

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 33

Padrão de Sintomas de Isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Dois Genótipos de Feijoeiro Comum

Adriane Wendland, Nara Edreira Alencar,
Leonardo Cunha Melo, Joaquim Geraldo
Cáprio da Costa, Maria José Del Peloso,
Helton Santos Pereira, Luis Cláudio de
Faria, Marcio Vinicius de Carvalho Barros
Côrtes, Rosana Pereira Vianello Brondani

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Luís Fernando Stone*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*

Capa: *Sebastião José Araújo*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2008): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Padrão de sintomas de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em dois genótipos de feijoeiro comum / Adriane Wendland ...[et al.]. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2008.

19 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 33)

1. Feijão - Murcha de Curtobacterium. 2. Feijão - Doença de planta - Bactéria. 3. Feijão - Planta - Crescimento. I. Wendland, Adriane. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 635.6529 (21. ed.)

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultado e Discussão	12
Conclusões	17
Referências	18

Padrão de Sintomas de Isolados de *Curvobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Dois Genótipos de Feijoeiro Comum

Adriane Wendland¹, Nara Edreira Alencar², Leonardo Cunha Melo³, Joaquim Geraldo Cáprio da Costa⁴, Maria José Del Peloso⁵, Helton Santos Pereira⁶, Luis Cláudio de Faria⁷, Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes⁸, Rosana Pereira Vianello Brondani⁹

Resumo

Curvobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff), agente causal da murcha de curvobacterium em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), é um patógeno vascular de difícil controle, detectado pela primeira vez no Estado de São Paulo, Brasil em 1995. Devido à dificuldade de controlar essa doença, a resistência genética tem sido a melhor opção. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação diferencial entre isolados, o padrão de sintomas e o crescimento das plantas em dois genótipos de feijoeiro comum considerados como resistente (Ouro Branco) e suscetível (LMRs 11997) à murcha de curvobacterium. Os sintomas como Murcha (M), Flacidez (F), Amarelecimento (A), Queima (BQ) e Encarquilhamento (BE) foram avaliados aos 7, 11, 14 e 18 dias após a inoculação de sete isolados de Cff em plantas aos dez dias após a semeadura. A altura das plantas foi

¹ Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, adrianew@cnpaf.embrapa.br

² Estudante de Graduação em Agronomia, UFG, Estagiária, Embrapa Arroz e Feijão, narexxx@gmail.com

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, leonardo@cnpaf.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, caprio@cnpaf.embrapa.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, mjpeloso@cnpaf.embrapa.br

⁶ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, helton@cnpaf.embrapa.br

⁷ Engenheiro Agrônomo, Mestre em Genética e Melhoramento, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, lcfaria@cnpaf.embrapa.br

⁸ Farmacêutico, BSc., Analista, Embrapa Arroz e Feijão, marciov@cnpaf.embrapa.br

⁹ Engenheira Agrônoma, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, rosanavb@cnpaf.embrapa.br

medida aos 14 dias após a inoculação. Ouro Branco apresentou menor intensidade da doença e os sintomas de murcha e flacidez foram mais frequentes. As plantas inoculadas com o isolado CffcNPAF 03 não apresentaram sintomas de amarelecimento e encarquilhamento do bordo durante todo o período da avaliação. Houve variação na altura das plantas de acordo com os isolados utilizados. Os isolados UnB 1252, CffcNPAF 01, CffcNPAF 02, CffcNPAF 03 e CffcNPAF 04 foram mais agressivos, causando maior redução na altura, diferindo da testemunha (plantas não inoculadas). Já os isolados IAPAR 12771 e IAPAR 14305 foram estatisticamente iguais à testemunha. Em contraste, a linhagem LMRs 11997 apresentou maior intensidade da doença, pois as plantas apresentaram todos os sintomas avaliados (M, F, A, BQ e BE). A quantidade de plantas que apresentaram amarelecimento, queima e encarquilhamento do bordo foi maior para todos os isolados e houve redução na altura das plantas de forma semelhante, onde os isolados diferiram apenas da testemunha. Portanto, foi possível observar que o padrão de sintomas e o crescimento das plantas (altura) variou de acordo com o genótipo e/ou isolado utilizado.

