

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

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEJJOEIRO A**  
*Curtobacterium flaccumfaciens* **PV. flaccumfaciens, AGRESSIVIDADE E**  
**VARIABILIDADE MOLECULAR DE ISOLADOS**

**VALMIR LUIZ DE SOUZA**

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

BOTUCATU – SP  
Novembro de 2004

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

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO A**  
*Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*, **AGRESSIVIDADE E**  
**VARIABILIDADE MOLECULAR DE ISOLADOS**

**VALMIR LUIZ DE SOUZA**

Orientador: **Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni**

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

BOTUCATU – SP  
Novembro de 2004

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

S628r Souza, Valmir Luiz de, 1964-  
Reação de genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, agressividade e variabilidade molecular de isolados / Valmir Luiz de Souza. -- Botucatu, [s.n.], 2004.  
vii, 75 f. : il. color., tabs.

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

1. Feijão. 2. Plantas - Resistência genética. 3. Plantas - Resistência a doenças. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

Palavras-chave: Feijão; Resistência genética; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; Variabilidade genética; Agressividade de isolados.

**Ao meu filho Diogo, com  
muito carinho  
dedico**

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela orientação.
- À Profa. Dra. Renate Krause-Sakate pelo ensinamento em Biologia Molecular.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelo fornecimento das sementes de feijoeiro, através do Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell.
- Ao Dr. Itamar de Melo Soares, da Embrapa-Meio Ambiente, pela cessão de uso do microscópio eletrônico de varredura.
- À FAPESP pelo auxílio financeiro.
- À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. RESUMO .....	01
2. SUMMARY .....	03
3. INTRODUÇÃO .....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	07
4.1 Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro .....	07
4.2 Resistência genética em genótipos de feijoeiro a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. flaccumfaciens</i> .....	10
4.2.1 Fatores de Resistência Estruturais e Bioquímicas .....	13
4.3 Identificação de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> via PCR a partir dos pares de iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5 .....	15
4.4 Variabilidade genética em <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> avaliada por Rep-PCR .....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
5.1 Obtenção dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> .....	20
5.2 Identificação da resistência genética em germoplasma de feijoeiros a <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i> .....	22
5.3 Agressividade de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i> em genótipos de feijoeiro.....	23
5.4 Colonização de <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i> no xilema de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, visualizados sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	24
5.5 Reações de PCR .....	25
5.5.1 Preparo do inóculo de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> para a extração do DNA.....	25
5.5.2 Extração do DNA genômico .....	25
5.5.3 Amplificação do DNA com os iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5.....	26
5.5.4 Condições de PCR para os iniciadores REP, ERIC e BOX .....	27

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 Identificação da resistência genética em germoplasma de feijoeiros a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> .....	28
6.2 Agressividade de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em genótipos de feijoeiro.....	47
6.3 Colonização de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> no xilema de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, visualizados sob microscopia eletrônica de varredura .....	51
6.4 Identificação de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> via PCR utilizando dois pares de iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5 e variabilidade genética por rep-PCR.....	58
7. CONCLUSÕES .....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
1. Procedência dos isolados de <i>Curtobacterim flaccumfaciens</i> testados .....	21
2. Reação de genótipos de feijoeiro à Cff.....	29
3. Variações nos níveis de resistência a murcha-de-curtobacterium em linhagens de feijoeiro de mesma genealogia .....	43
4. Severidade da murcha-de-curtobacterium em seis genótipos de feijoeiros inoculados com quatro isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> procedentes de várias regiões do Brasil.....	48
5. Massa da matéria seca (g) de plantas de seis genótipos de feijoeiro inoculados com quatro isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> .....	49
6. Redução (%) da massa da matéria seca da parte aérea em seis genótipos de feijoeiros inoculados com quatro isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em relação as testemunhas não inoculadas	49



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sintomas de murcha-de-curtobacterium em genótipos de feijoeiro altamente resistentes (Ovo de Codorna Tyunaga e Cal-153) e suscetíveis (Gordo Branco e ARC-4), aos 30 dias após a inoculação .....	45
2. Sintomas de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro da cultivar Pérola inoculada (A) e não inoculada (B) com o isolado Feij 2634, aos 30 dias após inoculação .....	46
3. (A) <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em vasos de xilema de feijoeiros resistentes Ac-297 e em (B) Ac-405, trinta dias após a inoculação visto em microscopia eletrônica de varredura.....	52
4. (A) e (B) Estrutura rendilhada sob pontuações da parede do vaso do xilema de feijoeiro resistente Ac-592, trinta dias após inoculação de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , visto em microscopia eletrônica de varredura .....	53
5. (A) e (B) <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , sob pontuações da parede no vaso de xilema de feijoeiro suscetível Ac-586, trinta dias após a inoculação, em microscopia eletrônica de varredura .....	54
6. (A) e (B) <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , trinta dias após inoculação, em vaso de xilema de feijoeiro suscetível Ac-546, visualizado sob microscopia eletrônica de varredura.....	55
7. Identificação de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> endofíticos de citros, com os iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5.....	58
8. Perfil eletroforético de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (1 a 24) e de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (25 e 26), obtido com os iniciadores REP, ERIC e BOX.....	60
9. Dendograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise de bandas polimórficas geradas pela rep-PCR de 24 isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (feijoeiros) e dois isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (Citros).....	61



## 1. RESUMO

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), agente causal da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro, é um patógeno de colonização vascular de difícil controle. A doença foi detectada pela primeira vez no Brasil na safra das águas de 1995, no Estado de São Paulo. Além da região Sudeste, atualmente a doença encontra-se distribuída nas regiões Sul e Centro-Oeste. Sintomas típicos da doença incluem a murcha, amarelecimento das folhas e morte de plantas, sintoma variável em resposta aos diferentes níveis de resistência em genótipos de feijoeiro. Por tratar-se de uma doença de difícil controle, o uso de material comercial com resistência genética ao patógeno tem sido a melhor opção.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a reação de genótipos de feijoeiro a murcha-de-curtobacterium, frente a 333 acessos pertencentes ao banco de germoplasma de feijoeiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), comparar por meio da microscopia eletrônica de varredura a colonização de Cff em vasos de xilemas de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, avaliar através de técnica molecular a especificidade dos iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5 em reação de PCR, como ferramenta de identificação de vinte e quatro isolados de Cff de diferentes regiões geográficas e dois isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofíticos de citros, como também a variabilidade genética destes isolados pela técnica de rep-PCR, e por fim a análise da agressividade de Cff, através de inoculação em genótipos de feijoeiro suscetíveis e altamente resistentes.

Os resultados mostraram a existência de variabilidade genética nas amostras dos 333 genótipos de feijoeiro avaliados, ao isolado de Cff Feij 2634. Os materiais

foram classificados em quatro grupos de resistência: 29 genótipos (8,7%) comportaram-se como altamente resistentes, 13 genótipos (3,9%) como resistentes, 18 genótipos (5%) como moderadamente resistentes e 273 genótipos (81%) suscetíveis. Através da microscopia eletrônica de varredura, foram observadas na região do xilema em genótipos de feijoeiro altamente resistentes (Ac-297, Ac-405, e Ac-592), várias aglutinações de células bacterianas envolvidas por filamentos e sob as pontuações da parede do xilema, o desenvolvimento de estruturas rendilhadas, que possivelmente estão relacionadas a protuberâncias da parede celular. Estas observações sugerem a ativação de mecanismos de defesa estrutural e bioquímica em plantas de feijoeiros altamente resistentes a Cff, não observados em genótipos suscetíveis (Ac-546 e Ac-586), nos quais foi verificado grande fluxo bacteriano nas pontuações da parede do vaso do xilema.

Para a identificação dos isolados de Cff em feijoeiro, e isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofíticos de citros, os iniciadores CffFOR2-CffREV4 foram altamente específicos em reação de PCR para os 26 isolados, porém, os iniciadores CF4-CF5 não detectaram dois isolados de Cff de feijoeiro e os isolados endofíticos de citros. A diversidade genética dos isolados de Cff e endofíticos de citros, realizado por meio da técnica de rep-PCR, permitiu agrupar os mesmos em quatro grupos distintos de padrões de bandas para os iniciadores REP, ERIC e BOX, considerando um índice de similaridade de 75%. A análise da agressividade dos isolados de Cff, em genótipos de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, indicaram a presença de variabilidade quanto à agressividade de Cff, independente da região de origem.

-----  
Palavras chaves: *Phaseolus vulgaris*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, resistência genética, agressividade e diversidade genética de isolados.

## 2. SUMMARY

REACTION OF BEAN GENOTYPES TO *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, AGGRESSIVENESS AND MOLECULAR VARIABILITY ISOLATES. Botucatu-SP, 2004, 75 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: VALMIR LUIZ DE SOUZA

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), causer agent of the bacterial wilt of common bean. It is a vascular colonization pathogen of difficult control. The disease was first detected in Brazil in the 1995 waters harvest time in São Paulo State. Besides the Southeast region, the disease is currently also distributed in the South and Middle West regions. Typical symptoms of the disease include: wilt yellow leaves and plant death. However, the symptoms are variable according to the different levels of resistance in the plant genotypes. Due to the difficult disease control, genetic resistance has been the better option.

The aim of this study was to evaluate the reaction of bean genotypes to the bacterial wilt in common bean in 333 access of the bean plant germoplasm database of the Instituto Agronômico de Campinas (IAC), and to compare the Cff colonization in xylem vessels of highly resistant and susceptible bean plants by scanning electronic microscopy. It also aimed the molecular evaluation of the CffFOR2-CffREV4 and CF4-CF5 primers

specificity using PCR reaction in the identification of 24 Cff isolates from geographically separated regions and 2 citrus endophytic *Curtobacterium flaccumfaciens* isolated, as well as the genetic variability of these isolates by rep-PCR, and the Cff aggressiveness analysis by the inoculation of susceptible and highly resistant bean plant genotypes.

The observed results indicated genetic variability in all 333 genotypes evaluated in relation to the Cff isolate Feij 2634. The materials were classified into four resistance levels: 29 highly resistance genotypes (8.7%), 13 resistant genotypes (3.9%), 18 moderately resistant genotypes (5.0%) and 273 susceptible genotypes (81.0%). Using the scanning electronic microscopy, several bacteria agglutinations involved by filaments and the appearance of tangled structures under the punctuations, which are possibly related to cell wall protuberances, were observed in the xylem region in highly resistant bean plant genotypes (Ac-297, Ac-405, and Ac-592). These observations suggest the activation of structural and biochemical defense mechanisms in Cff highly resistant plants, not observed in highly susceptible genotypes (Ac-546 and Ac-586) in which a large bacteria flow was verified in xylem vessel wall punctuations.

For the identification of Cff isolates in bean plant and citrus endophytic *Curtobacterium flaccumfaciens* isolates, the primers CffFOR2-CffREV4 were highly specific in the PCR reaction for the 26 isolates, however, the primers CF4-CF5 presented less specificity for 2 bean plant Cff isolates and for the citrus endophytic isolates. The genetic diversity of the Cff and citrus endophytic isolates by the rep-PCR technique allowed the constitution of 4 distinct fingerprint groups for the primers (REP, ERIC and BOX), considering a 75% similarity index. The aggressiveness analysis of Cff isolates in highly resistant and susceptible bean plant genotypes indicated variability in relation to Cff aggressiveness in bean plant genotypes, independently of the origin region.

---

Keyword: *Phaseolus vulgaris*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* , genetic resistance, aggressiveness, genetic variability isolates.

### 3. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa anual e herbácea de grande importância econômica, por ser uma fonte básica de proteínas e calorias na dieta humana em países em desenvolvimento (Vieira, 1988; Mariot, 1989). Também é importante fonte de fósforo, ferro e vitaminas (Bressani & Elias, 1980). A cultura do feijoeiro ocupa uma área de 12 milhões de hectares e constitui na leguminosa mais importante para a alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. O Brasil é o maior produtor, com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale à cerca de 20% da produção mundial (CIAT, 2003).

A cultura do feijoeiro está sujeita à incidência de várias doenças que acarretam perdas significativas na produção, dentre as quais encontra-se a murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). No Brasil, esta doença, tem se tornado um novo problema para a cultura do feijoeiro nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. O primeiro relato da ocorrência da doença no Brasil foi constatada na safra das águas de 1995, no Estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1997). Os sintomas típicos da doença incluem: murcha e amarelecimento das folhas, e morte das plantas (Hedges, 1926; Hall, 1991). Por ser uma doença de constatação recente, não são conhecidas as perdas na produção por ela ocasionadas na cultura do feijoeiro comum. Entretanto, apresenta grande importância potencial devido ao fato de o patógeno ser transmitido pelas sementes (Maringoni, 1993; Rava & Costa, 2001).

O controle desta doença através da resistência genética tem sido o

método mais prático e econômico na cultura do feijoeiro (Maringoni, 2000), porém a possibilidade da existência de variabilidade patogênica presente em isolados de Cff, pode ser uma conseqüência maléfica ao melhoramento visando a obtenção de cultivares de feijoeiro resistentes, especialmente na estabilidade e durabilidade da resistência.

Dentre as várias técnicas moleculares utilizadas em estudos da variabilidade genética, rep-PCR vem sendo utilizada em estudos na caracterização de isolados bacterianos (Versalovic et al., 1991; Versalovic et al., 1994). Famílias de seqüências de DNA repetitivos altamente conservadas estão dispersos em genomas de diversas espécies bacterianas (Lupski & Weinstock, 1992), sendo que três famílias vêm sendo estudadas com mais detalhes: REP (“repetitive extragenic palindromic”) (Stem et al., 1984), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) (Hulton et al., 1991) e BOX (“BOX element”) (Martin et al., 1992).

Pela importância da murcha-de-curtobacterium nas principais áreas de cultivos de feijoeiros, este trabalho teve como objetivos:

- Detectar fontes de resistência em genótipos de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, de 333 acessos pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC);
- Avaliar a agressividade de isolados de Cff em genótipos de feijoeiro altamente resistentes e suscetíveis
- Comparar a colonização de Cff nos vasos de xilema de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a especificidade de dois pares de iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 e CF4-CF5 em reação de PCR, na identificação dos 26 isolados estudados, como também o estudo da variabilidade genética de 24 isolados de Cff, e dois isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros, a partir da técnica de rep-PCR.



## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Murcha-de-curtobacterim do feijoeiro

A cultura do feijoeiro está sujeita à incidência de vários patógenos que causam doenças e acarretam perdas significativas na produção. Segundo Saettler (1991), os principais patógenos bacterianos que ocorrem na cultura do feijoeiro, em várias localidades do mundo, são: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al., *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, *P. syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young et al. e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones.

Atualmente, o cultivo de feijão na região Centro-Sul do Brasil tem sido afetado por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), agente causal da doença denominada de murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, que tem acarretado sérios danos e prejuízos à produção. A doença foi constatada pela primeira vez no Estado de São Paulo em 1995 (Maringoni & Rosa, 1997). No Estado do Paraná, tem sido observada a ocorrência de Cff em diferentes regiões produtoras de feijoeiro, dentre os quais, nos municípios de Castro, Wenceslau Braz e Pato Branco (Leite & Behlau, 2001). Em Santa Catarina também foi confirmada a presença dessa doença no município de Campos Novos (Leite & Behlau, 2001). Neste mesmo ano foi relatada pela primeira vez a ocorrência de Cff em feijoeiro da cultivar Pérola, no município de Cristalina-GO; e, em janeiro de 2002, foi confirmada a presença de Cff em sementes de feijão das cultivares Pérola, FT-Bionobre e Emgopa Ouro, coletado no Distrito Federal (DF), em cultivo irrigado e sequeiro (Uesugi et al., 2002).

A colonização de Cff em feijoeiro dá-se comumente em vasos de xilema (Dinesen, 1978). Em sementes, Cff fica alojada nas células paliçádicas que formam a testa; sob condições de inoculação artificial, foi constatada a transmissão de 51,4% a 52,5 % em sementes de feijoeiro, além de seu efeito negativo sobre a germinação (Chavarro et al., 1985).

Os sintomas da doença consistem em plantas amarelecidas, murchas ou com folhas flácidas durante os períodos secos e quentes. A ocorrência da doença em plântulas pode levar à formação de plantas subdesenvolvidas, ou causar a sua morte antes mesmo da formação do primeiro par de folhas. A murcha é resultado do bloqueio do movimento da água no sistema vascular da planta, causado pelas células bacterianas. A bactéria penetra através de ferimentos causadas nas raízes, pelas práticas de cultivo e por nematóides, nos cotilédones de sementes durante a germinação e por ferimentos no caule, folhas e vagens. Não se tem relato de penetração por estômatos, hidatódios ou aberturas naturais na parte aérea ou subterrânea da planta de feijão (Hedges, 1926; Burke & Seliskar, 1957; Schuster, 1959; Rickard & Walker, 1965).

