

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

TRANSMISSÃO PLANTA - SEMENTE DE *Curtobacterium flaccumfaciens*

PV. *flaccumfaciens* EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO

RENATA DE CÁSSIA CAMARA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Outubro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**TRANSMISSÃO PLANTA - SEMENTE DE *Curtobacterium flaccumfaciens*
PV. *flaccumfaciens* EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO**

RENATA DE CÁSSIA CAMARA

BIÓLOGA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Outubro – 2008

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

C172t Camara, Renata de Cássia, 1978-
Transmissão planta-semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *flaccumfaciens* em cultivares de feijoeiro / Renata de Cássia Camara. - Botucatu : [s.n.], 2008. v, 41 f. : il. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Inclui bibliografia.

1. Feijão comum. 2. Murcha-de-curtobacterium. 3. Feijão comum - Resistência a doenças e pragas. 4. Fitopatologia. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

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

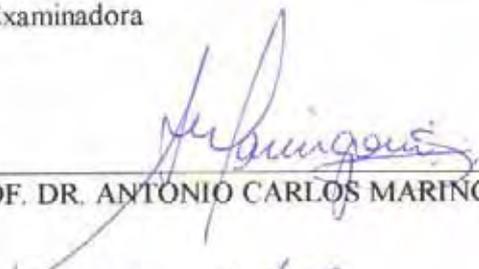
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "TRANSMISSÃO PLANTA-SEMENTE DE *Curtobacterium flaccumfaciens* PV.
flaccumfaciens EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO.

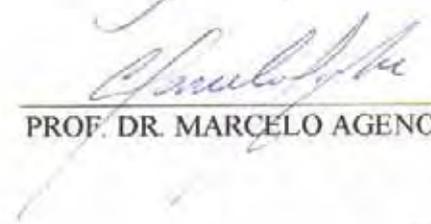
ALUNA: RENATA DE CÁSSIA CAMARA

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

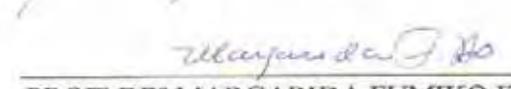
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF.ª DR.ª MARGARIDA FUMIKO ITO

Data da Realização: 17 de outubro de 2008.

A Deus, por ter iluminado meu caminho e ajudado a vencer os obstáculos, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos pais João e Maria, pelo carinho, incentivo e imprescindível ajuda.

Ao meu esposo Luciano, pela compreensão e aos amores da minha vida, meus filhos, João Vittor e Anna Lawra.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela orientação, ensinamentos, amizade e compreensão;

Aos funcionários do Setor Defesa Fitossanitária: Norberto Vaz de Carvalho, Paulo Roberto Rodrigues, Maria Aparecida (Dinha), pelo apoio e amizade;

Aos professores do Departamento de Produção Vegetal da FCA – UNESP, pelos ensinamentos e colaboração;

À Profa. Dra. Renate Krause-Sakate pela ajuda e ensinamentos que ajudaram a concretizar este trabalho;

Aos alunos do laboratório de Virologia Vegetal: Ana Carolina, Kelly, Júlio, Mônica e Tatiane que foram receptivos comigo na realização dos ensaios de biologia molecular;

A aluna de pós graduação Andréia Higuti pela amizade e companherismo;

A todos os colegas do programa de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, em especial aos amigos Tadeu A. F. da Silva Jr., pela amizade e ajuda na condução do experimento e à ex - aluna de doutorado Sandra Cristina Vigo-Schultz, a quem serei eternamente grata, pela compreensão, apoio, ajuda e grande amizade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico– CNPq, pela concessão de bolsa de estudos;

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	V
1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 MURCHA DE CURTOBACTERIUM	5
3.2 BACTÉRIAS EM SEMENTES	10
CAPÍTULO I	14
TRANSMISSÃO DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> PV. <i>flaccumfaciens</i> EM SEMENTES DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO	15
4. CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sintomas da murcha-de-curtobacterium nas cultivares de feijoeiro Pérola (A), IAC Carioca (B), IAC Carioca Aruã (C), IAC Carioca Akytã (D), IAC Carioca Tybatã (E) e IAC Carioca Pyatã (F),terceiro ensaio	31
2. Sementes de feijoeiro da cultivar IAC Carioca (A) e IAC Carioca Tybatã (B) provenientes de plantas inoculadas com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	31
3. Produtos de PCR (300 pb) de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> obtidos com os iniciadores CffFOR2-CffREV4. Números de 1 a 49 - isolados obtidos de sementes; 50 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>); CP - controle positivo; CN - controle negativo; M - marcador molecular	32

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Transmissão planta – semente de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em cultivares de feijoeiro inoculados. Primeiro ensaio, 2004	28
2. Transmissão planta – semente de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em cultivares de feijoeiro inoculados. Segundo ensaio, 2005	29
3. Transmissão planta – semente de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em cultivares de feijoeiro inoculados. Terceiro ensaio, 2006	30

1. RESUMO

A murcha-de-curtobacterium é uma doença que acarreta sérios prejuízos na produção do feijoeiro no País e seu agente causal, a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é transmitido por sementes. São indicados o uso de sementes livres do patógeno, rotação de culturas e cultivares resistentes para o manejo da doença em campo. Foi realizada a avaliação da transmissão de Cff via sementes de feijão, em três ensaios, em seis cultivares de feijoeiro (IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã e Pérola). Essas cultivares foram inoculadas com um isolado de Cff via punção no caule e os sintomas da doença foram avaliados com uma escala de notas. A análise da transmissão da bactéria pelas sementes foi realizada nos três ensaios, em 500 sementes das cultivares IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã e para a cultivar Pérola, foram analisadas 46, 155 e 87 sementes respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ensaios. As sementes foram maceradas individualmente em água destilada e esterilizada, incubadas por 24 horas e a suspensão obtida foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura semi-seletivo para Cff e incubadas à temperatura de 28 a 30 °C, durante 96 a 120 horas. As colônias com características típicas de Cff, comparadas com um isolado puro padrão, foram purificadas em meio NSA + NaCl 7%, realizados testes de coloração diferencial de Gram, KOH e patogenicidade. Os isolados do

primeiro e segundo ensaios foram caracterizados por Microlog2TM e os do terceiro, via PCR. Os resultados mostraram que as cultivares de feijoeiro IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã apresentaram baixos índices de severidade da doença, indicando resistência à murcha-de-curtobacterium, já as cultivares Pérola e IAC Carioca foram suscetíveis, em todos os ensaios, com altos níveis de severidade. Com relação à transmissão de Cff das plantas para as sementes, as cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã não apresentaram transmissão da bactéria, enquanto que a cultivar IAC Carioca Aruã, apresentou a transmissão na ordem de 5,5 a 14,8% e as cultivares IAC Carioca e Pérola apresentaram uma alta porcentagem de transmissão; a cultivar IAC Carioca, entre 10,4 a 70% e a Pérola, entre 32,61 a 74,2 %.