Termos para indexação: murcha de *Curtobacterium*, interação diferencial, crescimento da planta

Standard symptoms of *Curtobacterium* *flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolates in two genotypes of common beans

Abstract

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff), the causal agent of the bacterial wilt of common bean (*Phaseolus vulgaris*), is a vascular pathogen of difficult control, first detected in São Paulo State, Brazil in 1995. Due to the difficulty in controlling this disease, genetic resistance has been the best option for disease management. The aim of this study was to evaluate the differential interaction between isolates, the disease progress and difference in plant growth of two common bean genotypes considered resistant (Ouro Branco) and susceptible (LMRs 11997) to the bacterial wilt. The disease symptoms as wilt (M), flaccidity (F), yellowing (A), leaf burn (BQ) and wizen leaf board (BE) were assessed at 7, 11, 14 e 18 days after inoculation with inoculation of seven Cff isolates in plants at ten days after sowing. The plant height was measured at 14 days after inoculation. Ouro Branco showed lower intensity of the disease and the symptoms of wilt and flaccidity were more frequent. Plants inoculated with the isolate CffCNPAF 03 showed no symptoms of yellowing and wizened the board throughout the period of evaluation. There was variation in plant height according to the isolates used. Isolates UnB 1252, CffCNPAF 01, CffCNPAF 02, CffCNPAF 03 and CffCNPAF 04 were more aggressive, causing further reduction in height, differing from the control (non-inoculated plants) and isolates IAPAR 12771 and IAPAR 14305 were statistically equal to the control. In contrast, the LMRs 11997 showed higher intensity of disease and the plants showed all symptoms evaluated (M, F, A, BE and BQ). The amount of plants that showed yellowing, burning, and wizen leaf board was higher for all isolates

and there was a similar reduction in plant height, where the isolates differed only from control. Therefore, it was possible to observe that the pattern of symptoms and plant growth (height) varied with the genotype and/or used alone.

Index terms: bacterial wilt, differential interaction, plant growth

Introdução

O cultivo do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) está sujeito à incidência de vários fitopatógenos: bactérias, fungos, vírus e nematóides, que acarretam em perdas significativas na produção da cultura. Entretanto, a obtenção de alta produtividade nesta cultura pode ser alcançada com o controle destas doenças através do uso de sementes certificadas, adoção de práticas culturais que incluem rotação de culturas e eliminação dos restos culturais e o uso de cultivares resistentes, entre outras.

A murcha de *Curtobacterium* é uma doença de crescente importância no cultivo de feijão, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Foi primeiramente relatada por Hedges (1922), no Estado de Dakota do Sul (EUA). No Brasil, sua ocorrência foi relatada pela primeira vez em 1995, no Estado de São Paulo, (MARINGONI; ROSA, 1997) e atualmente está disseminada em várias regiões produtoras de feijão. O aparecimento da doença em Goiás foi observado em 2001, no Município de Cristalina-GO e na região do Distrito Federal, em janeiro de 2002 (UESUGI et al., 2003). A bactéria é uma espécie fitopatogênica gram-positiva e caracteriza-se por colonizar os vasos xilemáticos, obstruindo a passagem de seiva, causando murcha, flacidez, amarelecimento das folhas, queima ou encarquilhamento do bordo foliar, escurecimento vascular, nanismo, enfezamento nas plantas e, conseqüentemente, morte da parte aérea do feijoeiro e/ou redução do seu potencial produtivo.

O uso de genótipos resistentes ou tolerantes é uma das medidas mais eficientes e econômicas para o controle de muitas doenças de plantas e também o método mais prático e econômico para controle da murcha de *Curtobacterium* na cultura do feijoeiro (VIEIRA, 1988; MARINGONI, 2000; RAVA; COSTA, 2001). Os sintomas observados ainda apresentam grande variação em função do genótipo e do isolado utilizado nas inoculações em casa de vegetação (WENDLAND et al., 2008). O objetivo deste estudo foi avaliar a interação diferencial entre isolados, o padrão de sintomas e o crescimento das plantas em dois genótipos de feijoeiro comum considerados como resistente (Ouro Branco) e suscetível (LMRs 11997) à murcha de *Curtobacterium*.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, nos meses de maio a junho de 2008, na Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás–GO. O primeiro experimento foi a inoculação de sete isolados de Cff (Tabela 1) na cultivar Ouro Branco, considerada como resistente (RAVA et al., 2003) e o segundo experimento foi a inoculação destes isolados na linhagem LMRs 11997, considerada como suscetível (WENDLAND et al., 2008).

