

JOSÉ MARCELO SOMAN

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE
CULTIVARES DE FEIJOEIRO COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA À
MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM**

Botucatu

2018

JOSÉ MARCELO SOMAN

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE
CULTIVARES DE FEIJOEIRO COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA À
MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Maringoni

Botucatu

2018

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

S693a Soman, José Marcelo, 1987-
Avaliação de características agronômicas e bioquímicas de cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à murcha-de-curtobacterium / José Marcelo Soman. - Botucatu: [s.n.], 2018
73 p.: fots. color., ils., grafs., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Inclui bibliografia

1. Feijão comum - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. Bactérias fitopatogênicas. 3. Plantas cultivares. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE
CULTIVARES DE FEIJOEIRO COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA À
MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM**

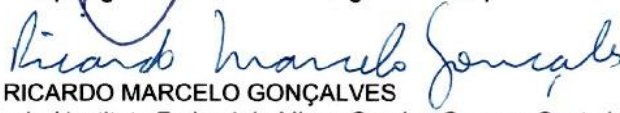
AUTOR: JOSÉ MARCELO SOMAN

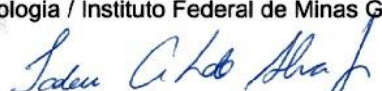
ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS MARINGONI

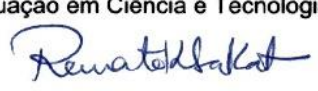
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu


Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM
Bactérias Fitopatogênicas / Instituto Biológico de Campinas


Prof. Dr. RICARDO MARCELO GONÇALVES
Fitopatologia / Instituto Federal de Minas Gerais - Campus Santa Luzia


Prof. Dr. TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental / Universidade Sagrado Coração - USC


Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Depto de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 03 de janeiro de 2018.

Aos meus pais Alice e José (*in memorian*),
pela participação ativa na minha formação,
ajudando e incentivando a suportar as
dificuldades e à minha querida esposa
Milena pela paciência e compreensão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dons recebidos que me possibilitaram chegar até aqui.

Aos meus pais por todo amor, dedicação e apoio.

À minha esposa Milena, com quem pude contar em todos os momentos e que esteve sempre presente apoiando meus objetivos.

À UNESP/FCA pelo emprego e possibilidade da realização do curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, por sua dedicação durante todos esses anos, compartilhando ensinamentos para toda a vida. Agradeço também pelos conselhos e conversas, propiciando minha evolução profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Renate Krause Sakate pela confiança, apoio e licença para o uso de seu laboratório.

Aos chefes e servidores do Departamento de Proteção Vegetal pela compreensão durante o curso.

Aos professores do Programa de Pós-graduação – Proteção de Plantas pelo apoio e ensinamentos, contribuindo muito para minha formação profissional.

Aos servidores da Seção de Pós-Graduação da FCA/UNESP pelo auxílio com os processos e documentos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Daniele, João César, Ricardo, Ronaldo e Tadeu, pela amizade, convivência e ajuda nos momentos mais críticos.

Aos estagiários do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Bianca, Karine, Letícia, Mayara e Thiago, pela amizade e ajuda na instalação e execução dos ensaios.

Aos colegas de Pós-Graduação pela agradável convivência e momentos de descontração.

À Dra. Maria Márcia P. Sartori pela paciência e disponibilidade nas análises estatísticas dos dados.

Aos amigos recentes e de longas datas que sempre estiveram ao meu lado, pelos conselhos, apoio e compreensão.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Agradeço, por fim, a todos que participaram desse momento em minha vida.

RESUMO

A murcha-de-curtobacterium, incitada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é uma das principais doenças do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil e em alguns países do mundo. Até o momento, sua principal forma de manejo é a utilização de cultivares com níveis de resistência. Porém há escassez de informações sobre a dinâmica populacional bacteriana, mecanismos de resistência e produtividade nessas cultivares. Diante disto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a dinâmica populacional de Cff em cultivares resistentes e suscetíveis de feijoeiro; caracterizar as principais alterações fisiológicas em resposta ao processo de infecção das plantas por Cff e; avaliar as características agrônomicas das plantas de feijoeiro de cultivares resistentes e suscetíveis em resposta à infecção por Cff. Para tal, os ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação, na Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu-SP. No primeiro ensaio e na sua repetição, foi avaliada a dinâmica populacional bacteriana em cultivares resistentes e suscetíveis de feijoeiro nos quatro primeiros entrenós. No segundo ensaio, foi avaliada a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), polifenoloxidase (PFO), peroxidase (POX) e a concentração de proteínas e compostos fenólicos totais em nove coletas realizadas às 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 e 336 horas após a inoculação. No terceiro ensaio, em três repetições, foram avaliadas as principais características agrônomicas para a cultura do feijoeiro, tais como número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos, juntamente com a severidade da doença. Foi observado que a colonização em cultivares com níveis de resistência é mais lenta e estas apresentam menor número de bactérias em seus tecidos em relação às cultivares suscetíveis, sendo este resultado influenciado por temperaturas médias mais elevadas. As enzimas avaliadas responderam com maior intensidade ao estresse oxidativo gerado pela presença da bactéria em cultivares resistentes em comparação às suscetíveis, podendo ser utilizadas como marcadores de resistência. Os teores de proteínas e compostos fenólicos também foram aumentados nessas cultivares em resposta à doença. As características agrônomicas foram diretamente afetadas pela doença em cultivares suscetíveis, destacando-se a cultivar Pérola que teve sua produção extremamente reduzida. A doença também fez com que os níveis de matéria seca fossem diretamente reduzidos nessas cultivares.

Palavras-chave: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Murcha-de-curtobacterium, feijoeiro comum, cultivares resistentes

ABSTRACT

The Bacterial wilt, induced by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), is one of the main disease of common bean crops (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil and around world. Until now, the basic management form is the cultivars application with levels of resistance, however there is lack of information about bacterial population dynamic, resistance mechanisms and productivity in those cultivars. Based on that, the objectives of this work were: to evaluate the dynamic of Cff population in resistant and susceptible cultivars of common bean; to characterize the main physiological alterations in response to the plant colonization process by Cff and; to measure the agronomic parameters of bean plants from resistant and susceptible cultivars in response to the colonization by Cff. To this end, the assays were performed in greenhouse condition located on Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu-SP. During the first assay and your respective repetition, was evaluated the dynamic bacterial population in resistant and susceptible cultivars of bean in the first four internodes. In the second assay, was evaluate the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) and the concentration of proteins and total phenolic compounds in nine collections accomplished at 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 and 336 hours after the inoculation. About the third assay, with three repetitions, were evaluated the main agronomic parameters for beans crop, such as number of pods per plant, number of grain per pod, mass of one hundred grains, along with the severity of the disease. It was observed that the colonization in cultivars with levels of resistance is slowest and present the smallest number of bacteria in their tissues comparing the susceptible cultivars, as this result influenced by medium temperatures higher. The enzymes evaluated respond with greater intensity to oxidative stress induced by the presence of bacteria in resistant plants comparing to susceptible, which can be used as resistant markers. The levels of proteins and phenolic compounds are also increased in those cultivars as a response to bacterial wilt. The agronomic parameters were directly affected by the disease in susceptible cultivars, highlighting the Pérola cultivar, which it had extremely reduced production. The disease also contributed with the directly decreasing of the levels of dry matter in those cultivars.

Key-words: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, bacterial wilt of common bean, common bean, resistant cultivars.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de elétrons durante a explosão oxidativa e rotas de conversão existente em plantas.....	28
Figura 2 - Variação do teor de proteínas totais nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação.....	48
Figura 3 - Variação do teor de fenóis totais nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação.....	50
Figura 4 - Variação da atividade da SOD nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação.....	52
Figura 5 - Variação da atividade da PFO nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação.....	54
Figura 6 - Variação da atividade da POX nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação.....	56
Figura 7 - Reação das cultivares a murcha-de-curtobacterium aos 21 DAI	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progressão da murcha-de-curtobacterium (AACPD) nos dois ensaios de colonização de cultivares por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	41
Tabela 2 - Concentração de bactéria nos tecidos (Log_{10} UFC.g tecido ⁻¹) para cinco cultivares em dois ensaios realizados em 2014 e 2015 inoculadas ou não com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	42
Tabela 3 - Matéria seca das cinco cultivares de feijoeiro frente a inoculação com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	46
Tabela 4 - Área abaixo da curva da concentração de proteínas e fenóis totais em cinco cultivares de feijoeiro inoculadas ou não com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	47
Tabela 5 - Área abaixo da curva da atividade da Superóxido-dismutase, polifenoloxidase e peroxidase em cinco cultivares de feijoeiro inoculadas ou não com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	51
Tabela 6 - Área abaixo da curva de progressão da murcha-de-curtobacterium em três ensaios realizados em diferentes épocas.....	57
Tabela 7 - Características agronômicas de cultivares resistentes e suscetíveis de feijoeiro inoculadas ou não com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , em três ensaios em diferentes épocas	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Aspectos gerais da cultura do feijoeiro.....	21
2.2	Aspectos gerais da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro	22
2.3	Resistência de cultivares de feijoeiro às doenças	24
2.4	Os níveis populacionais bacterianos e seu impacto na expressão das doenças	26
2.5	Atividade enzimática e compostos fenólicos como indicadores de resistência.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Isolados bacterianos	32
3.2	Local dos ensaios.....	32
3.3	Cultivares de feijoeiro	32
3.4	Avaliação da severidade da murcha-de-curtobacterium	33
3.5	Confirmação da identidade dos isolados recuperados, por PCR	33
3.6	Colonização de cultivares de feijoeiro por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	34
3.7	Matéria seca da parte aérea de cultivares de feijoeiro infectadas por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	35
3.8	Atividade enzimática, quantificação de proteínas e fenóis totais de cultivares de feijoeiro infectadas por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	36
3.8.1	Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar	36
3.8.2	Obtenção dos extratos vegetais.....	36
3.8.3	Atividade da peroxidase	37
3.8.4	Atividade da polifenoloxidase	37
3.8.5	Atividade da superóxido-dismutase	37
3.8.6	Quantificação de proteínas totais	38
3.8.7	Quantificação de fenóis totais.....	38
3.8.8	Análise dos dados	39
3.9	Avaliação das características agronômicas em cultivares de feijoeiro infectados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	39

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Colonização de cultivares de feijoeiro por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	41
4.2	Matéria seca da parte aérea de cultivares de feijoeiro infectadas por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	46
4.3	Atividade enzimática, quantificação de proteínas e fenóis totais de cultivares de feijoeiro infectadas por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	47
4.4	Avaliação das características agronômicas em cultivares de feijoeiro infectados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	57
5	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A agricultura tropical está exposta constantemente a fatores que limitam sua produção. A alta incidência de pragas e doenças, aliada às drásticas mudanças climáticas e variedades de baixa qualidade proporcionam perdas econômicas significativas às culturas. O primeiro semestre de 2016 foi marcado pela alta do preço do feijão, em 33,49%, até maio, devido ao fenômeno climático El Niño ter atingido áreas extremamente importantes para a produção brasileira. Os estados de Minas Gerais e Bahia enfrentaram graves secas enquanto o estado do Paraná foi prejudicado pelo excesso de chuvas (“O feijão está mais caro; entenda por quê”, 2016).

As doenças respondem por grande parte das perdas da produção de feijão no Brasil. Fungos, vírus e bactérias são os principais agentes etiológicos responsáveis pela elevação dos custos de produção e riscos associados ao uso intensivo de agrotóxicos. Nesse contexto, as doenças causadas por bactérias têm se destacado devido ao seu difícil controle, muitas vezes pelo desconhecimento do patossistema. Entre as principais doenças bacterianas do feijoeiro, destaca-se a murcha-de-curtobacterium, incitada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff).

A planta colonizada por Cff geralmente apresenta sintomas iniciais facilmente confundidos com déficit hídrico. Com o passar dos dias, em plantas suscetíveis, os sintomas evoluem para murcha severa, amarelecimento das folhas, queima dos bordos foliares, escurecimento ou não dos tecidos condutores, nanismo e muitas vezes morte da parte aérea das plantas. Em plantas com algum grau de resistência, os sintomas são menos severos geralmente reduzindo a capacidade fotossintética, vigor das plantas e consequentemente a produção (HARVESON; SCHWARTZ, 2007; MARINGONI et al., 2015).

A adoção de genótipos com níveis de resistência pode ser considerada como uma das medidas mais eficiente, econômica e prática para o controle da murcha-de-curtobacterium uma vez que as aplicações dos agrotóxicos atualmente registrados para a cultura não possuem eficácia contra essa doença (MARINGONI, 2000; RAVA et al., 2015). Alguns autores encontraram diferentes genótipos de feijoeiro com resistência a murcha-de-curtobacterium (HSIEH et al., 2005; URREA; HARVESON, 2014; MARINGONI et al., 2015) porém os mecanismos que a conferem ainda não foram completamente elucidados.

É sabido que a interação planta-patógenos é uma condição desfavorável capaz de ativar mecanismos de defesas contra os patógenos. Esses mecanismos estão diretamente relacionados com o aumento da atividade de algumas enzimas, acúmulo de metabólitos secundários e deposição de substâncias que impedem o avanço do patógeno. Dessa forma, essas alterações fisiológicas e estruturais podem ser utilizadas como marcadores para comparação de plantas consideradas resistentes e suscetíveis, bem como para nortear pesquisas para elucidar a expressão genética envolvida na resistência.

Com isso, os objetivos deste trabalho foram avaliar a dinâmica da colonização das plantas pela bactéria, os processos bioquímicos envolvidos na resistência e na suscetibilidade de cultivares de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium, bem como as características agronômicas afetadas pela doença em cultivares resistentes e suscetíveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura do feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é sem dúvida a espécie de maior importância econômica mundial do gênero. Sua origem, segundo aos padrões eletroforéticos da faseolina, é múltipla e a domesticação ocorreu principalmente na Mesoamérica e Andes em dois “pools” de genes independentes levando a uma forte redução da diversidade genética da espécie (PEREIRA, 1990).

Atualmente, o feijoeiro pertence à Classe Magnoliopsida, Ordem Fabales e Família Fabaceae. As folhas são trifoliadas, possuem pequenas estípulas e os folíolos são completos na maioria das vezes. As estípulas são persistentes e não se estendem até a base. As plantas possuem tricomas em forma de ganchos, encontrados principalmente no caule e nos pecíolos. No caso de plantas com hábito de crescimento determinado, o caule e os ramos laterais terminam em uma inflorescência, sendo que a floração se inicia do ápice para a base da planta. O hábito indeterminado de crescimento é caracterizado por um caule principal que cresce continuamente, com inflorescências axilares e a floração inicia da base para o ápice da planta. O fruto é um legume deiscente, constituído de duas valvas de forma reta, arqueada ou recurvada com ápice abrupto, afilado, arqueado ou reto. A semente é constituída externamente de um tegumento, hilo, micrópila e rafe e internamente de um embrião constituído pela pluma, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e radícula (DELGADO SALINAS, 1985; VIEIRA et al., 2006; PAULA JÚNIOR; VENZON, 2007).

Entre as espécies do gênero *Phaseolus*, o feijão comum é o mais cultivado. De acordo com dados da FAOSTAT, publicados em 2015, referentes ao ano de 2014, a produção mundial de feijão foi de 25,09 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial da produção de feijões com aproximadamente 3,03 milhões de toneladas. Em primeiro e terceiro lugar estão Índia (3,34 milhões de toneladas) e Birmânia (2,28 milhões de toneladas) respectivamente. A China ocupou o quarto lugar com uma produção média de aproximadamente 1,53 milhões de toneladas seguida pelos Estados Unidos com um total de 1,21 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015).

Na região Mercosul, a Argentina é o segundo maior produtor, porém exporta quase sua totalidade da produção. É o principal país fornecedor de feijão preto para o Brasil, com destino ao Rio de Janeiro. Cerca de 90% da sua produção de feijão

branco é destinado à Espanha. As importações brasileiras giram atualmente em 2% (CONAB, 2015).