Cff também induz a “tan spot” em soja, mas com colonização não-vascular, ao contrário do que ocorre no feijoeiro, onde a colonização é vascular e a bactéria é transmitida pela semente (Saettler, 1991). Outras plantas têm sido relacionadas como hospedeiras de Cff. Hedges (1926) evidenciou, através de inoculação artificial, a suscetibilidade da soja cultivar Ito San a isolados da bactéria procedentes de feijoeiros. Schuster & Sayre (1967) inocularam um isolado de Cff obtido de sementes de feijoeiro, constataram que a soja cultivar Bansei, *Phaseollus lunatus*, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, ervilha cultivares Alaska e Perfection, *Dolichos labllab*, *Phaseolus radiatus*, *P. lathyroides*, *P. vulgaris*, *P. calcaratus* e *P. acutifolius* foram suscetíveis a esse isolado, evidenciando sintomas de murcha.

*Curtobacterium flaccumfaciens* apresenta especialização a nível de espécie hospedeira, sendo classificadas em patovares. Isolados patogênicos às culturas de feijoeiro e soja é *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Na cultura de beterraba como *C. flaccumfaciens* pv. *betae* e em duas plantas ornamentais como *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* em bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*) e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* em tulipa (*Tulipa generiana*). Entretanto, recentemente, *C. flaccumfaciens* tem sido isolada como

endófitas de diferentes espécies vegetais como citros, trevo, arroz, milho, sorgo, batata, pastagens e inhame, sendo também avaliada no controle de doenças em pepino, batata e fumo (Belmonte et al., 2002)

*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi descrita inicialmente em feijoeiro por Hedges, em 1921, em Dakota do sul, nos E.U.A, sendo o patógeno denominado *Bacterium flaccumfaciens* (Hedges, 1922). Com a extinção do gênero *Bacterium*, o patógeno passou a ser denominado *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson. Durante os anos de 1952 a 1955, Schuster & Christiansen (1957), ao analisarem inúmeros lotes de sementes empregadas para a instalação de campos comerciais no Oeste de Nebraska, E.U.A., constataram a presença de sementes alaranjadas e que, submetidas a isolamento, deram origem a isolados patogênicos de Cff que apresentavam colônias de coloração alaranjada. Esses isolados foram denominados de *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*.

A partir da reclassificação das corinebactérias, antes classificadas no gênero *Corynebacterium*, surgiram os gêneros *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Rhodococcus*. Com isso, Collins e Jones, em 1983, propuseram a nomenclatura de Cff, atualmente aceita para designar o agente causal da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro (Bradbury, 1986).

*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é uma bactéria Gram positiva, aeróbia, apresentando bastonetes retos ou levemente curvados, na maioria individuais, mas podendo estar arranjados em forma de V, Y ou em paralelo, com um ou mais flagelos polares ou subpolares. A superfície das colônias em meio nutriente-glicose-ágar é brilhante, circular, de bordo liso, sem viscosidade, semi-fluída e amarela, laranja ou rosa, medindo de 1 a 4 mm de diâmetro em 3 a 4 dias de cultivo. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 24-27 °C (Bradbury, 1986; Saettler, 1991).

A bactéria pode ser detectada por meio de vários métodos: sintomas foliares, observação de exsudato bacteriano sob microscópio, testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos, isolamento indireto por meio de plântulas e teste sorológico da imunofluorescência, sendo os dois últimos eficientes para detecção em semente. Diatloff et al., (1993) concluíram que o teste de imunofluorescência, com anticorpos monoclonais e um meio semi-seletivo para Cff, detectou mais sementes infectadas que os métodos de observação de

sintomas foliares e corrida bacteriana, inclusive detectando o patógeno em plantas assintomáticas.

A caracterização da bactéria realizada por meio de testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos, compreendem: morfologia celular, coloração diferencial de Gram, solubilidade em hidróxido de potássio a 3%, oxidação/fermentação da glicose, redução de nitrato, urease, produção de indol, produção de gás sulfídrico de cisteína, podridão de discos de batata, catalase, tirosinase, vermelho de metila, tolerância a cloreto de sódio a 7% e a 9%, oxidase e produção de ácidos a partir de adonitol, amido, inositol, glicerol, glicose, melizitose, maltose e sacarose (Bradbury, 1986).

Atualmente, oligonucleotídeos específicos para a detecção e identificação de vários patógenos em diversos hospedeiros vêm sendo utilizados com frequência. Tegli et al. (2002) obtiveram os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 e os utilizaram em reação de polimerase em cadeia (PCR), e conseguiram detectar com êxito a presença de *Cff* em sementes de feijoeiro. Guimarães et al. (2001) demonstraram alta especificidade dos iniciadores CF4-CF5 na identificação de isolados de *Cff*.

#### **4.2 Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***

Várias pesquisas foram iniciadas no final da década de 50 e no início da década de 60 visando selecionar fontes de resistência em feijoeiro à murcha-de-curtobacterium. Estudos pioneiros desenvolvidos por Coyne et al. (1965), para verificar a reação de 1067 introduções de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, evidenciaram que linhagem PI 165078 de *P. vulgaris* e a variedade G.N. Nebraska # 1 apresentaram níveis satisfatórios de resistência a esse patógeno. A cultivar americana “Great Northern” (GN) e a linhagem PI 165078 foram os principais materiais tolerantes/resistentes utilizados nestes programas (Coyne & Schuster, 1974).

Coyne & Schuster (1971) obtiveram a cultivar “GN Emerson”, com alta tolerância a isolados de Cff, a qual foi derivada da seleção por “pedigree” do cruzamento entre GN 1140 e PI 165078. Coyne & Schuster (1976) lançaram a cultivar “Great Northern Star”, que foi a primeira variedade a apresentar resistência conjunta ao crestamento e à murcha-de-curtobacterium. Estudos genéticos da resistência de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, em vários cruzamentos, demonstraram que a herança é de natureza poligênica (Coyne et al. 1965; Coyne et al. 1966).

Maringoni (2002), analisou o comportamento varietal de 40 cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium, sob condições de inoculação artificial com dois isolados bacterianos, em casa-de-vegetação e constatou que as cultivares ‘IAC-Carioca Akytã’, ‘IAC-Carioca Aruã’ e ‘IAC-Carioca Pyatã’ foram resistentes e que ‘A-768’, ‘Aeté’, ‘Aporé’, ‘Bambuí’, ‘Bico de Ouro’, ‘BR-IPA 11- Brígida’, ‘Carioca-MG’, ‘Carioca Comum’, ‘Catu’, ‘Corrente’, ‘Diamante Negro’, ‘FT-Bonito’, ‘FT-Nobre’, ‘FT-120’, ‘IAC Carioca’, ‘IAC-Maravilha’, ‘IAC-Una’, ‘IAPAR-14’, ‘IAPAR-16’, ‘IAPAR-31’, ‘IAPAR-44’, ‘IPA-6’, ‘Iraí’, ‘Jalo Precoce’, ‘Jamapa’, ‘Ônix’, ‘Ouro Negro’, ‘Pérola’, ‘R-161’, ‘RAO-33’, ‘Rio Tibagi’, ‘Rosinha-G2’, ‘Roxo-90’, ‘Rudá’, ‘Safira’, ‘Tarumã’ e ‘Xamego’ foram suscetíveis à murcha-de-curtobacterium. Plantas de feijoeiro das cultivares resistentes (IAC-Carioca Aruã, IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Pyatã) apresentaram menor redução da matéria seca da parte aérea do que das suscetíveis (IAC-Carioca e Pérola), quando inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Leite & Behlau (2002) avaliaram a reação de cultivares de feijoeiro a Cff. As 27 cultivares de feijoeiro avaliadas, de importância regional e nacional, apresentaram sintomas de murcha-de-curtobacterium. Cultivares de grande importância como ‘Carioca’, ‘FT-Tarumã’, ‘FT-120’, ‘IAC-Una’ e ‘linhagem LP-97-23’ foram as mais suscetíveis, enquanto que as cultivares ‘IAPAR-31’, ‘IAC-Carioca Tybatã’ e ‘IAPAR-MD 841’ foram as mais resistentes.

Rava et al. (2002), na busca de fontes de resistência à murcha-de-curtobacterium, avaliaram 74 amostras de feijoeiros coletados na região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba. Nenhuma amostra apresentou todas suas plantas resistentes ao patógeno; entretanto, em algumas delas, foram encontradas plantas com reação de resistência. Segundo os autores, o fato era esperado porque os materiais eram compostos, na maioria das

vezes, de mistura de genótipos. Dentre as amostras de feijoeiro comum que apresentaram plantas com reação de resistência a Cff podem ser citadas: ‘Santa Fé’, ‘Roxinho’, ‘Roxinho Antigo’, ‘Roxão de Cacho’, ‘Roxão’, ‘Trilha de Ferro’.

Recentemente, Rava & Costa (2003) estudaram a reação de cultivares de feijoeiro comum à *murcha-de-curtobacterium* e verificaram que a maioria das cultivares apresentaram alta intensidade de sintomas de murcha. As cultivares ‘Ouro Branco’, ‘IPA-9’, ‘IAPAR-31’, ‘IAC-Carioca Pyatã’ e ‘IAC-Carioca Aruã’ tiveram reação de resistência ou moderada resistência. As cultivares ‘IAC-Carioca Pyatã’ e ‘IAC-Carioca Aruã’ foram as mais resistentes dentre as testadas por Maringoni (2000) e segundo Rava & Costa (2003), o fato destes cultivares comportarem-se como moderadamente resistentes, pode ser devido à maior agressividade do isolado de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* utilizado. As cultivares ‘IPA-9’ e ‘Ouro Branco’ estão sendo utilizadas como genitores no programa de melhoramento genético para resistência a doenças realizado na Embrapa Arroz e Feijão, com objetivo de introduzir resistência à *murcha-de-curtobacterium* em linhagens elites e cultivares recomendadas. Também está sendo realizado um estudo da herança de resistência à *murcha-de-curtobacterium*, utilizando as cultivares ‘IPA-9’ e ‘Ouro Branco’ como genitores resistentes, ‘IAPAR-31’ e ‘IAC-Carioca Aruã’, moderadamente resistentes, e ‘EPABA-1’ e ‘Aporé’ como suscetíveis (Rava & Costa, 2003).

Como medidas de controle da doença, além da resistência genética em cultivares, devem ser utilizadas sementes livres do patógeno, rotação de cultura com pelo menos dois anos entre os cultivos de feijoeiro e eliminar plantas que possam ser hospedeiras do patógeno (Saetler & Perry, 1972; Saettler, 1991). O emprego de sementes sadias tem demonstrado eficiência no controle da doença em vários países do mundo. Esta medida foi tão eficaz que durante vários anos a *murcha-de-curtobacterium* não tinha sido constatada em várias áreas de produção de Dakota do Norte, em Minnessota, E.U.A. (Venette et al., 1995).

#### 4.2.1 Fatores de Resistência Estruturais e Bioquímicas

Não há estudos citados em literatura, pertinentes às análises ultraestruturais e bioquímicas da interação *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* - *Phaseolus vulgaris* L., em genótipos de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, visando caracterizar possíveis alterações anatômicas e bioquímicas, observadas em resposta à presença do patógeno. Frequentes relatos de ativação de mecanismos de resistência física e bioquímica em plantas à infecção pelo patógeno, em vários outros patossistemas são citados em literatura. Pascholati & Leite (1995) citam a formação de tilose como estrutura de defesa histológica, formada no vaso de xilema, em resposta à invasão por determinados patógenos. De maneira geral, plantas resistentes à murchas vasculares exibem a capacidade de formar maiores quantidades de tiloses do que plantas suscetíveis. Na interação algodoeiro-*Verticillium albo-atrum*, por exemplo, a rápida obstrução dos vasos do xilema por tiloses contribui para a resistência das plantas.

Rahman et al. (1999), em estudos de microscopia eletrônica de transmissão, analisaram a colonização vascular em cultivares resistentes e suscetíveis de pimentão (*Capsicum annuum*) a *Ralstonia solanacearum* e observaram que vasos do xilema adjacentes à infecção foram recobertos pela expansão da parede celular, limitando a dispersão e redução do inóculo em plantas resistentes. Foi observado também que a reação de hipersensibilidade nos vasos do xilema induz a distorção e lise da bactéria e formação de “goma” envolvendo as bactérias, não observadas na cultivar suscetível de pimentão (cultivar LC 455). Nas cultivares resistentes ocorreram a formação de vários tipos de vesículas na célula parenquimática do tecido vascular, as quais envolvem a massa de bactérias, restringindo a dispersão do patógeno nos vasos adjacentes. Os autores concluíram que a limitação e redução do inóculo de *R. solanacearum* nos vasos do xilema em cultivares resistente de pimentão são induzidas por barreiras físicas e morfológicas.

Trujillo et al. (2001), em estudo da interação entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), analisaram as mudanças ocorridas a nível celular na epiderme, mesófilo e tecido vascular em genótipos resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis. Em genótipos resistentes foi verificado

encapsulamento das células bacterianas. Nos moderadamente resistentes observaram-se poucas bactérias nos espaços intercelulares e a formação de vesículas entre o plasmalema e a parede celular. Nos genótipos suscetíveis, houve maior número de bactérias nos espaços intercelulares, condensação do citoplasma, desintegração de organelas, rompimento da lamela média e penetração no tecido vascular (vaso do metaxilema) de massas de células bacterianas.

Fatores bioquímicos pré ou pós-formados em genótipos resistentes podem exibir atividades antimicrobianas, que podem estar envolvidas na resistência da planta de feijoeiro a Cff. Geralmente essas substâncias estão presentes em tecidos sadios das plantas, e, em alguns casos, como resultado da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas. Segundo Pascholati & Leite (1995), dentre as substâncias bioquímicas pré ou pós-formadas, encontram-se os compostos fenólicos e fitoalexinas, sintetizados pela própria planta e que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (Paxton, 1981).

A síntese e o acúmulo de fitoalexinas, assim como a ativação de outras respostas de defesa, ocorrem após o reconhecimento de moléculas eliciadoras (Hahn, 1996). Elicidores são moléculas que estimulam a resposta de defesa nas plantas, apresentam natureza química variada, incluindo carboidratos, glicoproteínas, proteínas, ácidos graxos e componentes da parede celular vegetal (Hahn, 1996; Guzzo & Moraes, 1997).

A literatura traz poucas informações sobre bactérias como agentes eliciadores de fitoalexinas, mesmo assim, quase que exclusivamente, envolvendo plantas da família das leguminosas (Gnanamanickam & Patil, 1977; Lyon & Wood, 1975; Sanz, 1981; Wyman & Vanetten, 2002).

Gnanamanickam & Palti (1977), inoculando plantas de feijoeiro com uma raça incompatível de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, detectaram fitoalexinas do tipo faseolidina, faseolinizoflavana e kievitona, além de faseolina e coumestrol, relatada por Lyon & Wood (1975). Foram constatadas também as atividades antimicrobianas desses compostos sobre a formação de colônias de *P. phaseolicola*.

Stholasuta et al. (1971) e Lyon & Wood (1975) detectaram, respectivamente, acúmulo de faseolina e faseolidina e coumestrol, em extratos de folhas de feijoeiro cv. "Red Mexican" inoculadas com a raça 1, incompatível, de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, em quantidades dez vezes superiores às encontradas em tecidos suscetíveis



inoculados com a raça 2, compatível. Inoculando os cultivares “Red Mexican” e “Canadian Wonder” com a bactéria incompatível *P. syringae* pv. *morsprunorum*, ambos exibindo nítida reação de hipersensibilidade, Stholasuta et al. (1971) não constataram faseolina no cultivar “Red Mexican” e encontraram quantidades mínimas desta fitoalexina em “Canadian Wonder”, enquanto que Lyon e Wood (1975) detectaram grandes quantidades de faseolina e coumestrol em ambos os cultivares. Apesar dos diferentes resultados encontrados no que tange ao acúmulo dessas fitoalexinas, a faseolina parece não contribuir para a resistência do feijoeiro, em virtude de sua baixa atividade antibacteriana.