Tabela 1. Relação de sete isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* utilizados na inoculação das plantas.

<i>Isolado</i>	<i>Procedência</i>
UnB 1252	UnB ¹ , Brasília, DF
CffcNPAF 01	CNFC 10758, Embrapa SNT, Ponta Grossa-PR
CffcNPAF 02	CNFC 10758, Embrapa SNT, Ponta Grossa-PR
CffcNPAF 03	CNFC 10758, Embrapa SNT, Ponta Grossa-PR
CffcNPAF 04	CNFC 11970, Embrapa SNT, Ponta Grossa-PR
IAPAR 12771	IAPAR ² , Londrina, PR
IAPAR 14305	IAPAR ² , Londrina, PR

¹Isolado cedido por Carlos Hidemi Uesugi (Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília)

²Isolado cedido por Rui Pereira Leite Junior (Instituto Agrônomo do Paraná)

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados de altura de planta coletados aos 14 dias após a inoculação foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

Aos dez dias após o plantio em vasos com solo adubado, a inoculação foi realizada artificialmente, por meio de duas perfurações no caule das plantas, entre as folhas cotiledonares e as primárias, efetuadas com agulha entomológica de ponta achatada previamente umedecida em colônia bacteriana. A testemunha consistiu de plantas de ambos os genótipos, perfuradas por duas punções na haste, entre as folhas cotiledonares e as primárias, porém, sem o crescimento bacteriano.

Os isolados UnB 1252, IAPAR 12771 e IAPAR 14305 foram recuperados do tampão fosfato pH 6,8, em meio Agar Nutriente, por 72 horas, a 24°C.

Os isolados CffcNPAF 01, CffcNPAF 02, CffcNPAF 03 e CffcNPAF 04 foram obtidos através de isolamento de material vegetal com sintomas da doença. Todos os isolados foram submetidos a testes de KOH, coloração de Gram e PCR de detecção específica com os iniciadores CF4 e CF5 (GUIMARÃES et al., 2001) e REV4/FOR2 (TEGLI et al., 2002), para confirmar sua identificação.

Os sintomas da doença (Fig. 1) foram avaliados aos 7, 11, 14 e 18 dias após a inoculação. Além disso, a altura das plantas foi avaliada aos 14 dias após a inoculação, com régua, medindo-se a partir do nível do solo do vaso até a extremidade final de sua guia. Posteriormente, obteve-se as médias da altura, considerando a média da testemunha como 100%, para comparar a altura das plantas de acordo com a resposta a cada isolado.

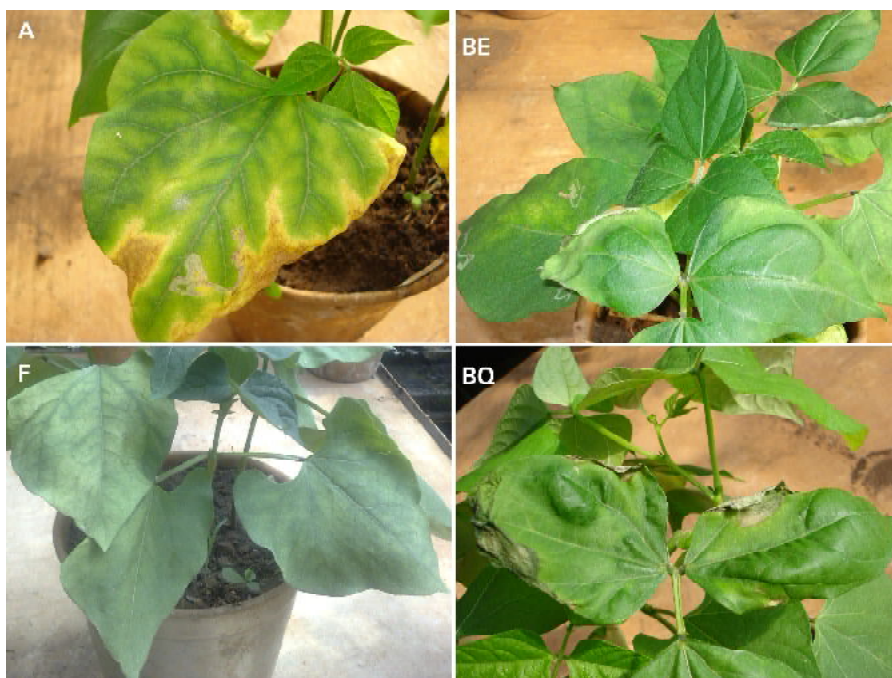


Fig. 1. Características dos sintomas avaliados: Amarelecimento das folhas(A), Flacidez (F), Encarquilhamento do bordo foliar (BE) e Queima do bordo foliar (BQ).

