Table 7) indicated that all trees were incongruent with each other but were not different from the tree based on concatenated sequences, except for *dnaK* and *recA*, for which the probability was lower than threshold value ($P = 0.029$ and $P = 0.000$, respectively). The minimal MLSA scheme was checked using only for partial genes sequences (*atpD*, *gyrB*, *ppk* and *rpoD*), based on P value for concatenated genes showed in table 6 (P value > 0.05). This new phylogenetic 4-genes tree shown to be congruent with the six partial genes concatenated (Figure 3). New phylogenetic trees were constructed using only two set of housekeeping genes (*gyrB* + *recA* and *gyrB* + *rpoD*, Figure 4 and 5, respectively). Both phylogenetic tree shown congruent result with concatenated six genes. The tree using *gyrB* and *recA* genes shown to be more suitable for *Curtobacterium* because: a) the phylogenetic tree constructed with single *gyrB* shown congruent with concatenated six genes; b) all strains were amplified by PCR using *recA* primers; c) both set of primers are the same used for *Clavibacter* (Jacques et al., 2012) and d) *recA* gene shows more diversity than *rpoD*.

Table 7. Result of *P* values for Shimodera-Hasegawa test performed with each partial gene and concatenated six partial genes bases in tree topologies using Maximum Likelihood

Locus	<i>P</i> value						Concat
	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>ppK</i>	
<i>atpD</i>		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>dnaK</i>	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>rpoD</i>	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
<i>gyrB</i>	0.009	0.000	0.011		0.000	0.000	0.006
<i>recA</i>	0.001	0.000	0.007	0.000		0.000	0.000
<i>ppK</i>	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000		0.003
Concat	0.217	0.029	0.153	0.090	0.000	0.240	

Phylogenetic network and sequence types

All loci showed polymorphism with number of polymorphic sites range from 75 (*atpD*) to 206 (*gyrB*). The number of alleles at each locus varied from 24 for *rpoD* to 47 for *gyrB* and *recA* (Table 6).

The phylogenetic network was constructed for each and concatenated genes using the Neighbor-Net algorithm to detect signal conflict in the gene sequence data, which could indicate, if happening, exchange or acquisition of genetic material (Figure 6). The more reticulation there are in the network, the more conflicting signal there is, possibly by exchange of genetic material. All locus showed significant number of reticulations. However, *gyrB*, *ppK* and *recA* showed more reticulations. The network for *dnaK* allowed to identify *C. f. pv. betae*, *C. f. pv. oortii* and *C. f. pv. flaccumfaciens* sharing alleles each other. The analysis of *gyrB* showed alleles shared between *C. f. pv. poinsettiae* and *C. f. pv. flaccumfaciens* and other strains from *C. f. pv. flaccumfaciens* sharing alleles between *C. f. pv. betae* and *C. f. pv. oortii*. The network with *ppK* showed result similar as *gyrB*. The network for *recA* exhibited strains from *C. f. pv. flaccumfaciens* sharing alleles with other three pathovars. The network

with concatenated genes presented significant number of reticulations. The process of recombination should have contributed to genetic evolution within *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Using RDP software at least three recombinant events were detected in the data set (confirmed by six different tests) (Table 8). One event was detected between positions 488 (*atpD*) and 692 (*dnaK*) on concatenated sequence by RDP, Geneconv, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3 Seq tests. It involved ST7 as a major parent for ST13. The other event started in the same position but ended on 967 (*gyrB*) on concatenated sequence. It involved ST22 as a major parent (95.2%) for ST20. The last event started and ended the same position (488 and 967) but ST7 was the major parent (99.4%) for ST20. There are more 13 events of recombination detected on the data set but confirmed only by two tests (SiScan and 3 Seq) (Table 8).

Table 8. Results of recombination detection program (RDP) analyzed with a set of tests