Wyman & Vanetten (2002) compararam o acúmulo de fitoalexinas com a multiplicação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas de feijoeiro, cultivar “Dark Red Kidney”, suscetível e a cultivar resistente “Tara”. Nenhuma das fitoalexinas isoflavanóides conhecidas foi encontrada na cultivar suscetível. Entretanto, em tecidos da cultivar “Tara” houve reação de hipersensibilidade e produção de faseolina, faseolinizoflavona e coumestrol. Em tecidos dessa mesma cultivar, que não apresentaram reação de hipersensibilidade, nenhum dos isoflavanóides foi detectado, mas, cinco dias após a inoculação, o patógeno atingiu a fase estacionária, indicando que a resistência havia sido induzida. A limitada atividade antibacteriana de faseolina e coumestrol e ausência dos quatro isoflavanóides, caracterizadas no tecido da cultivar Tara, que não reagiu hipersensivelmente, sugere que as fitoalexinas estudadas não contribuíram significativamente para resistência do feijoeiro à *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

#### **4.3 Identificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* via PCR a partir dos pares de iniciadores CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5**

A diagnose e identificação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) vêm sendo tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas bioquímicas. Entretanto, iniciadores específicos para Cff utilizados em PCR já se encontram disponíveis, tornando-se uma ferramenta útil para a identificação e detecção. Em estudo recente, Tegli et al. (2002) demonstraram a eficiência dos iniciadores CffFOR2-CffREV4 na detecção de Cff em

sementes de feijoeiro, porém não houve reação de amplificação de DNA quando utilizados isolados de outros patovares, representados por *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsetiiae* e outros gêneros de bactérias como *Clavibacter*, *Xanthomonas* e *Rhodococcus*. Recentemente, Guimarães et al. (2001) elaboraram um par de iniciadores para PCR, a partir de seqüência de fragmentos de DNA cromossômico obtidos por sub-clonagem da porção específica hibridizada para Cff, denominando-os CF4-CF5. O resultado demonstrou alta especificidade para detecção de Cff utilizando estes iniciadores, e não para outros patovares e gêneros de bactéria.

Segundo Guimarães et al. (2001) esses iniciadores apresentaram alta especificidade na amplificação de fragmento de DNA genômico de Cff e não de outros patovares de *C. flaccumfaciens* ou de bactérias de outros gêneros.

#### **4.4 Variabilidade genética em *Curtobacterium flaccumfaciens* avaliada por Rep-PCR**

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é atualmente uma técnica com inúmeras aplicações em ciências biológicas. PCR é uma técnica fácil, rápida, versátil e sensível, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase (Mullis, 1990). PCR envolve ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com suas seqüências complementares e polimerização da fita complementar ao molde (Gama, 1998).

Dentre as várias técnicas moleculares utilizadas em estudos da variabilidade genética, rep-PCR vem sendo utilizada na identificação de isolados bacterianos (Versalovic et al., 1991; Versalovic et al., 1994). Famílias de seqüências de DNA repetitivos altamente conservadas estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (Lupski & Weinstock, 1992). No genoma de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas há descrição de inúmeras seqüências repetitivas de DNA (Lupski & Weinstock, 1992), sendo que três famílias vêm sendo estudadas com mais detalhes: REP (“repetitive extragenic palindromic”) ou PU, unidades palindrômicas, e que possuem uma estrutura central conservada com seqüências de

35-40 pb (Higgins et al., 1982; Stem et al., 1984; Gilson et al., 1984), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) com 124-127 pb (Kamoun & Kado, 1990; Hulton et al., 1991) e a mais recente denominada de elemento BOX (“Box element”), sendo um grupo de seqüências de DNA altamente conservadas, localizadas nas regiões intergênicas do cromossomo de *Streptococcus pneumoniae* e são compostos pelas subunidades BOX A, BOX B e BOX C, que possuem respectivamente 59, 45 e 50 nucleotídeos (Martin et al, 1992; Koeuth et al., 1995). Estes iniciadores foram obtidos a partir das regiões flangeadoras destas seqüências repetitivas e, quando usados na reação de PCR, produzem uma amplificação seletiva de regiões genômicas em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, localizadas entre os elementos REP, ERIC e BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, coletivamente chamados de rep-PCR, independentemente dos iniciadores utilizados (Versalovic et al., 1991; Versalovic et al., 1994). Os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel-de-agarose e conforme o número e posicionamento das bandas é possível estabelecer perfis eletroforéticos específicos. Os produtos de amplificação do DNA com os iniciadores REP, ERIC e BOX, mostram um perfil de amplificação específica aos níveis de espécie, sub-espécie, patovar ou mesmo de isolados (Versalovic et al, 1994). Deste modo, a amplificação dessas seqüências, por meio de PCR, permite uma rápida avaliação da variabilidade genética em populações, sendo que esta técnica tem sido utilizada com sucesso em estudos de diversidade, bem como para identificação e classificação de diversas bactérias, sendo uma importante ferramenta no estudo de populações, devido à simplicidade e potencialidade na análise de um grande número de amostras, a partir de uma pequena quantidade de DNA (De Bruijn, 1992; Lows et al., 1994; Opgenorth et al., 1996; Pooler et al., 1996; Weingart & Volksch, 1997).

A utilização de rep-PCR para caracterização de bactérias e estudos de diversidade genética têm se mostrado uma ferramenta útil para muitas bactérias, entretanto, Versalovic et al. (1991), ao utilizarem estes iniciadores em várias espécies de bactérias, verificaram maior afinidade de hibridização dos iniciadores REP e ERIC para bactérias Gram-negativas. ERIC, foram utilizados juntamente com os iniciadores REP na identificação de patovares dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Lows et al. 1994), também para análise da diversidade genética entre isolados de *Burkholderia solanacearum* raça 3 (Smith et al. 1995) e *Rhizobium meliloti* (De Bruijn, 1992).

Os iniciadores REP, ERIC e BOX foram avaliados para diferenciação de patovares de isolados de *C. flaccumfaciens*, e cada uma das três seqüências mostrou diferentes níveis de afinidade e sensibilidade para diferenciação (Guimarães et al. 2003). Seqüências BOX, encontravam-se presentes no genoma de todos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A amplificação do DNA com os iniciadores (BOX) permitiram a diferenciação de todas as espécies de *Curtobacterium* testadas, como também a separação dos dois patovar; *C. flaccumfaciens* pv. *poinsaettiae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, entretanto, não sendo possível a separação entre *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfciens* e *C. flaccumfaciens* pv. *betae* (Guimarães et al. 2003).

Lows et al. (1994), empregando os iniciadores BOX, ERIC e REP, em PCR, obtiveram perfis eletroforéticos específicos para vários patovares de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, e concluíram que essa técnica foi rápida, simples e reproduzível em identificar e classificar isolados desses gêneros, sendo uma ferramenta útil para a diagnose desses patógenos. Lopes (1994) conseguiu diferenciar isolados de *Xanthomonas albilineans* de diferentes regiões geográficas em grupos distintos, através de análise de grupamento, obtida a partir de perfis eletroforéticos de fragmentos de DNA, amplificados com os iniciadores ERIC e BOX.

Schneider & de Bruijn (1996) analisaram perfis eletroforéticos de *Rhizobium meliloti*, *R. loti*, *Bradrhizobium* spp. e *Arzorhizobium caulinodans*, obtidos a partir dos iniciadores REP, ERIC e BOX e concluíram, através de análise de grupamento, que a técnica rep-PCR foi um método confiável para estudo de relacionamento filogenético entre essas bactérias.

McDonald & Wong (2000), em estudos da diversidade genética de isolados bacterianos, empregando os iniciadores BOX, ERIC e REP, e através de análise de grupamento, observaram que dez dos isolados de *C. flaccumfaciens* utilizados foram distribuídos em dois grupos distintos. No primeiro grupo foram identificados quatro isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* e no segundo grupo, três isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, com isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *betae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oorti*, sendo que isolados bacterianos de outros gêneros formaram grupamento distintos.

A utilização de rep-PCR para caracterizar isolados de *Ralstonia solanacearum* permitiu separar os mesmos em quatro grupos distintos de padrões de bandas para os iniciadores BOX e ERIC, e cinco para o iniciador REP (Bringel, 2002).

Gagliardi (2003), em estudos recentes, utilizando-se da técnica rep-PCR, verificou que não houve diversidade genética entre dois isolados australianos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, ao passo que, entre *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis*, a diversidade genética foi de 35%. Estas, por sua vez, quando comparadas com as bactérias do gênero *Clavibacter*, apresentaram diversidade genética de mais de 75%.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios e em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Setor de Defesa Fitossanitária, campus de Botucatu, SP.

### 5.1 Obtenção dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*

Os 26 isolados bacterianos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1, dos quais 20 são provenientes de feijoeiros oriundos de diferentes regiões do Brasil, quatro de coleções internacionais (Cff), e dois isolados endofíticos de citros (*C. flaccumfaciens*). Os isolados de Cff brasileiros utilizados foram obtidos de culturas preservadas pertencentes à coleção do Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, FCA/UNESP, a partir do isolamento de tecido vascular de plantas de feijoeiro com sintomas da doença, bem como de isolados de coleções internacionais. Dois isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros (SR 1/6 e PR 4/3) foram cedidos pelo CENA/SP. Testes de caracterização morfológica e bioquímica / fisiológica foram realizados para todos os isolados utilizados.

Tabela 1. Procedência dos isolados de *Curtobacterim flaccumfaciens* testados.

	Código dos isolados	Hospedeiros	Procedência
1	Feij 2500	Feijoeiro	SP
2	Feij 2502	Feijoeiro	SP
3	Feij 2624	Feijoeiro	SP
4	Feij 2628	Feijoeiro	SP
5	Feij 2634	Feijoeiro	SP
6	Feij 2648	Feijoeiro	SP
7	Feij 2716	Feijoeiro	SP
8	Feij 2718	Feijoeiro	SP
9	Feij 2720	Feijoeiro	SP
10	Feij 2721	Feijoeiro	SP
11	Feij 2769	Feijoeiro	E.U.A
12	Feij 2771	Feijoeiro	E.U.A
13	Feij 2772	Feijoeiro	E.U.A
14	Feij 2773	Feijoeiro	França
15	Feij 2774	Feijoeiro	SP
16	Feij 2855	Feijoeiro	SP
17	Feij 2910	Feijoeiro	PR
18	Feij 2912	Feijoeiro	PR
19	Feij 2927	Feijoeiro	SC
20	Feij 2928	Feijoeiro	SC
21	Feij 2929	Feijoeiro	SC
22	Feij P29	Feijoeiro	SP
23	Feij 2936	Feijoeiro	DF
24	Feoj 2937	Feijoeiro	DF
25	C2932	*Citros	SP
26	C2933	*Citros	SP

\*CENA/SP

## 5.2 Identificação da resistência genética em germoplasma de feijoeiros a *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*

Os ensaios foram realizados sob condições de casa-de-vegetação, visando avaliar a reação de resistência em 333 acessos de feijoeiros, pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Os materiais foram inoculados artificialmente com o isolado Feij 2634 de Cff. Empregaram-se cinco repetições para cada genótipo. Utilizou-se a cultivar Pérola como testemunha (inoculada e não inoculada).

As plântulas de feijoeiro foram obtidas em vaso, contendo o volume aproximado de 2 L de substrato autoclavado, constituído da mistura de terra, esterco de curral curtido e areia grossa lavada na proporção de 1:1:1, acrescido de 0,6 Kg de sulfato de amônio, 1,7 Kg de superfosfato simples, 0,6 Kg de cloreto de potássio e 0,8 Kg de calcáreo dolomítico para cada m<sup>3</sup> da mistura. Em cada vaso foram mantidas três plantas e, aos nove dias após emergência, foram inoculadas, através de duas punções no caule, entre as folhas cotiledonares e folhas primárias, com uma agulha entomológica previamente umedecida em colônias bacterianas, obtidas do isolado Feij 2634, desenvolvidas em meio Nutriente Sacarose e Agar (NSA), durante 96 h a 28 °C. No tratamento testemunha, as plantas ao invés de inóculo bacteriano receberam água destilada (Maringoni, 2000).

As plantas foram irrigadas diariamente e pulverizadas semanalmente com defensivos agrícolas registrados para a cultura, visando o controle de ácaros e insetos.

Os sintomas da doença foram avaliados aos 30 dias após a inoculação, atribuindo-se notas que variaram de 0 a 9, conforme Maringoni (2000), onde: 0 = sem sintomas da doença; 1 = sintomas de mosaico nas folhas; 3 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); 5 = aproximadamente 25% de folhas apresentam murchas e amarelecimento; 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e/ou morte da planta. A média de notas dos sintomas da doença para cada genótipo correspondeu à severidade média da doença.



### **5.3 Agressividade de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro**

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, onde as condições ambientais foram parcialmente controladas: temperatura diurna 25 a 30 °C e temperatura noturna mantida acima de 20 °C. Utilizando-se da mesma metodologia de inoculação descrita no item 5.2, foi avaliada a agressividade de quatro isolados de Cff, procedentes de diferentes locais, a partir da reação em genótipos de feijoeiros suscetíveis e resistentes, selecionados após triagem do Banco de Germoplasma, cedido pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Isolados procedentes de quatro Estados brasileiros: Feij 2634 de São Paulo, Feij 2910 do Paraná, Feij 2928 de Santa Catarina e Feij 2936 do Distrito Federal foram inoculados em genótipos de feijoeiros resistentes (IAC Carioca Pyatã, Ac-297, Ac-405 e Ac-587) e suscetíveis (cultivares Pérola e IAC Rosinha). Empregaram-se quatro repetições para cada genótipo com três plantas/vaso e testemunha (água). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso. Os parâmetros avaliados 30 dias após a inoculação foram: severidade da doença (1- sem sintomas; 2- folíolos menores, plantas menos desenvolvidas, início de murcha e necrose de folhas; 3- amarelecimento, murcha e necrose de folhas até 50% das plantas; 4- presença de amarelecimento, murcha e necrose de folhas superior a 50%; 5- plantas mortas), massa seca da parte aérea (g) por planta e redução (%) na massa seca da parte aérea por planta. Esta escala foi desenvolvida, pois a anteriormente empregada não foi suficiente para diferenciar a severidade apresentada pelas plantas inoculadas.

#### **5.4 Colonização de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no xilema de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, visualizados sob microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Neste estudo, utilizou-se da microscopia eletrônica de varredura para comparar a colonização de células bacterianas de Cff, por inoculação artificial, no xilema de feijoeiros altamente resistentes (Ac-297, Ac-405 e Ac-592) e suscetíveis (Ac-546 e Ac-586). Foram utilizadas cinco repetições para cada genótipo. Em cada vaso foram mantidas três plantas e, aos nove dias após emergência, inoculadas com o isolado de Cff Feij 2634, através de duas punções no caule, entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias, com uma agulha entomológica previamente umedecida em colônias bacterianas, desenvolvidas em meio NSA, durante 96 h a 28 °C. No tratamento testemunha, as plantas ao invés de inóculo bacteriano receberam água destilada (Maringoni, 2000).

Trinta dias após a inoculação, foram realizados cortes longitudinais dos caules de feijoeiros resistentes e suscetíveis, de aproximadamente 4 cm da região de inoculação, em três repetições de cada amostra, para análise em MEV da bactéria presente no xilema.

No preparo das amostras, os materiais vegetais foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,3 – 0,1 M, seguidos de lavagem em água destilada três vezes a cada dez minutos. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 0,5% em água destilada por 30 minutos, seguidos de desidratação em séries crescentes de etanol (7,5 a 100%). Para a secagem das peças em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-020, utilizou-se dióxido de carbono líquido. Em seguida procedeu-se a montagem das amostras em “stubs”, as quais foram cobertas com 10 nm de ouro em Metalizador MED-010 da Balzers, para a análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura.

## 5.5 Reações de PCR

### 5.5.1 Preparo do inóculo de *Curtobacterium flaccumfaciens* para a extração do DNA

Os 26 isolados de *C. flaccumfaciens* utilizados, a partir de culturas preservadas, foram transferidos para tubo de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de água destilada estéril, seguidos de plaqueamento em meio de cultura (NSA) durante 48 - 72 h, a 30 °C. As colônias bacterianas formadas na superfície do meio de cultura foram analisadas quanto ao seu formato, coloração, brilho e característica de crescimento. Dentre os 26 isolados utilizados, todos apresentaram as características do gênero *Curtobacterium*. Os respectivos isolados foram transferidos em Erlemeyer contendo 30 mL de nutriente líquido e mantidos a 30 °C durante 12 a 16 h.