Tabela 3. Quantidade de plantas da linhagem LMRs 11997 que manifestaram sintomas causados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Isolado	Avaliação	Características					Total de plantas Sintomas
		M	F	A	BQ	BE	
UnB 1252	I	4	4	5	2	0	15
	II	5	5	5	5	5	25
	III	5	5	5	5	5	25
	IV	5	5	5	5	5	25
CffcNPAF 01	I	4	4	3	1	1	13
	II	4	4	3	3	3	17
	III	5	5	5	5	5	25
	IV	5	5	5	5	5	25
CffcNPAF 02	I	5	5	2	1	1	14
	II	5	5	5	5	5	25
	III	5	5	5	5	5	25
	IV	5	5	5	5	5	25
CffcNPAF 03	I	3	3	3	0	0	9
	II	4	4	4	3	3	18
	III	4	4	4	3	4	19
	IV	4	4	4	4	4	20
CffcNPAF 04	I	4	4	4	0	0	12
	II	4	4	4	3	4	19
	III	4	4	4	4	4	20
	IV	4	4	5	4	4	21
IAPAR 12771	I	4	4	4	0	0	12
	II	5	5	5	4	4	23
	III	5	5	5	5	5	25
	IV	5	5	5	5	5	25
IAPAR 14305	I	3	3	2	2	2	12
	II	4	5	3	4	3	19
	III	5	5	5	5	5	25
	IV	5	5	5	5	5	25
TOTAL							563

A cultivar Ouro Branco apresentou menor intensidade da doença (Fig. 2). Os sintomas de murcha e flacidez foram os mais frequentes, com exceção das plantas inoculadas com UnB 1252, que apresentaram queima dos bordos da

folha e das plantas inoculadas com IAPAR 14305, que por sua vez, apresentaram encarquilhamento dos bordos da folha (Fig. 3A, Tabela 2). As plantas inoculadas com o isolado CffCNPAF 03 não apresentaram sintomas de amarelecimento e encarquilhamento do bordo durante todo o período da avaliação (Tabela 2). Houve variação na altura das plantas de 38 a 68 cm, de acordo com os isolados utilizados (Fig. 4). Os isolados UnB 1252, CffCNPAF 01, CffCNPAF 02, CffCNPAF 03 e CffCNPAF 04 foram mais agressivos, causando maior redução na altura das plantas da cultivar Ouro Branco, diferindo da testemunha (plantas não inoculadas). Já os isolados IAPAR 12771 e IAPAR 14305 foram estatisticamente iguais à testemunha (Fig. 4), demonstrando que há interação entre isolados do patógeno e a cultivar Ouro Branco.



Fig. 2. Diferença de tamanho e intensidade dos sintomas entre os genótipos Ouro Branco e LMRs 11997.