No Brasil, o feijoeiro é cultivado por pequenos e grandes produtores em todas as regiões sob diversificados sistemas de produção. Tido como uma importante fonte proteica e de carboidratos, é utilizado como componente de dietas de combate a fome e desnutrição (EMBRAPA, 2003). Segundo dados da CONAB (2017), na safra 2016/17 a região centro-sul foi a maior produtora com 2,62 milhões de toneladas de grãos produzidas em uma área de 1.532 mil hectares. A segunda região brasileira mais produtora foi a norte-nordeste com 730 mil toneladas em uma área de 1653,2 mil hectares.

Em São Paulo, quase todo o feijão é produzido na região sudoeste do Estado. O feijão colhido é considerado de média qualidade, devido ao excesso de chuvas que ocorreram durante a colheita. O produtor sinalizou com manutenção na área plantada, com o cultivo de 48,2 mil hectares, incremento na produtividade de 2% em relação à safra de 2014/15, partindo de 2.331 kg/ha para 2.378 kg/ha. Incremento também de 16,2% na produção em relação à safra anterior, saiu de 98,6 mil toneladas para 98,6 mil toneladas. Mesmo assim, a produção de feijão é insuficiente para o abastecimento do mercado interno, devido a baixos rendimentos principalmente pela incidência de doenças quando o manejo não é adequado (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000; CONAB, 2015).

No ano de 2016, as grandes áreas produtoras de feijão do Brasil foram atingidas negativamente pelo fenômeno climático El Niño que potencializou as chuvas na região sul e a seca na região nordeste. A primeira safra, cujo estado do Paraná é o que se destaca, sofreu perdas significativas pelo excesso de umidade. Aproximadamente 15% da produção brasileira foi comprometida resultando em uma aumento de cerca de 30% no preço final (FREITAS, 2015)

O plantio sucessivo de cultivares suscetíveis, condições climáticas desfavoráveis, plantio direto e ausência de práticas culturais adequadas como rotação de culturas também potencializam a ocorrência de doenças que acarretam redução na qualidade da produção e na renda do produtor.

2.2 Aspectos gerais da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro

Por ser cultivado durante todo o ano em vários ecossistemas, o feijoeiro está propenso a uma série de doenças de origem fúngica, bacteriana e virótica. No Brasil

já foram descritas as seguintes doenças de etiologia bacteriana: “Murcha-de-Curtobacterium”, incitada pela *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (MARINGONI; ROSA, 1997); “Crestamento bacteriano aureolado” incitado pela *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (YORINORI et al., 1998); “Mancha bacteriana marrom” incitada pela *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; “Fogo Selvagem” incitado pela *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (MOHAN, 1982) e; “Crestamento bacteriano comum” incitado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (MALAVOLTA et al., 2008). Há um relato (AKIBA et al., 1980) de *Ralstonia solanacearum* causando sintomas de murcha bacteriana, em plantas de feijão vagem, porém não há dados mais recentes desse patógeno na cultura do feijoeiro comum, no país.

O primeiro relato da murcha-de-curtobacterium ocorreu nos Estados Unidos, no estado de Dakota do Sul, com perdas aproximadas de 90% de produtividade das plantas afetadas (HEDGES et al., 1922). Mais tarde, houve relatos da doença no Distrito de Colúmbia, em Maryland, Michigan, Montana e Virginia (HEDGES et al., 1926). Segundo a CABI (2010), a bactéria já foi relatada na Albânia, Turquia, Grécia, Bulgária, Romênia, Tunísia, Canadá, México, Colômbia, Venezuela entre outras localidades.

No Brasil, foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo, no município de Itaporanga em plantas de feijoeiro do cultivar Carioca, em 1992 (MARINGONI; ROSA, 1997). Apesar de ser relativamente recente está distribuída na maioria das regiões produtoras de feijão do Brasil. Atualmente há relatos da bactéria nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (LEITE JUNIOR et al., 2001; UESUGI et al., 2003; THEODORO; MARINGONI, 2006; THEODORO et al., 2010).

Os sintomas normalmente ocorrem em reboleiras e caracterizados pela murcha das folhas ou parte destas inicialmente durante as horas mais quentes do dia seguida pela recuperação do vigor assim que a temperatura cai a noite. A evolução da colonização da planta provoca a degeneração dos vasos condutores tornando a murcha permanente durante os dias seguintes até o ponto em que o suprimento de água é totalmente cortado, levando a uma redução do metabolismo e consequentemente à redução da produtividade. Ocasionalmente, os sintomas de murcha podem estar ausentes e substituídos por lesões foliares amarelo-douradas

que podem ser confundidas com os sintomas causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, entretanto a lesão é de aspecto irregular (CABI, 1982).

A infecção também pode ocorrer na sutura das vagens, semelhante aos sintomas do “Crestamento bacteriano aureolado” e ao “Crestamento bacteriano comum”. As sementes infectadas podem apresentar as colorações amarelas, laranjas ou púrpuras dependendo do isolado bacteriano envolvido (FRANC, 1998; HARVESON; SCHWARTZ, 2007; VALENTINI et al., 2010).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* é uma bactéria móvel, aeróbia, possui formato de bastonetes curvados com um a três flagelos laterais ou polares, não formadora de esporos, ocorrem sozinhas ou em pares medindo 0,6-3,0 x 0,3-0,5 µm de tamanho. As colônias são brilhantes, circulares, bordas lisas, semi-fluida de coloração variando entre amarelo, laranja, rosa, e púrpura, com 1 a 4 milímetros de diâmetro em três a quatro dias de cultivo em meio nutriente-glicose-água. São gram-positivas, reduzem nitrato e urease, produzem indol e são tolerantes a cloreto de sódio entre 7 e 9% no meio de cultura. São capazes de produzir gás sulfídrico a partir de cisteína e ácidos a partir de adonitol, amido, glicerol, glicose, inositol, melizitose, maltose e sacarose (BRADBURY, 1986).

As principais e efetivas medidas de controle desta doença estão baseadas na rotação de culturas, utilização de sementes saudáveis e cultivares resistentes (MARINGONI; CAMARA, 2006). Outras medidas como manutenção da adubação adequada (MARINGONI, 2003; THEODORO; MARINGONI, 2006), utilização do tratamento de sementes com *Rhizobium leguminosarum* (HUANG et al., 2007) se mostraram efetivas. Atualmente, o uso de cultivares resistentes se mostrou a melhor forma de controle desta doença.

2.3 Resistência de cultivares de feijoeiro às doenças

Os programas de melhoramento genético de feijoeiro visam, basicamente, a produtividade e resistência às doenças. Atualmente, outras características como tipo e qualidade do grão, arquitetura da planta e sua adaptabilidade à colheita mecanizada, adaptação a solos e regimes hídricos e fixação simbiótica de nitrogênio, também são levadas em consideração, porém tratadas em segundo plano (VIERA; BORÉM; RAMALHO, 1999).

A produtividade como foco do programa de melhoramento leva em consideração características fisiológicas, morfológicas e de rendimento. A

produtividade está intrinsicamente relacionada ao stand utilizado com base em três componentes principais: número de vagens por planta; número de sementes por vagem e peso médio das sementes. A partir desse fato, Adams (1967) observou a “compensação entre os componentes de rendimento” determinando que o aumento de um desses componentes pode trazer a diminuição de outro (ADAMS, 1967; CASTOLDI, 1991; SINGH et al., 1991).

Hall e Nasser (1996) e Schwartz e Peairs (1999) revisaram as estratégias para o manejo integrado de 50 doenças do feijoeiro. Até nesse momento, a disponibilidade de cultivares resistentes foi para apenas 50% das doenças, enquanto o controle químico e práticas culturais era indicado para mais de 80%. Além do mais, a resistência para muitas doenças do feijoeiro não é indicada para proteger a cultura de perdas quantitativas e qualitativas, pois pode ser contornada por interações entre hospedeiro, ambiente e novas raças ou variantes do patógeno. Essas observações sugeriram que o manejo cultural, incluindo rotação de culturas e sementes livres do patógeno, são essenciais para que se obtenha sucesso com o uso de cultivares resistentes.

Há diversas pesquisas avaliando a reação de cultivares de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium. No Canadá, HSIEH et al. (2005) testaram 124 cultivares e linhagens de feijoeiro a variantes amarelas e laranjas de Cff e evidenciaram diferenças significativas entre as cultivares. Nos Estados Unidos, Urrea e Harveson (2014b) avaliaram 467 linhagens do Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas para o gênero *Phaseolus* e encontraram apenas uma linhagem (PI325691) altamente resistente, porém não possui características comerciais aceitáveis, sendo portanto utilizada apenas para programas de melhoramento.

No Brasil, vários trabalhos buscando cultivares resistentes a Cff também foram realizados. Souza et al. (2006) avaliaram 333 acessos de feijoeiro do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A grande maioria (81%) foi suscetível e apenas 29 linhagens foram altamente resistentes (8,7%). Theodoro e Maringoni (2006) avaliaram 24 genótipos evidenciando as cultivares IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã como fontes de resistência. Maringoni et al. (2015) avaliaram a reação de 54 genótipos de feijoeiro, assim como a obstrução dos vasos de xilema provocada pela bactéria. Os resultados evidenciaram as cultivares IAC Alvorada, IAC Diplomata, IPR Corujinha e IPR Tangará como sendo as mais resistentes e com menor velocidade de colonização dos vasos de

xilema podendo servir de base para o programa de melhoramento genético de feijoeiro visando o controle da doença no Brasil.

Poucos trabalhos disponíveis na literatura correlacionam a reação de cultivares resistentes e suscetíveis a Cff com perdas na produção e qualidade das sementes. Em 1920, era considerada nos EUA, a doença de maior importância para o feijoeiro, pois causava perdas totais da produção (HEDGES, 1926). No Brasil, a doença pode causar perdas que variam entre 4 a 47% na redução da produtividade, dependendo do nível de inóculo na cultivar Pérola (MIRANDA-FILHO; RESENDE; UESUGI, 2005).

Foi demonstrado também que cultivares resistentes e suscetíveis diferem quanto ao teor de nutrientes incorporados e matéria seca da parte aérea. As cultivares resistentes apresentam maiores teores de macronutrientes do que as suscetíveis (MARINGONI, 2003). Esse fator implica diretamente na produção, uma vez que, aos 40 dias após a germinação, a planta exige a maior quantidade de nutrientes disponíveis para produção de biomassa e posterior formação de vagens e grãos (ARAUJO, 1996).

2.4 Os níveis populacionais bacterianos e seu impacto na expressão das doenças

Vários autores reportaram até o momento cultivares resistentes de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium (HSIEH et al., 2005; URREA; HARVESON, 2014; MARINGONI et al., 2015), porém os dados sobre a dinâmica populacional da bactéria nessas plantas ainda são escassos. Souza et al. (2006) quantificaram a resistência com base nos sintomas apresentados e compararam através de microscopia eletrônica de varredura a colonização dos vasos de xilema de cultivares altamente resistentes frente as suscetíveis, porém a população bacteriana nas plantas não foi determinada.

Maringoni et al. (2015) avaliaram 33 genótipos de feijoeiro com base nos sintomas e na porcentagem de vasos de xilema obstruídos. As cultivares IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Tibatã e IAC Diplomata, consideradas resistentes, apresentaram menor quantidade de vasos obstruídos, indicando assim uma relação entre o nível de resistência e a colonização da planta pela bactéria.

Estudos conduzidos por Goodwin et al.(1995) evidenciaram que os genótipos suscetíveis ao “Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro”, acumularam uma alta

população bacteriana em suas folhas e que essas se moveram sistematicamente mais rápido que em plantas de genótipos resistentes ou tolerantes. Além do mais, trabalhos conduzidos posteriormente evidenciaram que o genótipo pode se mostrar resistente nas folhas e suscetíveis nas vagens ou vice-versa (MUTLU et al., 2008).

Em plantas de tomateiro, a relação entre resistência e níveis populacionais de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* foi amplamente estudada (WAKIMOTO; UEMATSU; MUKOO, 1968; STRIDER, 1969). A população bacteriana de *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas* spp também foi avaliada (HIRANO; UPPER, 1990; HAYWARD, 1991; LOBO et al., 2005). Em todos os trabalhos houve a correlação positiva entre resistência e diminuição da população bacteriana no hospedeiro.

Estudos da dinâmica populacional de *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* em cultivares resistentes e suscetíveis de alface apontam que a severidade dos sintomas está diretamente relacionada à concentração de bactérias nos tecidos e no papel dessas plantas na epidemiologia da doença, fornecendo inóculo para cultivos subsequentes (BARAK et al., 2001; AL-SALEH et al., 2011; BULL et al., 2015).

Fry et al. (1990), avaliando três genótipos de uva, sendo eles resistente, tolerante e suscetível, observaram que as populações de *Xylella fastidiosa* aumentavam rapidamente no genótipo suscetível e gradualmente nos genótipos tolerantes e resistentes. Esse aumento rápido da população influenciou diretamente a expressão dos sintomas, entretanto foi observada uma população ligeiramente maior nas cultivares com algum grau de resistência. Segundo os autores, a concentração de inóculo pode ter levado a quebra da resistência.

Dados concretos e atuais sobre a expressão dos sintomas, epidemiologia e níveis populacionais de Cff em feijoeiros com diferentes níveis de resistência não estão disponíveis na literatura.

2.5 Atividade enzimática e compostos fenólicos como indicadores de resistência

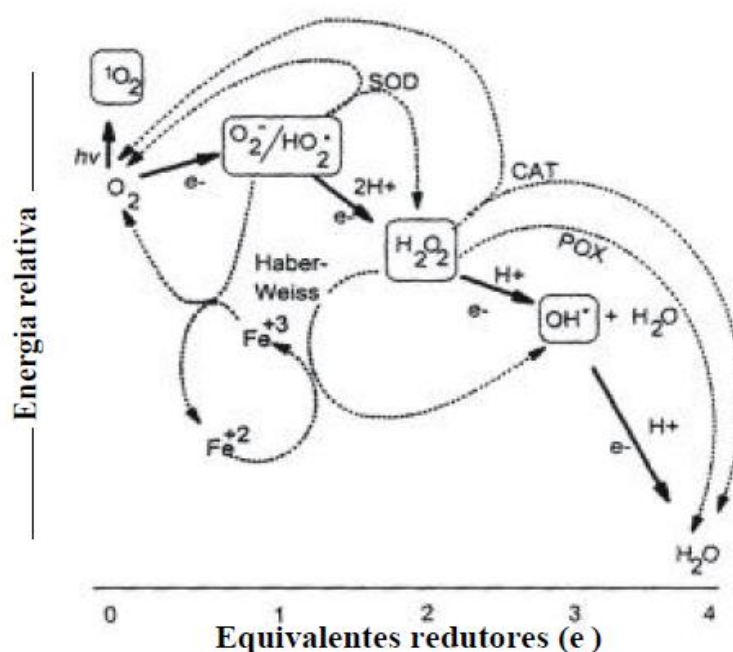
A infecção da planta por patógenos causa mudanças drásticas em seu metabolismo. No caso de uma colonização vascular, as células parenquimáticas são responsáveis pela elevação metabólica e acúmulo de diferentes proteínas e metabólitos secundários na seiva. Alguns desses compostos são as proteínas relacionadas à patogênese (PRP) do tipo 1, 2, 3, 4, e 5, peroxidases, proteases,

compostos fenólicos e fitoalexinas (COOPER et al., 1996; HILAIRE et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002; REP et al. 2003; HOUTERMAN et al., 2007; GAYOSO et al., 2010; BASHA et al., 2010). Esses compostos contribuem diretamente para a resistência das plantas (YADETA; THOMMA, 2014).

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. Nas interações incompatíveis entre patógeno e hospedeiros, os sistemas de defesa são rapidamente ativados levando à resistência. Essa ativação não ocorre ou é tardia em plantas suscetíveis, o que resulta em doença. As respostas de defesa geralmente resultam em colapso localizado das células pela produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) incluindo o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ e liberação de compostos fenólicos (HEGEDÜS et al., 2001).

O oxigênio molecular não é reativo e tóxico devido a estabilidade estrutural dos elétrons em sua camada externa. Porém, qualquer alteração nessa camada pode provocar sua ativação e consequente influência nos sistemas biológicos. As EROs são formadas por uma excitação no elétron externo formando oxigênio simples (1O_2) ou a sucessiva adição de elétrons produzindo $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$. São consideradas moléculas ativas pois não necessitam de energia extra para essa reação ocorrer (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Fluxo de elétrons durante a explosão oxidativa e rotas de conversão existente em plantas



Fonte: Resende et al., 2003.