### 5.5.2 Extração do DNA genômico

A técnica utilizada na extração do DNA genômico dos 26 isolados foi a descrita por Li & De Bôer (1995). Um volume aproximado de 2,4 mL de meio líquido contendo células bacterianas de cada isolado foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante de cada amostra e procedeu-se a lavagem do sedimento com adição de 1 mL de água destilada e esterilizada, seguidos de centrifugação (13.000 rpm / 5 minutos). Este procedimento foi repetido duas vezes. O sedimento foi submetido a -20 °C por 1 hora. Após o descongelamento, temperatura ambiente, foram adicionados 100 µl de acetona (- 20° C) e as amostras homogeneizadas, mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida ressuspensas em 500 µl de tampão de extração TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 50 µl de 500 mM EDTA pH 8,0 + 50 µl de dodecyl sulfato de sódio SDS a 14% + 10 µl de proteinase K (0,1%), seguidos de homogeneização e incubação por 1 hora a 55 °C. Adicionou-se igual volume de acetato de amônio (7,5 M), seguidos de homogeneização e

centrifugação (13.000 rpm / 20 minutos). Foram retirados 900 µl do sobrenadante de cada amostra e transferidos para um novo microtubo, adicionando 540 µl de isopropanol, seguidos de homogeneização e precipitação a -20 °C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm / 30 minutos) a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70% (-20°C), centrifugado por 13.000 rpm / 5 minutos e secado a vácuo. O DNA foi ressuscitado em 50 µl de água destilada esterilizada.

### 5.5.3 Amplificação do DNA com os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 e CF4-CF5

Os iniciadores *Cff*FOR2 5' GTTATGAACTTCACTCC 3' e *Cff*REV4 5' GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3' descritos por Tegli et al. (2002) e CF4 5' CACAGCCACCTACATGC 3' e CF5 5' GATCGGGAGTCCGAG 3' (Guimarães et al. 2001) foram utilizados para a identificação dos 26 isolados de *C. flaccumfaciens*. As condições de PCR para os iniciadores CF4-CF5 foram as descritas por Guimarães et al. (2001), onde em 25 µl de reação foram adicionados 2,5µl de DNA, 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 25mM dNTP. A reação de PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação à 96 °C por 2 minutos; 34 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com um ciclo final de extensão à 72 °C por 10 minutos. Para os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 foi utilizada a condição de PCR descrita por Tegli et al. (2002). Aos 25 µl de reação foram adicionados 2,5µl de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 25mM dNTP. A reação de PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão à 72 °C por 30 segundos, com um ciclo final de extensão à 72 °C por 5 minutos. O produto amplificado por PCR foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5%, tratado com brometo de etídeo, sendo que foi utilizado o marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen Brasil).

#### 5.5.4 Condições de PCR para os iniciadores REP, ERIC e BOX

Para a amplificação do DNA utilizou-se os iniciadores ERIC (ERIC1R 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3') e ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'), BOX (BOXA1R 5'CTACGCCAAGGCGACGCCTGACG3') e REP (REPIR-I 5'IICGICGICATCIGGC 3' e REP2I 5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3') (Versalovic et al. 1994). As condições de PCR utilizada foram as descritas por McDonald & Wong (2000), com algumas modificações. A reação foi realizada num volume de 25 µl contendo 50 ng de DNA, 50 pmol de iniciadores, 2 U de *Taq* DNA polimerase e 1,25 mM dNTP. As etapas de amplificação incluíram desnaturação inicial a 95 °C por 7 minutos; 34 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 3 segundos, e 92 °C por 30 segundos, anelamento por 1 minuto para os iniciadores REP a 40 °C e ERIC e BOX a 50 °C e extensão à 65 °C por 8 minutos, com um ciclo final de extensão à 65 °C por 8 minutos. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5%, por 6 horas a 40 V/cm e em seguida tratado com brometo de etídio. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Lader (Invitrogen Brasil).

As 26 bandas de DNA polimórficas geradas pelos iniciadores REP, ERIC e BOX foram observadas para cada um dos isolados, atribuindo-se os valores 1 (presença da banda) e 0 (ausência da banda) e a matriz obtida foi analisada no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean), no programa NTSYS-pc (versão 1,70; Exeter Software, Setaukaat, NY, EUA) para obtenção do dendograma, visando comparar a similaridade ou a diversidade dos isolados bacterianos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação da resistência genética em germoplasma de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os resultados referentes à avaliação dos 333 acessos de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, 30 dias após a inoculação com o isolado Feij 2634, encontra-se na Tabela 2. A partir dos sintomas da doença, foram atribuídas notas que variaram de 0 a 9, conforme Maringoni (2000). A média de notas dos sintomas da doença para cada genótipo correspondeu à severidade média da doença.(SMD). Foram considerados altamente resistentes (SMD= 0 a 0.9) 29 genótipos (8,7%); resistentes (SMD= 1.0 a 2.9) 13 genótipos (3,9%); moderadamente resistentes (SMD= 3.0 a 4.9) 18 genótipos (5,4%) e suscetíveis (SMD acima de 5.0) 273 genótipos (82%).

Tabela 2. Reação de genótipos de feijoeiro à Cff

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Cal-153	0	AR
GEN 96A58 (P3-4-1-1)	0	AR
H96A98 (5-1-1-55)	0	AR
IAPAR-31	0	AR
IAC-Carioca Tybatã	0	AR
H96A34 (P1-2-2-1-1)	0.1	AR
H96A46 (7-1-1-1-51)	0.1	AR
Vermelho Desconhecido	0.1	AR
H96A34 (P1-3-2-1-1)	0.2	AR
H96A58 (P3-4-1-1-1)	0.2	AR
I-114	0.2	AR
TIB-3042	0.2	AR
H96A14 (7-3-1-53P-1)	0.3	AR
H96A14 (7-3-1-53V-2)	0.3	AR
H96A34 (P1-1-1)	0.3	AR
H96A101 (P2-4-1-1)	0.3	AR
H96A28 (P7-1-1-1-1)	0.4	AR
GEN 96A28 (P4-1-1-1-1)	0.5	AR
H96A55 (2-2-3-51-1)	0.5	AR
H96A58 (P3-1-1)	0.5	AR
H96A55 (P16-1-1)	0.6	AR
H96A98 (5-1-51-1)	0.6	AR
Ovo de Codorna Tyunaga	0.6	AR
H96A31 (P1-2-1-1-1)	0.7	AR
H96A34 (1-1-2-51-1)	0.8	AR
H96A45 (P1-7-2-1-1)	0.8	AR

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
H96A51 (P1-2-4-1-1)	0.8	AR
H96A98 (5-1-51-1)	0.8	AR
H96A101 (3-3-51-1)	0.9	AR
H96A28 (P4-1-1-1-1)	1.0	R
TO	1.1	R
Fradinho	1.2	R
Fradinho Cruzeiro	1.2	R
H96A56 (P6-1-4-1P-2)	1.3	R
Mex-54	1.3	R
H96A3 (P17-1-1)	1.5	R
MAN-38	1.5	R
DOR-482	1.7	R
H96A50 (P7-1-2-1-1)	1.8	R
H96A31 (1-2-1-53-1)	1.9	R
H96A18 (P2-1-1-1-1)	2.0	R
H96A101 (2-4-51-1)	2.4	R
GEN 96A10 (P5-1X-1)	3.0	MR
RAZ-59	3.0	MR
ABC 136	3.1	MR
Leg Floresta 5	3.1	MR
Rosada	3.1	MR
WAF-74	3.1	MR
G5207	3.2	MR
D. Calima	3.3	MR
RAZ-49	3.3	MR
AND-279	3.4	MR



**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Durango-222	3.4	MR
H96A34 (P1-5-1-1-1)	3.4	MR
LP 88-175	3.4	MR
BB LAKE	3.8	MR
WAF-69	3.9	MR
Xan-112	3.9	MR
H96A37 (P12-1-1)	4.0	MR
Durango- 222	4.2	MR
GEN 96A13 (P3-3-2-1-1)	5.0	S
Mar- 01	5.0	S
H96A46 (51-1-1-1-52)	5.1	S
WAF-75	5.1	S
Xan-251	5.1	S
G 5686	5.2	S
Xan-159	5.2	S
G 2858	5.3	S
H96A103 (1-151-1)	5.3	S
Jabola (CB)	5.3	S
Raven	5.3	S
RAZ-56	5.3	S
A-449	5.4	S
IAC-Carioca Eté	5.4	S
Pirapora (CB)	5.4	S
Bat-332	5.5	S
Car-Marron	5.5	S
H96A37 (P1-1-2-1-1)	5.5	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Antioquia 8	5.6	S
R.bac	5.6	S
Baetão	5.7	S
Bat-477	5.7	S
IAC-Carioca Eté	5.8	S
Jamara	5.8	S
Kaboon	5.8	S
Mamoninha	5.8	S
A-211	5.9	S
Baetão	5.9	S
IAC-Carioca Eté	5.9	S
H96A28 (P1-1-1)	6.0	S
H96A34 (P12-1-1)	6.0	S
H96A28 (P5-2-1-1-1)	6.1	S
H96A98 (15-2-53-1)	6.5	S
H96A98 (P5-2-1-1)	6.7	S
A-322	7.0	S
Cornell-49242	7.0	S
H96A55 (P1-1-4-1-1)	7.0	S
H96A98 (12-1-51-1)	7.0	S
IAPAR 81	7.0	S
Pijão	7.0	S
CNF-86-9	7.1	S
H96A31 (P2-1-3-1-1)	7.1	S
H96A98 (12-1-53-1)	7.1	S
Mortiño	7.1	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Montcalm	7.1	S
Preto-158	7.1	S
Bayo	7.2	S
H96A56 (9-3-2-51-1)	7.2	S
H96A98 (15-2-51-1)	7.2	S
H96A102 (1-1-52-1)	7.2	S
IAPAR-14	7.2	S
Preto-167	7.2	S
Batista Brilhante (CB)	7.3	S
Carioca Comum	7.3	S
H96A5 (P2-51-1)	7.3	S
H96A28 (P4-5-2-1-1)	7.3	S
H96A55 (2-2-3-51-1)	7.3	S
H96A102 (1-2-51-1)	7.3	S
IAPAR-Bac 6	7.3	S
Bat. 93	7.4	S
Copinho Grande Preto	7.4	S
Goytacazes	7.4	S
H96A10 (P5-1X-1)	7.4	S
Pato de Minas	7.4	S
Rim de Porco	7.5	S
H96A96 (2-1-51-1)	7.6	S
Preto-196	7.6	S
RAZ-55	7.6	S
Safira	7.6	S
Feb. 29	7.7	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
H96A35 (P6-2-1-1-1)	7.7	S
H96A55 (1-1-4-1-53)	7.7	S
H96A102 (1-2-54-1)	7.7	S
México-309	7.7	S
Mulatinho	7.7	S
H96A3 (P13-1-1)	7.9	S
México-435	7.9	S
73-VUL-3205	7.9	S
H96A12 (5-1-4-52-1)	8.0	S
H96A13 (P3-51-1)	8.0	S
IAC UNA	8.0	S
H96A83	8.1	S
Rosinha	8.1	S
Baio da Praia	8.2	S
GEN 96A31 (P2-1-1-1-1)	8.2	S
H96A5 (P5-1-1)	8.2	S
H96A28 (P4-4-1-1-1)	8.2	S
Sanilac	8.2	S
H96A3 (7-52-1)	8.3	S
H96A54 (P2-2-1-1-1)	8.3	S
H96A98 (15-2-51-1)	8.3	S
Rosinha	8.3	S
H96A98 (15-3-52-1)	8.4	S
Carioca 80	8.5	S
CF-840743	8.5	S
H96A34 (P13-1-1)	8.5	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
H96A3 (2-51-1)	8.5	S
Mulata Gorda	8.5	S
Pérola	8.5	S
Preto do Procone	8.5	S
Red Kidney	8.5	S
Rosinha	8.5	S
Rosinha	8.5	S
Rosa Guaranésio Tipo C	8.5	S
A-443 (Res. Bac.)	8.6	S
Baetão	8.6	S
Black Turtle Soup Bean	8.6	S
Cavalo Amarelo	8.6	S
Contender	8.6	S
Costa Rica	8.6	S
DOR-476	8.6	S
ECU-208	8.6	S
Frijol Negro	8.6	S
Gordo Branco	8.6	S
H96A13 (P3-3-2-1B-2)	8.6	S
H96A31 (P2-1-1-1-1)	8.6	S
H96A51 (P1-2-1-1-1)	8.6	S
H96A51 (P1-2-1-1-1)	8.6	S
H96A56 (9-3-2-52-1)	8.6	S
H96A57 (P2-6-1-1-1)	8.6	S
IPA-8	8.6	S
IAPAR-72	8.6	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Manteiguinha	8.6	S
México-12	8.6	S
Porrilo-1	8.6	S
PR-733612	8.6	S
RAI-76	8.6	S
Rosado-13	8.6	S
Rosinha-127	8.6	S
Samll White 59 Preto	8.6	S
Vermelhinho	8.6	S
A-21	8.7	S
A-55	8.7	S
A-439 (Res. Bac)	8.7	S
Actoplan	8.7	S
Aporé	8.7	S
ARC-4	8.7	S
B-Puebla-40	8.7	S
Branco Graúdo	8.7	S
Canejo	8.7	S
Carioca-MG	8.7	S
Chileno Preto	8.7	S
Chubinho	8.7	S
DOR-391	8.7	S
EMB-81	8.7	S
Enxofre (Diacol Mina Pent)	8.7	S
Guatemala 2226	8.7	S
G-4000	8.7	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
G-11796	8.7	S
H96A55 (P1-1-8-1-1)	8.7	S
H96A104 (4-1-51-1)	8.7	S
IAC UNA	8.7	S
IAPAR-57	8.7	S
Jalo Itararé	8.7	S
México-488	8.7	S
México-114	8.7	S
Pan 72	8.7	S
Perry Marron	8.7	S
PI-207262	8.7	S
Preto Lages	8.7	S
Real Mexican 34	8.7	S
Retinho Santa Rosa	8.7	S
Rosinha G2	8.7	S
Sem nome-Rosinha	8.7	S
Tupi	8.7	S
Turrialba-1	8.7	S
Uberabinha	8.7	S
A-ICA-TUI	8.8	S
Alemão	8.8	S
Baetão	8.8	S
Bagajo	8.8	S
B.Porrilo-70	8.8	S
Branco-119	8.8	S
Canário-101	8.8	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Coco Bianchi	8.8	S
Corrilo Sintético	8.8	S
ECU-311	8.8	S
Feijão Ingá	8.8	S
Feijão Vermelho Graúdo	8.8	S
IAPAR-80	8.8	S
Jalo-110	8.8	S
Jamapa	8.8	S
Leg. Rosinha	8.8	S
MDRK	8.8	S
Mex-279	8.8	S
México-44	8.8	S
México-498	8.8	S
Monte Negro-1349	8.8	S
Oito e Nove	8.8	S
Preto-146	8.8	S
Preto-209	8.8	S
Preto Dom Feliciano	8.8	S
Preto Uberabinha	8.8	S
Pirata-1	8.8	S
Quarenteno	8.8	S
Rim de Porco	8.8	S
Rosinha	8.8	S
Rosinha-145-1-1	8.8	S
Sem. Grande cor de vinho	8.8	S
STO-ROSS	8.8	S



**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Terra Velha	8.8	S
TU	8.8	S
Uberabinha	8.8	S
Venezuela-350	8.8	S
Venezuela-350	8.8	S
Venezuela-42-5-1	8.8	S
Vermelho de Minas	8.8	S
73-VUL-3210	8.8	S
A-285	8.9	S
A-300	8.9	S
AFR-188	8.9	S
Alemão	8.9	S
Barbunya	8.9	S
Caéte (preta)	8.9	S
Chileno / Branco	8.9	S
DOR-390	8.9	S
EMP-407	8.9	S
EMP-408	8.9	S
Feijão Pintado	8.9	S
Flor de Mayo	8.9	S
Goiano Precoce	8.9	S
G916	8.9	S
G2333	8.9	S
HF 5465-63-1	8.9	S
H96A10 (P5-1-1)	8.9	S
H96A39 (P3-1-1)	8.9	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
H96A39 (P3-1-1)	8.9	S
H96A42 (P5-3-1-1-1)	8.9	S
IAPAR-44	8.9	S
IAPAR-65	8.9	S
IPA-1	8.9	S
Jalo	8.9	S
Jalo	8.9	S
Jamapa	8.9	S
MD-806	8.9	S
Pinto-114	8.9	S
Pompadair	8.9	S
Pompador	8.9	S
PR-733639	8.9	S
Puebla-152	8.9	S
RG 342 CH60(MA)	8.9	S
Rico-23	8.9	S
Riz-30	8.9	S
Rosa Guaranésio Tipo B	8.9	S
Rosinha	8.9	S
Sangre-Toro	8.9	S
Tarumã	8.9	S
Amendoim	9.0	S
Apetito Branco	9.0	S
ARC-1	9.0	S
ARC-2	9.0	S
ARC-3	9.0	S

**Continuação da Tabela 2**

<b>Genótipos</b>	<b>*Severidade da Doença</b>	<b>Classe de Resistência</b>
Bataav	9.0	S
B. Turrialba	9.0	S
Cal-143	9.0	S
Guatemala-479	9.0	S
HIBC	9.0	S
Honduras-32	9.0	S
H96A9 (P6-1-1)	9.0	S
H96A13 (P3-1B-2)	9.0	S
H96A45 (3-51-52-1)	9.0	S
H96A96 (2-1-52-1)	9.0	S
IPA-2	9.0	S
Mar-2	9.0	S
Méx-54	9.0	S
México 115	9.0	S
PI-310724	9.0	S
Puebla-152	9.0	S
Preto-184	9.0	S
R. bac.	9.0	S
Rico	9.0	S
Rosado-14 Mulatinho	9.0	S
60 Dias	9.0	S

\* Escala de notas da severidade média da doença (SMD) de 0 a 9.0 (Maringoni 2000)

No conjunto dos 333 acessos de feijoeiros avaliados em reação ao isolado de Cff Feij 2634 (Tabelas 2) foram observados diferentes níveis de resistência. Pode-se inferir que no germoplasma de feijoeiro do IAC avaliado, cerca de 18% dos materiais, desde altamente resistentes a moderadamente resistentes, podem ser úteis para o melhoramento como fonte de genes para resistência a Cff.

