

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 15/06/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

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

RICARDO MARCELO GONÇALVES

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

BOTUCATU-SP
Dezembro, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

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

RICARDO MARCELO GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

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

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

BOTUCATU-SP
Dezembro, 2015

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

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

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015

Orientador: Antonio Carlos Maringoni

Coorientador: Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior

Inclui bibliografia

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

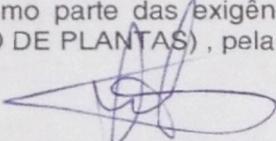
TÍTULO: *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens*: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA

AUTOR: RICARDO MARCELO GONÇALVES

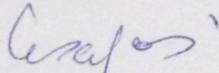
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI

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

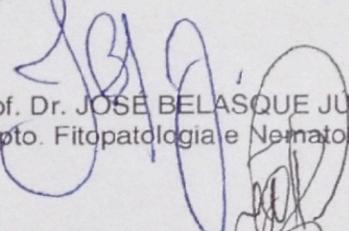
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI

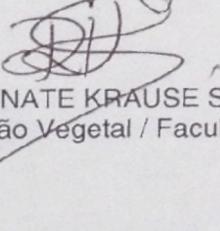
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu


Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

Depo. Fitopatologia e Nematologia - ESALQ USP


Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM

Instituto Biológico de Campinas


Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Data da realização: 15 de dezembro de 2015.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao assistente operacional Paulo Roberto Rodrigues pela ajuda e convivência;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

1. RESUMO

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

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

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

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

Author: RICARDO MARCELO GONÇALVES

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

Co-adviser: TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

2. SUMMARY

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

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

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

3. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÕES

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

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