Segundo Baker e Orlandi (1995), a produção de EROs ocorre em três fases após o contato do patógeno com a planta. A primeira fase é caracterizada pelo reconhecimento dos elicitores dos patógenos, que podem ser polissacarídeos, proteínas ou glicoproteínas. Esses elicitores, uma vez reconhecidos, disparam os eventos de transdução dos sinais. Na segunda fase, há um rápido aumento da atividade de enzimas antioxidativas, lipoxigenases e fitoalexinas. Nesta fase há o aumento da lignificação dos tecidos, porém os sintomas ainda não são visíveis. A terceira fase é caracterizada pelo desenvolvimento ou não da doença e dos sintomas.

A indução de EROs em células vegetais foi avaliada e separada em duas fases. A fase I é correspondente a uma resposta muito rápida após o contato (minutos) e de intensidade pouco duradoura. Essa fase, apesar de envolver a interação receptor-elictor, não pode ser relacionada às doenças, pois não é específica. Na segunda fase, a concentração de EROs aumenta e permanece constante por longos períodos podendo ser diretamente relacionada a resistência em plantas (DANGL et al., 2000).

Para resistir às condições de estresse, seja ele causado por patógenos ou condições ambientais desfavoráveis, as plantas utilizam sistemas de remoção de EROs, sendo eles, um enzimático e outro não enzimático. Os mecanismos enzimáticos são compostos pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalases (CAT), Peroxidases (POX), Polifenoloxidasas (PFO), Glutathione Peroxidase (GPX), Ascorbato Peroxidase (APX), Glutathione Redutase (GR) e Glutathione S-Transferases (GSTs). Os mecanismos não enzimáticos são formados por glutathione, ascorbato, tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides (SCANDALIOS, 2005).

A enzima SOD (EC 1.15.1.1) é a primeira a atuar em altas concentrações de EROs. Devido a impermeabilidade da membrana fosfolipídica a O_2^- , é crucial a atuação dessa enzima nos sítios de produção do radical. Seu metal cofator é o que determina sua classificação e localização podendo ser ele Ferro, Manganês ou Cobre/Zinco (Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD). As Fe-SOD estão alocadas no cloroplasto, Mn-SOD nas mitocôndrias e Cu/Zn-SOD nos cloroplastos, no citosol e nos espaços extracelulares (ALSCHER et al., 2002).

Segundo Babitha et al. (2002), diferentes padrões de indução da SOD foram observados em genótipos resistentes e suscetíveis de *Pennisetum glaucum* a *Sclerospora graminicola*. A atividade da SOD aumentou de duas a três vezes em

plantas resistentes após a inoculação. Este estudo também revelou a intensidade diferenciada das três formas de SOD em genótipos resistentes destacando a atividade da Cu/Zn-SOD como a mais envolvida na resistência.

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como aceptores de elétrons para catalisar um grande número de reações, reduzindo-o a água segundo a equação: “*2 Fenol doador + $H_2O_2 \rightarrow 2$ Radical Fenoxil do doador + H_2O* ”. Nas plantas, as principais peroxidases se encaixam na classe III com a função de remover o peróxido de hidrogênio dos cloroplastos e citosol, oxidação de compostos tóxicos, biossíntese de parede celular, catabolismo do ácido indolacético (AIA) e síntese de etileno, entre outras funções. A grande variabilidade de funções da peroxidase está relacionada a sua relativa falta de especificidade para substratos e ocorrência de grande variedade de isoenzimas (RE et al., 1994; SCHULLER et al., 1996).

Segundo Debouba et al. (2006), alterações na atividade das enzimas peroxidases ocorrem também devido ao ajuste osmótico das plantas em condições de estresse hídrico e a resposta dessas enzimas podem diferir entre espécies e cultivares submetidos a essas condições.

Em seu trabalho, Campos et al. (2004) avaliaram a influência das enzimas POX e PFO na resistência à antracnose de quatro cultivares de feijão. Plântulas de feijão foram induzidas com ácido salicílico e uma raça avirulenta do patógeno. Acréscimos nas atividades dessas enzimas foram maiores nos tratamentos com ácido salicílico e fungo indutor em todas as cultivares, sendo que as cultivares resistentes foram as que mais tiveram acréscimo na atividade enzimática. Foi constatado também, a correlação positiva entre as atividades da peroxidase e da polifenoloxidase, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose.

As polifenoloxidases (E.C. 1.14.18.1) são enzimas intracelulares contendo cobre no seu centro ativo e que catalisam dois tipos de reação envolvendo oxigênio. A primeira corresponde a hidroxilação de monofenóis para *orto*-difenois e a segunda à oxidação dos *orto*-difenois para *orto*-quinonas (GOMES et al., 2001).

Thipyapong et al. (2004) introduziram um cDNA anti-senso da PFO em plantas de tomate com a finalidade de suprimir a expressão do gene codificante dessa enzima. Houve um aumento significativo na suscetibilidade da planta à *Pseudomonas syringae* enquanto o crescimento e desenvolvimento da planta não foi afetado. Essas evidencias demonstram que esta enzima está diretamente

relacionada com a resistência em plantas pois quanto maior sua atividade, maiores as concentrações de produtos tóxicos de oxidação, conferindo resistência (AGRIOS, 2005)

O papel das PFO na resistência das plantas foi postulado desde os primeiros estudos, porém os mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados. Li e Steffens (2002) propuseram quatro formas de ação da PFO relacionadas a resistência: (1) As quinonas geradas pelas PFOs acelerariam a morte celular restringindo o avanço do patógeno; (2) redução da biodisponibilidade de proteínas para o patógeno; (3) ligações cruzadas de proteínas com quinonas e outros compostos fenólicos formando barreira física para o patógeno na parede celular e; (4) redução de quinonas a peróxido de hidrogênio e outras EROs tóxicas aos patógenos.

Os compostos fenólicos fazem parte de um grande grupo de compostos caracterizados por um anel aromático com ao menos uma hidroxila. São solúveis em água e ocorrem na forma de glicosídeos nos vacúolos celulares. São sintetizados pelas vias do ácido shiquímico e cinâmico, estando envolvidos na resistência das plantas à doenças com destaque aos compostos ácido clorogênico, ácido protocatecóico e catecol, floridizina e glicosídeos fenólicos (VIDYASEKARAN, 1988; STANGARLIN et al., 2011).

Segundo Nicholson e Hammerschmidt (1992), a liberação de compostos fenólicos por plantas atacadas por patógenos está associada com os mecanismos de defesa ativos e passivos das plantas. Nas interações, assim que o patógeno é reconhecido, a resposta fica caracterizada pelo rápido acúmulo de compostos fenólicos no local da infecção, limitando o desenvolvimento do patógeno pela morte celular devido a deposição de lignina (FERNANDEZ & HEATH, 1989).

Pela natureza da lignina e sua ligação covalente à parede celular, sua quantificação é dificultada em relação aos fenóis solúveis, porém suas características favorecem a reação histoquímica em observações diretas ao microscópio de tecidos infectados. Reagentes como floroglucinol-HCl e azul de toluidina são eficientes para determinar a localização da deposição desse composto (LEWIS; YAMAMOTO, 1990; VANCE et al., 1980).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Foi utilizado o isolado de Cff, FEIJ-2634, pertencente à coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, FCA-UNESP, Botucatu. Para os ensaios de colonização de cultivares por Cff, foi utilizado o isolado FEIJ-2634-4, um variante espontâneo do isolado anterior, resistente a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina, obtido segundo a metodologia descrita por Weller e Saettler (1978). Os isolados foram mantidos por aproximadamente 48h a 28°C, em meio de cultura NSA (extrato de carne: 3g, peptona: 5g, sacarose: 5g, ágar bacteriológico: 15g e água destilada q.s.p. 1l) e quando necessário, o ao meio foi acrescido 100 mg.L⁻¹ de rifampicina. Os isolados foram preservados sob diferentes métodos tais como: cultura sob óleo mineral, liofilização, dessecação em tiras de papel e a -80°C em meio nutriente líquido (70%) – glicerol (30%), em ultrafreezer.

3.2 Local dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos em vasos sob ambiente de estufa, estrutura tipo arco, coberto por filme de polietileno transparente de baixa densidade (PEBD), no Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, município de Botucatu, SP, nas coordenadas geográficas aproximadas de 22,85 latitude sul e 48,44 longitude oeste com altitude em torno de 900 metros. O clima local é do tipo mesotérmico, subtropical úmido com pluviosidade média anual em torno de 1320 mm e temperaturas médias de 21°C. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Departamento de Proteção Vegetal, UNESP/FCA, Botucatu, SP.

3.3 Cultivares de feijoeiro

Foram utilizados as cultivares de feijoeiro IAC Carioca e Pérola, suscetíveis à murcha-de-curtobacterium e; IAC Diplomata, IPR Corujinha e IAC Carioca Alvorada, resistentes à murcha-de-curtobacterium, conforme Maringoni et al. (2015) (Quadro 1). As sementes foram pré-germinadas em papel "Germitest" umedecido em água destilada, por 48 horas, e após a emissão da radícula, transplantadas para vasos de 2 ou de 10 L contendo substrato com a adubação recomendada para a cultura baseada na análise de solo, conforme o ensaio conduzido.

Quadro 1 - Principais características das cultivares de feijoeiro utilizadas nos ensaios

Cultivar	Porte	Grupo Comercial	Peso de mil sementes	Ciclo	Reação a Cff ¹
IAC Alvorada ²	Semi-ereto	Carioca	300g	92 dias	R
IAC Diplomata ²	Ereto	Preto	240g	92 dias	R
IPR Corujinha ³	Ereto	Pintado	220g	87 dias	R
IAC Carioca ⁴	Semi-ereto	Carioca	230g	90 dias	S
Pérola ⁵	Semi-ereto	Carioca	270g	90 dias	S

¹Maringoni et al, 2015; ²Carbonell et al., 2008; ³IAPAR, 2009; ⁴Almeida et al., 1971; ⁵Yokoyama et al., 1999

3.4 Avaliação da severidade da murcha-de-curtobacterium

A severidade da murcha-de-curtobacterium foi avaliada segundo a escala proposta por Maringoni (2002) em que: 0- sem sintomas da doença; 1- sintomas de mosaico nas folhas; 2- poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% da planta); 5- aproximadamente 25% das folhas apresentam murcha e amarelecimento; 7- aproximadamente 50% das folhas apresentando murcha, amarelecimento, necrose de folíolos e nanismo; 9- aproximadamente 75% ou mais de folhas murchas e/ou necrose, queda prematura das folhas, nanismo severo e/ou morte das plantas. A partir das notas obtidas, foi calculada a área abaixo da curva de progressão da doença pela seguinte equação: $AACPD = \sum (Y_i + Y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ti}$, onde Y_i e Y_{i+1} representam os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações (SHANER; FINNEY, 1977).

3.5 Confirmação da identidade dos isolados recuperados, por PCR

Após a instalação de todos os ensaios, foram amostradas plantas ao acaso para confirmação da identidade do isolado utilizado. As amostras foram submetidas a isolamento em meio de cultura NSA e colônias com características de Cff foram submetidas à análise de PCR, com os iniciadores específicos CffFOR2 (5'- GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC -3') e CffREV4 (5'- GAT GTT CCC GGT GTT CAG - 3') (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002).

O DNA dos isolados foi extraído em uma suspensão a 10^8 UFC.mL⁻¹, submetida a 95 °C/15 min, seguida por resfriamento a 4°C. Cada reação da PCR foi composta por 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 0,5 µL de cada iniciador, 8,5 µL de água e 3,0 µL de DNA. A reação foi submetida a 94 °C por 3 min, para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 45 s,

72 °C por 30 s. e incubadas por 10 min a 72 °C para extensão final. Os DNAs amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose à 1% (p/v) em tampão TBE 1X (90 mM Tris; pH 8,3; 90 mM de ácido bórico e 0,1 mM EDTA), acrescido do corante brometo de etídio (2 µL/100 mL). Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP, CA). Os resultados estão expressos no Apendice 1.

3.6 Colonização de cultivares de feijoeiro por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Foram conduzidos dois ensaios durante os meses de dezembro a janeiro de 2014 e 2015. Sementes livres da bactéria das diferentes cultivares (Quadro 1) foram semeadas em vasos de 3 litros de capacidade, com substrato autoclavado. Foram utilizados cinco vasos por cultivar com quatro plantas cada, inoculadas aos dez dias após a germinação por punção no caule, entre o nó cotiledonar e o primeiro par de folhas verdadeiras, com agulha entomológica umedecida em uma porção da colônia bacteriana. Plantas puncionadas apenas com água destilada esterilizada foram utilizadas como controle negativo.

Para a inoculação empregou-se o isolado FEIJ-2634-4, resistente a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina e com características de colônias e patogenicidade ao feijoeiro idênticas ao isolado selvagem. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI).

Para a avaliação da colonização das plantas, foi realizada a quantificação de células bacterianas por grama de tecido. Fragmentos do 1º entrenó foram coletados das plantas aos 7 DAI, fragmentos do 1º e 2º entrenós aos 14 DAI, fragmentos do 1º, 2º e 3º entrenós aos 21 DAI e fragmentos do 1º, 2º, 3º e 4º entrenós aos 28 DAI. Os fragmentos foram pesados e macerados em Tampão PBS (NaCl: 8g; KCl: 0,2g; Na₂HPO₄: 2,9g; KH₂PO₄: 0,2g; água destilada q.s.p. 1L) 100mM, pH 7,0, na proporção de 1:10 p/v. A suspensão resultante foi diluída (10⁰ a 10⁻⁵) no mesmo tampão e 100 µL de cada diluição foi semeada em meio de cultura Nutriente-água acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina (3 placas/diluição/repetição). As placas permaneceram em estufa bacteriológica por 48 horas, a 28°C. Colônias semelhantes a Cff foram quantificadas e os resultados obtidos transformados em log₁₀ UFC.g⁻¹ de tecido fresco.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso no esquema fatorial 5x2 (cinco cultivares de feijoeiro e dois tratamentos) com 5 repetições e 4 plantas úteis por parcela. Para este fim, cada vaso foi considerado como uma unidade experimental. Os resultados foram submetidos às análises de variância individual de cada ensaio seguidas da análise de variância conjunta. A análise de variância conjunta foi realizada pelo modelo de efeitos aleatórios para cultivares, para ensaio e para interação de cultivares x ensaio. Para avaliação da homogeneidade das variâncias residuais utilizou-se a razão entre o maior e menor quadrado médio residual dos ensaios. Por meio do teste $F_{\max}$, as variâncias foram consideradas homogêneas quando a razão foi menor que 7,0 (PIMENTEL-GOMES, 1990). Após a verificação da significância da interação, as médias de $\text{Log}_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ de tecido fresco das cultivares foram submetidas ao teste de agrupamento de Tukey a 95% de confiabilidade, em cada um dos ensaios, a fim de verificar o agrupamento diferencial entre cultivares.

3.7 Matéria seca da parte aérea de cultivares de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Foram conduzidos dois ensaios nos períodos de 01 a 02/2015 e 07 a 08/2017. As plantas foram cultivadas em vasos de 3 litros de capacidade e inoculadas com agulha entomológica umedecida em colônia bacteriana do isolado FEIJ-2634, aos 10 DAE, conforme descrito no item 3.6. Como controle, as plantas foram puncionadas apenas com água destilada.

Trinta dias após a inoculação, (estádio R5), a parte aérea das plantas foi coletada, lavada com água destilada e secas separadamente em estufa com circulação de ar forçada a 65°C até atingirem peso constante para determinação da incorporação de matéria seca.

O experimento foi conduzido com o delineamento experimental em blocos ao acaso no esquema fatorial 5X2 sendo cinco cultivares de feijoeiro (Quadro 1) e dois tratamentos (controle e inoculado), com 15 repetições e 3 plantas úteis por parcela. Para este fim, considerou-se cada vaso como uma parcela experimental. O dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade com auxílio do software Assistat (AZEVEDO, 2016).

3.8 Atividade enzimática, quantificação de proteínas e fenóis totais de cultivares de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Sementes das cinco cultivares de feijoeiro (Quadro 1) foram pré-germinadas e após três dias, transplantadas para vasos com três litros de substrato autoclavado composto de pela mistura de terra, substrato Plantmax® e areia grossa na proporção de 1:1:1, acrescido de 500g de calcário dolomítico, 1 kg de adubo mineral 4-14-8 para cada m³ de mistura.