A identificação de fontes de resistência a diversas doenças do feijoeiro é uma etapa básica em programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças. Além da resistência genética, devem ser reunidas várias outras características agrônômicas desejáveis à cultivar. Neste sentido, dentre os genótipos do IAC selecionados para a avaliação de resistência a Cff, constam aqueles avaliados para outros caracteres obtidos após cruzamentos artificiais, realizados entre fontes de genes para resistência a doenças causadas por antracnose, mancha angular e cretamento bacteriano comum do feijoeiro, variedades locais adaptadas e plantas com grãos de outros tipos (Tabela 2).

A avaliação da resistência genética para alguns genótipos de feijoeiro a Cff realizados em diferentes instituições corroborou na comparação dos resultados obtidos neste estudo. As cultivares IAC-Carioca Tybatã, IAPAR-31 e IAPAR-14, consideradas resistentes a murcha-de-curtobacterium por Leite & Behlau (2001), no presente trabalho foram altamente resistentes apenas para as duas primeiras cultivares (Tabela 2), sendo que a cultivar IAPAR-14 apresentou reação de suscetibilidade, concordando com os resultados obtidos por Maringoni (2002) e Rava & Behlau (2002). Os genótipos IAPAR-31, IAC-Carioca Pyatã e IAC-Aruã, considerados moderadamente resistente por Rava & Costa (2002), para as duas últimas cultivares foram as mais resistentes dentre as testadas por Maringoni (2002). Segundo Rava & Costa (2001), o fato das duas cultivares comportarem como moderadamente resistentes numa região e resistentes em outra pode ser devido à diferença de agressividade dos isolados de Cff. Neste sentido, torna-se de grande importância o conhecimento da variabilidade da agressividade de isolados de Cff.

Na Tabela 3 estão algumas linhagens de feijoeiro que, embora da mesma genealogia, apresentaram reações diferentes nos níveis de resistência a Cff.

Tabela 3 Variação nos níveis de resistência a *murcha-de-curtobacterium* em linhagens de feijoeiros de mesma genealogia

Genealogia	Linhagem	C.R.*
(Vax1.Aruã).(Akytã.IAPAR14) x A686	H96A28	AR
(Vax1.Aruã).(Akytã.IAPAR14) x A686	H96A28	R
(Vax1.Aruã).(Akytã.IAPAR14) x A686	H96A28	S
(Vax1.Aruã) x (Aruã.Mar1).(Maravilha.Cal143)	H96A31	AR
(Vax1.Aruã) x (Aruã.Mar1).(Maravilha.Cal143)	H96A31	R
(Vax1.Aruã) x (Aruã.Mar1).(Maravilha.Cal143)	H96A31	S
(Pyatã.Mar1).(Akytã.IAPAR14) x (Marav..Mar1).(Una.A300)	H96A45	AR
(Pyatã.Mar1).(Akytã.IAPAR14) x (Marav..Mar1).(Una.A300)	H96A45	R
(Una.A300).(Marav.G2338) x (Pyatã.G916).(Marav..Mar1)	H96A46	AR
(Una.A300).(Marav.G2338) x (Pyatã.G916).(Marav..Mar1)	H96A46	S
(Marav.Cal143).(Pyatã.Mar2) x (Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1)	H96A55	AR
(Marav.Cal143).(Pyatã.Mar2) x (Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1)	H96A55	S
(Pyatã.A686).(Marav.G2338).(Maravilha.And277) x L317-1	H96A98	AR
(Pyatã.A686).(Marav.G2338).(Maravilha.And277) x L317-1	H96A98	S
(Aruã.G5686).(Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1) x Aruã	H96A101	AR
(Aruã.G5686).(Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1) x Aruã	H96A101	R
(Marav.Mar2).(Una.A300) x (Pyatã.G916).(Marav.Mar1)	H96A56	R
(Marav.Mar2).(Una.A300) x (Pyatã.G916).(Marav.Mar1)	H96A56	S
(Aruã.G5686) x (Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1)	H96A37	MR
(Aruã.G5686) x (Xan251.Akytã).(Pyatã.Mar1)	H96A37	S
(Aruã.Mar1) x (Akytã.IAPAR14)	H96A12	S
(Una).(Arc1) x (Pyatã).(Cal143)	H96A83	S
(Akytã.Xan251) x (Pyatã.Mar1)	H96A14	AR

\*Classe de Resistência: AR = Altamente Resistente; R = Resistente; MR = Moderadamente Resistente; S = Suscetível

A análise da genealogia de alguns cruzamentos mostram reações diferentes dentro do mesmo genótipo ao isolado de Cff (Tabela 3). A Tabela 2, representada pelos cruzamentos H96A98 (5-1-1-55) e H96A46 (7-1-1-1-51), pertencentes ao ensaio de avaliação de Cff em plantas de feijoeiros com resistência à antracnose, comportaram-se como altamente resistentes e suscetíveis a Cff. Neste caso como os cruzamentos e seleções precoces nas gerações iniciais foram realizados para resistência à antracnose e não para Cff, o gene de resistência pode ter se perdido durante o processo de seleção para resistência à antracnose. Assim houve casos em que a resistência a Cff coincidiu com a resistência à antracnose e em outros casos não. Pode-se inferir que os genes de resistência à antracnose e Cff não estão ligados ou próximos, pois permitiram a segregação independente dos genes (comunicação pessoal – Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell - IAC). Outros exemplos de progenitores da mesma genealogia, utilizados em cruzamentos artificiais, e que geraram linhagens altamente resistentes e suscetíveis a Cff, estão listados na Tabela 3.

A ausência de informações sobre a reação de genótipos a doenças utilizadas num bloco de cruzamento, em adição à ausência de outras características agronômicas desejáveis, podem limitar em pouco tempo o uso de uma nova cultivar lançada no mercado. Alguns genes de interesse pertencentes a determinados progenitores, por ocasião dos cruzamentos e seleção, podem ser perdidos ou mesmo não existirem e, por fim não serem agregados à nova linhagem. Entre os cruzamentos listados na Tabela 3, H96A12: (Aruã.Mar1) x (Akytã.IAPAR14) e H96A83: (Una).(Arc1) x (Pyatã).(Cal143), originaram linhagens suscetíveis a Cff mesmo compostas por cultivares resistentes IAC-Carioca Akytã e IAC-Carioca Pyatã (Maringoni. 2002). Ao contrário, o cruzamento entre H96A14: (Akytã.Xan251) x (Pyatã.Mar1), resultou linhagem altamente resistentes a Cff (Tabelas 2 e 3) .

A Figura 1 ilustra os sintomas da murcha-de-curtobacterium em genótipos de feijoeiro altamente resistentes (Ovo de Codorna Tyunaga e Cal-153) e suscetíveis (Gordo Branco e ARC-4). Figura 2 os sintomas desta doença em plantas de feijoeiro da cultivar Pérola inoculada (A) e não inoculada (B) com o isolado Feij 2634, 30 dias após a inoculação.

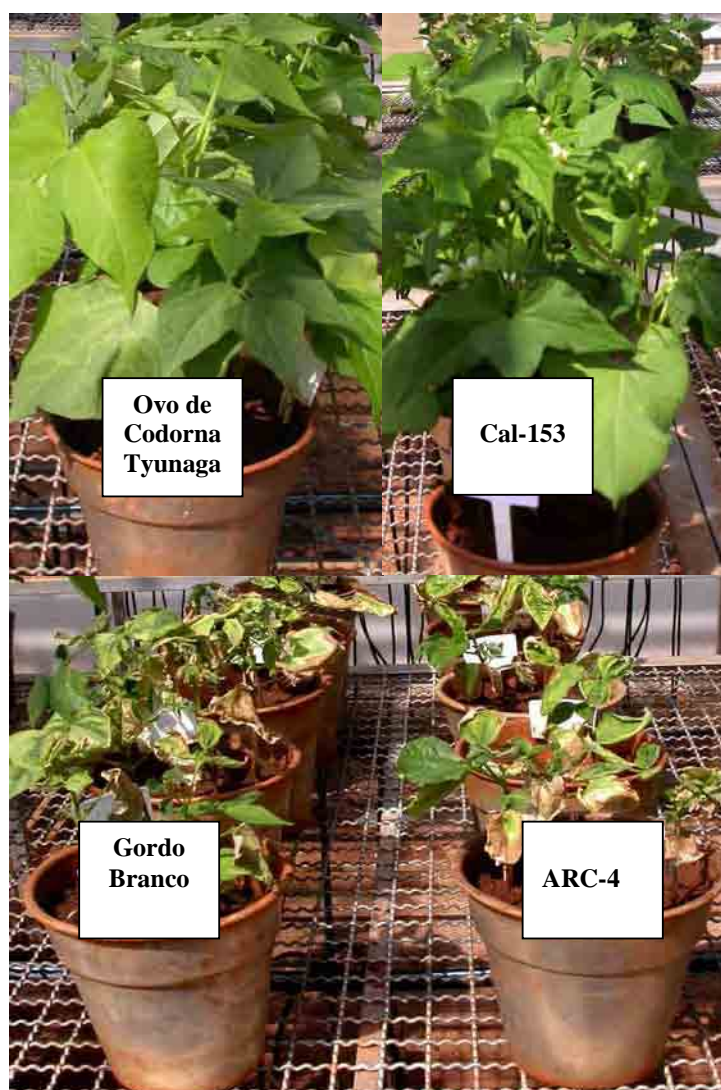


Figura 1 – Sintomas de murcha-de-curtobacterium em genótipos de feijoeiro altamente resistentes (Ovo de Codorna Tyunaga e Cal-153) e suscetíveis (Gordo Branco e ARC-4), aos 30 dias após a inoculação.

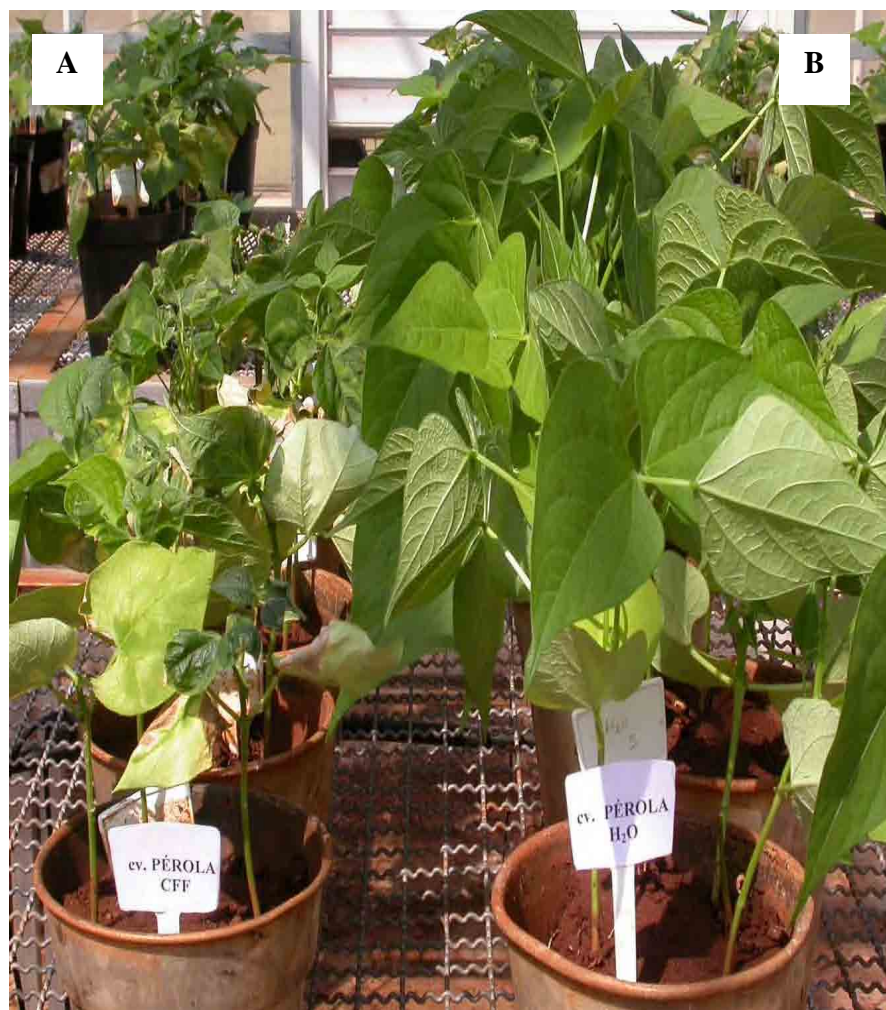


Figura 2. Sintomas de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro da cultivar Pérola inoculada (A) e não inoculada (B) com o isolado Feij 2634, aos 30 dias após a inoculação.



A suscetibilidade dos acessos Gordo Branco e ARC-4 a Cff, trinta dias após a inoculação (Figura 1), evidenciaram sintomas de nanismo, murcha, amarelecimento e necrose. Nesta mesma figura constam dois genótipos altamente resistentes Ovo de Codorna Tyunaga e Cal-153, nos quais observam-se plantas sem sintomas de murcha e em média, de um a dois pares de folhas por planta com murcha, o que conferiu alto nível de resistência. Sob as mesmas condições de ambiente, plantas da cultivar Pérola foram inoculadas com isolados de Cff e água (testemunha). A Figura 2(B) mostra o desempenho vegetativo normal das plantas testemunhas em comparação às plantas inoculadas [Figura 2(A)], nas quais observam-se sintomas de nanismo e amarelecimento. Por outro lado, os sintomas observados na cultivar Pérola (Figura 2A) foram menos severos, em relação aos acessos Ac-546 e Ac-586 (Figura 1), indicando para estes genótipos maior suscetibilidade ao isolado Cff Feij 2634.

## **6.2 Agressividade de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro.**

Os resultados referentes à avaliação da severidade da murcha-de-curtobacterium, em seis genótipos de feijoeiro, inoculados separadamente com quatro isolados de Cff, provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina e do Distrito Federal, encontram-se na Tabela 4. Constatou-se que todos os genótipos considerados resistentes (IAC Carioca Pyatã, Ac-297, Ac-405 e Ac-587) apresentaram baixo índice de severidade à doença, quando comparados com as cultivares suscetíveis (Pérola e Rosinha). Houve diferença na severidade da doença, principalmente para os genótipos IAC Carioca Pyatã e Acesso 405. Para os genótipos IAC Carioca Pyatã os isolados de Cff procedentes do Estado de Santa Catarina e do Distrito Federal foram mais agressivos, enquanto que para os acessos Ac-297 e Ac-587 a severidade da doença manteve-se constante. As cultivares suscetíveis, Pérola e Rosinha apresentaram maior severidade da doença, com sintomas de murcha e necrose de folhas superior a 50% para todos os isolados de Cff utilizados.

A Tabela 5 mostra os resultados da massa da matéria seca da parte aérea de plantas inoculadas ou não inoculadas, com os diferentes isolados de Cff e na Tabela 6 encontram-se as porcentagens de redução da massa da matéria seca das plantas inoculadas.

Em plantas de todos os genótipos de feijoeiro, houve menor desenvolvimento da massa aérea na presença da inoculação com os diferentes isolados de Cff (Tabela 5). Os genótipos que mais reduziram a massa da matéria seca da parte aérea foram a cultivar IAC Carioca Pyatã, para o isolado procedente do Distrito Federal, o acesso Ac-297, para o isolado de Santa Catarina, o acesso Ac-405, para os isolados do Paraná e Santa Catarina, e o acesso Ac-587, para os isolados de São Paulo e do Distrito Federal. Os isolados de Santa Catarina e do Paraná foram os que mais reduziram a massa da matéria seca respectivamente para as cultivares suscetíveis Pérola e Rosinha (Tabela 6).