Palavras-chave adicionais: murcha-de-curtobacterium, resistência, *Phaseolus vulgaris*

PLANT - SEED TRANSMISSION OF *Curtobacterium flaccumfaciens* PV. *Flaccumfaciens* ON BEAN CULTIVARS. Botucatu, 2008. 41p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Author: Renata de Cássia Camara

Adviser: Dr. Antonio Carlos Maringoni

2. SUMMARY

Bean bacterial wilt is a disease that cause serious losses to the Brazilian dry beans production and its causal agent, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), is seed-transmitted. The use of pathogen-free seeds, culture rotation and resistant cultivars are recommended for disease handling on the field. The evaluation of Cff transmission by seeds was carried out by conducting three assays in six common beans cultivars (IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã and Pérola). These cultivars were inoculated with a Cff isolate via a puncture on the stem and the disease symptoms were evaluated with severity index. The analysis of bacterial seed transmission was carried out in all of the three assays in 500 seeds of cultivars IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã. For cultivar Pérola, 46; 155 and 87 seeds were analyzed respectively on the first, second and third assays. Seeds were individually macerated in distilled and sterilized water for 24 hours and the suspension thus obtained was sown on Petri dishes with a Cff semi-selective medium and incubated at 28 - 30 °C from 96 to 120 h. Colonies with typical Cff characteristics as compared with a standard pure isolate were purified in a NSA + NaCl 7% medium, Gram, KOH and pathogenicity tests being carried out. The isolates from the first and second assays were characterized by Microlog2TM and those of the third one by PCR. Results showed that common beans cultivars IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã presented

low levels of disease severity indicating resistance to wilting while in all assays and cultivars Pérola and IAC Carioca were shown susceptible and with high severity levels. Regarding Cff plant-to-seed transmission, cultivars IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã did not show any bacterial transmission while cultivar IAC Carioca Aruã presented transmission levels ranging from 5.5 to 14.8% while cultivars IAC Carioca and Pérola showed high transmission percentages: IAC Carioca from 10.4 to 70%, and Pérola from 32.61 to 74.2 %.

Additional key words: wilt, resistance, *Phaseolus vulgaris*

3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro

O feijoeiro é cultivado em todo território nacional e é considerado uma das principais fontes protéicas empregadas na alimentação da população brasileira. O Brasil é o segundo maior produtor e consumidor mundial de feijão, cuja produção é de 3,5 milhões de toneladas, numa área cultivada de 4,22 milhões de hectares, com um consumo médio de 16,3 Kg/ habitante/ ano (AGRIANUAL, 2007).

Sobre a produção internacional de feijão, são cultivados anualmente, em média, 27 milhões de hectares e colhidos, aproximadamente, 20 milhões de toneladas, em mais de 100 países. Desse total, 60% da produção mundial se concentram em seis países: Brasil, Índia, China, Myanmar, México e Estados Unidos (FAOSTAT, 2006).

No Brasil, o cultivo de feijoeiro é feito em três safras distintas, a primeira (safra das “águas”), com semeadura nos meses de agosto a novembro e colheita de novembro a fevereiro, a segunda (safra da seca ou safrinha), com semeadura de dezembro a março e colheita de março a junho, a terceira (safra de inverno ou irrigada), com semeadura de abril a julho e colheita de julho a outubro (WANDER , 2007).

A cultura do feijoeiro está sujeita à incidência de vários tipos de patógenos que causam doenças e acarretam perdas significativas na produção. Essas doenças podem ser de origem virótica, fúngica, bacteriana, assim como as incitadas por nematóides (SARTORATO, 2006).

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*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

A doença bacteriana denominada murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, inicialmente descrita por Hedges (1922), em Dakota do Sul, nos E.U.A é causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones (1983) (Cff). A bactéria coloniza vascularmente as plantas, sobrevive, é disseminada e transmitida por sementes oriundas de plantas doentes (SAETTLER, 1991).

No Brasil, essa doença foi constatada em 1995, na safra das águas, no Estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1997) e atualmente, pode ser encontrada no Paraná, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal (LEITE Jr. et al., 2002; UESUGI et al., 2003; THEODORO & MARINGONI, 2006).

Na Austrália, Wood & Easdown (1990) constataram a presença de Cff em *Vigna radiata* e caupi e verificaram que isolados bacterianos procedentes dessas plantas foram patogênicos ao feijoeiro e à soja.

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

Conforme Harverson et al. (2005), nos anos de 2003 e 2004 foram constatadas infecções de Cff em alguns campos destinados à produção de sementes em Nebraska, E.U.A., onde epidemias da murcha-de-curtobacterium não tinham sido observadas há mais de 30 - 40 anos. No Canadá, havia a descrição da ocorrência de Cff em feijoeiro desde 1947, entretanto, essa bactéria não tinha sido constatada na região sudoeste de Ontário e esta só foi observada em 2002 (HSIEH et al., 2002). No ano de 2001, González et al. (2005)

descreveram surtos epidêmicos da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro cultivar Donna, na região Sudoeste da Espanha, sendo até então considerada doença causada por patógeno quarentenário.

Os sintomas típicos da doença em feijoeiro são principalmente murcha, escurecimento vascular e morte da parte aérea (HEDGES, 1926). Sob condições de campo, em épocas de temperaturas amenas, plantas de feijoeiro desenvolveram e não expressaram sintomas de doenças bacterianas. Esse fato foi observado por Thomas & Graham (1952), que isolaram *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e Cff de caules de plantas de feijoeiro sem sintomas externos. Os sintomas de murcha na parte aérea, é devido a falha no transporte de seiva provocada pela degradação das paredes dos vasos de xilema (DINENSEN, 1978).

Outras plantas, além do feijoeiro, têm sido relacionadas como hospedeira da Cff: ervilha, soja, *Phaseolus lunatus*, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, *Dolichos lablab*, *Phaseolus radiatus*, *P. lathyroides*, *P. calcaratus* e *P. acutifolius* (HEDGES, 1926; SCHUSTER & SAYRE, 1967).

Em 1975, em Iowa, E.U.A., Dunleavy (1983) relatou, em folhas de soja, a presença de manchas necróticas que se destacavam e que davam a aparência esburacada. Plantas de soja doentes não exibiam sintomas de murcha. Essa doença foi denominada por este autor de "tan spot". Inoculações em feijoeiro e soja com isolados de Cff provenientes dessas plantas manifestaram sintomas de mancha e de murcha em feijoeiro, independente da origem dos isolados, e sintomas de mancha foliar em plantas de soja, inoculadas com isolados bacterianos congêneros.

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

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 com mancha alaranjada e que, submetidas a isolamento, deram origem a isolados patogênicos de Cff que apresentavam

colônias de coloração alaranjada. A esses isolados denominaram *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*.

Schuster & Sayre (1967) verificaram a presença de mancha púrpura em sementes de feijoeiro cultivar U.I. 59. Dessas sementes, obtiveram isolados bacterianos patogênicos que produziram colônias amarelas e induziram hipertrofia em folhas e murcha em feijoeiros inoculados. A esses isolados denominaram *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum* (SCHUSTER & SAYRE, 1967). Schuster et al. (1968) constataram que os isolados da variedade *violaceum* produziam pigmento extracelular de coloração azul a púrpura em meio de cultura, com excelente produção em pH neutro e colônias incubadas a 20°C.

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

Em sementes, Cff fica alojada nas células paliçádicas que formam a testa (CHAVARRO et al. 1985). Schuster & Smith (1983) comentam que a Cff entra no sistema vascular das sementes em desenvolvimento, através do hilo, e forma uma massa de células bacterianas no tegumento. A infecção da plântula, durante a germinação, pode ocorrer por ferimentos da radícula provocados pelo atrito com a casca. Embriões de sementes infectadas possuem células bacterianas ao seu redor que podem promover a infecção do epicótilo e hipocótilo.

A disseminação da bactéria por água de irrigação foi demonstrada sob condições experimentais de casa - de - vegetação em feijoeiro, porém, em campo, esse resultado foi negativo. Em soja, cujo patógeno causa lesões em folhas, foi comprovada

experimentalmente a disseminação secundária da bactéria em campo (DUNLEAVY, 1985). Ferimentos radiculares provocados por nematóides (*Meloidogyne incognita*) favoreceram a penetração de Cff sob condições de campo (SCHUSTER, 1959), porém sob condições controladas, não foram constatadas interações entre a presença de *Meloidogyne incognita* (raça 2) e a infecção das cultivares de feijoeiro Iapar 16 e Pérola (SALGADO et al., 2007)

O controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro está fundamentado no uso de sementes saudáveis, rotação de culturas e cultivares resistentes (HALL, 1991).