Recombinant	Beginning breakpoint	Ending breakpoint	Major Parent (percentage)	Tests confirmed
ST1	488 (<i>atpD</i>)	802 (<i>dnaK</i>)	ST37 (96.5)	SiScan/3Seq
ST27	434 (<i>atpD</i>)	1043 (<i>gyrB</i>)	ST37 (98.2)	SiScan/3Seq
ST13	488 (<i>atpD</i>)	692 (<i>dnaK</i>)	ST7 (unknown)	RDP/Geneconv/MaxChi/Chimaera/SiScan/3Seq
ST12	1 (<i>atpD</i>)	1008 (<i>gyrB</i>)	ST31 (98.7)	SiScan/3Seq
ST36	488 (<i>atpD</i>)	802 (<i>dnaK</i>)	ST37 (97.5) and ST31 (97.5)	SiScan/3Seq
ST39	488 (<i>atpD</i>)	802 (<i>dnaK</i>)	ST37 (97.5) and ST31 (97.5)	SiScan/3Seq
ST40	488 (<i>atpD</i>)	802 (<i>dnaK</i>)	ST37 (97.1)	SiScan/3Seq
ST28	129 (<i>atpD</i>)	2060 (<i>ppK</i>)	ST37 (98.7)	SiScan/3Seq
ST30	488 (<i>atpD</i>)	978 (<i>gyrB</i>)	ST31 (99.6)	SiScan/3Seq
ST38	488 (<i>atpD</i>)	811 (<i>dnaK</i>)	ST37 (97.2)	SiScan/3Seq
ST18	1712 (<i>ppK</i>)	3478 (<i>rpoD</i>)	ST11 (98.8)	SiScan/3Seq
ST20	488 (<i>atpD</i>)	967 (<i>gyrB</i>)	ST22 (95.2)	RDP/Geneconv/MaxChi/Chimaera/SiScan/3Seq
ST21	319 (<i>atpD</i>)	811 (<i>dnaK</i>)	ST31 (99.6)	SiScan/3Seq
ST20	488 (<i>atpD</i>)	967 (<i>gyrB</i>)	ST7 (99.4)	RDP/Geneconv/MaxChi/Chimaera/SiScan/3Seq
ST10	319 (<i>atpD</i>)	802 (<i>dnaK</i>)	ST31 (99.6)	SiScan/3Seq
ST18	1712 (<i>ppK</i>)	3478 (<i>rpoD</i>)	ST43 (99.9)	SiScan/3Seq

A total of 50 ST were identified, 38 belonging to *C. f. pv. flaccumfaciens*, 3 for *C. f. pv. poinsettiae*, 7 for *C. f. pv. oortii* and 2 for *C. f. pv. betae*.

Twenty nine ST were represented by a single strain and the biggest ST group by 5 strains. The result of eBurst algorithm was able to identify only one clonal complex within *Curtobacterium flaccumfaciens*. The clonal complex linked 2 ST. All other ST were singletons (Figure 7). This clonal complex clustered two strains from CFBP collection (CFBP3484 and 3485), both were isolated from *Phaseolus vulgaris* in USA. The 48 remaining ST were singletons representing 84 strains.

DISCUSSION

The classification of *Curtobacterium flaccumfaciens* were based on techniques linked to subjective interpretation of agarose gels (McDonald and Wong, 2000; Guimarães et al., 2003; Souza et al., 2006; Agarkova et al., 2012). Rep-PCR shown that *Curtobacterium flaccumfaciens* could be separated from other Gram-positives bacteria (*Clavibacter* and *Rathayibacter*) but strains of *C. f. pv. flaccumfaciens* were dispersed into two groups within others pathovars (McDonald and Wong, 2000). In other study, AFLP and BOX-PCR did not allow to differentiate between four pathogenic pathovars of *Curtobacterium*. Using BOX-PCR *C. f. pv. flaccumfaciens* were distributed along the entire phylogenetic tree, only *C. f. pv. oortii* and *C. f. pv. poinsettiae* were grouped together. AFLP allowed separation of *C. f. pv. betae* from all three others pathovars. Only PFGE allowed the distinct grouping of four pathovars (Guimarães et al., 2003). Souza et al. (2006) using rep-PCR technique observed that *C. f. pv. flaccumfaciens* did not group relative of isolation country and showed that there is genetic variability between strains of *C. f. pv. flaccumfaciens*. The genetic diversity also was

confirmed by analyzing 67 strains collected between 1957-2009 from bean and alternative hosts by AFLP, PFGE and rep-PCR (Agarkova et al., 2012). High diversity in *C. f. pv. flaccumfaciens* also was confirmed by rep-PCR and serology, wherein formed two clusters mixed with strains of other pathovars (McDonald and Wong, 2000).

The MLSA was successfully performed for differentiation between Gram-positive bacteria like for *Microbacterium*, *Aureobacterium* and *Clavibacter* (Richert et al., 2007; Jacques et al., 2012; Tancos et al., 2015; Gonzalez and Trapiello, 2015). The results showed in this research indicate that using six housekeeping genes, the *Curtobacterium flaccumfaciens* species is not structured according with pathovars. The four plant pathogenetic pathovars did not exhibited monophyletic groups. The pathovar *flaccumfaciens* showed high genetic diversity between strains. The variable sites (15.2% to 28.2%) can be considered high when compared, for example, to *Clavibacter* (5.0% to 12.8%) (Jacques et al., 2012), *Xanthomonas campestris* (1.8% to 10.2%) (Fargier et al., 2011) or *Helicobacter pylori* (19.8% to 23.7%) (Maggi et al., 2001).