Tabela 4 - Severidade da murcha-de-curtobacterium em seis genótipos de feijoeiros inoculados com quatro isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, procedentes de várias regiões do Brasil.

Isolados	IAC-Carioca Pyatã	Ac-297	Ac-405	Ac-587	Pérola	Rosinha
Feij 2634 (SP)	1.5*	2.0	2.5	2.0	4.0	4.0
Feij 2910 (PR)	1.0	2.0	1.0	2.0	4.0	4.0
Feij 2928 (SC)	1.8	2.0	1.1	2.0	4.0	4.0
Feij 2936 (DF)	2.0	2.0	1.9	2.0	3.9	4.0
Não inoculado	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

\*Escala de notas 1 a 5

Tabela 5 - Massa da matéria seca (g) de plantas de seis genótipos de feijoeiro inoculados com quatro isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Isolados	IAC-Carioca Pyatã	Ac-297	Ac-405	Ac-587	Pérola	Rosinha
Feij 2634 (SP)	9.2 b	7.9 bc	11.2 b	4.2 bc	5.7 bc	4.2 bc
Feij 2910 (PR)	11.2 a	7.6 bc	5.0 c	5.0 bc	6.4 bc	1.8 c
Feij 2928 (SC)	5.1 c	5.6 c	4.2 c	6.2 b	4.5 c	3.9 bc
Feij 2936 (DF)	3.8 d	8.6 ab	8.7 b	2.4 c	7.8 b	5.6 b
Não Inoculado	11.5 a	10.8 a	15.4 a	12.0 a	13.3 a	14.3 a
CV%	7.7	13.2	18.4	22.5	14.3	20.9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Redução (%) da massa da matéria seca da parte aérea em seis genótipos de feijoeiros inoculados com quatro isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em relação às testemunhas não inoculadas.

Isolados	IAC Carioca Pyatã	Ac- 297	Ac-405	Ac-587	Pérola	Rosinha
Feij 2634 (SP)	20.3 b	27.6 b	27.4 b	65.4 ab	57.3 ab	70.4 b
Feij 2910 (PR)	4.3 c	30.5 ab	67.4 a	58.1 b	52.0 ab	87.2 a
Feij 2928 (SC)	55.3 a	51.3 a	72.9 a	48.6 b	66.2 a	72.7 b
Feij 2936 (DF)	67.4 a	20.3 b	43.5 b	80.2 a	41.3 b	61.2 b
CV%	9.4	29.7	18.2	12.7	14.6	10.5

Médias seguidas por letra na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados  $\text{Arc sen } (x/100)^{1/2}$ .

Para determinados genótipos altamente resistentes ao isolado de Cff não houve correlação entre maior severidade da doença e menor produção da matéria seca da parte aérea. O acesso Ac-405 apresentou maior severidade da doença ao isolado Feij 2634, embora tenha sido verificado menor interferência no peso da matéria seca em relação aos demais isolados (Tabelas 4 e 5).

Na cultivar IAC-Carioca Pyatã foram observadas variações na agressividade dos isolados. Utilizando o isolado Feij 2910 procedente do Estado do Paraná, não foram verificadas diferenças estatísticas em relação à testemunha não inoculada (Tabela 5). Ao contrário, para a mesma cultivar, o isolado Feij 2936 do Distrito Federal apresentou maior agressividade. Os isolados Feij 2634, Feij 2928 e Feij 2936 procedentes respectivamente do Estado de São Paulo, do Estado de Santa Catarina e Distrito Federal apresentaram diferenças estatísticas na produção da massa da matéria seca da parte aérea em relação a testemunha não inoculada, sendo que estes isolados proporcionaram maior agressividade a cultivar IAC-Carioca Pyatã (Tabela 5).

No acesso Ac-297 o isolado Feij 2928, procedente do Estado de Santa Catarina, foi mais agressivo, não sendo verificada diferença na produção da massa seca da parte aérea, quando utilizados os isolados Feij 2634 e Feij 2910, procedentes respectivamente do Estado de São Paulo e Paraná (Tabela 5).

A maior redução da matéria seca da parte aérea (80.2%), dentre os genótipos considerados altamente resistentes, em relação à testemunha não inoculada, foi observada para o acesso Ac-587, indicando maior agressividade ao isolado Feij 2936 procedente do Distrito Federal. Para o genótipo Ac-405 frente aos isolados Feij 2910 e Feij 2928 procedentes respectivamente do Estado do Paraná e Santa Catarina, foi observado grande redução da matéria seca da parte aérea, que não diferiu na análise estatística (Tabela 6). Para o acesso Ac-587 utilizando os isolados Feij 2910 (PR) e Feij 2928 (SC) houve redução da matéria seca da parte aérea das plantas, sem diferenças estatísticas. Interpretação semelhante foi obtido quando utilizada a cultivar Rosinha aos isolados Feij 2634 (SP), Feij 2928 (SC) e Feij 2936 (DF) (Tabela 6).

Os resultados observados mostram que isolados de Cff de diferente procedência e mesma localidade podem diferir na agressividade em genótipos de feijoeiro. As

diferenças na agressividade em isolados de Cff aos genótipos de feijoeiro, obtidos neste estudo confirmam os indicativos de variabilidade observados em outras instituições de pesquisa, que ao utilizarem diferentes isolados de Cff e genótipos de feijoeiro obtiveram diferentes níveis de resistência. Pode ser citada a cultivar IAPAR-31, que inoculada com isolados de Cff de outras regiões apresentou resposta de resistência à suscetibilidade (Leite et al., 2001; Maringoni 2002; Rava et al. 2003; Souza et al. 2004), e as cultivares IAC-Carioca Pyatã e IAC-Carioca Aruã, resistentes ao isolado Cff Feij 2634 no Estado de São Paulo (Maringoni, 2000) e moderadamente resistentes ao isolado CffCNF 04, testado por Rava et al. (2003), em Santo Antônio de Goiás (GO).

### **6.3 Colonização de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no xilema de feijoeiros altamente resistentes e suscetíveis, visualizados sob microscopia eletrônica de varredura**

Exames das fotografias em microscopia eletrônica de varredura (MEV) na região do xilema, em genótipos de feijoeiro resistentes (Ac-297, Ac-405 e Ac-592) à murcha-de-curtobacterium, inoculados com o isolado de Cff Feij 2634, evidenciou várias aglutinações bacterianas envolvidas por filamentos e “grânulos” (Figuras 3A, 3B e 4B) e o aparecimento de estruturas rendilhadas nas pontuações da parede do vaso do xilema (Figuras 4A e 4B) não observadas em genótipos suscetíveis, nos quais foram verificados grande quantidade de células bacterianas presente nas pontuações da parede do vaso do xilema (Figuras 5A, 5B e 6A, 6B). No genótipo de feijoeiro suscetível Ac-546, (Figuras 6A e 6B), houve aparente ativação tardia dos mecanismos de defesa (estrutura rendilhada) nas pontuações dos vasos de xilema.

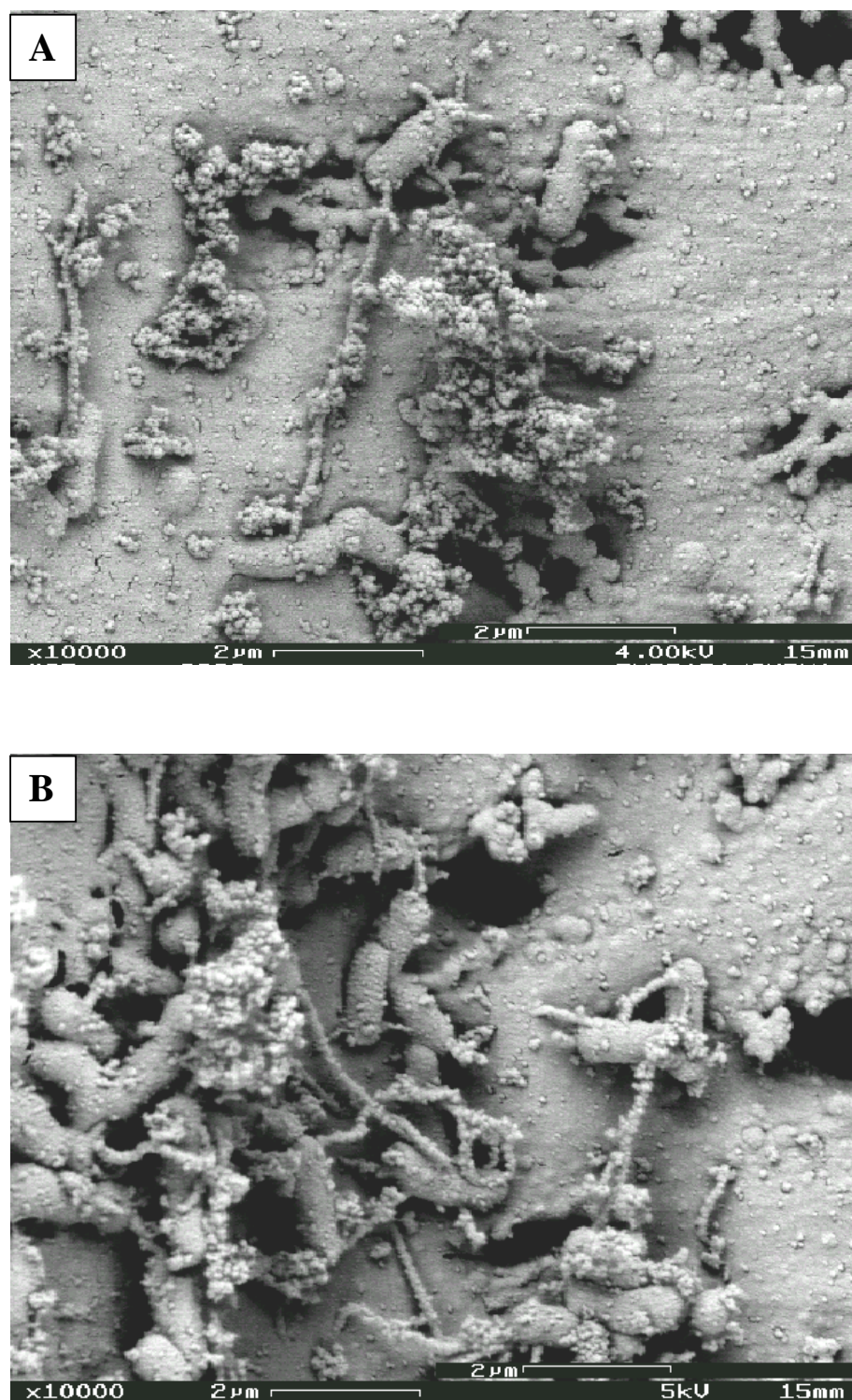


Figura 3. (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em vasos de xilema de feijoeiros resistentes Ac-297 e em (B) Ac-405, trinta dias após a inoculação, visto em microscopia eletrônica de varredura.

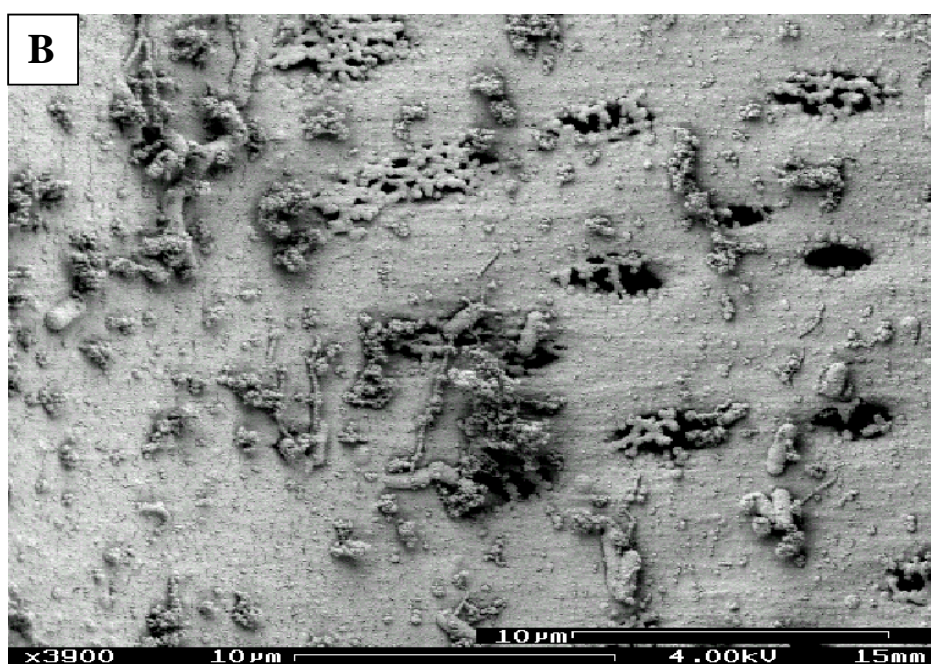
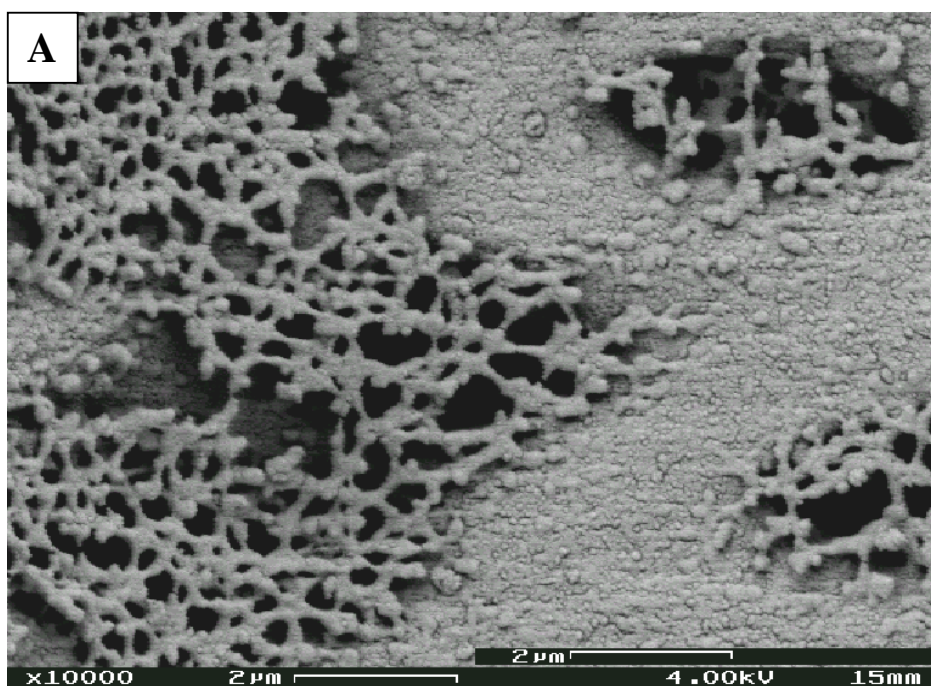


Figura 4. (A) e (B) Estrutura rendilhada sob pontuações da parede do vaso do xilema de feijoeiro resistente Ac-592, trinta dias após a inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, visto em microscopia eletrônica de varredura.