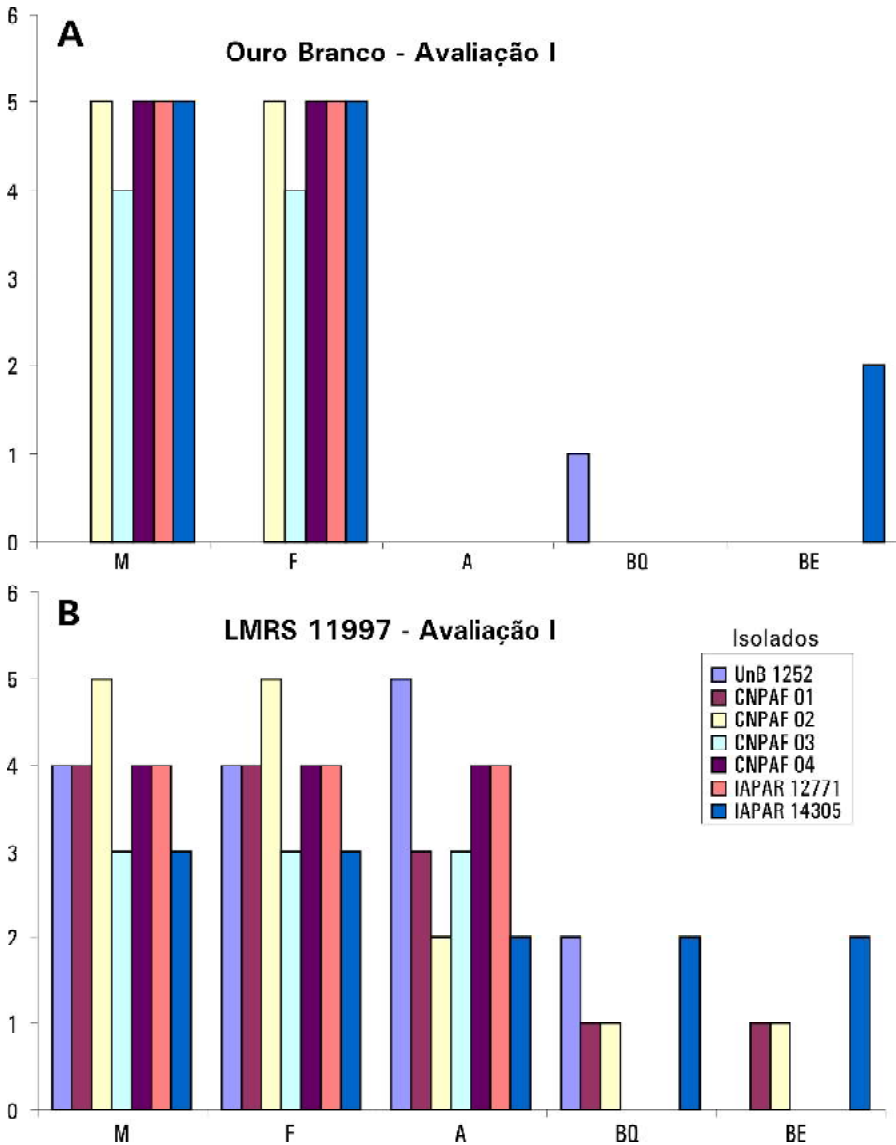


Fig. 3. Comparação de sintomas entre Ouro Branco–resistente (A) e LMRs 11997-suscetível (B), aos sete dias após a inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Os sintomas avaliados foram Murcha (M), Flacidez (F), Amarelecimento das folhas(A), Queima do bordo foliar (BQ) e Encarquilhamento do bordo foliar (BE).

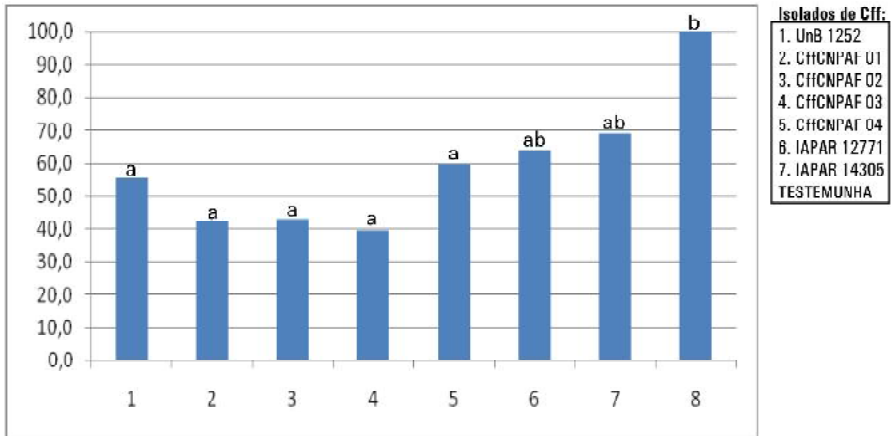


Fig. 4. Porcentagem média da altura das plantas da cultivar Ouro Branco de feijão, de acordo com os sete isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, aos quatorze dias após a inoculação.

Colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em contraste, a linhagem LMRs 11997 apresentou maior intensidade da doença quando comparada com a cultivar Ouro Branco (Fig. 2). O amarelecimento das folhas, queima e encarquilhamento do bordo foliar foram constantes nas plantas inoculadas com os sete isolados de Cff. A partir da última avaliação, mais de 80% das plantas apresentaram todos os sintomas da doença (Fig. 3B, Tabela 3). A redução na altura das plantas foi maior quando comparada com Ouro Branco, variando entre 25 e 37 cm, porém os isolados diferiram apenas da testemunha, mostrando semelhança na agressividade entre os sete isolados inoculados nas plantas da linhagem LMRs 11997 (Fig. 5).