Our results confirm the former results. Beyond of no observation of monophyletic group, the phylogenetic tree did not show correlation with year and geographical isolation. MLSA revealed that the species is structured in three major clusters. One strain appeared alone (CFBP3400). Genetic sequencing of 16S rDNA gene confirmed the identity as *Curtobacterium flaccumfaciens*. This strain may belong to a new pathovar, or may even be classified in another species. Further analysis are necessary to solve the taxonomic position of this strain.

The three observed clusters do not correspond to known pathovars. We could not observe correlation between pathology and phylogeny. This is similar to the

situation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, on common bean, where four different lineages can have the same impact on the same host (Hajri et al., 2009; Mhedbi-Hajri et al., 2011). In this case, the type 3 effectors repertoire of the strains could explain the convergent pathogenicity between the genetically divers strains (Hajri et al., 2009). A similar mechanism could be present here in *Curtobacterium* explaining the divergence between phylogeny and pathogeny. However, as *Curtobacterium* does not harbor Type 3 secretion system and effectors, the underlying mechanisms are probably different.

The MLSA results can give insights about the evolutionary history of *Curtobacterium flaccumfaciens*. The analysis of Split-tree revealed that recombination could affect *dnaK*, *gyrB*, *ppK* and *recA*. These results were confirmed by RDP software analysis.

The results of Tajima's and Fu/Li's Tests confirmed that there is high purifying selection diversity or indicating recent demography expansion in *Curtobacterium flaccumfaciens*, as demonstrated by negatives values. The result of synonymous/nonsynonymous test confirmed the same result for purifying selection for *atpD*, *gyrB*, *ppK* and *recA* partial genes (prob=1). These negative values indicate that there is a polymorphism's excess with low frequency.

CONCLUSIONS

This study showed that the species *Curtobacterium flaccumfaciens* displays a large diversity, which is not correlated to the defined pathovars, or isolation date, place or host. It seems that recombination and purifying selection could have played a role in the evolution of the species.