O emprego de sementes saudáveis, visto que este patógeno sobrevive e é transmitido por sementes (SAETTLER & PERRY, 1972), tem sido adotado na maioria dos países do mundo, através da sua certificação sanitária. Esta medida foi tão eficaz que durante vinte anos a murcha-de-curtobacterium não tinha sido constatada em áreas de produção de Dakota do Norte, em Minnessota, E.U.A., que apenas em 1994 Cff foi isolado de sementes utilizadas por um agricultor daquela região (VENETTE et al., 1995).

Os programas de melhoramento genético no Brasil têm dado ênfase na obtenção de linhagens mais resistentes às doenças causadas por vírus, fungos e bactérias. Uma das medidas mais eficientes e econômicas para o controle da murcha-de-curtobacterium é o uso de genótipos resistentes ou tolerantes (RAVA & COSTA, 2001). De acordo com Vieira et al. (2005), são vários os genes envolvidos na resistência e os alelos de resistência são dominantes.

Estudos pioneiros desenvolvidos por Coyne et al. (1963), para verificar a reação de 1067 introduções de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, evidenciaram que o PI 165.078 de *P. vulgaris* e a variedade G.N. Nebraska # 1 apresentaram níveis satisfatórios de resistência a essa doença.

Na literatura internacional há indicação da resistência em algumas cultivares e linhagens de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium. Entre elas destacam-se: G.N. Emerson (COYNE & SCHUSTER, 1974), G-12/965, G-16/965 e G-10/968 (PHANG et al., 1974), G.N. 123, Pearlgreen, Snocrop, Maxidor, Romulus (NIKITINA et al., 1980) e Rositsa (KARKMKOVA & BOYADZHIEV, 1984). Chavarro et al. (1985), na Colômbia, inoculando os genótipos de feijoeiro PI 136677, PI 204600 e Porrillo Sintetico com a mistura de três isolados de Cff provenientes de *Z. glabra*, sob condições de campo, constataram que o Porrillo

Sintético apresentou maior nível de resistência à murcha-de-curtobacterium quando comparado com os genótipos PI 136677 e PI 204600. Hsieh et al. (2005) analisaram a resistência de 124 acessos de feijoeiro comum, através de inoculação no hilo e imersão das sementes em solução bacteriana de isolados com colorações variantes amarelo e laranja por uma hora. Como resultado observaram que a linhagem L02E317, a cultivar Resolute e as linhagens Pinto L02B662 e 9995-2^a foram altamente resistentes a ambos os variantes do patógeno, com índices de severidade da doença 0 em uma escala de notas de 0 – 5.

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

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

A avaliação da reação de 333 genótipos do banco de germoplasma de feijoeiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), à murcha-de-curtobacterium realizada por Souza et al. (2006), resultaram que cerca de 18% dos genótipos de feijoeiros mostraram-se altamente resistentes a moderadamente resistentes, que poderão ser úteis para o programa de melhoramento genético como fonte de genes para resistência a Cff.

3.2 Bacterias em sementes

Sementes infectadas ou contaminadas podem levar patógenos de uma região à outra, ou ainda introduzir uma raça de patógeno que venha a provocar danos consideráveis à cultura (ITO et al., 2003).

O principal meio de sobrevivência, disseminação e introdução de bactérias fitopatogênicas, em novas áreas de cultivo é através de sementes de plantas doentes. Para Cff as sementes são consideradas como principal veículo de transporte do patógeno, pois, se tratando de um patógeno de colonização vascular, não é disseminado através de águas de chuvas ou irrigação (SCHUSTER & CHRISTIANSEN, 1957).

Sementes de feijoeiro, infectadas por Cff, apresentam alteração em sua coloração e a colonização da bactéria, ocorre através do hilo, formando uma massa amarela ou laranja por todo tegumento (SCHUSTER & SMITH, 1983).

A coloração da casca da semente infectada pela bactéria indica uma maior ou menor concentração do patógeno, conforme mostrou Hsieh et al. (2006), que ao analisarem a germinação, a emergência de plântulas e a incidência de plantas com sintomas de murcha-de-curtobacterium, observaram que as sementes com coloração mais acentuada no tegumento, apresentavam maior concentração de bactéria, resultando em maior incidência de plantas doentes e conseqüentemente, um menor crescimento de plântulas.

A sobrevivência de bactérias, fungos e nematóides em sementes por diferentes períodos e sob diferentes condições tem sido objeto de estudos, Cff sobreviveu por 25 anos em sementes infetadas e armazenadas a temperatura ambiente (BURKHOLDER, 1945).

Marques et al. (2005) analisaram sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em um lote de sementes de feijão cv. Roxão, submetido a três condições de temperatura, durante 60 meses de armazenamento a -18 e 5 °C e à temperatura ambiente (20 - 30 °C). Observaram que, a partir de 30 meses sementes mantidas a -18 e 5 °C, apresentaram níveis de infecção de 58 e 72%, enquanto as que foram conservadas à temperatura ambiente apresentaram 20% de infecção, e aos 60 meses taxas de 46 e 8%, respectivamente. A temperatura mais propícia à sobrevivência da bactéria foi 5°C, onde encontraram uma população máxima de $1,2 \times 10^8$ UFC/semente. Ao longo de todo período de armazenamento das sementes, ficou constatado o poder infectivo da bactéria, concluindo que as condições ótimas para a conservação de sementes são as mesmas para a manutenção da longevidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Existem várias técnicas para detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, algumas são onerosas e exigem equipamentos sofisticados e/ou

pessoal especificamente treinado, como é o caso de imunofluorescência ou sondas de DNA (SCHAAD, 1987; KLEMENT et al., 1990).

Meios de cultura semi-seletivos permitem determinar a porcentagem de sementes infectadas, quantificar populações bacterianas em sementes, bem como isolar bactérias em solos e em restos culturais. Possuem vantagens de serem de fácil execução e de rápida obtenção de resultados (KLEMENT *et al.*, 1990). Tebaldi et al. (2007) utilizaram três meios de cultura semi-seletivos: SX ágar, NSCAA e BSCAA para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de brócolis e verificaram que os meios de cultura semi-seletivos NSCAA (3,33%) e SX ágar (3,33%) foram mais eficientes para a detecção de Xcc em sementes de brócolis, quando comparado ao meio BSCAA (0,33%) e recomendou o meio NSCAA, pois foi o que possibilitou melhor recuperação do patógeno, maior facilidade de visualização e identificação das colônias bacterianas formadas. Maringoni & Câmara (2006), utilizaram meio semi-seletivo (MSCFF) para detectarem Cff em trinta amostras de sementes de feijoeiro naturalmente infectadas e verificaram a eficiência do método empregado identificarem a presença de Cff em cinquenta por cento das amostras de sementes analisadas.

Atualmente técnicas moleculares como a de PCR vem sendo muito utilizada na diagnose e identificação de bactérias em sementes. Tegli et al. (2002), demonstraram a eficiência dos iniciadores CffFOR2-CffREV4 na detecção de Cff em sementes de feijoeiro.

Entre os métodos de tratamento de sementes descritos na literatura, de acordo com Azevedo et al. (1991), a termoterapia é uma das mais citadas para erradicação de fitobactérias localizadas interna ou externamente nas sementes. Mas muitas vezes pode causar danos à qualidade fisiológica das sementes como, retardamento ou redução da germinação e do vigor (MENTEN, 1995). A eficiência desse tratamento depende, em grande parte, do tipo e localização do patógeno alvo, do vigor da semente e da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas (MENTEN, 1995).