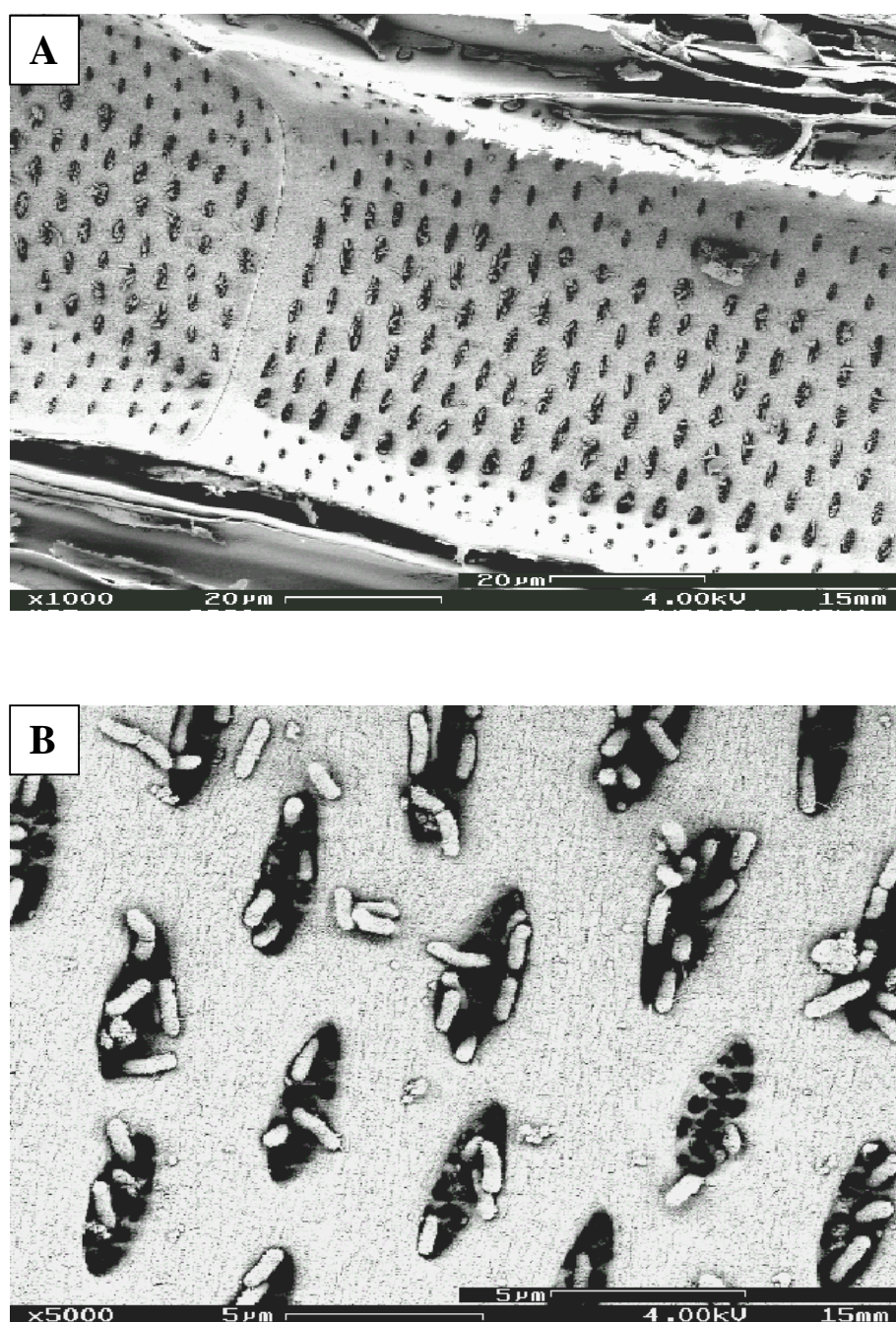
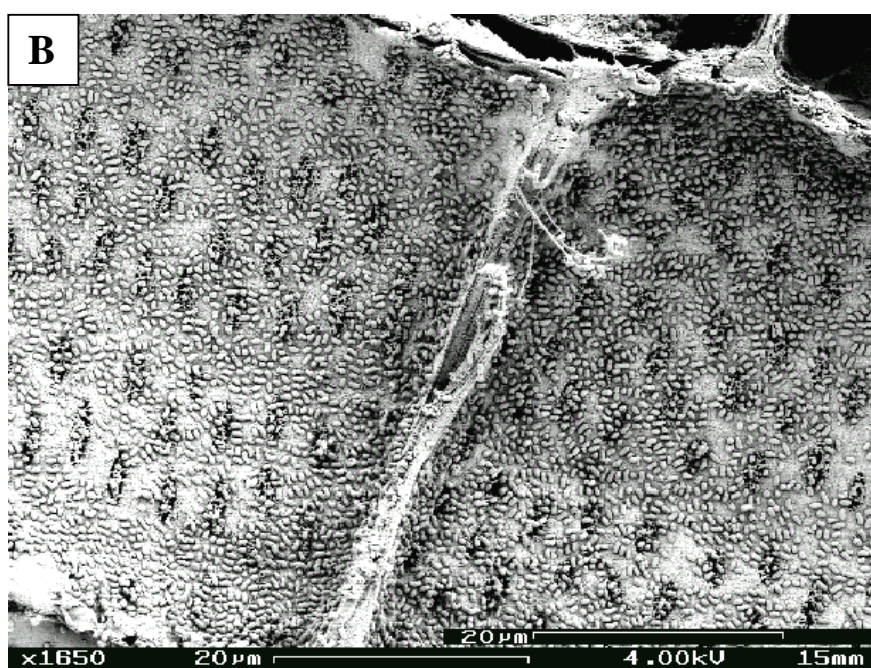


Figura 5. (A) e (B) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, sob pontuações da parede no vaso de xilema de feijoeiro suscetível Ac-586, trinta dias após a inoculação, em microscopia eletrônica de varredura.





Figuras 6. (A) e (B) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, trinta dias após inoculação, em vaso de xilema de feijoeiro suscetível Ac-546, visualizado sob microscopia eletrônica de varredura.

Anterior à formação dos aglomerados bacterianos, verificou-se inicialmente a formação de filamento sob a superfície da bactéria. Esses filamentos formam ligações entre células próximas e distantes na região do xilema. As distâncias entre as bactérias tornam-se menores formando subseqüentes aglutinações bacterianas, que provavelmente, dificultam a proliferação de Cff para outras regiões do vaso do xilema, a partir do ponto de inoculação, em genótipos de feijoeiro altamente resistentes. Concomitantemente às aglutinações das células bacterianas, foi observado crescimento de estrutura rendilhada sob as pontuações da parede do xilema de feijoeiro Ac-592, representadas pelas Figuras (4A e 4B) que, aparentemente, impossibilita o avanço e proliferação da bactéria para regiões adjacentes no vaso do xilema, limitando o crescimento da população bacteriana. Tais observações sugerem a atuação de mecanismo de resistência física e bioquímica, pós-formados em genótipos de feijoeiro altamente resistentes. Nos genótipos suscetíveis de feijoeiro, Ac-586 e Ac-546, representados respectivamente pelas Figuras (5A e 5B) e (6A e 6B) foi verificado grande quantidades de células bacterianas sob pontuações da parede do vaso do xilema, no entanto, o genótipo Ac-546 apresentou pequenas formações de estruturas rendilhadas. Esta observação sugere a hipótese de que a ativação tardia do mecanismo de resistência física, no vaso do xilema, ao genótipo Ac-546 ocorreu em menor intensidade que a dinâmica do crescimento populacional de Cff.

Pontuações guarnecidas são comuns em vasos do xilema de espécies de *Casalpinaeae* e *Fabaceae* (Quick & Miller, 1985). Tais guarnições são descritas como projeções da parede celular rendilhada encontrada em muitas leguminosas, sendo especialmente características de plantas de clima temperado, nas quais tais formações têm sido associadas a mecanismos de resistência a baixas temperaturas, que podem levar ao congelamento da seiva no xilema. Assim, é de grande interesse esclarecer se as estruturas rendilhadas, observadas nos feijoeiros resistentes a Cff, são relacionadas às guarnições das pontuações comumente encontradas em leguminosas e, neste caso induzida como resposta de resistência estrutural à presença do patógeno nos vasos do xilema. Rahman et al. (1999), em estudos de microscopia eletrônica de transmissão, analisaram a colonização vascular em cultivares resistentes e suscetíveis de pimentão (*Capsicum annuum*) a *Ralstonia solanacearum* e observaram que vasos do xilema adjacentes à infecção foram recobertos pela expansão da parede celular, limitando a dispersão e redução do inóculo em plantas resistentes. Trujillo et al.

(2001), em estudo da interação entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em genótipos resistentes foi verificado encapsulamento das células bacterianas. Nos moderadamente resistentes observaram-se poucas bactérias nos espaços intercelulares e a formação de vesículas entre o plasmalema e a parede celular. Nos genótipos suscetíveis, houve maior número de bactérias nos espaços intercelulares,

Neste sentido, estudo detalhado de microscopia eletrônica de transmissão em vasos do xilema de feijoeiro altamente resistentes a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* poderá auxiliar a nível celular, como verificado em *Capsicum-Ralstonia*, no entendimento da formação de barreira física ou estrutura de defesa histológica.

A literatura traz poucas informações sobre bactérias como agentes eliciadores de fitoalexinas, mesmo assim, quase que exclusivamente, envolvendo plantas da família das leguminosas (Gnanamanickam & Patil, 1977; Lyon & Wood, 1975; Sanz, 1981; Wyman & Vanetten, 2002). As formações de aglutinações de Cff em genótipos de feijoeiros altamente resistentes podem estar associadas a fatores bioquímicos pós-formados. A produção de fitoalexina no gênero *Phaseolus* como atividade antimicrobiana em resposta a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, até o momento não foram estudadas. Wyman & Vanetten (2002) compararam o acúmulo de fitoalexinas com a multiplicação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas de feijoeiros resistentes e constataram a produção de fitoalexina do tipo faseolina e coumestrol associada a reação de hipersensibilidade a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, que atingiu a fase estacionária, indicando que a resistência havia sido induzida.

Neste sentido, análises ultraestruturais e bioquímicas da interação de genótipos de feijoeiros altamente resistentes associadas às aglutinações de Cff e formação de estrutura rendilhadas, observados em vasos de xilema, poderão ser correlacionadas com a resistência da planta ao ataque da bactéria.

**6.4. Identificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* via PCR utilizando dois pares de iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 e CF4-CF5 e variabilidade genética por rep-PCR**

A Figura 7 ilustra a amplificação de fragmentos específicos de DNA genômico de isolados de *Cff*, provenientes de feijoeiros, e de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros (25 e 26). Os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 originaram a amplificação de um fragmento de DNA de 300 pb, para todos os isolados, já os iniciadores CF4 e CF5, não amplificaram o DNA dos isolados (20 - Feij 2928) e (23 - Feij 2936) de *Cff* e os dois isolados endofíticos de citros (25 - C2932 e 26 - C2933). Os iniciadores CF4 e CF5 deram origem à síntese de um fragmento de DNA genômico de 200 pb para 22 isolados de *Cff*.

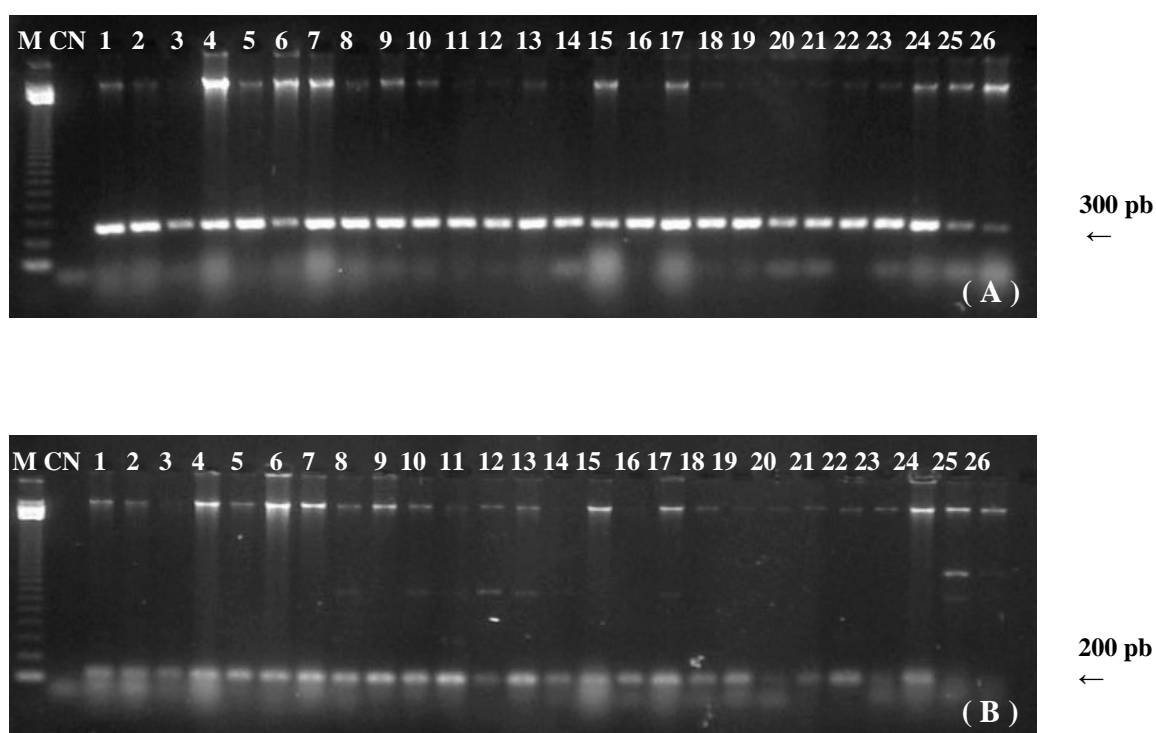


Figura 7. Identificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Curtobacterium flaccumfaciens* endofíticos de citros, com os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 (A) e CF4-CF5 (B).

M: Marcador de peso molecular. CN: Controle Negativo

Número de 1 a 26 correspondentes a isolados descritos na Tabela 1.

Os iniciadores CF4-CF5 desenvolvidos por Guimarães et al. (2001), demonstrou alta especificidade para a identificação de isolado de Cff utilizados pelos autores, porém, neste estudo, dois isolados de Cff de feijoeiro (Feij 2928 e Feij 2936) previamente caracterizado como Cff e dois isolados endofíticos de citros (2932) e (2933), não apresentaram amplificação da banda de DNA correspondente (Figura 7). Tegli et al. (2002) demonstraram a eficiência dos iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 na detecção e na identificação de Cff de sementes de feijoeiro. Os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4, até então específicos para Cff, no presente estudo foram capazes de amplificar banda de DNA de isolados endofíticos de citros (*C. flaccumfaciens*), que aparentemente não pertencem à patovar *flaccumfaciens* (isolados cedidos pelo CENA/SP). Portanto, observa-se que os iniciadores *Cff*FOR2-*Cff*REV4 são mais indicados para identificação de isolados de Cff, porém não são específicos somente para este patovar, como pode ser verificado pela detecção dos isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros. Os iniciadores CF4-CF5 apresentam desvantagem de não amplificarem o DNA de dois isolados de Cff provenientes de feijoeiro.

As comparações dos padrões de amplificação dos fragmentos de DNA genômico, geradas pelos elementos repetitivos amplificados pelos iniciadores REP, ERIC e BOX estão representadas na Figura 8. O estudo da diversidade genética dos 26 isolados bacterianos por meio desta técnica permitiu separá-los em quatro grupos distintos, adotando-se o índice de similaridade de 75%. No grupo 1; foram alocados dez isolados do Estado de São Paulo, dois isolados do Estado de Santa Catarina e um isolado da coleção internacional de Cff e um isolado endofítico de citros; no grupo 2, três isolados do Estado de São Paulo, dois isolados do Estado do Paraná e três isolados de coleção internacional de Cff; no grupo 3, um isolado do Estado de Santa Catarina de Cff e, no grupo 4, dois isolados do Distrito Federal de Cff e um isolado endofítico de citros (Figura 9).

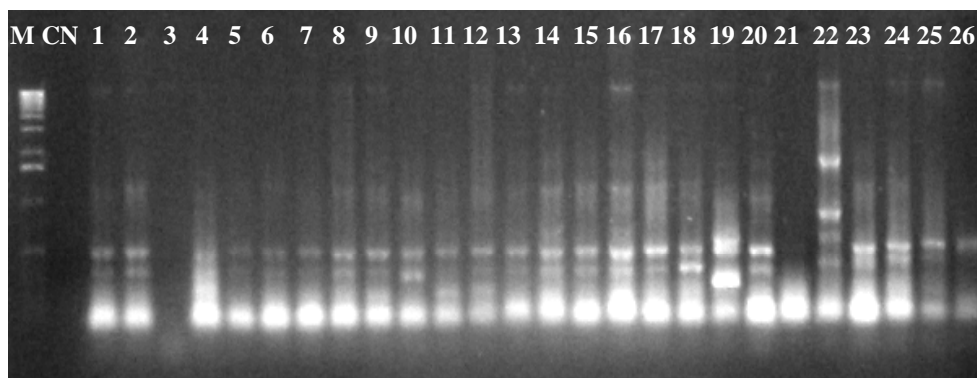
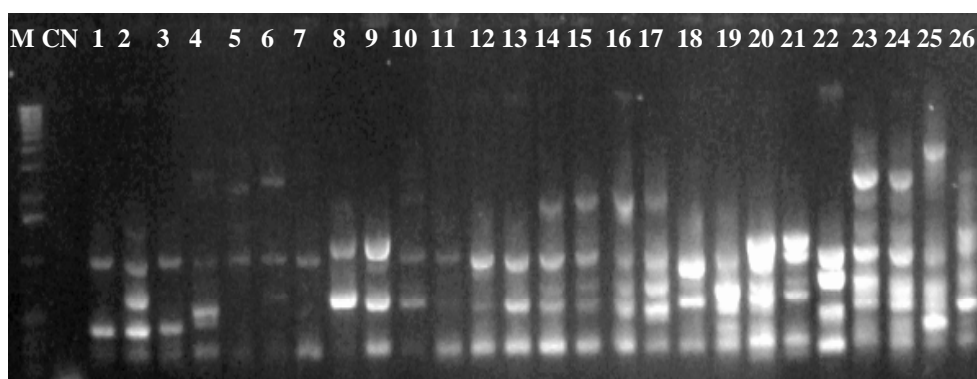
**REP****ERIC****BOX**

Figura 8. Perfil eletroforético de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (1 a 24) e de *Curtobacterium flaccumfaciens* (25 e 26), obtido com os iniciadores REP, ERIC e BOX. M: Marcador de peso molecular, CN: Controle Negativo.