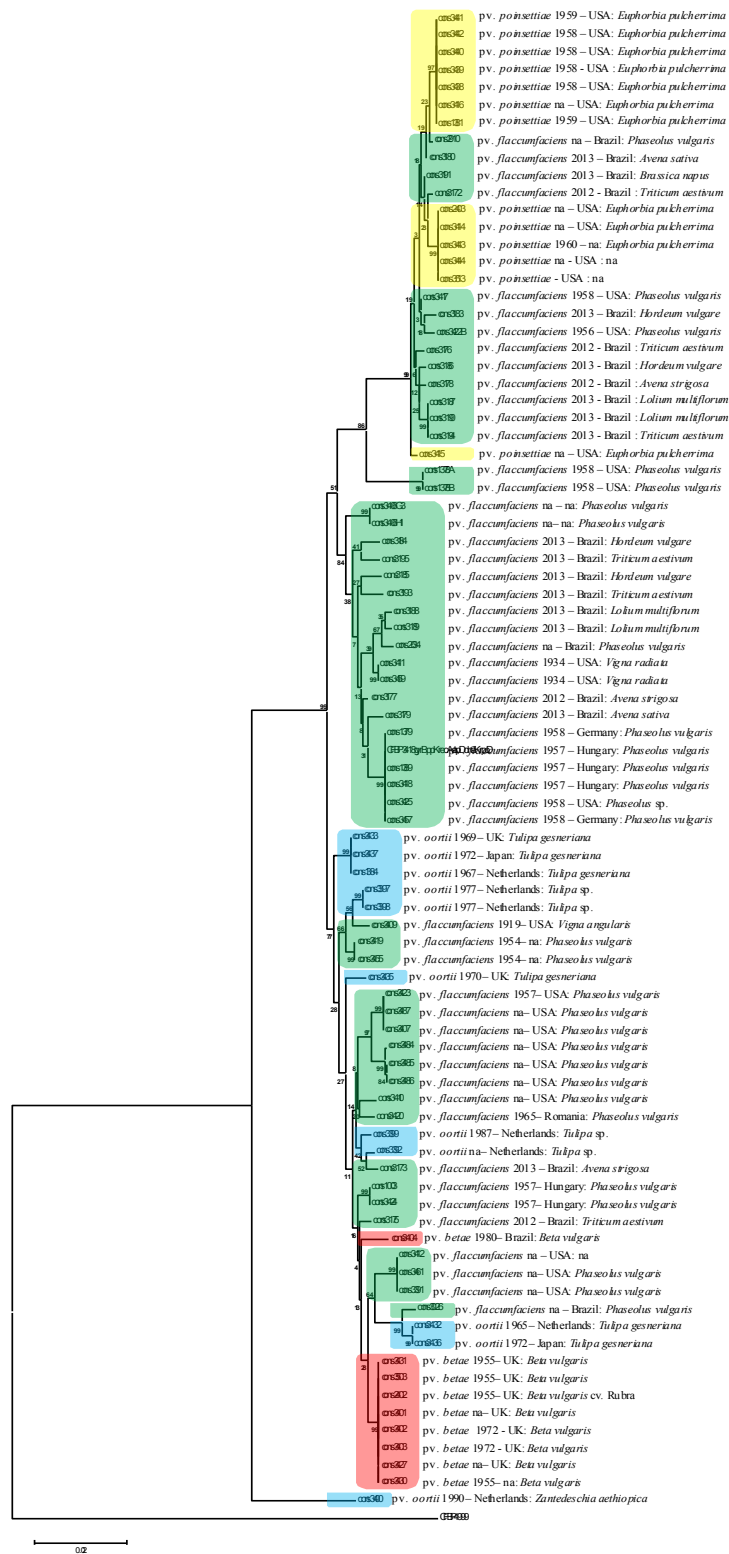


Figure2. Phylogenetic tree with concatenated six genes and constructed using Maximum likelihood and Jukes Cantor analysis.