Azevedo et al. (1991) relatam controle de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.), por meio de calor seco, em estufa de circulação forçada de ar. Constataram que a combinação temperatura x tempo de exposição mais eficiente para erradicação da bactéria nas sementes foi de 80°C, por 96 horas, que

resultou, no entanto, em morte das sementes. Por outro lado, temperatura de 70°C, por 96 horas, não interferiu na germinação e apresentou eficiência de 99,99%.

O método de termoterapia por meio de calor seco foi utilizado por Silva et al. (2002) para verificar a eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e os efeitos na qualidade fisiológica e estrutura das sementes de tomate, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foram realizados dois ensaios, com tratamento térmico das sementes inoculadas em estufa, com circulação forçada com temperatura de $70 \pm 2^\circ\text{C}$, por 96 horas, que revelaram eficiência de 100 e 99,96% na erradicação da bactéria no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. O tratamento térmico não causou nenhum efeito na germinação, mas através da microscopia eletrônica de varredura foram observadas alterações na estrutura superficial das sementes, com remoção, quebra e fusão de tricomas, além de danos à integridade das células bacterianas associadas à superfície do tegumento.

Estefani et al. (2007) avaliaram o efeito da termoterapia e quimioterapia, na erradicação de Cff em sementes de feijoeiro cv. Pérola. Os resultados mostraram a redução de 90% da quantidade de células bacterianas nas sementes inoculadas, submetidas ao tratamento térmico de calor a seco, a 60°C, por 2 horas. Já no controle químico, embebição de sementes em solução aquosa contendo 0.3g de oxitetraciclina + 1.5g de sulfato de cobre por litro, durante 2 horas, não foi efetivo na erradicação de Cff das sementes inoculadas (10^8 UFC/mL), mas eliminou a bactéria de sementes naturalmente infectadas.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a severidade da murcha - de-curtobacterium em seis cultivares de feijoeiro (IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã e Pérola), sob condições de casa - de - vegetação e verificar a transmissão de Cff nas sementes produzidas por essas cultivares. A dissertação redigida em um capítulo, intitulado “Transmissão de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de cultivares de feijoeiro”, conforme as normas do periódico Summa Phytopathologica.

CAPÍTULO I

**TRANSMISSÃO PLANTA - SEMENTE DE *Curtobacterium flaccumfaciens*
PV. *flacummfaciens* EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO**

Transmissão planta – semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em
sementes de cultivares de feijoeiro

Renata de Cássia Camara¹, Antonio Carlos Maringoni¹ & Sandra Cristina Vigo²

¹Departamento de Produção Vegetal FCA/UNESP, Cx. Postal 237, 18603-970 Botucatu, SP,.

Autor para correspondência: Renata de Cássia Camara < camaracrenata@yahoo.com.br >

¹Bolsista CNPq

Data da chegada:

Aceito para publicação em:

RESUMO

Camara, R.C.; Maringoni, A.C.; Vigo, S.C. Transmissão planta – semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de cultivares de feijoeiro. *Summa Phytopathologica*.

A murcha-de-curtobacterium é uma doença que acarreta sérios prejuízos na produção do feijoeiro no País e seu agente causal, a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é transmitida por sementes. São indicados o uso de sementes livres do patógeno, rotação de culturas e cultivares resistentes para o manejo da doença em campo. Foi realizada a avaliação da transmissão de Cff via sementes em três ensaios, em seis cultivares de feijoeiro (IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã e Pérola). Essas cultivares foram inoculadas com um isolado de Cff via

punção no caule e os sintomas da doença foram avaliados com uma escala de notas. A análise da transmissão da bactéria pelas sementes foi realizada nos três ensaios, em 500 sementes das cultivares IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã e para a cultivar Pérola, foram analisadas 46, 155 e 87 sementes respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ensaios. As sementes foram maceradas individualmente em água destilada e esterilizada e incubadas por 24h, a suspensão obtida foi

semeada em placas de Petri contendo meio de cultura semi-seletivo para Cff e incubadas a 28 – 30 °C, durante 96 a 120 h. As colônias com características típicas de Cff, comparadas com um isolado puro padrão, foram purificadas em meio NSA + NaCl 7%, realizados testes de coloração diferencial de Gram, KOH e patogenicidade. Os isolados do primeiro e segundo ensaios foram caracterizados por Microlog2TM e os do terceiro, via PCR. Os resultados mostraram que as cultivares de feijoeiro IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã apresentaram baixos índices de severidade da doença, indicando resistência à murcha-de-curtobacterium, já as cultivares Pérola e IAC Carioca foram suscetíveis, em todos os ensaios, com altos níveis de severidade. Com relação à transmissão de Cff das plantas para as sementes, as cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã não apresentaram transmissão da bactéria, enquanto a cultivar IAC Carioca Aruã, apresentou a transmissão na ordem de 5,5 a 14,8% e as cultivares IAC Carioca e Pérola apresentaram uma alta porcentagem de transmissão; a cultivar IAC Carioca, entre 10,4 a 70%, e a Pérola, entre 32,61 a 74,2 %.

Palavras-chave adicionais: murcha-de-curtobacterium, resistência, *Phaseolus vulgaris*

ABSTRACT

Camara, R.C., Maringoni, A.C., Vigo, S.C. Plant - seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on bean cultivars. *Summa Phytopathologica*

Bean bacterial wilt is a disease that cause serious losses to the Brazilian dry beans production and its causal agent, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), is seed-

transmitted. The use of pathogen-free seeds, culture rotation and resistant cultivars is recommended for disease handling on the field. The evaluation of Cff transmission by seeds was carried out by conducting three assays in six common beans cultivars (IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tybatã and Pérola). These cultivars were inoculated with a Cff isolate via a puncture on the stem and the disease symptoms were evaluated with severity index. The analysis of bacterial seed transmission was carried out in all of the three assays in 500 seeds of cultivars IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã. For cultivar Pérola, 46, 155 and 87 seeds were analyzed respectively on the first, second and third assays. Seeds were individually macerated in distilled and sterilized water for 24 hours and the suspension thus obtained was sown on Petri dishes with a Cff semi-selective medium and incubated at 28 - 30 °C from 96 to 120 h. Colonies with typical Cff characteristics as compared with a standard pure isolate were purified in a NSA + NaCl 7% medium, Gram, KOH and pathogenicity tests being carried out. The isolates from the first and second assays were characterized by Microlog2TM and those of the third one by PCR. Results showed that common beans cultivars IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã presented low levels of disease severity indicating resistance to wilting while in all assays and cultivars Pérola and IAC Carioca were shown susceptible and with high severity levels. Regarding Cff plant-to-seed transmission, cultivars IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã and IAC Carioca Tybatã did not show any bacterial transmission while cultivar IAC Carioca Aruã presented transmission levels ranging from 5.5 to 14.8% while cultivars IAC Carioca and Pérola showed high transmission percentages: IAC Carioca from 10.4 to 70%, and Pérola from 32.61 to 74.2 %.

Additional key words: wilt, resistance, *Phaseolus vulgaris*

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em todo o Brasil, constituindo-se no alimento protéico básico na dieta da população brasileira, mas a cultura está exposta a muitas doenças que podem reduzir a produção e a qualidade dos grãos (10).

São diversos os patógenos que atacam a cultura e dentro desses destaca-se a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), (2, 4). As medidas de controle para essa bacteriose são fundamentadas através do uso de sementes saudáveis, rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes (6, 7, 8).