Após 10 dias após a emergência, as plantas foram inoculadas por punção no caule com alfinete entomológico contendo uma porção da colônia bacteriana, conforme o item 3.6. Plantas puncionadas apenas com água foram utilizadas como controle negativo. A coleta das amostras foi realizada a 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 e 336 horas após inoculação.

Foi adotado nas unidades experimentais os tratamentos correspondentes às cinco cultivares e nove momentos de coletas (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 horas e 7 e 14 dias após inoculação), com 45 tratamentos e cinco repetições, totalizando 225 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso com três plantas cada. O controle consistiu em plantas puncionadas apenas com água.

3.8.1 Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar

Para a realização das análises, foram amostradas folhas completamente expandidas do terço médio das plantas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e colocadas imediatamente no gelo até serem transportadas ao laboratório para pesagem, processamento e armazenamento.

3.8.2 Obtenção dos extratos vegetais

As amostras de folhas (100mg) foram tratadas com nitrogênio líquido e trituradas com auxílio de almofariz e pistilo, em 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (KH₂PO₄: 13,61 g; K₂HPO₄: 17,42 g; água destilada: q.s.p. 1L), pH 6,7. O extrato obtido foi centrifugado a 12.000g, durante 25 minutos, a 4°C, e o sobrenadante usado para a determinação da concentração de proteínas e das atividades das enzimas: peroxidase (POD), polifenoloxidase (PFO) e superóxido dismutase (SOD).

3.8.3 Atividade da peroxidase

A atividade da POX (EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método descrito por Allain et al. (1974) e modificado por Lima et al. (1999). Para tal, 1,0 mL do sobrenadante foi usado como fonte de enzima em tubos de ensaio, acrescidos de 0,5 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30% em tampão fosfato de potássio (0,2M, pH 6,7) e 0,5 mL de solução aquosa de fenol-aminoantipirina (1,63 mg.L^{-1} de fenol + 0,813 mg.L^{-1} de aminoantipirina). Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C e após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de etanol P.A.. Os tratamentos considerados como controle da reação receberam os mesmos reagentes e tratamentos, porém, ao invés de extrato vegetal, receberam tampão fosfato. A leitura da absorbância da reação resultante foi realizada em espectrofotômetro (505 nm) e os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína ($\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína).

3.8.4 Atividade da polifenoloxidase

A atividade da PFO (EC 1.14.18.1) foi determinada pelo método descrito por Kar e Mishra (1976) e modificado por Lima et al. (1999). Para tal, 0,3 mL do extrato vegetal foi usado como fonte de enzima em tubos de ensaio, juntamente com 1,85 mL de solução de catecol (pyrocatechol 0,1 M em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,7). Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C, durante 30 minutos. Os tratamentos considerados como controle da reação receberam os mesmos reagentes e tratamentos, porém, ao invés de extrato vegetal, receberam tampão fosfato. A reação foi interrompida pela adição de 0,8 mL de solução aquosa de ácido perclórico 2N. A leitura da absorbância da reação foi realizada em espectrofotômetro (395 nm) e os resultados expressos em $\mu\text{mol catecol oxidado}.\text{min}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína ($\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína).

3.8.5 Atividade da superóxido-dismutase

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pelo método descrito por Beauchamp e Fridovich (1973), avaliando a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) para formazana azul, em um meio de reação composto por 13,0 mM de metionina, 100 μM de EDTA, 75 μM de NBT e 2,0 μM de riboflavina, em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8). Para tal, foi adicionado 50 μL de extrato vegetal a 3 mL da solução descrita acima.

A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos de ensaio em câmara composta por duas lâmpadas fluorescentes (15W), a 25°C. Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da iluminação. Os tubos considerados como controle receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, isto é, protegidos da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi determinada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em U. μg^{-1} de proteína.

3.8.6 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais presentes nos extratos foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976) em curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB), variando de 0 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para tal, 100 μL de extrato vegetal foi adicionado a 5 mL de reagente de Bradford (coomassie brilliant blue G-250: 100 mg; etanol: 50 mL; ácido ortofosfórico 85%: 100 mL; água destilada: q.s.p. 1L). A concentração de proteínas, foi expressa em termos de equivalentes μg de ASB por grama de amostra (μg proteína.g de tecido fresco⁻¹).

3.8.7 Quantificação de fenóis totais

Amostras de tecido vegetal foram trituradas em nitrogênio líquido. Deste material, 500 mg foram transferidos para tubo "falcon" de 15 mL e homogeneizados com 5,0 mL de acetona 50% e submetidos a banho ultrassônico por 20 minutos, em temperatura ambiente. O extrato obtido foi centrifugado a 12.000g por 10 minutos e o sobrenadante coletado. Ao precipitado foi adicionado 5,0 mL de acetona 50% novamente procedeu-se o banho ultrassônico e centrifugação, como descrito. O sobrenadante resultante foi coletado e adicionado ao coletado anteriormente.

Os compostos fenólicos totais foram determinados pela adição de 150 μL do extrato obtido a 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se então 2,5 mL de Na_2CO_3 1M em solução aquosa, sendo homogeneizado e mantido por 10 min em temperatura ambiente. À mistura foi adicionado 0,9 mL de água destilada e mantida a temperatura ambiente por uma hora. Para o controle da reação (branco), o extrato

vegetal foi substituído por acetona 50%. A absorbância da reação foi aferida a 725 nm e os valores de absorbância calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em mg de fenois.g de tecido seco⁻¹.

3.8.8 Análise dos dados

Os dados obtidos foram transformados em área abaixo da curva para cada repetição e submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial 5 x 2 (cinco cultivares e dois tratamentos sendo controle e inoculado) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade com auxílio do software Assistat (AZEVEDO, 2016). Para adequação à normalidade dos dados, os resultados referentes a atividade da POX foram transformados em $\sqrt{x}$.

3.9 Avaliação das características agronômicas em cultivares de feijoeiro infectados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Foram conduzidos três ensaios durante os seguintes períodos: Ensaio I: 01 a 03/2015 (correspondente a safra da seca); Ensaio II: 04 a 06/2016 (correspondente a safra de inverno) e; Ensaio III: 07 a 09/2017 (correspondente a safra das águas). Sementes livres da bactéria das diferentes cultivares (Quadro 1) foram semeadas em vasos de 10 litros de capacidade, com substrato autoclavado.

Para avaliação da severidade, o delineamento experimental foi Inteiramente Casualizado, com 6 repetições, 5 cultivares de feijoeiro e dois tratamentos (controle e inoculado) e 3 plantas úteis por parcela. Para este fim, considerou-se cada vaso como uma parcela experimental. A condução das plantas foi feita em estaca de bambu e para o controle de pragas e doenças foram feitas pulverizações regulares com agrotóxicos registrados para a cultura.

Aos dez dias após a emergência (DAI), as plantas foram inoculadas por punção no caule com alfinete entomológico contendo uma porção da colônia bacteriana conforme descrito anteriormente, no item 3.6. Plantas puncionadas apenas com água foram utilizadas como controle negativo. A avaliação da severidade ocorreu aos 07, 14, 21, 28 e 35 DAI segundo a escala proposta por Maringoni (2002). A partir das notas obtidas, foi calculada a área abaixo da curva de progressão da doença com auxílio do software SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.systatsoftware.com).

As plantas foram mantidas até a produção das sementes que foram colhidas manualmente, secas em estufa a 30°C e armazenadas sob refrigeração. Para fins de avaliação das características agronômicas, foram contabilizados o número de vagens por planta, o número de grãos por vagem e o peso de cem grãos para cada cultivar inoculada e respectivo controle não-inoculado. Neste caso, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com tratamentos arranjados em esquema fatorial 5 x 2 (cinco cultivares e dois tratamentos sendo controle e inoculado).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade com auxílio do software Assistat (AZEVEDO, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Colonização de cultivares de feijoeiro por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os resultados da análise de variância conjunta evidenciaram a interação significativa ($p < 0,05$) entre cultivares e ensaios para a expressão dos sintomas da doença, indicando que as condições específicas nos dois ensaios influenciaram nos resultados obtidos (Tabela 1). No ensaio II, as cultivares apresentaram notas de severidade maiores que no primeiro. Durante a realização dos Ensaio I e II, as temperaturas máximas e mínimas registradas foram de 31,3°C, 13,7°C e; 34,6°C e 12,8°C respectivamente. As médias de umidade relativa do ar foram de 64% e 71% para os ensaios I e II, respectivamente.

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progressão da murcha-de-curtobacterium (AACPD) nos dois ensaios de colonização de cultivares por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Cultivares	Ensaio I	Ensaio II
IAC Alvorada	17,25 cB*	52,57 cA
IAC Diplomata	12,53 cB	28,25 dA
IPR Corujinha	16,33 cA	19,78 dA
IAC Carioca	41,26 bB	99,26 aA
Pérola	64,41 aB	82,71 bA
CV (%)	22,46	

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados da concentração de bactérias por grama de tecido fresco estão expressos na Tabela 2. Foi observado que a concentração de bactérias por grama de tecido se apresentou maior nas condições do segundo ensaio. Aos 7 DAI, as plantas apresentavam apenas o primeiro entrenó. A interação não foi significativa entre os ensaios ($p < 0,05$), mas sim para os fatores isolados. As médias da concentração bacteriana foram maiores para o ensaio II. As cultivares IAC Alvorada e IAC Diplomata apresentaram as menores médias de população bacteriana enquanto IPR Corujinha, IAC Carioca e Pérola não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 2 - Concentração de bactéria nos tecidos (Log_{10} UFC.g tecido⁻¹) para cinco cultivares em dois ensaios realizados em 2014 e 2015 inoculadas ou não com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Cultivar	1º Entrenó									
	7 DAI			14 DAI		21 DAI		28 DAI		
	Ens. 1	Ens. 2	Média	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Média
IAC Alvorada	6,68	8,75	7,71 a	6,18 cB	10,18 aA	6,65 bB	10,60 aA	7,53	10,09	8,81 bc
IAC Diplomata	6,89	8,85	7,87 ab	4,86 dB	9,19 aA	4,07 cB	8,54 bA	4,87	6,36	5,62 d
IPR Corujinha	6,85	8,78	7,81 b	6,68 bcB	9,20 aA	7,31 abB	9,34 abA	6,83	9,81	8,32 c
IAC Carioca	8,33	9,35	8,84 b	7,56 abB	9,80 aA	6,89 bB	10,64 aA	7,86	10,98	9,42 ab
Pérola	8,26	9,88	9,07 b	8,50 aB	10,32 aA	8,47 aB	10,50 aA	8,97	11,44	10,22 a
Média	7,40 b	9,12 a		-	-	-	-	7,21 b	9,73 a	
CV (%)	11,27			8,03		9,45		9,23		
2º Entrenó										
IAC Alvorada	-	-	-	5,77 cB	10,02 aA	6,33 bB	10,30 aA	7,33	10,00	8,67 b
IAC Diplomata	-	-	-	4,71 cB	9,16 aA	3,46 cB	8,76 bA	4,64	6,28	5,46 c
IPR Corujinha	-	-	-	6,50 bcB	8,59 aA	7,13 bB	10,15 abA	7,85	9,87	8,86 b
IAC Carioca	-	-	-	8,05 abB	10,06 aA	7,74 abB	10,85 aA	7,42	10,86	9,14 b
Pérola	-	-	-	8,46 aB	10,20 aA	8,63 aB	10,80 aA	8,82	11,78	10,3 a
Média	-	-		-	-	-	-	7,21 b	9,76 a	-
CV (%)	-			12,32		9,44		9,89		
3º Entrenó										
IAC Alvorada	-	-	-	-	-	5,38 bB	10,94 abA	7,06	9,85	8,46 b
IAC Diplomata	-	-	-	-	-	2,92 cB	7,93 cA	4,08	6,71	5,39 c
IPR Corujinha	-	-	-	-	-	7,81 aB	9,49 bcA	7,58	9,77	8,67 b
IAC Carioca	-	-	-	-	-	8,21 aB	10,79 abA	7,85	10,07	8,96 b
Pérola	-	-	-	-	-	8,63 aB	11,27 aA	9,04	12,09	10,56 a
Média	-	-		-	-	-	-	7,12 b	9,69 a	
CV (%)	-			-		10,73		12,90		

Continua...

...Continuação da Tabela 2.

								28 DAI		
								4º Entrenó		
IAC Alvorada	-	-	-	-	-	-	-	6,81	10,33	8,57 b
IAC Diplomata	-	-	-	-	-	-	-	4,41	6,30	5,36 c
IPR Corujinha	-	-	-	-	-	-	-	7,37	9,41	8,39 b
IAC Carioca	-	-	-	-	-	-	-	7,36	11,26	9,31 ab
Pérola	-	-	-	-	-	-	-	8,82	12,09	10,45 a
Média	-	-	-	-	-	-	-	6,95 b	9,88 a	
CV (%)	-	-	-	-	-	-	-		13,52	

*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Ens. 1 – Realizado de Dezembro a Janeiro de 2014

Ens. 2 – Realizado de Dezembro a Janeiro de 2015.

Aos 14 DAI a planta apresentava o 1º e 2º entrenós. No ensaio I, as cultivares Pérola e IAC Carioca obtiveram as maiores concentrações de bactéria nos tecidos enquanto IAC Alvorada apresentou as menores concentrações no 2º entrenó, juntamente com IAC Diplomata que apresentou baixa concentração nos 1º e 2º entrenós. No segundo ensaio, as cultivares não apresentaram diferenças significativas na população bacteriana aos 14 DAI.

Vinte e um dias após a inoculação, a cultivar IAC Diplomata apresentou os menores níveis de população bacteriana nos tecidos em comparação às outras cultivares em todos os entrenós. No ensaio I, primeiro entrenó, Pérola e IPR Corujinha apresentaram os maiores níveis populacionais, não diferindo entre si. IAC Alvorada e Carioca também apresentaram níveis estatisticamente similares. Para o segundo entrenó, IAC Carioca e Pérola apresentaram as maiores populações e IAC Alvorada e IPR Corujinha populações intermediárias, também não diferindo entre si. No terceiro entrenó, IPR Corujinha, IAC Carioca e Pérola apresentaram altas populações, não diferindo entre si. Durante o segundo ensaio, para primeiro e segundo entrenós, IAC Alvorada, IAC Carioca e Pérola apresentaram altas populações. No terceiro entrenó, no entanto, a população da cultivar Pérola era a maior e IAC Carioca e Alvorada não diferiram entre si.

Aos vinte e oito dias após a inoculação, a interação não foi significativa entre os ensaios, porém significativa para os fatores isolados. A cultivar Pérola apresentou a maior população bacteriana para todos os entrenós, IPR Corujinha apenas apresentou baixas populações no primeiro entrenó enquanto que não diferiu das cultivares IAC Alvorada, IAC Carioca nos demais entrenós. A cultivar IAC Diplomata apresentou as menores populações em todos os entrenós.

Os resultados demonstraram que Cff foi capaz de colonizar os tecidos de feijoeiro independentemente do nível de resistência à doença. As cultivares IAC Carioca e Pérola, que apresentaram maior severidade da murcha-de-curtobacterium, foram as que apresentaram a maior população bacteriana em seus tecidos. Resultados semelhantes foram relatados por (SILVA; LOPES, 1995), relacionando o aumento populacional com a alta severidade da pinta-bacteriana, incitada por *P. syringae* pv. *tomato* em cultivares suscetíveis de tomateiro. Para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e outras bactérias, os níveis populacionais aumentam após a inoculação independentemente do genótipo hospedeiro, sendo porém menor

em cultivares resistentes (COOK, 1966; COYNE; SCHUSTER; HILL, 1973; EKPO, 1976).

Os mecanismos que conferem resistência às cultivares de feijoeiro que apresentaram menores níveis populacionais de Cff ainda não foram completamente elucidados. Chand e Walker (1964), propuseram que na interação entre *P. syringae* pv. *lachrymans* e pepino, a resistência estaria relacionada à limitação de nutrientes essenciais, presença de inibidores pré-formados ou induzidos pela ação da bactéria ou ainda por outros fatores.