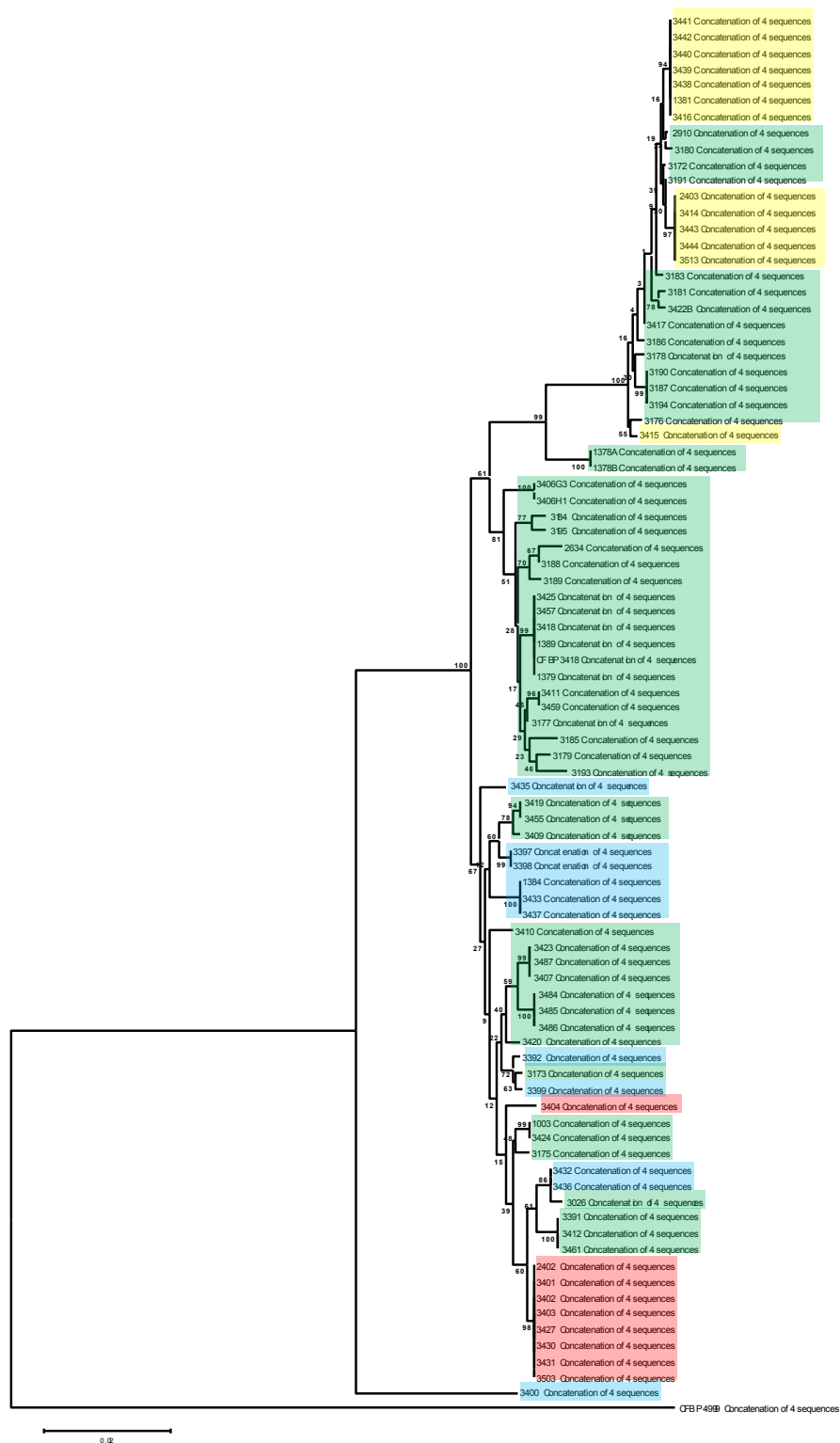


Figure3. Phylogenetic tree with concatenated four partial genes (*atpD*, *gyrB*, *ppK* and *rpoD*) and constructed using Maximum Likelihood and Jukes Cantor analysis.

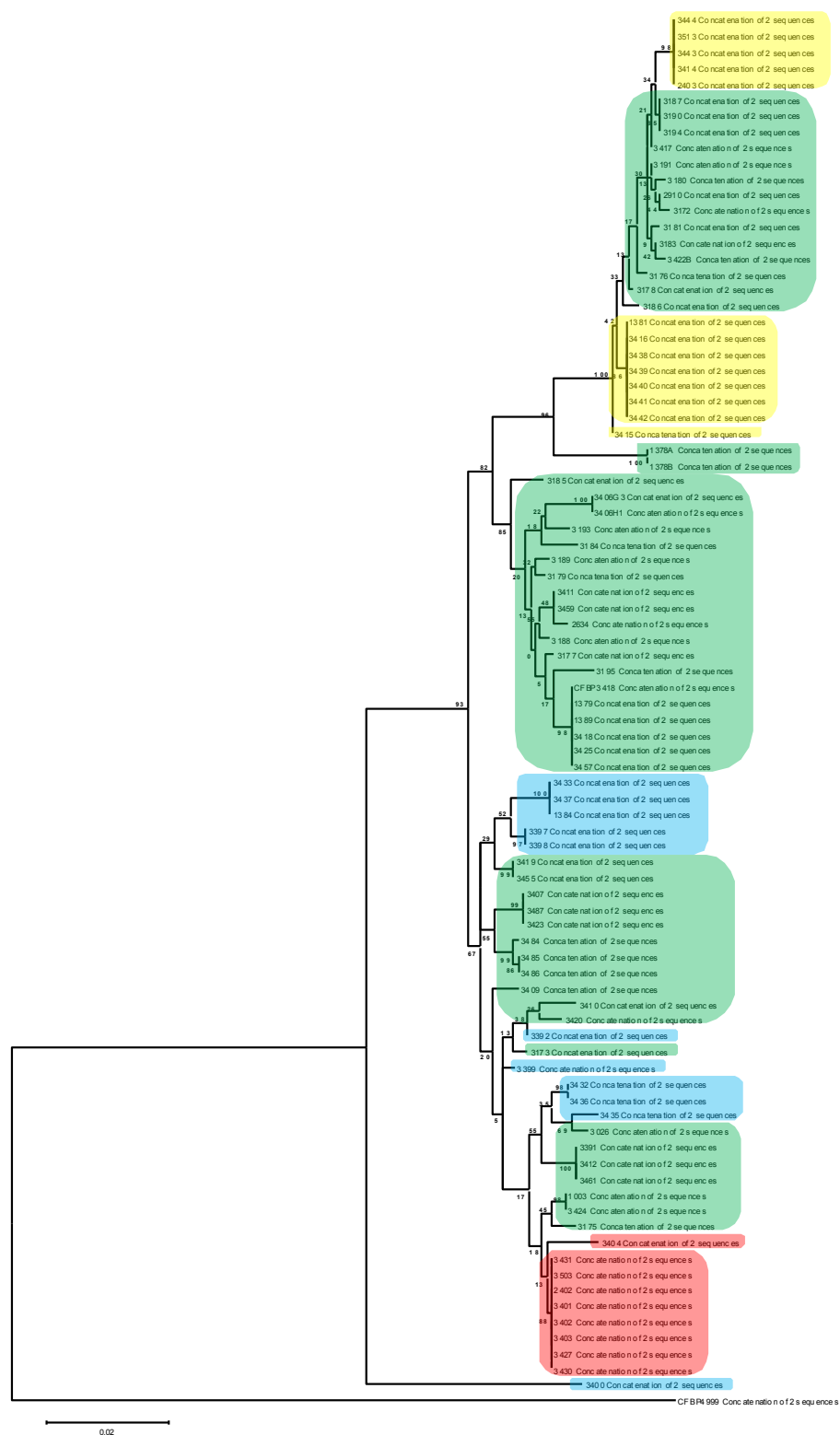


Figure 4. Phylogenetic tree constructed using Maximum Likelihood, Jukes Cantor and *gyrB* + *recA* housekeeping genes.