Pesquisas que relacionam o comportamento varietal de feijoeiro com a transmissão dessa bactéria por sementes são escassas na literatura. O conhecimento dessa transmissão é importante, pois, as sementes servem de fonte de inóculo inicial para epidemias em campo. Sob condições de inoculação artificial constatou-se a transmissão de Cff de plantas de feijão para sementes na ordem de 51,4 a 52,5 %, além do efeito negativo sobre a germinação (1). A transmissão de sementes para plântulas foi observado por Schuster & Smith (11), entre 83,2 a 98,2 %, e também efeito drástico na emergência de plântulas (49 a 76 %).

Provavelmente, sendo Cff um patógeno de colonização vascular, diferenças na capacidade de transmissão dessa bactéria de plantas doentes para sementes possam existir entre genótipos com diferentes níveis de resistência. Tal fato foi constatado em alguns genótipos de feijoeiro com diferentes níveis de resistência ao agente causal do cretamento bacteriano comum (9, 17).

Conforme Hsieh et al. (5), ao analisarem a reação de 124 genótipos de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, verificaram elevados níveis de resistência nas linhagens L02E317, L02B662 e 9995-2, para isolados de Cff de cor amarela e laranja. No Brasil algumas pesquisas têm demonstrado bons níveis de resistência nas cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã e IAC Carioca Pyatã (6, 13) e IAC Carioca Tybatã (13). Theodoro et al. (15) analisaram a reação de 73 cultivares de feijoeiro, coletadas em Santa Catarina à murcha-de-curtobacterium, evidenciaram maiores níveis de resistência nas cultivares Mouro Piratuba e Vagem Amarela. Cultivares de feijoeiro que apresentavam maiores níveis de resistência à murcha-de-curtobacterium possuem menores reduções no desenvolvimento da parte aérea, quando comparada com as cultivares mais suscetíveis (6).

Genótipos de feijoeiro com maiores níveis de resistência à murcha-de-curtobacterium, quando inoculadas por picada no nó cotiledonar segundo Schuster et al. (10), ou por pulverização sob alta pressão nos folíolos conforme Halluka et al. (2), apresentaram menores quantidades da bactéria nos tecidos quando comparados com genótipos suscetíveis. Provavelmente, há diferença na transmissão de Cff de planta para semente em genótipos de

feijoeiro com diferentes níveis de resistência a este patógeno. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a transmissão de Cff de plantas para sementes em seis genótipos de feijoeiro com diferentes níveis de resistência, em três ensaios realizados em três épocas, sob condições de casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaios

Foram realizados três ensaios, sob condições de casa-de-vegetação, nos anos de 2004, 2005 e 2006. No primeiro ensaio (2004) foram empregadas as cultivares de feijoeiro IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e Pérola e nos segundo (2005) e terceiro (2006) ensaios, além dessas cultivares foi inclusa a IAC Carioca Tybatã. Para tanto, sementes das cultivares de feijoeiro foram germinadas em papel "Germ test" até a emissão da radícula e transplantadas para vaso de aproximadamente 8L de capacidade, contendo substrato autoclavado e devidamente adubado para a cultura. Em cada vaso foram conduzidas três plantas que foram inoculadas com o isolado típico e agressivo de Cff, Feij 2634, pelo método de punção no caule, com agulha umedecida em colônias bacterianas desenvolvidas em meio NSA, durante 96 horas, a 28°C, aos nove dias após a emergência (6). Cada parcela experimental foi representada por um vaso, disposto no delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições.

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

Após 37 dias da inoculação, os sintomas da doença foram avaliados com o emprego de uma escala de notas, conforme Maringoni (6), 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 apresentam 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. As plantas foram

mantidas até a produção das sementes, que foram colhidas, secas e armazenadas sob refrigeração (5 - 8 °C), para a detecção de Cff.

Deteção de Cff nas sementes

No primeiro ensaio, 500 sementes de cada uma das cultivares de feijoeiro IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã, foram colocadas em maceração individualmente em 5 mL de água destilada e esterilizada, a temperatura de 5°C, durante 24 h. Para a cultivar Pérola, foram analisadas 46 sementes. Nos segundo e terceiro ensaios, foram analisadas 500 sementes de cada uma das cultivares IAC Carioca, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã. Para a cultivar Pérola foram analisadas respectivamente 155 e 87 sementes no segundo e no terceiro ensaios. As suspensões resultantes da maceração das sementes foram plaqueadas com o auxílio de uma alça em aro, na superfície do meio de cultura semi-seletivo para Cff (MSCFF) composto de peptona – 5 g, extrato de carne – 3 g, sacarose – 5 g, ágar – 15 g, leite em pó desnatado* - 5 g, vermelho do Congo* - 0.05 g, clorotalonil* – 0.01 g, tiofanato metílico* – 0.01 g, ácido nalidíxico* – 0.01 g, nitrofurantoina* – 0.01 g, oxacilina* 0.001 g, azida de sódio* - 0.001 g e água destilada q.s.p. 1L, *adicionado após a autoclavagem do meio basal, conforme Maringoni et al. (8). Após o plaqueamento no meio semi-seletivo as placas foram incubadas a 28 - 30 °C, durante 96 a 120 horas, e as colônias com características semelhantes a Cff, comparadas com um isolado puro padrão, foram purificadas em meio NSA + NaCl 7% (ágar – 15g, sacarose – 5g, peptona – 5g, extrato de carne – 3g, cloreto de sódio – 70g) e posteriormente submetidas à coloração diferencial de Gram, teste de KOH, teste de patogenicidade em feijoeiro cv. Pérola (7, 8), visando determinar a porcentagem de transmissão de Cff nas sementes dos diferentes genótipos de feijoeiro.

Caracterização dos isolados bacterianos obtidos das sementes

1. MICROLOG2™

Foram submetidos à caracterização 56 isolados do primeiro ensaio e 27 isolados do segundo ensaio que apresentavam características culturais típicas de Cff. Os isolados foram cultivados em meio NSA, por 48 horas, e posteriormente cultivados por duas vezes consecutivas em meio de cultura universal de crescimento BUG™ Agar (Biolog® Universal Growth Agar) durante 24 horas, a 30 °C. Colônias bacterianas desenvolvidas na superfície do meio BUG foram transferidas, homogeneizadas em fluido inoculante e a suspensão resultante padronizada por colorimetria, a 28% de transmitância, no comprimento de onda de 600 nm. Cento e cinquenta microlitros da suspensão bacteriana foram depositados em cada um dos poços da microplaca (GP2 MicroPlate™), que continha 95 diferentes fontes de carbono.

O material foi incubado em câmara úmida, a 30°C, durante 24 horas. Seguido o período de incubação, foi realizada a leitura de cada um dos poços contendo as diferentes fontes de carbono atribuindo-se os sinais + (reação positiva), - (reação negativa) e ± (reação variável). As reações obtidas da utilização das diferentes fontes de carbono foram plotadas e analisadas no programa MicroLog2™ System, para identificação de bactéria. Os resultados obtidos foram expressos em índice de similaridade do isolado que estava sendo analisado com um espécime bacteriano identificado existente no banco de dados do programa.

2. Reação de PCR

Dos isolados bacterianos obtidos no terceiro ensaio, 49 foram selecionados, cultivados em meio de cultura NSA e após o crescimento na placa, foram repicados para 5 mL de meio Nutriente Líquido (NL), constituído de extrato de carne – 5g, peptona – 3g, mantidos a 30°C, durante 72 horas.