Neste trabalho ficou claro que as cultivares resistentes possuem mecanismos capazes de limitar a multiplicação da bactéria em seus tecidos, impedindo seu deslocamento e até mesmo, contornar os danos causados pela colonização desta. Souza e Maringoni (2008), observaram que cultivares resistentes à murcha-de-curtobacterium apresentaram projeções protoplasmáticas para o interior dos vasos de xilema, sugerindo tiloses que podem obstruir os vasos de xilema e restringir a colonização pela bactéria. A formação de tiloses e deposições de celulose podem ter feito com que as cultivares resistentes não apresentassem altas populações de Cff.

Os resultados obtidos diferiram parcialmente dos de Maringoni et al. (2015), onde não foi constatada a colonização por Cff na base do 1º, 2º e 3º trifólio na cultivar IAC Diplomata enquanto para as cultivares IAC Carioca e Pérola a bactéria colonizou todos os trifólios avaliados. Como visto, a população bacteriana é dependente das condições ambientais às quais a planta é exposta. Neste trabalho foi possível observar que IAC Diplomata possui níveis populacionais inferiores a todas as cultivares avaliadas, o que pode explicar a não detecção da bactéria em ensaios anteriores.

Considerando o melhoramento para a resistência à murcha-de-curtobacterium, a simples relação entre severidade da doença e resistência de cultivares, pode não ser tão eficaz. A escolha de uma cultivar que apresente baixa severidade da doença e alta colonização dos tecidos pode fazer com que a cultura aumente substancialmente o inóculo de Cff em uma área de produção, haja visto que esta bactéria pode apresentar longos períodos de sobrevivência em solo, em restos de cultura e em plantas hospedeiras (SILVA-JÚNIOR et al., 2012; GONÇALVES et al., 2016).

4.2 Matéria seca da parte aérea de cultivares de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Durante a realização dos ensaios I e II, as temperaturas máximas e mínimas foram 35,6°C e 13,6°C e; 29,8°C e 10,7°C respectivamente. As cultivares IAC Carioca e Pérola apresentaram maior redução em matéria seca da parte aérea em relação às cultivares resistentes (tabela 3). De maneira geral, a presença de Cff fez com que houvesse uma redução significativa da incorporação de massa.

Tabela 3 - Matéria seca das cinco cultivares de feijoeiro frente a inoculação com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Cultivar	Ensaio I		Ensaio II		Redução (%)
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	
IAC Alvorada	2,04*	1,54	2,44	1,92	21,61
IAC Diplomata	1,71	1,43	2,81	2,38	15,68
IPR Corujinha	2,25	1,86	3,12	2,48	17,39
IAC Carioca	1,97	1,23	3,63	2,61	30,37
Pérola	2,03	1,52	2,72	1,98	26,31
Média	1,99 a**	1,52 b	2,94 a	2,27 b	-
CV (%)	21,74		22,39		-

*Médias expressas em g. planta⁻¹

**As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

A presença da bactéria nos vasos condutores pode ter feito com que estes não desempenhem sua função de forma adequada, restringido o suprimento de água e nutrientes. A falta de água prejudica diretamente a respiração e fotossíntese, a incorporação de carbono e nutrientes, diminuindo, consequentemente, a massa da parte aérea.

Os resultados aqui obtidos são semelhantes aos propostos por Maringoni (2002). Foram observadas reduções na ordem de 69,2% a 80,7% nas cultivares IAC Carioca e Pérola enquanto as cultivares resistentes apresentaram redução na ordem de 44,1% a 50,7% na matéria seca da parte aérea. As diferenças obtidas neste trabalho podem estar relacionadas com a agressividade do isolado utilizado e com a época de instalação dos ensaios. Muniz et al. (1991) correlacionaram positivamente a diminuição do teor de matéria seca com a severidade da antracnose em feijão jalo, concluindo que o aumento da severidade fez com que os teores de matéria seca diminuíssem drasticamente.

A temperatura é fator determinante do estabelecimento, crescimento e desenvolvimento, podendo influenciar diretamente na matéria seca das plantas. A ocorrência de temperaturas superiores a 30/32 °C podem influenciar negativamente no desenvolvimento da parte aérea e positivamente na multiplicação da bactéria nos tecidos (GONÇALVES; WREGE; CARAMORI, 1997; JÚNIOR et al., 2007).

4.3 Atividade enzimática, quantificação de proteínas e fenóis totais de cultivares de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os valores da área abaixo da curva da concentração de proteínas e fenóis totais em função do tempo estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Área abaixo da curva da concentração de proteínas e fenóis totais em cinco cultivares de feijoeiro inoculadas ou não com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Cultivar	Proteínas Totais**		Fenóis Totais**	
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado
IAC Alvorada	9,14.10 ³ aB*	1,07.10 ⁴ bA	2,46.10 ⁵ aB	4,27.10 ⁵ bA
IAC Diplomata	9,16.10 ³ aB	1,17.10 ⁴ aA	2,43.10 ⁵ aB	3,39.10 ⁵ cA
IPR Corujinha	7,41.10 ³ cB	9,43.10 ³ cA	2,56.10 ⁵ aB	3,35.10 ⁵ cA
IAC Carioca	8,43.10 ³ bB	1,09.10 ⁴ bA	2,33.10 ⁵ aB	3,18.10 ⁵ cA
Pérola	8,66.10 ³ bA	9,06.10 ³ cA	2,04.10 ⁵ bB	4,61.10 ⁵ aA
CV (%)	5,13		6,41	

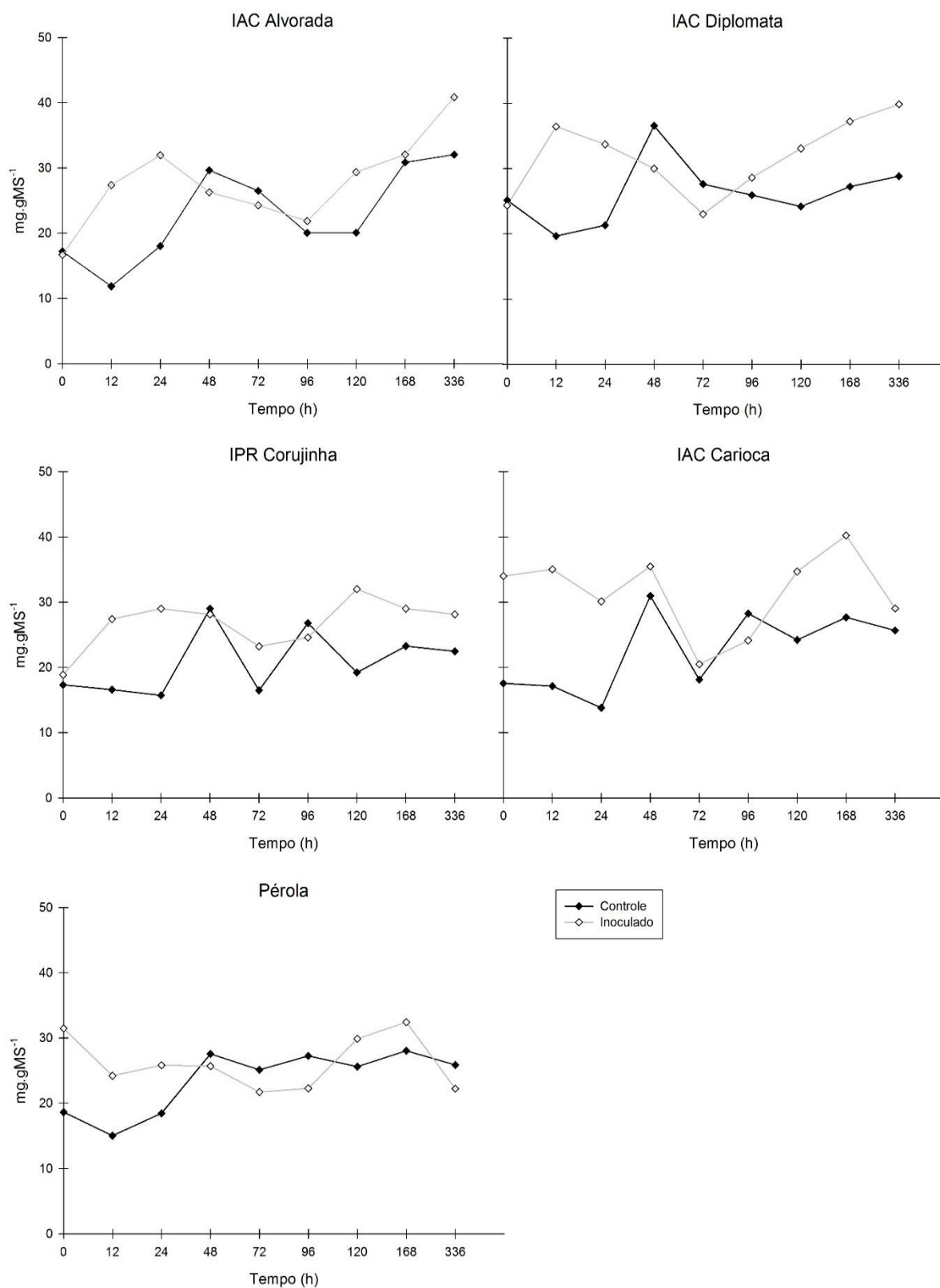
*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

**Os dados estão expressos em mg.gMS⁻¹

A concentração de proteínas e fenóis totais foi significativamente maior ($p < 0,05$) para os tratamentos inoculados, com exceção da cultivar Pérola, que não apresentou alterações nos níveis de proteínas entre tratamento controle e inoculado. Quando inoculadas, as cultivares IAC Alvorada e IAC Diplomata e IAC Carioca apresentaram os maiores teores de proteínas totais (Figura 2).

Diversos autores ressaltam a importância das proteínas nos mecanismos de resistência (LEVINE et al., 1994; VAN DER BIEZEN; JONES, 1998; TAKKEN; TAMELING, 2009). O aumento da concentração de proteínas pode estar relacionado à reação de resistência das cultivares, porém a conclusão não é definitiva, uma vez que outros fatores como a concentração bacteriana nos tecidos pode influenciar diretamente nos resultados obtidos.

Figura 2 - Variação do teor de proteínas totais nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação



*Os valores estão expressos em miligramas por grama de massa seca (mg.gMS⁻¹).

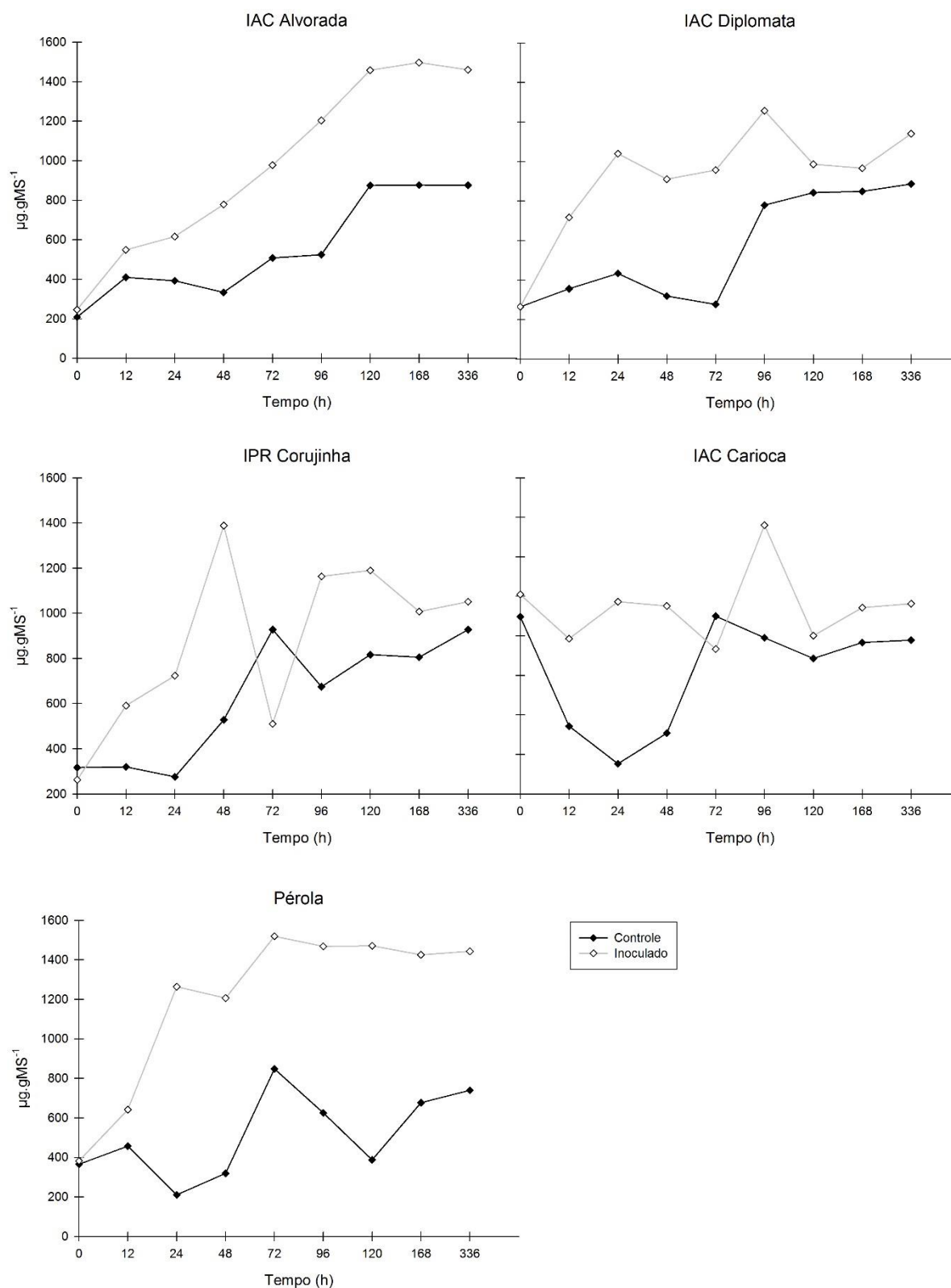
Quanto a fenóis totais, com exceção da cultivar Pérola que apresentou a menor concentração no tratamento controle, as outras cultivares não diferiram entre si. Nos tratamentos inoculados com Cff, houve aumento significativo da concentração nos tecidos e os maiores teores foram apresentados pelas cultivares Pérola e IAC Alvorada (Figura 3).

Os compostos fenólicos desempenham papel essencial na formação de barreiras para deter o avanço da colonização bacteriana pelos tecidos. O aumento observado nos tratamentos inoculados, sendo mais expressivo nas cultivares resistentes pode estar diretamente relacionado a esses, o que pode explicar também a menor concentração de bactérias nos tecidos. Por outro lado, o acúmulo de compostos fenólicos torna-se prejudicial à planta. Uma vez que, a expressão das enzimas que utilizam esses compostos como substrato, a exemplo das peroxidase e polifenoloxidasas, seja baixa ou esteja prejudicada pela colonização, a planta torna-se incapaz de eliminar esses compostos vindo a entrar em colapso.

Segundo Campos et al. (2004), avaliando resistência de feijoeiro quanto a antracnose, teores elevados de fenóis podem ser atribuídos à oxidação de polímeros e pela ação das enzimas polifenoloxidasas, após o estímulo de indução pelo patógeno. Neste sentido, torna-se importante o papel da lignina nas reações de resistência pois é a primeira resposta à infecção. Em sequência, ocorre o acúmulo de deposições na parede celular, como papilas mediadas por ácidos benzoicos e fenilpropanóides (NIEMANN et al., 1991).

Entre as enzimas avaliadas, a atividade da SOD obteve a maior variação entre as cultivares (Tabela 5). IAC Alvorada e Pérola, quando inoculadas, apresentaram aumento na atividade desta enzima. As cultivares IAC Diplomata e IPR Corujinha não apresentaram diferença e a cultivar Pérola obteve decréscimo e sua atividade. Como característica das cultivares, foi observado que as cultivares IAC Carioca e Pérola, apresentaram menor atividade desta enzima, comparada às resistentes, mesmo quando não inoculadas (Figura 4).

Figura 3 - Variação do teor de fenóis totais nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação



*Os valores estão expressos em microgramas por grama de massa seca (µg.gMS⁻¹).