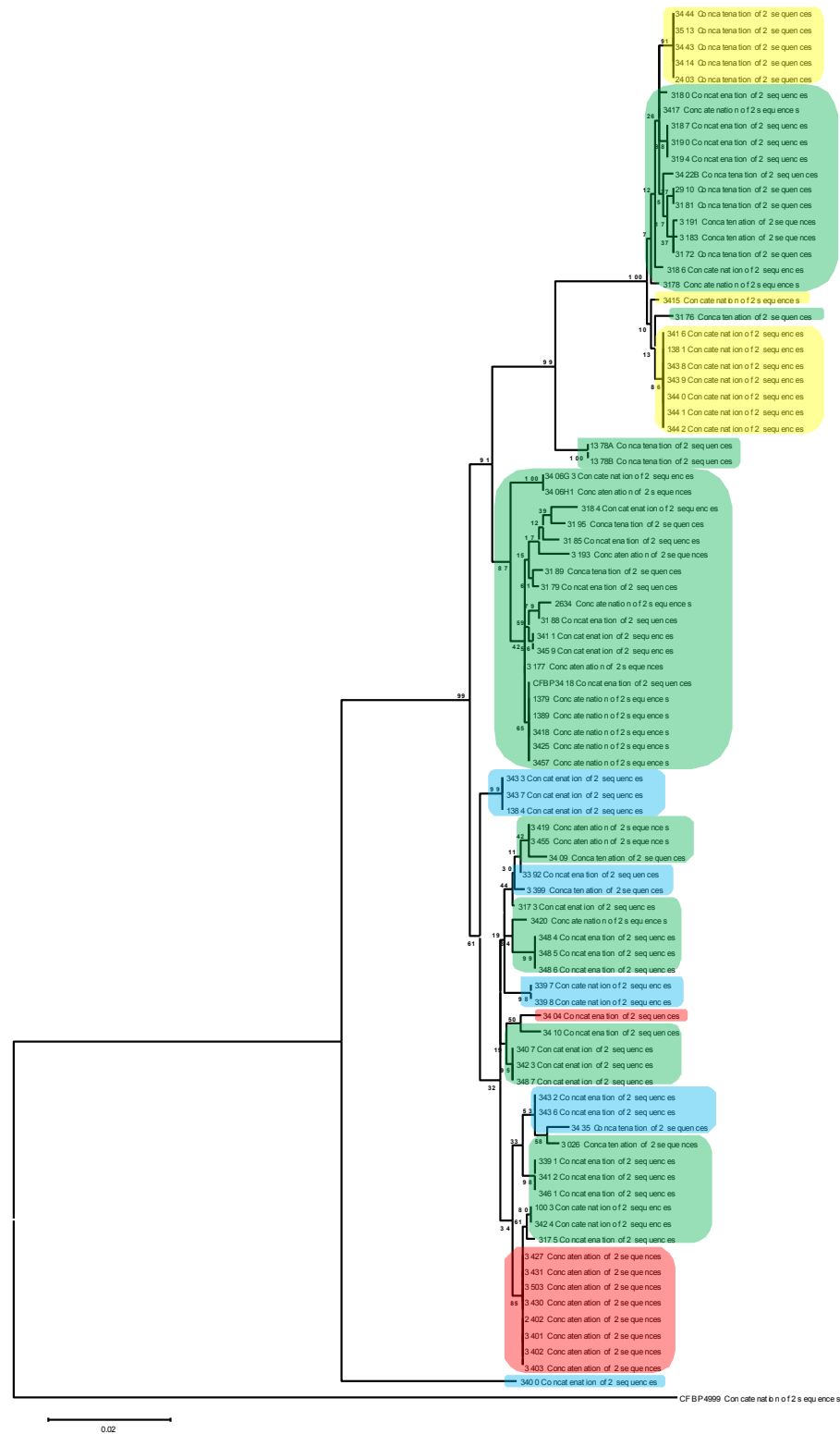


Figure 5. Phylogenetic tree constructed using Maximum Likelihood, Jukes Cantor and *gyrB* + *rpoD* housekeeping genes.