Dois mililitros da suspensão bacteriana foram centrifugados a 8.000 g, por 2 min. Após a centrifugação, o sedimentado obtido foi ressuspensionado e lavado por duas centrifugações (8.000 g/5 min) sucessivas, em 1 mL de água destilada e esterilizada. Após a segunda lavagem, ressuspendeu-se o precipitado em 50 µL de tampão de extração TE (10mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) e os tubos contendo as suspensões foram autoclavados por 1 minuto, a 121°C. Ao término da autoclavagem a suspensão resultante foi centrifugada (12.000 g/5 min) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C, para posterior uso como DNA molde nas reações de PCR. A metodologia empregada para a obtenção do DNA foi baseada em Simmon et al. (12).

Para a identificação dos 49 isolados bacterianos foram empregados os iniciadores CffFOR2 5' GTTATGACTGAACTTCACTCC 3' e CffREV4 5' GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3', descritos por Tegli et al. (14), para Cff. Foi utilizado como padrão positivo o DNA do isolado de Feij 2634 de Cff, como padrão negativo foi utilizado água destilada esterilizada ao invés de DNA e também DNA de *Pseudomonas fluorescens*. A condição de PCR foi realizada de acordo com o mesmo autor, onde em 25 µL de reação foram adicionados 2,5 µL de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase e 25mM dNTP. A reação de PCR consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, 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 final amplificado por PCR foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5%, tratado com brometo de etídeo e como marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos primeiro, segundo e terceiro ensaios encontram-se respectivamente nas Tabelas 1, 2 e 3. Pode-se observar que as cultivares IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã (ensaios 1, 2 e 3) e IAC Carioca Tybatã (ensaios 2 e 3) apresentaram consistência na reação de resistência à murcha-de-curtobacterium, com baixos índices de severidade, enquanto que as cultivares Pérola e IAC Carioca foram suscetíveis, em

todos os ensaios, com índices elevados de severidade. A Figura 1 ilustra os sintomas apresentados pelas diferentes cultivares de feijoeiro, durante o terceiro ensaio. A reação de resistência das cultivares IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã, bem como o de suscetibilidades das cultivares Pérola e IAC Carioca aqui observados vão ao encontro daqueles descritos na literatura (6, 13, 16)

Com relação à transmissão da Cff das plantas para as sementes, há variação em função do nível de resistência da planta. Nas cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã (Tabelas 1 a 3) e IAC Carioca Tybatã (Tabelas 2 e 3) não foi constatada a transmissão da bactéria das plantas para as sementes. Provavelmente, houve o desenvolvimento de algum tipo de mecanismo de resistência pós-infeccional que bloqueou a colonização da bactéria nos vasos de xilema e esta não atingiu as sementes. Souza et al. (13), ao examinarem a colonização de Cff em vasos de xilema de cultivares de feijoeiro com altos níveis de resistência, observaram a formação de aglutinados de células bacterianas envoltas com uma estrutura rendilhada, que bloqueou a colonização, e conseqüentemente o avanço da doença nas plantas inoculadas.

A cultivar IAC Carioca Aruã, embora com bom nível de resistência à *murcha-de-curtobacterium*, apresentou transmissão de Cff da planta para semente na ordem de 5,5 a 14,8% (Tabelas 1 e 2) e as cultivares suscetíveis (IAC Carioca e Pérola) com porcentagens mais elevadas de transmissão; a cultivar IAC Carioca, entre 10,4 a 70%, e a Pérola, entre 32,61 a 74,2 %, de transmissão (Tabelas 1 a 3). A Figura 2 ilustra as sementes das cultivares IAC Carioca e IAC Carioca Tybatã (terceiro ensaio). Os resultados aqui obtidos para a transmissão de Cff de planta para sementes nas cultivares de feijoeiro suscetíveis concordam parcialmente com Chavarro et al. (1), pois esses autores encontraram a taxa de transmissão na ordem de 52,5% . Conforme Chavarro et al. (1), a transmissão de Cff em sementes de *Zornia glabra* foi de 88,8%, superior a observada para feijoeiro.

Tanto a reação de resistência ou de suscetibilidade de feijoeiro a Cff podem ser variáveis em função de condições climáticas e da agressividade da bactéria, pois o PI 136677 de feijoeiro considerado resistente a isolados de Cff dos E.U.A. foi suscetível a isolados de Cff colombianos oriundos de *Z. glabra* (1). Tais observações poderiam explicar a variação observada na transmissão de Cff nos ensaios aqui desenvolvidos, com as cultivares IAC Carioca Aruã, IAC Carioca e Pérola (Tabelas 1 a 3), principalmente quanto às variações de

ambiente, no interior da casa - de - vegetação, durante o transcorrer dos ensaios nos três anos de condução dos experimentos.

Variações relacionadas à transmissão de *Xanthomonas axonopoidis* pv. *phaseoli* em sementes de genótipos de feijoeiro com diferentes níveis de resistência a esta bactéria foram descritos na literatura (9, 18). Tais observações encontradas no patossistema feijoeiro - *Xanthomonas axonopoidis* pv. *phaseoli* foram aqui observadas para Cff, pois maiores porcentagens de transmissão de Cff ocorreram nos genótipos suscetíveis, quando comparados com aqueles que apresentaram maiores níveis de resistência a Cff.

Os isolados bacterianos obtidos das sementes e submetidos à identificação foram consistentemente identificados como sendo Cff seja pelo método Microbiolog², primeiro e segundo ensaios (Tabelas 1 e 2), com índice de similaridade variando entre 0,51 a 0,86 %, e PCR, terceiro ensaio, Tabela 3, empregando-se iniciadores específicos (Figura 3) descritos por Tegli et al. (14), com a amplificação de uma banda de DNA de 300 pb. O método Microbiolog²TM foi utilizado anteriormente com sucesso para a identificação de Cff provenientes de sementes de feijoeiro naturalmente infectadas (7, 8) e de culturas tipo de coleções internacionais (3). Dos isolados de Cff submetidos à identificação, apenas um não foi patogênico ao feijoeiro cultivar Pérola, conforme relacionado na Tabela 1. Tal fato também foi observado por Maringoni et al. (7, 8) ao identificarem Cff em sementes de feijoeiro naturalmente infectadas.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPQ, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.2, p.64-79, 1985.
2. Halluka, M., Schuster, M.L.; Weihing, J.C.; Coyne, D.P. Population trends of *Corynebacterium flaccumfaciens* strain in leaves of *Phaseolus* species. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.3, n.1, p.13-26, 1978.
3. Harris-Baldin, A.; Gudmestad, N.C. Identification of phytopathogenic coryneform bacteria using the Biolog automated microbial identification system. **Plant Disease**, St Paul, v.80, p.874-878, 1996.
4. Hedges, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, 55, p.433-434, 1922.
5. Hsieh, T.F.; Huang, H. C.; Mündel, H.-H.; Conner, R. L.; Erickson, R. S.; Balasubramanian, P. M. Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, Berlin v.153, n.4, p.245-249, 2005.
6. Maringoni, A.C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, n.2, p.157-162, 2002.
7. Maringoni, A.C.; Camara, R.C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n.4, p.451-455, 2006.
8. Maringoni, A.C.; Camara, R.C.; Souza, V.L. Semi-selective culture medium for

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds. **Seed Science a Technology**, Zurich, v. 34, p. 117-124, 2006.

9. Maringoni, A.C.; Fregonese, L.H.; Tofoli, J.G.; Kurozawa, C. Reação foliar e de vagens de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.412-415, 1993.

10. Sartorato, A. Desafios no Controle de Doenças na Cultura do Feijoeiro na região Centro-Oeste. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/D3/Index.htm>..