Tabela 5 - Área abaixo da curva da atividade da Superóxido-dismutase, polifenoloxidase e peroxidase em cinco cultivares de feijoeiro inoculadas ou não com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Cultivar	Superóxido-dismutase**	
	Controle	Inoculado
IAC Alvorada	1,11.10 ⁵ aB*	1,29.10 ⁵ aA
IAC Diplomata	9,00.10 ⁴ bA	9,03.10 ⁴ cA
IPR Corujinha	1,08.10 ⁵ aA	1,08.10 ⁵ bA
IAC Carioca	7,87.10 ⁴ cA	5,45.10 ⁴ dB
Pérola	7,50.10 ⁴ cB	8,93.10 ⁴ cA
CV (%)	7,56	
Cultivar	Polifenoloxidase***	
	Controle	Inoculado
IAC Alvorada	108,31 aB	199,6 aA
IAC Diplomata	110,32 aB	128,60 bA
IPR Corujinha	114,78 aB	137,20 bA
IAC Carioca	102,24 aA	110,12 cA
Pérola	101,73 aB	130,51 bA
CV (%)	8,40	
Cultivar	Peroxidase***	
	Controle	Inoculado
IAC Alvorada	1,87.10 ⁻² aB	3,90.10 ⁻² aA
IAC Diplomata	1,57.10 ⁻² bB	3,23.10 ⁻² bA
IPR Corujinha	1,80.10 ⁻² aB	2,93.10 ⁻² cA
IAC Carioca	1,52.10 ⁻² bB	2,28.10 ⁻² dA
Pérola	1,31.10 ⁻² bB	1,82.10 ⁻² eA
CV (%)	8,77	

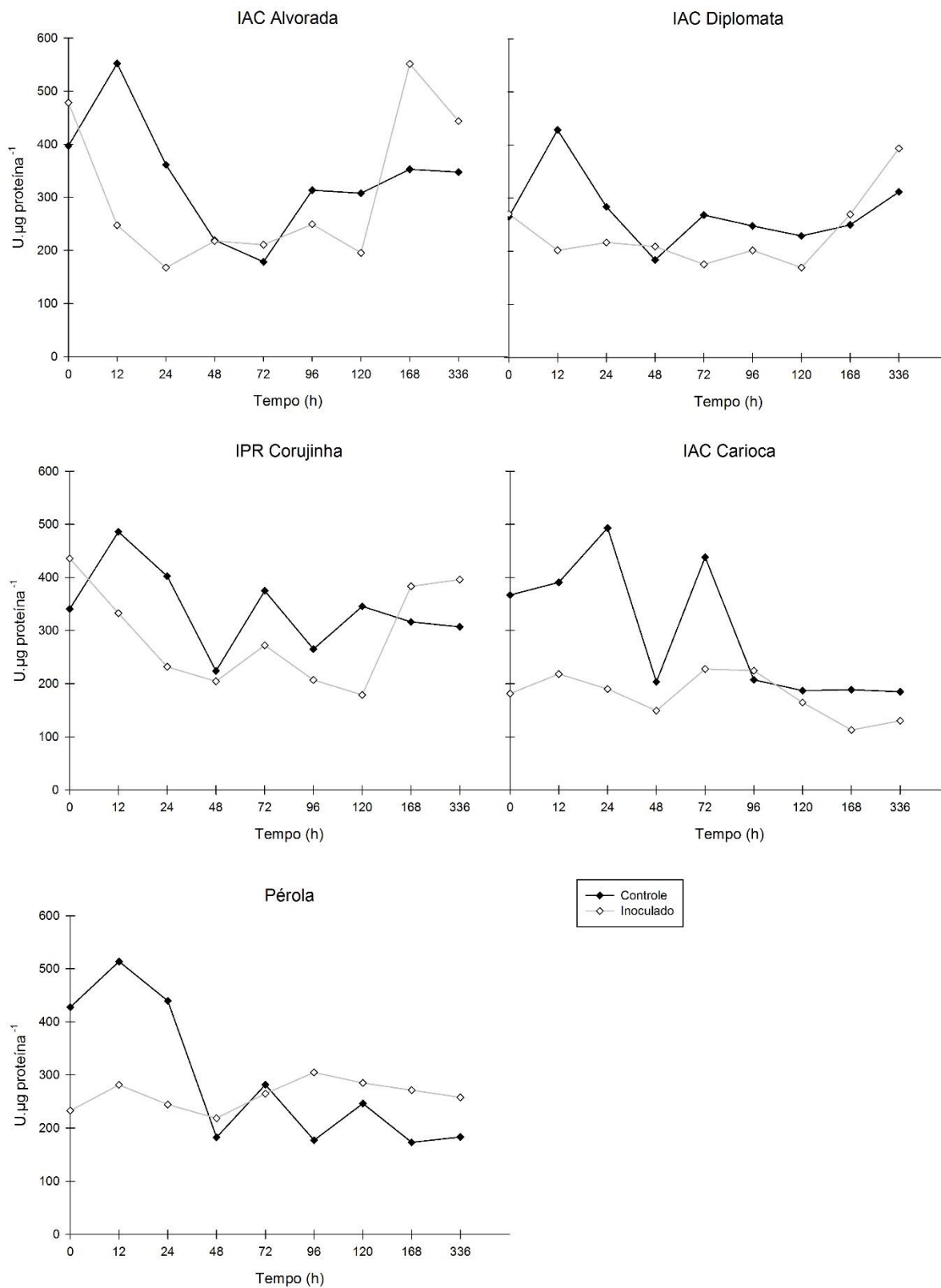
*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

**Valores expressos em U.µg proteína⁻¹

***Valores expressos em µKat.µg proteína⁻¹

A atividade da SOD neste estudo apresentou tendência a um aumento não significativo em plantas inoculadas. Estes aumentos foram amplamente discutidos (CROFT; VOISEY; SLUSARENKO, 1990; EL-MOSHATY et al., 1993; POZO et al., 2002). Em cultivares resistentes de morangueiro, o aumento da atividade da SOD é expressivo em relação às cultivares suscetíveis (EHSANI-MOGHADDAM et al., 2008). Porém, de acordo com Buonauro et al.(1987), a atividade desta, está diretamente relacionada à formação de O₂⁻, que por sua vez, têm suas concentrações elevadas na formação de lesões necróticas. Possivelmente, a atividade aumentaria com o aparecimento dos sintomas da murcha-de-curtobacterium, o que não foi avaliado nesse ensaio.

Figura 4 - Variação da atividade da SOD nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação



*Os valores estão expressos em Unidades de enzima por micrograma de proteína (U.µg proteína⁻¹).

A produção de grandes quantidades de O_2^- foi demonstrada em tecidos de tubérculos de batata infectados com *Phytophthora infestans* (DOKE, 1983). No presente estudo, não foi avaliada a concentração de O_2^- em folhas de feijão inoculadas e controle, portanto não foi possível a comparação direta entre a atividade da SOD e O_2^- nos tecidos infectados.

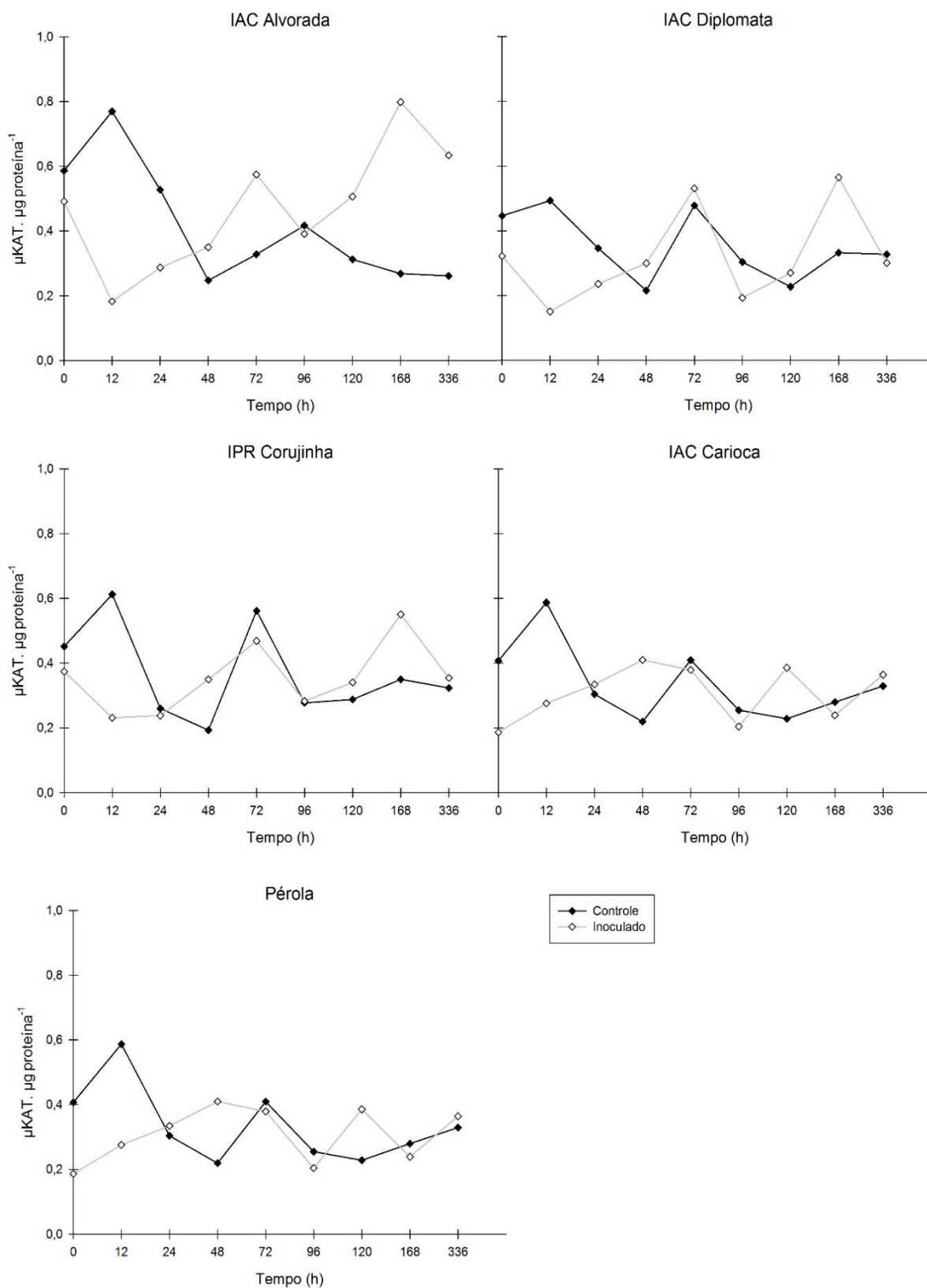
Os resultados obtidos para a SOD evidenciaram também, maior atividade nas cultivares resistentes porém a relação desta enzima com resistência não é clara, uma vez que as plantas inoculadas não apresentaram atividade significativamente aumentada em relação ao controle, com exceção da IAC Alvorada, entretanto Pérola também apresentou esse aumento. Provavelmente a diferença obtida entre as cultivares é resultante apenas das características genéticas de cada material.

As cultivares, exceto IAC Carioca, apresentaram aumento na atividade PFO quando inoculadas. A atividade enzimática não variou entre as cultivares na ausência da bactéria. A maior resposta foi da cultivar IAC Alvorada, seguida pelas cultivares IPR Corujinha, Pérola e IAC Diplomata. O menor valor de atividade desta enzima, foi da cultivar IAC Carioca, quando inoculada (Figura 5).

Wheatley (1982), afirma que a atividade das polifenoloxidasas aumenta a hidroxilação de monofenóis para fenóis complexos como o-difenóis e a consequente oxidação destes para quinonas. As quinonas possuem ação microbiana e seus complexos proteínados atuam como barreira física para patógenos, impedindo a colonização das plantas por estes (KOSUGE, 1969; MUELLER; BECKMAN, 1974).

Agrios (2005), comentou maior atividade das polifenoloxidasas em tecidos infectados de plantas resistentes do que em plantas suscetíveis ou sadias, assim como Kavitha e Umesha (2008), demonstraram atividade aumentada desta mesma enzima em tomateiros após a inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Sua atividade na resistência das cultivares IAC Alvorada, IAC Diplomata e IPR Corujinha à Cff provavelmente está relacionada a sua capacidade de oxidação de fenóis, transformando-os em substâncias com maior poder microbiano e sua atuação em barreiras estruturais que impedem a colonização das plantas pela bactéria.

Figura 5 - Variação da atividade da PFO nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação



*Os valores estão expressos em microkatal por micrograma de proteína ($\mu\text{Kat}.\mu\text{g proteína}^{-1}$).

A atividade da POX para as cultivares inoculadas foi maior nas plantas inoculadas em relação ao controle. Na ausência da bactéria, as cultivares IAC Alvorada e IPR Corujinha apresentaram maior atividade que as demais. Uma vez inoculadas, as cultivares IAC Alvorada, IAC Diplomata e IPR Corujinha apresentaram maior atividade desta enzima que as cultivares IAC Carioca e Pérola (Figura 6).

O aumento na atividade das peroxidases, destacando-se após 120 DAI nas cultivares resistentes, pode estar relacionado à resistência destas à Cff. A atuação desta enzima é justamente sobre a molécula de H_2O_2 , resultante da atividade da SOD, transformando esta em água, eliminando assim, os efeitos tóxicos para a célula (BARBOSA et al., 2014).

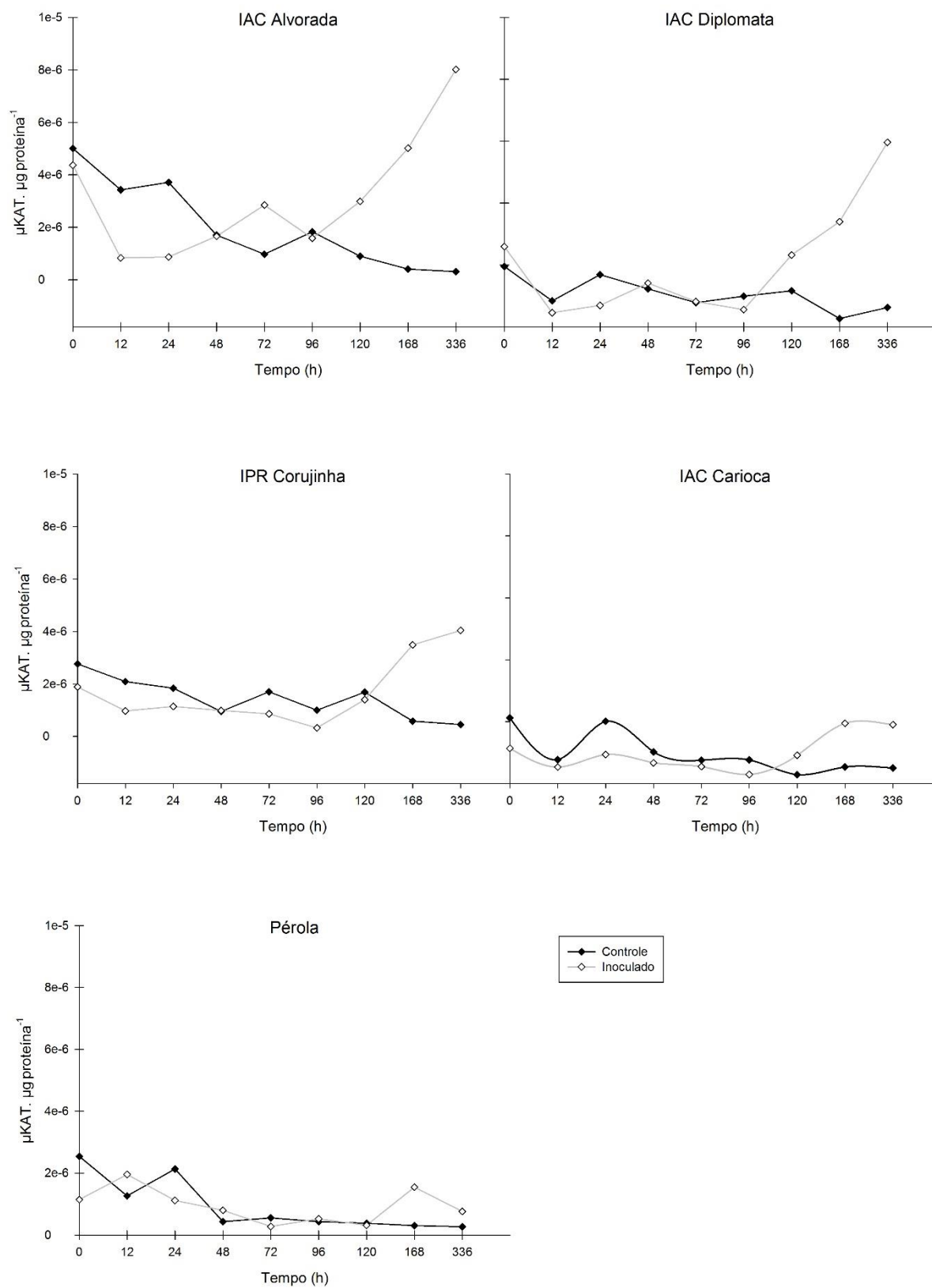
As cultivares resistentes apresentaram correlação positiva significativa entre SOD e POX (IAC Alvorada: 0,766; IAC Diplomata: 0,833 e; IPR Corujinha: 0,691), correlação negativa para IAC Carioca (0,858) e não houve correlação para Pérola (-0,089) evidenciando que a resistência e suscetibilidade das cultivares testadas está diretamente ligada a capacidade de detoxificação das EROs geradas durante a infecção por Cff.