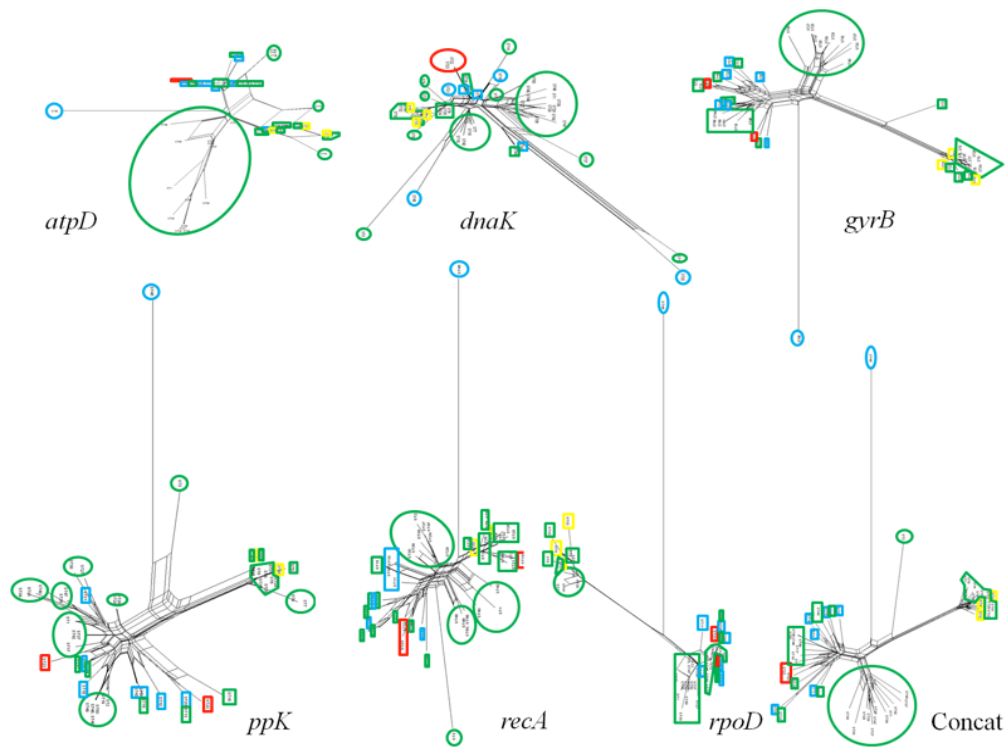


Figure 6. Split graphs of MLSA of two collections of strains of each sequence type (ST) for six genes (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppK*, *recA* and *rpoD*) and concatenated sequences. Strains from each pathovar (*flaccumfaciens*, *betae*, *oortii* and *poinsettiae*) are detached in green, red, blue and yellow, respectively.

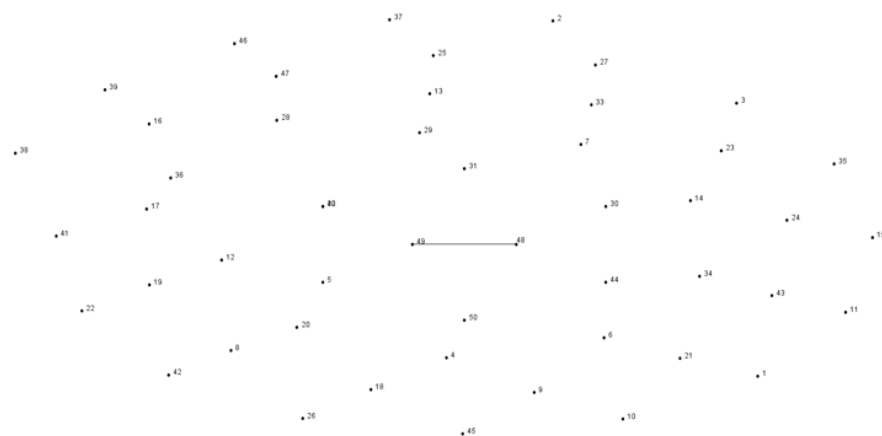


Figure 7. Relatedness and patterns of evolutionary descent among isolates with similar genotypes. Graph from e-Burst analysis showing ST linked by single-locus variations