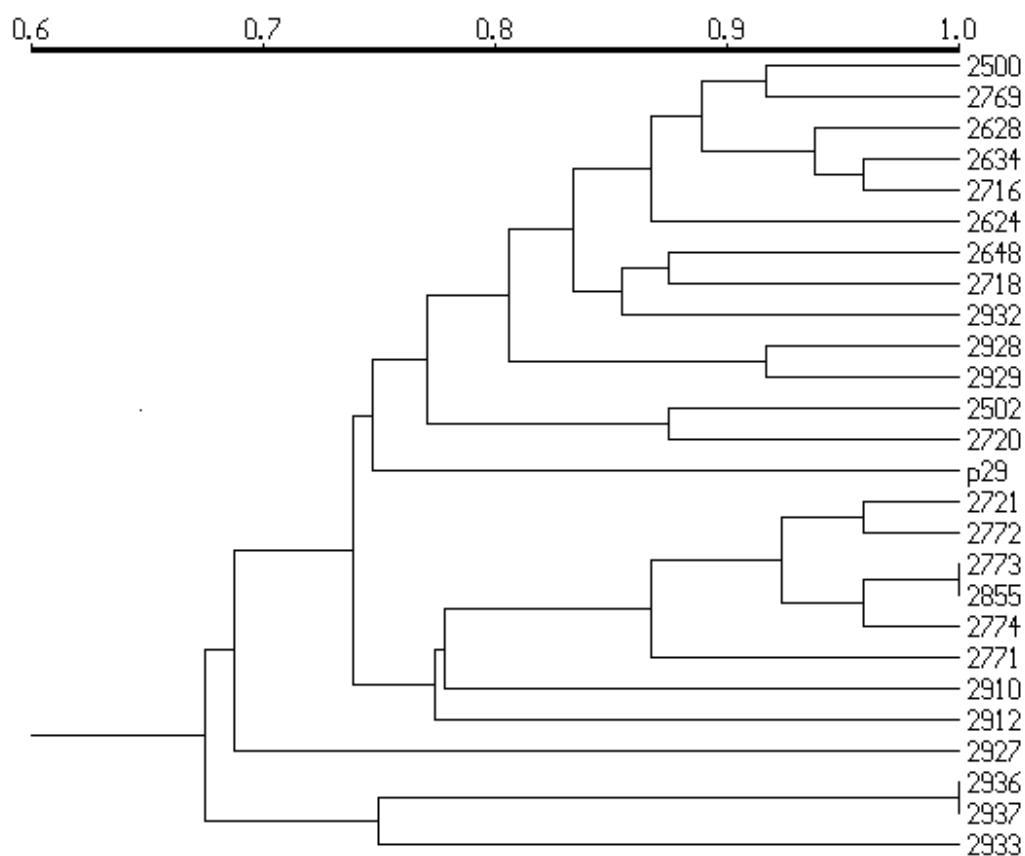


Figura 9. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise de bandas polimórficas geradas por rep-PCR de 24 isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (feijoeiros) e dois isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* (citros).

O estudo da diversidade genética dos 26 isolados (Tabela 1), por meio da técnica rep-PCR, permitiu separar os mesmos em quatro grupos distintos, de acordo com os padrões de bandas gerados pelos iniciadores REP, ERIC e BOX, considerando um índice de similaridade de 75%, pelo método UPGMA (Figura 9). Os isolados endofíticos de citros não formaram um grupamento distinto dos de feijoeiro. Isolados procedentes do mesmo Estado, ou mesma região não se encontram no mesmo ramo do dendograma. Isolados de Cff oriundos do Estado de São Paulo foram geneticamente heterogêneos, alguns se agruparam com isolados dos E.U.A, Santa Catarina e um isolado endofítico de citros, enquanto que outros com isolados de E.U.A, França e Paraná. Dentre os três isolados de Cff, procedentes do Estado de Santa Catarina, Feij 2927 foi o mais divergente dos demais, formando único grupo. O isolado endofítico de citros (2932) foi agrupado com isolados de feijoeiro, enquanto o outro isolado de citros (2933) foi geneticamente mais próximo dos isolados Feij 2936 e Feij 2937, procedentes do Distrito Federal. A formação de quatro grupos distintos, dentro dos quais encontram-se distribuídos os 26 isolados de *C. flaccumfaciens*, a partir do índice de similaridade de 75%, indicou a existência de diversidade genética entre os isolados avaliados (Figura 9).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a análise da distribuição e composição do número de famílias repetitivas, especialmente BOX, a partir da reação de PCR, permitiu grande nível de diferenciação dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A aplicação deste método em bactérias Gram-positivas, especialmente *Curtobacterium*, é limitada pela baixa afinidade de algumas destas unidades repetitivas no DNA de *Curtobacterium*. Isto pode ser observado pelo baixo número de bandas amplificadas, quando utilizados os iniciadores ERIC e REP. A amplificação desta região genômica do DNA via PCR, utilizando-se as unidades repetitivas ERIC e REP, foi efetiva para poucos isolados de *C. flaccumfaciens*. Versalovic et al. (1991), que utilizaram estas sequências repetitivas para várias espécies de bactérias, justificam que a baixa afinidade destes iniciadores para *C. flaccumfaciens*, deve-se a preferência de hibridização dos iniciadores REP e ERIC para bactérias Gram-negativas. Iniciadores ERIC foram utilizados juntamente com os iniciadores REP, na identificação de patovares e isolados dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Lows et al., 1994) e diversidade genética entre isolados de *Burkholderia solanacearum*, raça 3 (Smith et al., 1995) e *Rhizobium meliloti* (De Bruijn, 1992).



Os resultados deste estudo concordaram com aqueles obtidos por Guimarães et al. (2003), os quais verificaram que seqüências BOX encontravam-se presentes no genoma de todos os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Segundo os autores, a amplificação do DNA com os iniciadores (BOX) permitiu a diferenciação de todas as espécies de *Curtobacterium* testadas, como também a separação de duas patovares dentro de *C. flaccumfaciens*; *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, entretanto, não foi possível a separação entre *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *C. flaccumfaciens* pv. *betae*.

Neste sentido, a utilização conjunta dos iniciadores REP, ERIC e BOX, em especial BOX, foi fundamental na avaliação da variabilidade genética dos 26 isolados de *C. flaccumfaciens* aqui conduzidos.

## 7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados auferidos com a realização do presente trabalho, pode-se concluir que:

1) Existe variabilidade genética nas amostras dos 333 genótipos de feijoeiro avaliados, frente ao isolado Feij 2634 de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

2) Os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, procedentes de diferentes regiões brasileiras, apresentaram variabilidade quanto à agressividade em genótipos de feijoeiro.

3) A microscopia eletrônica de varredura em vasos de xilema de feijoeiro altamente resistente, inoculado com isolado de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, revelou possível atuação de mecanismos de resistência física e bioquímica.

4) Para a identificação dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, e isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofíticos de citros, os iniciadores CffFOR2-CffREV4 foram altamente específicos em reação de PCR para os 26 isolados, enquanto que os iniciadores CF4-CF5 não detectaram dois isolados de *C. flaccumfaciens* pv.

*flaccumfaciens*, proporcionando resultados falso-negativos. Os isolados endofíticos de citros não foram amplificados por CF4-CF5.

5) A partir da Reação de Polimerase em Cadeia (rep-PCR), detectou-se variabilidade genética entre os 24 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e dois isolados de *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros. Os iniciadores ERIC e BOX permitiram níveis satisfatórios de diferenciação dos isolados, no entanto, os iniciadores REP foram efetivos para poucos isolados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELMONTE, U. C. F. et al. Análise da variabilidade de linhagens endofíticas e patogenicias de *Curtobacterium flaccumfaciens*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 10., 2002, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba, 2002, v. 1, p. 7.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Ferry Lane: C A B. International Mycological Institute, Dordrecht, 1986, p. 332.

BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. Nutritional values of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A.H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p. 135-155.

BRINGEL, J. M. M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 de batata e berinjela**. 2002. 103f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

CHAVARRO, C. A.; LOPEZ, G. C. A.; LENNE, J. M. Características y pathogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. Agente causal del marchitamiento bacteriano de Zornia spp. Y su efecto en el rendimiento de Z. Glaba CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. **Acta Agronomica**, Palmira, v. 35, n.10, p.64-79, 1985.

CIAT – Common bean improvement. Cali. Disponível em <http://www.ciat.cgiar.org/beans/index.htm>. Acesso em: 16.maio 2003.

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

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**, Alexandria, v.87, n. 46, p. 279-285, 1965.

COYNE, D. B.; 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**, Alexandria, v. 88, n. 36, p.393-399, 1966.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L A new large-seeded Great Northern dry bean variety tolerant to bacterial wilt disease. **Univ. Nebr.Agric.Exp.Stn.Bull**, London, v. 516, n.11, p.10-11, 1971.

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

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. “Great Northern Star” dry bean tolerant to bacterial disease. **Hortsciense**, Alexandria, v. 11, n.13, p. 621, 1976.

De BRUJIN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences an the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilot* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental of Microbiology**, Washington, v. 58, n. 3, p.2180-2187, 1992.

DIATLOFF, A.; WONG, W. C.; WOOD, B. A. Non-destructive methods of detecting *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in mugbean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, n.47, p.269-273, 1993.

DINESEN, I. G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plant. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4, 1978, Washington. **Proceedings**.. Washington: INRA, 1978. p. 929-933.

GAGLIARDI, P. R. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GAMA, M. I. C. S. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. M. C.; CARNEIRO, V. T. C. C (ED.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA CENARGEM, 1998. p.179-189.

GILSON, E.; CLEMENTE, J. M.; BRUTLAG, D. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in E. Coli. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 34, p.1417-1421, 1984.

GNANAMANICKAM, S. S.; PALTI, S. S. Accumulation of antibacterial isoflavonoids in hypersensitively responding bean leaf tissues inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 10, n.25, p.159-168, 1977.

GUIMARÃES, P. M. et al. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 80, p.1-10, 2001.

GUIMARÃES, P. M. et al. Characterisation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p.817-825, 2003.

GUZZO, S. D.; MORAES, W. B. C. Purificação e caracterização parcial de um elicitor de fitoalexina em soja, a partir de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p.396-402, 1997.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plant. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 8, p.387-412, 1996.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1991. p.31.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, Washington, D. C., v. 55, n.1, p.433-433, 1922.

HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges). including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 16, n. 3, p.1-22, 1926.

HIGGINS, C. F. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, London, v. 298, n. 7, p.760-763, 1982.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, n.4, p.825-834, 1991.

KAMON, S.; KADO, C. I. Phenotypic switching affecting chemotaxis. xanthan production. and virulence in *Xanthomona campestris*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 12, n.56, p.3855-3860, 1990.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae*. BOX elements diverse in diverse bacterias. **Genome**, Ottawa, v. 5, n.6, p.408-418, 1995.

LEITE, R. P.; BEHLAU, F. Caracterização da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Paraná. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 5., 2001, Londrina. **Anais...** , Londrina: Editora IAPAR, 2001. p.50-54.

LEITE, R. P.; BEHLAU, F. Reação de genótipos de feijoeiro à murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, p. 63. 2002. (Suplemento).

LI, XI.; DE BÔER, S. H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 5, p.837-842, 1995.

LOPES, S. *Xanthomonas albilineans* detection. identification and infectivity tritiation in sugarcane. 1994, 90f. (PhD Dissertation) - Louisiana State University Louisiana, 1996.

LOWS, F. J. et. al. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences an PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 10, p.2286-2295, 1994.



LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short. interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington,, v. 174, n.14, p. 4525-4529, 1992.

LYON, F. M.; WOOD, R. K. S. Production of phaseollin, coumestrol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* spp. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 6, n.9, p.117-124, 1975.

MARINGONI, A. C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e consequências epidemiológicas.** 1993, 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

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

MARINGONI, A. C. **Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*curtobacterium*.** 2000. 73 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, n. 2, p.157-162, 2002.

MARIOT, E. J. **Ecofisiologia do feijoeiro:** O feijoeiro no Paraná. Londrina: Editora Instituto Agrônômico do Paraná, 1989, p. 25- 29.

MARTIN, B. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 20, n.13, p.3479-3483, 1992.

- 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**, Guelph, v. 22, n.5, p.17-22, 2000.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, Washington, v. 2, n.10, p.56-65, 1990.
- OPGENORTH, D. C.; SMARTH, C. D.; LOWS, F. J. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n.12, p.868-873, 1996.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 424-434.
- PAXTON, J. D. Phytoalexins: a working redefinition. **Phytopathologische Zeitschrift**, Hamburg, v. 101, n. 12, p.106-109, 1981.
- POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v. 31, n.7, p.377-381, 1996.
- QUIRK, J. T.; MILLER, R. B. Vestured pits in the tribe Cassieae Bronn (Leguminosae). **IAWA Bulletin**, Leiden, v. 6, n. 3, p.200-212, 1985.
- RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE, M. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivar infected with *Ralstonia solanacearum*. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 147, n.4, p.129-140, 1999.

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 5., 2001, Londrina, **Anais:** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2001. p.55-56.

RAVA, C. A. et. al. Procura de fontes de resistência à murcha-de-curtobacterium em coletas de feijoeiro-comum. In CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa, MG. **Resumo e expandido**, Viçosa, 2002. p.128-129.

RAVA, C. A. et al. Fontes de resistência à antracnose, crestamento-bacteriano-comum e murcha-de-curtobacterium em coletas de feijoeiro-comum. **Revista Ceres**, Santo Antonio de Goiás, v. 50, n. 292, p.797-802, 2003.

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 4., 2003, Lages, **Resumos e Expandidos**, Lages: Graphel, 2003 p. 246-247.

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

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

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

SANZ, M. P. Bacterial induction of the accumulation of phaseollin, pisatin and rishitin and their antibacterial activity. **Netherland Journal Plant Pathology**, Wageningen, v. 87, n.4, p.119-129, 1981.

SCHENEIDER, M.; De BRUJIN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of *rhizobia* and computer-assisted phylogenetic patten analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Washington, v. 12, n.5, p.163-174, 1996.

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

SCHUSTER, M. L.; CHRISTIANSEN, D. W. An orange colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt. **Phytopathology**, St. Paul, v. 47, n.4, p.51-53, 1957.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n.8, p.1964-1966, 1967.

SMITH, R. F. et al. Search Launcher-an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. **Genome Research**, Ottawa, v. 6, n. 5, p. 454-462, 1995.

SOUZA, V. L. et. al. Detecção de resistência à murcha-de-curtobacterium em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, p. 90, 2004 (Resumo).

STEM, M. J. et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Washington, v. 37, n.3, p.1015-1026, 1984.

STHOLATURA, P. et al. Effect of bacterial inoculation of bean and pea leaves and pisatin. **Physiological Plant Pathology**, St. Paul, v. 1, n.13, p.177-183, 1971.

TEGLI, S.; SEREN I, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **The Society for Applied Microbiology**, Italy, v. 35, n.9, p. 331-337, 2002.

TRUJILO, G. BORGES, O.; CENTENO, F. Análisis ultraestructural de la interacción de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* con genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles de *Phaseolus vulgaris* L. **Interciência**, Colômbia, v. 26, n. 11, p.554-557, 2001.

UESUGI, C. et al. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro na região geoeconômica do Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, p.571, 2002, Suplemento.

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

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPISKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 19, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J. et. al. Genomic fingerprinting of bactéria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Celular Biology**, Washington, v. 5, p.25-40, 1994.

VIERA, J. L. T. M. Produção e comercialização no Brasil. In: Zimmermann, M.J., Richa, M., Yamada, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, Associação para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p.21-36, 1988.

WEINGART, H.; VOLKSCH, B. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC. REP. IS50-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.145, n. 6, p.339-345, 1997.

WYMAN, J. G.; VANETTEN, H. D. Isoflavonoid phytoalexins and nonhypersensitive resistance of beans to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n.4, p. 1419-1424, 2002.