A resistência das cultivares em relação à peroxidase, pode estar relacionada ao aumento da biossíntese de lignina, uma vez que esta atua como barreira à infecção bacteriana, dificultando a colonização da planta. A atividade da enzima também pode promover aumentos na concentração de produtos derivados de fenóis tornando o meio tóxico a Cff e promovendo a cicatrização dos tecidos pela produção da AIA oxidase (MARRIOTT; BEEN; PERKINS, 1978).

O aumento da POX como resultado da infecção para diferentes patossistemas foi amplamente documentado (RUDOLPH; STAHMANN, 1964; LIMA; BRASIL; OLIVEIRA, 1999; HILAIRE et al., 2001; GAYOSO et al., 2010). Nos patossistemas estudados, a enzima tem um aumento em sua atividade, em relação aos controles. Mazzafera et al.,(1989) evidenciaram aumento da atividade da POX em cultivar resistente de cafeeiro a *Meloidogyne incognita*, enquanto em plantas suscetíveis esse aumento não foi evidenciado.

CAMPOS et al. (2004), ao avaliarem a resistência de cultivares de feijoeiro a *Colletotrichum lindemuthianum*, verificaram que há diferenças na atividade enzimática da POX em relação às cultivares resistentes ou suscetíveis à antracnose, à semelhança dos resultados obtidos neste estudo

Figura 6 - Variação da atividade da POX nas cinco cultivares de feijoeiro avaliadas ao decorrer das horas após a inoculação



* Os valores estão expressos em microkatal por micrograma de proteína (μKat.μg proteína⁻¹)

4.4 Avaliação das características agrônômicas em cultivares de feijoeiro infectados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os resultados referentes à reação das cultivares frente a murcha-de-curtobacterium encontram-se na tabela 6. As temperaturas máximas e mínimas registradas em casa-de-vegetação foram, respectivamente, de: Ensaio I: 34,6°C e 12,8°C; Ensaio II: 29,2°C e 6,4°C e; Ensaio III: 31,7°C e 9,5°C. Destaca-se a comparação entre cultivares resistentes e suscetíveis quanto ao tamanho da planta aos 21 dias após a inoculação e a severidade dos sintomas nas cultivares suscetíveis (Figura 7).

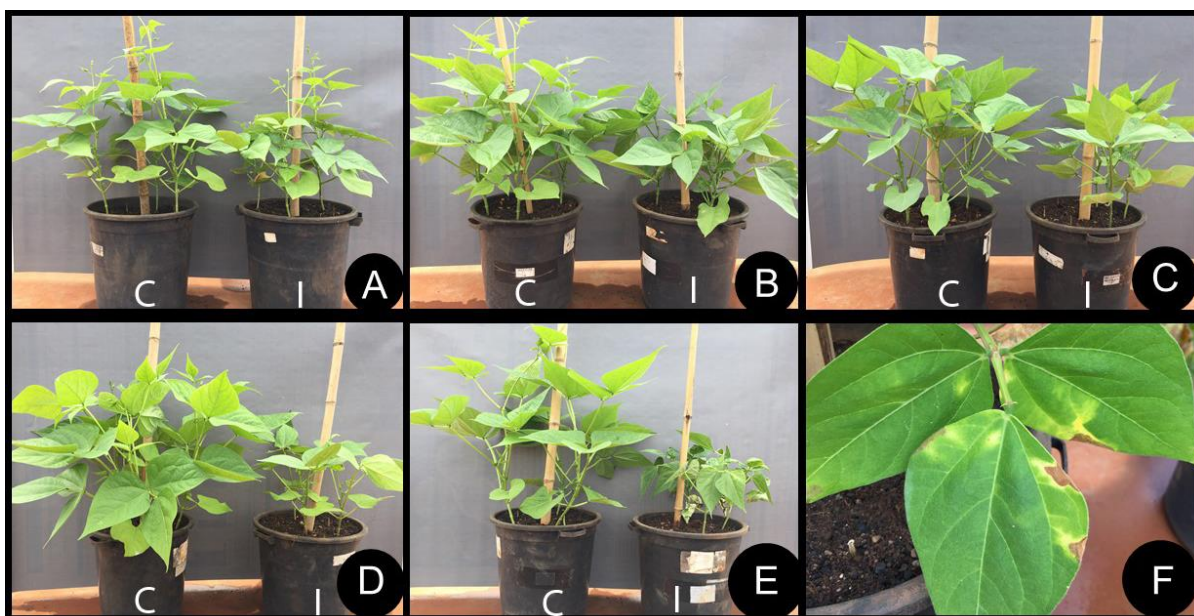
Tabela 6 - Área abaixo da curva de progressão da murcha-de-curtobacterium em três ensaios realizados em diferentes épocas

Cultivares	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	Reação**
IAC Alvorada	78,950 b*	42,19 b	57,57 b	R
IAC Diplomata	62,03 b	23,92 c	48,88 b	R
IPR Corujinha	29,75 c	31,01 c	32,71 b	R
IAC Carioca	194,83 a	129,88 a	148,72 a	S
Pérola	179,66 a	123,86 a	186,00 a	S
CV (%)	22,85	17,25	19,34	-

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

** (Maringoni et al., 2015)

Figura 7- Reação das cultivares a murcha-de-curtobacterium aos 21 DAI



*A: IAC Alvorada, B: IAC Diplomata; C: IPR Corujinha; D: IAC Carioca e; E: Pérola. F: Detalhe dos sintomas de queima de borda foliar causado por Cff.

Nos três ensaios, as cultivares IAC Alvorada, IAC Diplomata e IPR Corujinha, foram consideradas resistentes em comparação aos resultados de AACPD observados nas cultivares IAC Carioca e Pérola ($p < 0,05$), tidas como padrões de suscetibilidade, segundo a relação proposta por Maringoni et al. (2015).

Os resultados do número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de 100 grãos para os três ensaios conduzidos estão expressos na Tabela 7. Em relação a produtividade, as cultivares suscetíveis foram extremamente afetadas pela doença com danos expressivos de produtividade. A doença fez com que as características agronômicas avaliadas fossem significativamente diferentes ($p < 0,05$) das cultivares resistentes em todos os ensaios. As cultivares resistentes (IAC Alvorada, IAC Diplomata e IPR Corujinha) apresentaram pouca variação das características quando inoculadas. Na condição de ausência da doença, nos três ensaios conduzidos, notou-se que a cultivar Pérola é a que possui o melhor rendimento em relação a massa de grãos, seguida pela cultivar IAC Alvorada. O número de vagens por planta não diferiu entre as cultivares com exceção da cultivar IAC Carioca que apresentou um menor número no ensaio II.

Houve redução significativa no número de vagens por planta apenas nas cultivares suscetíveis, quando inoculadas, reduções estas na ordem de 90% para a cultivar Pérola. Embora a diferença não foi significativa, as cultivares IAC Alvorada e IPR Corujinha apresentaram aumento no número de vagens nas plantas inoculadas nos três ensaios.

O parâmetro número de grãos por vagens sofreu a maior variação entre os ensaios realizados. No ensaio I e II não foi observado diferenças significativas entre cultivares resistentes, mas sim entre essas e as cultivares suscetíveis, quando inoculadas, exceto para IAC Carioca que não diferiu o número de vagens das cultivares resistentes. No ensaio III foi observado a redução nas médias gerais na presença da bactéria, destacando-se maior redução para a cultivar Pérola. Todas as cultivares apresentaram redução em relação ao controle.

O fator massa dos 100 grãos seguiu o mesmo padrão do número de vagens por plantas. Houve diferenças significativas das cultivares suscetíveis para as cultivares resistentes na presença da bactéria. As cultivares suscetíveis apresentaram redução drástica da massa dos grãos, com maior evidência na cultivar Pérola. IAC Diplomata e IPR Corujinha não apresentaram reduções para este fator.

Tabela 7 - Características agronômicas de cultivares resistentes e suscetíveis de feijoeiro inoculadas ou não com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em três ensaios em diferentes épocas

Vagem por Planta										
Cultivares	Ensaio I		Ensaio II		Ensaio III		Média	Média Controle	Média Inoc.	Redução (%)
	Controle	Inoc.	Controle	Inoc.	Controle	Inoc.				
IAC Alvorada	9,33 aA*	10,32 aA	11,11 aA	12,05 bA	10,54 aA	10,37 aA	-	10,33	10,91	-5,68
IAC Diplomata	7,33 aA	7,14 aA	11,25 aA	10,69 bA	11,38 aA	6,07 bB	-	9,99	7,97	20,23
IPR Corujinha	9,27 aA	8,05 aA	12,36 aA	14,08 aA	10,54 aA	10,72 aA	-	10,72	10,95	-2,11
IAC Carioca	6,94 aA	1,61 bB	9,11 bB	6,27 cB	10,04 aA	3,77 bB	-	8,70	3,88	55,35
Pérola	6,77 aA	0,00 bB	11,77 aA	0,78 dB	10,72 aA	1,17 cB	-	9,75	0,65	93,34
CV (%)	36,49		18,61		24,75			-	-	-
Número de grãos por vagem										
IAC Alvorada	3,59 aA	2,81 bA	5,15 aA	4,34 aA	4,54	2,73	3,63 a	4,43	3,29	25,60
IAC Diplomata	3,77 aA	3,96 aA	4,85 aA	4,74 aA	4,37	3,89	4,14 a	4,33	4,20	3,08
IPR Corujinha	3,39 aA	2,85 bA	5,32 aA	4,05 aB	4,89	3,39	4,15 a	4,53	3,43	24,34
IAC Carioca	4,13 aA	1,57 cB	5,35 aA	4,64 aA	4,39	3,71	4,05 a	4,62	3,31	28,48
Pérola	2,74 aA	0,00 dB	5,09 aA	1,49 bB	3,39	1,68	2,53 b	3,74	1,06	71,75
Média	3,52	2,24	5,15	3,85	4,31 a	3,08 b	-	-	-	-
CV (%)	31,13		18,14		29,83			-	-	-
Massa de 100 grãos										
IAC Alvorada	23,20 bA	22,35 aA	27,39 aA	28,39 aA	22,56 bA	20,73 bA	-	24,38	23,82	2,30
IAC Diplomata	22,48 bA	22,09 aA	21,31 bA	27,78 bA	20,90 bA	20,55 bA	-	21,56	23,47	-8,86
IPR Corujinha	22,06 bA	21,55 aA	22,99 bA	22,55 bA	20,70 bB	28,40 aA	-	21,92	24,17	-10,27
IAC Carioca	22,51bA	1,29 bB	24,52 bA	20,37 bB	20,54 bA	15,52 cB	-	22,52	12,39	44,98
Pérola	27,86 aA	0,00 bB	27,63 aA	7,78 cB	24,40 aA	8,37 bD	-	26,63	5,38	79,78
CV (%)	18,25		15,23		17,05			-	-	-

*Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Estes ensaios demonstraram que cultivares resistentes são menos afetadas frente a murcha-de-curtobacterium em comparação à cultivares suscetíveis, levando-se em consideração o objetivo da cultura, ou seja, a produção. Além da interação patógeno-hospedeiro, fica demonstrado que fatores externos influenciam diretamente a doença. É sabido que em doenças incitadas por bactérias, a umidade relativa do ar, temperatura e incidência da radiação solar podem favorecer ou inibir a infecção, colonização e expressão dos sintomas pelas plantas (AGRIOS, 2005). Advém disto, a variação de resultados encontrados para um mesmo patossistema. Cultivares que apresentam reação caracterizada como resistência para determinados ambientes, podem muitas vezes ser suscetíveis em outros. Dessa forma a escolha da cultivar para o plantio em determinadas áreas é primordial para o sucesso da cultura.

Os resultados de resistência observados para as três cultivares e a suscetibilidade das cultivares IAC Carioca e Pérola corroboram o que foi proposto por Carbonell et al. (2008) e Maringoni et al.(2015) e discordam parcialmente ao que foi proposto pela Comissão Técnica Sul-Brasileira de Feijão, uma vez que esta considera a cultivar IPR Corujinha como moderadamente resistente a murcha-de-curtobacterium (FEIJÃO, 2012).

Poucos trabalhos disponíveis na literatura discutem danos na produção causada pela murcha-de-curtobacterium uma vez que a grande maioria deles abordam a reação das cultivares levando em consideração apenas a progressão da doença. Miranda Filho (2006) demonstrou perdas de até 68% na cultivar Pérola, em condições de campo. Os danos na produção foram ocasionadas pelo menor peso de sementes e pelas perdas relativas ao aborto dos grãos, porém não foi constatada a redução do número de vagens por plantas, o que diferiu dos ensaios conduzidos nesse trabalho, onde foram observados danos em todos os fatores avaliados.

Por sua vez, Maringoni (2002) considerou também a redução de massa da parte área das plantas, esta chegando até a 80% em cultivares suscetíveis como Pérola e IAC Carioca. Esta redução pode estar diretamente ligada a produção uma vez que a planta até 40 dias após a germinação acumula nutrientes para a posterior formação de vagens e grãos (ARAUJO, 1996).

A relação entre resistência e produção foi amplamente discutida e, segundo alguns autores, a relação entre a severidade da doença e a produção é incerta, uma vez que a severidade não fornece estimativas quanto ao tamanho e a duração da área foliar da planta e insolação por esta absorvida, o que resultará diretamente na

produção. Levando essa premissa em consideração, plantas com mesma severidade e diferentes valores de área foliar podem apresentar potenciais distintos de produção (WAGGONER; BERGER, 1987).

De acordo com Adams (1967), o programa de melhoramento não pode levar em consideração apenas a reação da cultivar ou variedade à doença, uma vez que fatores como condições ambientais e de solo também estão envolvidas. Características ligadas à produção devem ser considerados pois de maneira geral, a somatória deles determina qual é a melhor cultivar para cada caso em questão.