REFERENCES

- AGARKOVA, I. V.; LAMBRECHT, P. A. ; VIDAVER, A. K. ; HAVERSON, R. M. Genetic diversity among *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* populations in the American high plains, **Canadian Journal Microbiology**, v. 58, p. 788-801, 2012.
- COLLINS, M. D.; JONES, D.; KROPPESTEDT, R. M. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 384–385, 1982.
- COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. Nov. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 3545-3548, 1983.
- DARSONVAL, A.; DARRASSE, A.; DURAND, K.; BUREAU, C. ; CESBRON, S. ; JACQUES, M. A. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. **The American Phytopathological Society**, v. 22, p. 747-757, 2009.
- EPPO. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. OEPP/EPPO Bulletin, v. 41, p.320-328, 2011.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, Food and Agricultural commodities production. Available in: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.
- FARGIER, E.; FISCHER-LE SAUX, M.; MANCEAU, C. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 156-165, 2011.
- GONZALEZ, A. J.; TRAPIELLO, E. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli*, a new subspecies pathogen in bean, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 811-826, 2015.
- GUIMARÃES, P. M.; SMITH, J. J.; PALMANO, S.; SADDLER, G. S. Characterisation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 817-825, 2003.
- HAJRI, A.; BRIN, C.; HUNAULT, G.; LARDEUX, F.; LEMAIRE, C.; MANCEAU, C. ; BOUREAU, T. ; POUSSIER, S. A « repertoire for repertoire » hypothesis : repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. **PloS ONE**, v. 4, p. 1- 21, 2009.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by bacterium *flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, v. 60, p. 433-434, 1922.

HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccum-fasciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, v. 16, p. 1-22, 1926.

JACQUES, M. A.; DURAND, K.; ORGEUR, G.; BALIDAS, S.; FRICOT, C.; BONNEAU, S.; QUILLÉVÉRÉ, A.; AUDUSSEAU, C.; OLIVIER, V.; GRIMAULT, V.; MATHIS, R. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8388-8402, 2012.

MAGGI, S. N.; BERNASCONI, M. V.; VALSANGIACOMO, C.; VAN DOORN, L. J.; PIFFARETTI, J. C. Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analyzed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* and *recA*), and by *vacA*, *cagA*, *iceA* and IS605 genotyping. **Microbiology**, v. 147, p. 1693-1707, 2001.

MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 498-505, 1997.

MANDEL, M.; GUBA, E. F.; LITSKY, W. The causal agent of bacterial blight of American holly. **Bacteriological Proceedings**, 61, 1961

MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 157-162, 2002.

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

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies : a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*), **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTINS, S. J. **Controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro com isolados de bacterias endosporogênicas**. 2012. 55 p. Dissertação – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2012.

MCDONALD, J. G.; WONG, E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 22, p. 17-22, 2000.

MHEDBI-HAJRI, N.; DARRASSE, A.; PIGNÉ, S.; DURAND, K.; FOUTEAU, S.; BARBE, V.; MANCEAU, C.; LEMAIRE, C.; JACQUES, M. A. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-12, 2011.

MISHRA, S. R. BACTERIAL DISEASE IN PLANTS. IN: MISHRA, S. R. BACTERIAL PLANT DISEASES. New Delhi-India. Discovery Publishing House, 2007, 192 p.

NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes, **Microbiology**, v. 151, p. 2141-2150, 2005.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoD*, *recA* and *ppK* and 16SrRNA genes, **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 102-108, 2007.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 170-176, 2006.

TANCOS, M. A.; LANGE, H. W. ; SMART, C. D. Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. **Phytopathology**, v. 105, p. 169-179, 2015.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337, 2002.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F. PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. Proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zeland Journal of Agricultural Research**, v. 21, p. 153-177, 1978.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) apresenta capacidade de colonização endofítica em trigo, cevada, avevém, aveia branca e aveia preta;
- b) As coberturas de inverno aveia preta e trigo incrementaram a intensidade da murcha-de-curtobacterium, redução do peso médio de 100 grãos e produtividade do feijoeiro;
- c) Área com maior intensidade da doença apresentou maior redução dos parâmetros agrônômicos número de vagens/planta, número de grãos/planta, peso dos grãos/planta, peso de 100 grãos e da produtividade média do feijoeiro;
- d) Houve diferença no período de sobrevivência como células livres no solo entre isolados de Cff (22 a 34 dias) e em diferentes tipos de solos (30 a 94 dias), sob condições controladas, e o período de sobrevivência variou de 34 a 80 dias sob condições de campo, sendo observada influência da temperatura e umidade;
- e) A análise por MLSA revelou diversidade entre os patovares fitopatogênicos de *Curtobacterium flaccumfaciens*, possivelmente devido recombinações e seleção purificadora durante a evolução das espécies e não há correlação entre filogenia e patogenicidade em *Curtobacterium*.