Os sintomas de murcha e flacidez foram observados em ambos os genótipos no início do desenvolvimento da doença e os sintomas de queima e encarquilhamento dos bordos da folha parecem estar relacionados com o completo estabelecimento do patógeno na planta, em consequência do entupimento dos feixes vasculares. Os sintomas de amarelecimento das folhas tiveram associação constante apenas com o genótipo suscetível.

Portanto, este trabalho permitiu observar que o progresso e a intensidade da doença, analisados por meio da altura das plantas, quantidade e padrão de

sintomas é variável de acordo com genótipo e/ou isolado utilizado. A interação entre maior número de isolados do patógeno e de genótipos do hospedeiro será averiguada posteriormente em novos experimentos.

Os resultados mostraram que é necessário desenvolver e validar uma escala diagramática para murcha de *Curtobacterium*, passível de ser empregada para diferentes genótipos inoculados, baseada nos principais sintomas observados. A escala utilizada para seleção de genótipos com resistência à doença no programa de melhoramento do feijoeiro na Embrapa Arroz e Feijão, até o momento, foi adaptada do patossistema feijão-*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por Rava et al. (2003).

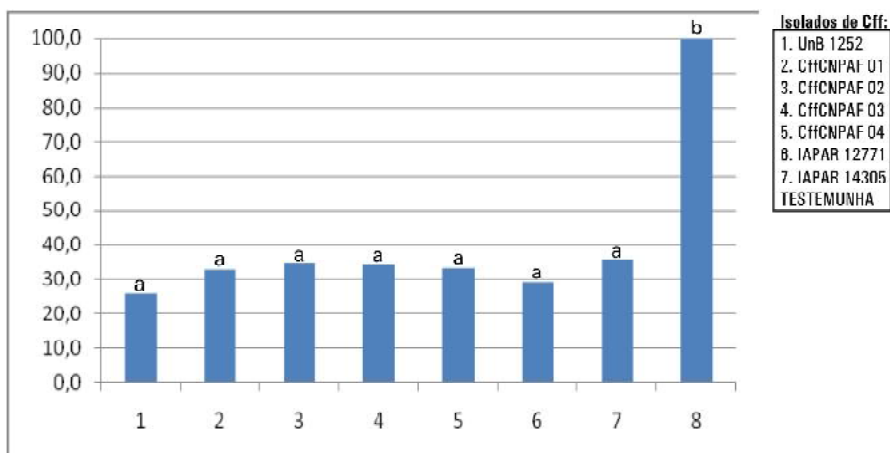


Fig. 5. Porcentagem média da altura das plantas da linhagem LMRs 11997 de feijão, de acordo com os sete isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, aos quatorze dias após a inoculação.

Colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Conclusões

- Houve diferença na agressividade entre os isolados;
- O padrão de sintomas e o crescimento das plantas (altura) variou de acordo com o genótipo e/ou isolado utilizado;
- A cultivar Ouro Branco apresentou menor intensidade de sintomas da doença quando comparada com o genótipo LMRs 11997.

Referências

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.6**. 2003. Disponível em: < http://www.dex.ufla.br/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=1 > . Acesso em: 10 set. 2008.

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

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens*, nov. sp. **Science**, Washington, v. 55, n. 1425, p. 433-434, Apr. 1922.

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

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 2, p. 160-162, abr./jun. 1997.

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. da. Reação de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 5.; REUNIÃO ANUAL PARANAENSE DE FEIJÃO, 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 55-56.

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. da; FONSECA, J. R.; SALGADO, A. L. Fontes de resistência à antracnose, crestamento-bacteriano-comum e murcha-de-curtobacterium em coletas de feijoeiro comum. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 292, p. 797-802, nov./dez. 2003.

TEGLI S.; SERENI A.; SURICO G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 331-337, 2002.

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

VIEIRA, J. L. T. M. Produção e comercialização no Brasil. In: ZIMMERMANN, M. J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p. 21-35.

WENDLAND, A.; ALENCAR, N. E.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C. da; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C. de; CÔRTEZ, M. V. de C. B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Ciência e tecnologia na cadeia produtiva do feijão**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. 1 CD-ROM. (IAC. Documentos, 85).