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

12. Simmon, K.E.; Steadman, D.D.; Durkin, S.; Baldwin, A.; Jeffrey, W.H.; Sheridan, P.; Horton, R.; Shields, M.S. Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.56, p.143-149, 2004.

13. Souza, V. L.; Maringoni, A.C.; Carbonell, S.A.M.; Ito, M.F. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 339-344, 2006.

14. Tegli, S.; Seren, I. A.; Surico, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Lett. Appl. Microbiol.**, St. Paul, v. 35, p. 331-337, 2002.

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

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

17. Torres, J.P.; Maringoni, A.C. Reação foliar de genótipos de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão via sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.546-549, 1997.

Tabela 1. Transmissão planta - semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultivares de feijoeiro inoculados. Primeiro ensaio, 2004.

Cultivar	Severidade da doença	Nº de semente		% transmissão de Cff	Nº isolado submetido ao teste de patogenicidade/nº isolado patogênico	Amplitude no valor do índice de similaridade (Microlog2™)
		analisada/nº semente com Cff	Cff			
IAC Carioca Aruã	1,68	500/74	14,80	20/19	0,74 – 0,84	
IAC Carioca Akytã	0,74	500/0	0	-	-	
IAC Carioca Pyatã	0,33	500/0	0	-	-	
Pérola	9,00	46/15	32,61	11/11	0,76 – 0,86	
IAC Carioca	8,87	500/221	44,20	25/25	0,66 – 0,80	

Tabela 2. Transmissão planta - semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultivares de feijoeiro inoculados. Segundo ensaio, 2005.

Cultivar	Severidade da doença	Nº de semente analisada/nº semente com Cff	% transmissão de Cff	Nº isolado submetido ao teste de patogenicidade/nº isolado patogênico	Amplitude no valor do índice de similaridade (Microlog2™)
IAC Carioca Aruã	1,0	500/29	5,5	10/10	0,53 – 0,73
IAC Carioca Akytã	0,5	500/0	0	-	-
IAC Carioca Pyatã	0,5	500/0	0	-	-
IAC Carioca Tybatã	0	500/0	0	-	-
Pérola	8,6	155/121	74,2	8/8	0,51 – 0,74
IAC Carioca	6,6	500/350	70	9/9	0,59 – 0,79

Tabela 3. Transmissão planta - semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultivares de feijoeiro inoculados. Terceiro ensaio, 2006.

Cultivar	Severidade da doença	Nº de semente analisada/nº semente com Cff	% transmissão de Cff	Nº isolado submetido ao teste de patogenicidade/nº isolado patogênico	Amplificação de banda de 300 pb com primers CffFOR2-CffREV4
IAC Carioca Aruã	1,00	500/0	0	-	-
IAC Carioca Akytã	1,00	500/0	0	-	-
IAC Carioca Pyatã	0,90	500/0	0	-	-
IAC Carioca Tybatã	0,90	500/0	0	-	-
Pérola	8,50	87/32	36,78	32/32	+
IAC Carioca	7,70	500/52	10,40	17/17	+



Figura 1: Sintomas da murcha-de-curtobacterium nas cultivares de feijoeiro Pérola (A), IAC Carioca (B), IAC Carioca Aruã (C), IAC Carioca Akytã (D), IAC Carioca Tybatã (E) e IAC Carioca Pyatã (F), terceiro ensaio.

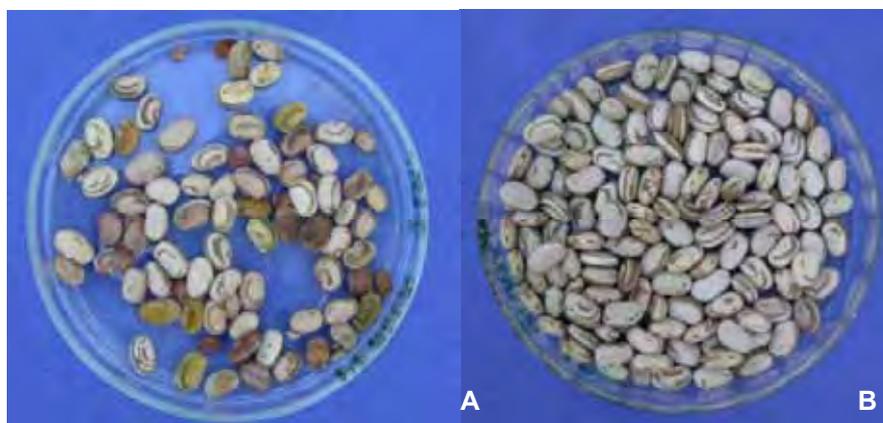


Figura 2. Sementes de feijão da cultivar IAC Carioca (A) e IAC Carioca Tybatã (B), provenientes de plantas inoculadas com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