As características vagem por planta, número de sementes por vagem e peso médio de sementes estão intimamente relacionados à resistência. De acordo com Castoldi (1991) o aumento de um desses componentes pode levar a diminuição de outro. Dessa forma, concordando com o trabalho de Vieira et al. (1999) deve-se identificar um material com uma combinação ótima de todos os componentes avaliados que finalmente resultará em uma produção adequada.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos aqui conduzidos, pode-se concluir que:

- a)** Os níveis populacionais de Cff variaram entre cultivares de feijoeiro resistentes e suscetíveis, porém todas foram colonizadas pela bactéria;
- b)** Cultivares resistentes e suscetíveis de feijoeiro responderam bioquimicamente de forma diferente frente à infecção por Cff. A resistência das cultivares avaliadas está intimamente ligada à expressão das enzimas antioxidantes, com destaque à peroxidase e polifenoloxidasas;
- c)** A infecção feijoeiros por Cff reduziu o desenvolvimento da parte aérea e, conseqüentemente, a produção das plantas em cultivares suscetíveis (IAC Carioca e Pérola), quando comparadas às resistentes (IAC Alvorada, IAC Diplomata e IPR Corujinha).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. W. Basis of yield component compensation in crop plants with special reference to the field bean, *Phaseolus vulgaris*. **Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 505–510, 1967.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. [s.l.] Elsevier Academic Press Burlington, MA, 2005. v. 5
- AKIBA, F. et al. Murcha bacteriana do feijão vagem: doença nova para o Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 379, 1980.
- AL-SALEH, M. A. et al. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on different plant species and management of bacterial leaf spot of lettuce under greenhouse conditions. **Crop Protection**, v. 30, n. 7, p. 883–887, 22 ago. 2011.
- ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–475, 1974.
- ALMEIDA, L. DE; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. Características do feijão carioca, um novo cultivar. **Bragantia**, v. 30, p. 33–38, 1971.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 2002.
- ARAUJO, R. S. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. [s.l.] Potafos, 1996.
- BABITHA, M. P. et al. Differential induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet. **Plant Pathology**, v. 51, n. 4, p. 480–486, 2002.
- BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual review of phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 299–321, 1995.
- BARAK, J. D.; KOIKE, S. T.; GILBERTSON, R. L. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. **Plant disease**, v. 85, n. 2, p. 169–178, 2001.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.
- BASHA, S. M.; MAZHAR, H.; VASANTHAIAH, H. K. N. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 3, p. 932–944, 2010.
- BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 317, n. 1, p. 50–64, 1973.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. [s.l.] CAB international, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BULL, C. T. et al. Host Genotype and Hypersensitive Reaction Influence Population Levels of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in Lettuce. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 316–324, 2015.

BUONAURO, R.; DELLA TORRE, G.; MONTALBINI, P. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 31, n. 2, p. 173–184, 1987.

CABI, E. **Curtobacterium flaccumfaciens** pv. **flaccu** - CORBFL_ds.pdfEPPO Quarantine pest, 1982. Disponível em: <https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/bacteria/CORBFL_ds.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2016

CAMPOS, Â. D. et al. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004a.

CAMPOS, Â. D. et al. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004b.

CARBONELL, S. A. M. et al. IAC-Alvorada and IAC-Diplomata: new common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 163–166, 2008.

CASTOLDI, F. L. **Análises das interrelações entre rendimento e diversas características agrônômicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. [s.l.] Viçosa–MG, 1991.

CHAND, J. N.; WALKER, J. C. Inheritance of resistance to angular leafspot of cucumber. **Phytopathology**, v. 54, n. 1, p. 51, 1964.

CONAB, C. N. DE A. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_10_09_09_03_07_boletim_graos_outubro_2015.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2016

COOPER, R. M. et al. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. **Nature**, v. 379, n. 6561, p. 159–162, 1996.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L.; HILL, K. Genetic control of reaction to common blight bacterium in bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by plant age and

bacterial multiplication. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 98, n. 1, p. 94–99, 1973.

CROFT, K. P. C.; VOISEY, C. R.; SLUSARENKO, A. J. Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 49–62, 1990.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; THOMAS, H. Senescence and programmed cell death. **Biochemistry and molecular biology of plants**, p. 1044–1100, 2000.

DEBOUBA, M. et al. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 12, p. 1247–1258, 2006.

DELGADO SALINAS, A. O. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. 1985.

DOKE, N. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. **Physiological Plant Pathology**, v. 23, n. 3, p. 359–367, 1983.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. Produção de feijão. **Guaíba: agropecuária**, v. 2, p. 19–20, 2000.

EHSANI-MOGHADDAM, B. et al. Regulation of superoxide dismutase isoforms in resistant and susceptible strawberry cultivars subjected to leaf spot disease. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 41, n. 7, p. 492–500, 2008.

EKPO, E. J. A. Pathogenic Variation in Common (*Xanthomonas phaseoli*) and Fuscous (*Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*) Bacterial Blights of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). 1976.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 109–119, 1993.

EMBRAPA, E. B. DE P. A. **Cultivo do Feijoeiro Cultivo do Feijoeiro Comum: Características da cultura**, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em: 24 ago. 2016

FEIJÃO, C. T. S. B. DE. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região-Sul brasileira**. Florianópolis: [s.n.].

FERNANDEZ, M. R.; HEATH, M. C. Interactions of the nonhost French bean plant (*Phaseolus vulgaris*) with parasitic and saprophytic fungi. III. Cytologically detectable

responses. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 3, p. 676–686, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
FAOSTAT, [s.d.]. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 21 ago. 2016

FRANC, G. D. **Bacterial diseases of beans**. [s.l.] Cooperative Extension Service, University of Wyoming, 1998.

FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D.; OTHERS. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v. 80, n. 1, p. 61–65, 22 ago. 1990.

GAYOSO, C. et al. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GOMES, M. R. A. et al. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 69–72, 2001.

GONÇALVES, R. M. et al. Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt. **European Journal of Plant Pathology**, n. November, p. 1–9, 2016.

GONÇALVES, S. L.; WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H. Probabilidade de ocorrência de temperaturas superiores a 30 C no florescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), cultivado na safra das águas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia, Santa Maria**, v. 5, n. 1, p. 99–107, 1997.

GOODWIN, P. H.; SOPHER, C. R.; MICHAELS, T. E. Multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and intercellular enzyme activities in resistant and susceptible beans. **Journal of Phytopathology**, v. 143, n. 1, p. 11–15, 1995.

HALL, R.; NASSER, L. C. B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, n. 2, p. 176–185, 1996.

HARVESON, R. M.; SCHWARTZ, H. F. Bacterial diseases of dry edible beans in the Central High Plains. **Plant Health Prog [serial on the Internet]**, 2007.

HAYWARD, A. C. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 65–87, 1991.

HEDGES, F.; OTHERS. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **American Association for the Advancement of Science**.

Science, v. 55, p. 433–434, 1922.

HEDGES, F.; OTHERS. Bacterial wilt of Beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 1926.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, v. 160, n. 6, p. 1085–1093, 2001.

HILAIRE, E. et al. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 12, p. 1411–1419, 2001.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 155–177, 1990.

HOUTERMAN, P. M. et al. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 2, p. 215–221, 2007.

HSIEH, T. F. et al. Resistance of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Bacterial Wilt Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 4, p. 245–249, 2005.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 1055–1061, 2007.

IAPAR. **IPR Corujinha**, 2009. Disponível em: <<http://www.iapar.br/pagina-1363.html>>

JÚNIOR, L. H. et al. Resposta de cultivares de feijão à alta temperatura do ar no período reprodutivo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1543–1548, 2007.

JÚNIOR, T. A. F. S. et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 331–337, 2012.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1976.

KAVITHA, R.; UMESHA, S. Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato. **Phytoparasitica**, v. 36, n. 2, p. 144–159, 2008.

LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583–593, 1994.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 455–496, 1990.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, v. 215, n. 2, p. 239–247, 2002.

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. DE. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 1, p. 21–25, 1999.

LOBO, V. L. DA S.; LOPES, C. A.; GIORDANO, L. DE B. Resistance components to bacterial spot and growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T2, in tomato genotypes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, 2005.

MALAVOLTA, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa phytopatológica**, v. 34, n. FEV, p. 9–87, 2008.

MARINGONI, A. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, 2002.

MARINGONI, A. C. **Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-Curtobacterium**. [s.l.] Faculdade de Ciências Agronômicas-Universidade Estadual Paulista“ Júlio de Mesquita Filho.”, 2000.

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

MARINGONI, A. C. et al. Reaction and colonization of common bean genotypes by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 87–93, 2015.

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

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

MARRIOTT, J.; BEEN, B. O.; PERKINS, C. The aetiology of vascular discoloration in cassava roots after harvesting: association with water loss from wounds. **Physiologia plantarum**, v. 44, n. 1, p. 38–42, 1978.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J. A. R. Phenols, peroxidase and polyphenoloxidase in the resistance of coffee to *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, v. 48, n. 2, p. 131–142, 1989.

MIRANDA-FILHO, R. J.; RESENDE, A. M.; UESUGI, C. H. Efeito dos níveis de infecção por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* na produção de feijão cultivar Pérola. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 62, 2005.

MIRANDA FILHO, R. J. DE. **Perda de Produtividade em feijoeiro comum cultivar Pérola causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2006.

MOHAN, S. K. Ocorrência de fogo selvagem causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* nos feijoeiros do Paraná. **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, v. 1, p. 296–297, 1982.

MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Ultrastructure of the phenol-storing cells in the roots of banana. **Physiological Plant Pathology**, v. 4, n. 2, p. 187IN5189-188IN7190, 1974.

MUNIZ, M. DE F. S. et al. Influência da nutrição com cálcio sobre a antracnose em feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 2025–2031, 1991.

MUTLU, N. et al. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. **Plant disease**, v. 92, n. 4, p. 546–554, 2008.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369–389, 1992.

NIEMANN, G. J. et al. Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stems. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 38, n. 6, p. 417–432, 1991.

O feijão está mais caro; entenda por quê. EBC, 2016. Disponível em: <<http://www.ebc.com.br/noticias/economia/2016/06/entenda-por-que-o-feijao-esta-mais-carro>>. Acesso em: 17 ago. 2016

PAULA JÚNIOR, T. J.; PAULA JUNIOR, T. J.; VENZON, M. Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **PAULA JUNIOR, TJ; VENZON, M.(Coord.)**, v. 101, p. 331–342, 2007.

PEREIRA, P. A. A. Evidências de domesticação e disseminação do feijoeiro comum e consequências para o melhoramento genético da espécie. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 25, p. 19–23, 1990.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1990.

POZO, M. J. et al. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 368, p. 525–534, 2002.

RAVA, C. A. et al. Fontes de Resistencia a Antracnose, Crestamento-Bacteriano-Comum e Murcha-de-Curtobacterium em Coletas de Feijoeiro-Comum. **Ceres**, v. 50, n. 292, 2015.

RE, N. et al. Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development.

EMBO J, v. 13, n. 15, p. 3438–3447, 1994.

REP, M. et al. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. **FEBS letters**, v. 534, n. 1–3, p. 82–86, 2003.

RESENDE, M. L. V; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123–130, 2003.

RUDOLPH, K.; STAHMANN, M. A. Interactions of Peroxidases and Catalases between *Phaseolus vulgaris* and *Pseudomonas phaseolicola* (Halo Blight of Bean). **Nature**, v. 204, n. 4957, p. 474–475, 1964.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.

SCHULLER, D. J. et al. The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, v. 4, n. 3, p. 311–321, 1996.

SCHWARTZ, H. F.; PEAIRS, F. B. Integrated pest management. In: **Common bean improvement in the twenty-first century**. [s.l.] Springer, 1999. p. 371–388.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. 1977.

SILVA, V. L. DA; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, 1995.

SILVA, F. DE A. S.; DE AZEVEDO, C. A. V. The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733–3740, 2016.

SINGH, S. P. et al. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, n. 1, p. 23–29, 1991.

SOUZA, V. L. DE et al. Genetic resistance to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean genotypes. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 339–344, 2006a.

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

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

STALL, R. E.; COOK, A. A. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistant and susceptible pepper. **Phytopathology**, v. 56, n. 10, p. 1152, 1966.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis, Cascavel**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STRIDER, D. L. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*; A literature review and bibliography. **NC Agr Exp Sta Tech Bull**, 1969.

TAKKEN, F. L. W.; TAMELING, W. I. L. To nibble at plant resistance proteins. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 744–746, 2009.

TATIANA FREITAS. **Fenômeno El Niño afeta produção de alimentos no Brasil - 22/11/2015 - Mercado - Folha de S.Paulo**Folha de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/11/1709363-fenomeno-el-nino-afeta-a-producao-de-alimentos-no-brasil.shtml>>. Acesso em: 24 ago. 2016

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

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Effect of potassium levels in the severity of bacterial wilt in common bean cultivars. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 139–146, 2006a.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Bacterial wilt of common bean in Santa Catarina State, Brazil, and behavior of genotypes to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 34–41, 2006b.

THIPYAPONG, P. et al. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science**, v. 167, n. 4, p. 693–703, 2004.

URREA, C. A.; HARVESON, R. M. Identification of Sources of Bacterial Wilt Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p. 973–976, 2014.

VALENTINI, G. et al. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Biotemas**, v. 23, n. 4, p. 1–8, 2010.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. D. G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. **Trends in biochemical sciences**, v. 23, n. 12, p. 454–456, 1998.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 259–288, 1980.

VIDYASEKARAN, P. **Physiology of Disease Resistance in Plants, Vol. 1.** [s.l.]

CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1988.

VIERA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do Feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). . **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 273–349.

WAGGONER, P. E.; BERGER, R. D. Defoliation, disease, and growth. **Phytopathology**, v. 77, n. 3, p. 393–398, 1987.

WAKIMOTO, S.; UEMATSU, T.; MUKOO, H. Bacterial canker disease of tomato in Japan. 1. Isolation and identification of the causal bacteria, and resistance of tomato varieties against the disease. **Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Ser. C**, v. 22, p. 269–279, 1968.

WELLER, D.; SAETTLER, A. Rifampin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: Tools for field study of bean blight bacteria. 1978.

WHEATLEY, C. **Studies on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root post-harvest physiological deterioration**. [s.l.] University of London, London, 1982.

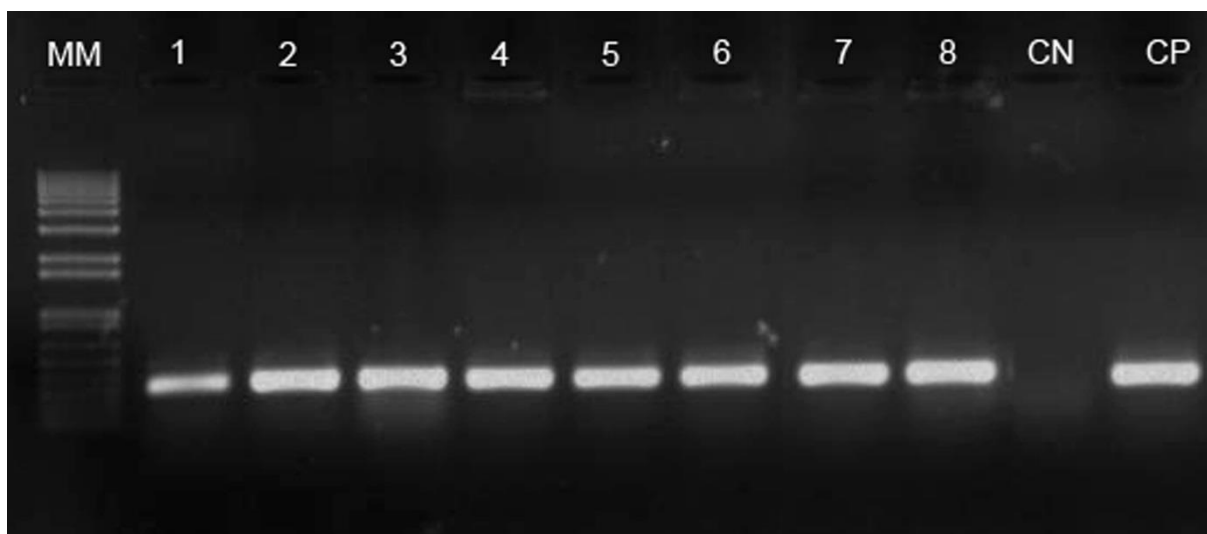
WILLIAMS, J. S. et al. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. **Plant Physiology**, v. 128, n. 1, p. 150–159, 2002.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Induced plant responses to microbes and insects**, p. 110, 2014.

YOKOYAMA, L. P. et al. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão “Pérola”: avaliação preliminar. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 1999.

YORINORI M.A.; FUNADA C.K; BIANCHINI, A; LEITE JR. R.P.; UENO, B. Ocorrência do crestamento bacteriano aureolado do feijoeiro causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 218, 1998.

APÊNDICE A - Amplificação do DNA dos isolados de Cff utilizados nos ensaios.



MM: Marcador molecular 1Kb Plus; 1 e 2: Isolados utilizados nos ensaios de colonização das cultivares por Cff; 3: Isolado utilizado no ensaio Atividade enzimática, quantificação de proteínas e fenóis totais de cultivares de feijoeiro infectados por Cff; 4 e 5: Isolado utilizado no ensaio sobre Matéria seca da parte aérea de cultivares de feijoeiro infectados por Cff; 6, 7 e 8: Isolado utilizado no ensaio sobre características agronômicas das cultivares de feijoeiro infectadas por Cff; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.