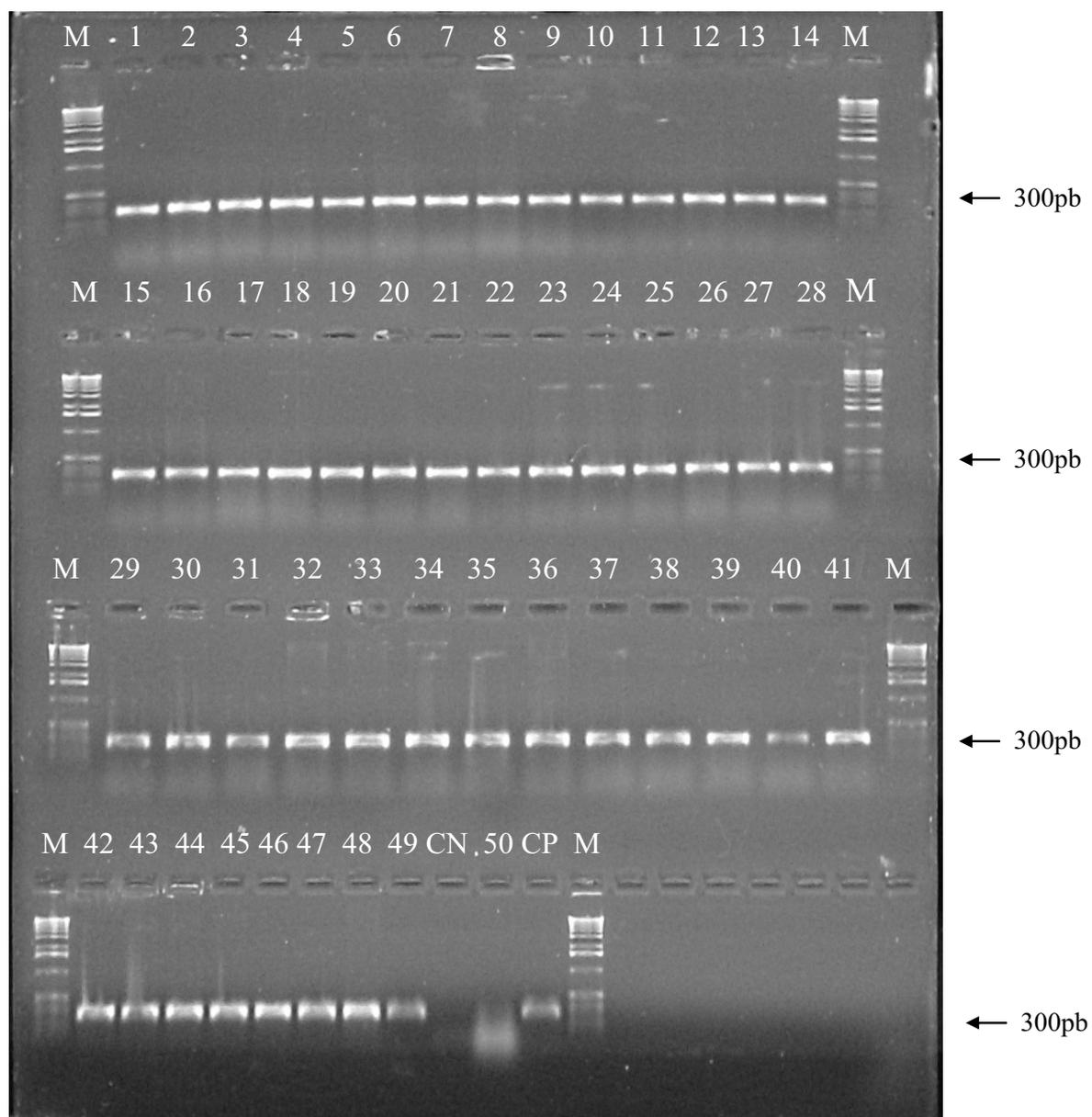


Figura 3. Produtos de PCR (300 pb) de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidos com os iniciadores CffFOR2-CffREV4. Números 1 a 49 isolados obtidos de sementes; 50 (*Pseudomonas fluorescens*); CP - controle positivo; CN - controle negativo; M – marcador molecular.

4. CONCLUSÕES

As cultivares de feijoeiro IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã apresentam altos níveis de resistência à murcha-de-curtobacterium enquanto que as cultivares Pérola e IAC Carioca são suscetíveis.

A transmissão de Cff das plantas para sementes é nula ou baixa nas cultivares IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã e alta nas cultivares Pérola e IAC Carioca.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL, 2007. Anuário da agricultura brasileira, São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2007. p. 329, 2007.

AZEVEDO, J.M.N.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R.L.D. & AKIBA, F. Tratamento térmico de sementes de pimentão objetivando a erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p. 44, 1991.

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

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

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**, v.35, n.2, p.64-79, 1985.

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

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. & AL-YASIRI, S. Reaction studies of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.47, p.534-537, 1963.

DINENSEN, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plants. In: **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Angers. *Anais...* Angers: INRA, p.929-933, 1978.

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

DUNLEAVY, J.M. Spread of bacterial tan spot of soybean in the field. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, n.10, p.1036-1039, 1985.

ESTEFANI, Renata C.C.; MIRANDA FILHO, Reinaldo J. & UESUGI, Carlos H. Tratamentos térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade fisiológica das sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, 2007 .

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://apps.fao.org>>. Acesso em 24/04/2006.

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

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: APS, p.73, 1991.

HARVERSON, R.M.; VIDAVER, A.K. & SCHWARTZ, H.F. Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska. NebGuide, C-51, np, 2005. In: <http://www.ianperbs.unl.edu/epublic/live/g1562/build/g1562.pdf> (consulta em 04/05/08).

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, 55, p.433-434, 1922.

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

HSIEH, T.F.; HUANG, H.C.; ERICKSON, R.S.; YANKE, L.J. & MUNDEL, H.H. First report of bacterial wilt on common bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in western Canada. **Plant Disease**, St. Paul, v.86, n.11, p.1275, 2002.

HSIEH, T.F.; HUANG, H. C.; MÜNDEL, H.-H.; CONNER, R. L.; ERICKSON, R. S. & BALASUBRAMANIAN, P. M. Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, n.4, p.245-249, 2005.

HSIEH, T.F.; HUANG, H. C. & ERICKSON, R.S. Bacterial of common bean: effect of seedborne inoculum on disease incidence and seedling vigour. **Seed Science And Technology**, Zurich, v.34, p. 57-67, 2006.

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M. & MORAES, M.H.D. Importância do uso de sementes de feijão e tratamento químico. **O Agrônomo**, Campinas, v.55, p.14-16, 2003.

KARKMKOVA, P. & BOYADZHIEV, K.H. The new garden bean cultivar Rositsa. **Gardinaska i Lozarka Nauka**, v.21, n.3, p.40-43, 1984. In: CAB Abstract, 1984/1986, ref. 840323803.

KLEMENT, Z.; RULDOPH, K. & SANDS, D.C. (Eds.). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, p. 568, 1990.

LEITE JÚNIOR, R.P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S.R. & BINCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, supl., p.303, 2002.

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

MARINGONI, A. C. & CAMARA, R.C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 451-455, 2006.

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

MARQUES, A.S.; SANTOS, J.P. & VIEIRA, T.M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, 2005.

MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes, detecção, danos e controle químico. São Paulo. **Ciba Agro**, p.321, 1995.

NIKITINA, K.V., BUDANOVA, V.I., STEPANOVA, S.I. & YASKINA, O.S. Rapid method of evaluating resistance to bacterial diseases in lupin and *Phaseolus*. **Seleksiya i Semenovodstvo URSS**, Moscow, n.5, p.22-23, 1980.

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

RAVA, C.A. & COSTA, J.G.C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. In: Reunião Sul-Brasileira de Feijão, 5.; Reunião Anual Paranense, 2001, Londrina. **Anais**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p.55-56, 2001.

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

SAETTLER, A.W. & PERRY, S.K. Seed-transmitted bacterial diseases in michigan navy (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.56, n.5, p.378-381, 1972.

SALGADO, R.G.D.; MARINGONI, A.C. & WILCKEN, S.R.S. Não-interação patogênica entre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Meloidogyne incógnita* raça 2 em feijoeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.30, p.202-205, 2007.

SARTORATO, A. Desafios no controle de doenças na cultura do feijoeiro na região Centro-Oeste. 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/D3/Index.htm>. Acesso em: 26/5/2008.

SCHAAD, N.W. Use and limitations of methods of detect seed-borne bacteria. In: **Seed Pathology International Advanced Course**, Passo Fundo, v.1, p.324-332, 1987.

SCHUSTER, M.L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.43, n.1, p.25-32, 1959.

SCHUSTER, M.L. & CHRISTIANSEN, D.W. An orange colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt. **Phytopathology**, Washington, v. 47, p.51-53, 1957.

SCHUSTER, M.L., COYNE, D.P. & SING, K. Population trends and movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum* in tolerant and susceptible beans. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48, n.10, p.823-827, 1964.

SCHUSTER, M.L., JONES, J.P. & SAYRE, R.M. The effects of thiamine and temperature upon the pigmentation and growth of bean wilt bacteria. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.43, n.4, p.439-443, 1959.

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

SCHUSTER, M.L., VIDAVER, A.K. & MANDEL, M. A purple-pigment-producing bean bacterium *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*, n. var. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.14, p.423-427, 1968.

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

SILVA, ANGELO M. S., CARMO, M.G. F., OLIVARES, F.L. & PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, n. 6, 2002 .

SOUZA, V.L.; MARINGONI, A.C. & KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, 2006.

TEBALDI, Nilvanira D.; SOUZA, Ricardo M. & MACHADO, José C.. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, 2007 .

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

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

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

THOMAS, W.D. & GRAHAM, R.W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, Washington, v.42, n.4, p.214-215, 1952.

TORRES, G.C., LENNE, J.M., VICTORIA, J.I. & LOZANO, J.C. Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterim flaccumfaciens*. **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, 5, 1982, Cali. *Anais....* Cali: CIAT, p. 74-79, 1982.

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

VENETTE, J.R.; LAMPRA, R.S. & GROSS, P.L. First report of bean bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* in North Dakota. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n.9, p.966, 1995.

WANDER, A.E. Produção e consumo de feijão no Brasil. *Informações Econômicas*, v.37, n.2, p. 7-21, 2007.

WOOD, B.A. & EASDOWN, W.J. A new bacterial disease of mung bean and cowpea for Australia. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v.19, n.1, p.16-21, 1990.