



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE PATOGÊNICA E
INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE ISOLADOS DE
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*
EM FEIJOEIRO-COMUM**

STELLA CRISTINA DIAS VALDO LIMA

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo

STELLA CRISTINA DIAS VALDO LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE PATOGÊNICA E
INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE ISOLADOS DE *Curtobacterium*
flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* EM FEIJOEIRO-COMUM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientadora:

Profª Drª. Leila Garcês de Araújo

Coorientadoras:

Draª. Adriane Wendland

Profª. Drª. Patrícia Guimarães Santos Melo

Goiânia, GO - Brasil

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

L732c Lima, Stella Cristina Dias Valdo
Caracterização da variabilidade patogênica e interação diferencial de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum [manuscrito] / Stella Cristina Dias Valdo Lima. - 2013.
95 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo; Co-orientadora: Adriane Wendland
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

1. Feijoeiro-comum – Cultivo 2. *Phaseolus vulgaris* – Resistência I. Título.

CDU: 635.632

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Stella Cristina Dias Valdo Lima		
E-mail:	sdiasvaldo@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor	Bolsista		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 00889834/0001-08
Título:	CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE PATOGENICA E INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM FEIJOEIRO-COMUM		
Palavras-chave:	<i>Phaseolus vulgaris</i> L., agressividade, resistência		
Título em outra língua:	Characterization of pathogenic variability and differential interaction of isolates <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> in common bean.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Phaseolus vulgaris</i> L., aggressiveness, resistance		
Área de concentração:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/03/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Orientador (a):	Dra. Leila Garcês de Araújo		
E-mail:	leilagarcasaraujo@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Adriane Wendland		
E-mail:	adriane.wendland@embrapa.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Stella Cristina D. Valdo Lima
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 01 / 09 / 2014

¹Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

STELLA CRISTINA DIAS VALDO LIMA

TÍTULO: Caracterização da variabilidade patogênica e interação diferencial de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum”

Dissertação DEFENDIDA em 27 de Março de 2013, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:


Prof.ª Dr.ª. Leila Garcês de Araújo
Orientadora – ICB/UFG


Dr. Valdir Lourenço Junior
IAPAR


Dr. Leonardo Cunha Melo
Embrapa Arroz e Feijão


Dr.ª Adriane Wendland
Embrapa Arroz e Feijão

UFG

Goiânia - Goiás
Brasil

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo. Pela vida, salvação, saúde e capacidade durante toda minha vida.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela formação e realização do Mestrado. À Embrapa Arroz e Feijão e Laboratório de Fitopatologia pela oportunidade de desenvolvimento de projeto e auxílio financeiro, sou grata.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos para o mestrado.

Às minhas orientadoras Prof^a. Dra Leila Garcês de Araújo e Dra. Adriane Wendland agradeço pelos ensinamentos. Sou grata por guiar-me pelo caminho do conhecimento científico.

À minha mãe Esther Gléria, farol da minha caminhada; à irmã querida Rhakell Hellen e meu amado esposo Valdeci Lima pela motivação, carinho, amor, lágrimas e sorrisos, sou imensamente grata. À minha família pelo apoio em todos os momentos difíceis com palavras de ânimo e conforto. Aos irmãos em Cristo pelas orações e apoio.

Aos pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão: Dr. Leonardo Cunha Melo, Dr. Helton Santos Pereira e Dra Patrícia Guimarães Santos Melo pela grande contribuição para o desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos sempre presentes: Maythsulene, Jacqueline Carvalho, Ana Paula Sena, Kellen Cristhina, Eugenio Sperandio, Fábio Gonçalves, Odilon Moraes, Elias Emanuel, Uéric, Aline Luzini, Gabriela, Larissa, Eduardo Yamamoto, Rodolfo Marcos, Leandro Kataki, João Luiz, Bruna Alícia, Amanda Abdallah, Bárbara Estevam, Gustavo Guimarães, Talita Mamedes, Ederson Antonio, Lorena Peixoto, Alan Carlos, Priscila Ferreira, Lara Almeida, Lidianne, Fernanda Yoshida, Jordene Aguiar, Alaerson Geraldine, Marcela Magalhães, Rafaela Guimarães, Pablo Melo, Priscilla Möller, Débora Cristina, Carlos Roberto, muito obrigada pelo convívio.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão: Márcio, Ronair, Elder, Lívia, Anaíres e Mônica.

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

À minha mãe com muito amor dedico

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	8
	LISTA DE TABELAS	11
	RESUMO.....	12
	ABSTRACT	15
1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	22
2.1.1	Agressividade de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em feijoeiro-comum	26
2.1.2	Variabilidade patogênica de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	27
2.2	RESISTÊNCIA GENÉTICA DO FEIJOEIRO-COMUM E CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA DE <i>Curtobacterium</i> <i>flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	30
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	
3.2.1	Morfologia Celular.....	31
3.2.2	Teste de Patogenicidade.....	31
3.2.3	Teste de Solubilidade em Hidróxido de Potássio 2%.....	31
3.2.4	Teste de Coloração Diferencial de Gram.....	32

3.2.5	Confirmação da identidade dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> com os iniciadores CffFOR2 e CffREV4.....	32
3.2.6	Preservação dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>.....	33
3.3	CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE 24 ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM TRÊS GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM.....	34
3.4	COLONIZAÇÃO DO XILEMA DE FEIJOEIRO-COMUM POR <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	36
3.5	INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM FEIJOEIRO-COMUM.....	36
3.5.1	Instalação de experimento em casa de vegetação.....	36
3.5.2	Preparo de inóculo e inoculação.....	38
3.5.3	Avaliação e análise de dados.....	39
3.6	INDICAÇÃO DE CULTIVARES DIFERENCIADORAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	43
4.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	43
4.3	CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE 24 ISOLADOS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM TRÊS GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM.....	47
4.4	COLONIZAÇÃO DO XILEMA DE FEIJOEIRO-COMUM POR <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	51
4.5	INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM FEIJOEIRO-COMUM	62

4.6	INDICAÇÃO DE CULTIVARES DIFERENCIADORAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	79
5.	CONCLUSÕES.....	88
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sintomas da murcha-de-curtobacterium de <i>Curtobacterium</i> : A – flacidez; B - mosaico; C - encarquilhamento de bordo; D - queima de bordo; E – nanismo; F – murcha e G – morte	45
Figura 2	Análise eletroforética de 8 isolados de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> obtidos com os iniciadores <i>Cff</i> FOR2 e <i>Cff</i> REV4 (M: marcador molecular 1kb Ladder; CN – controle negativo; 3- <i>Cff</i> 04; 4- <i>Cff</i> 11; 5- <i>Cff</i> 25; 6- <i>Cff</i> 27; 7- <i>Cff</i> 31; 8- <i>Cff</i> 33; 9- <i>Cff</i> 34; 10- <i>Cff</i> 36).....	46
Figura 3	Microscopia eletrônica de varredura na linhagem de feijoeiro comum CNFC 10429 infectada por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> . A - Corte longitudinal do epicótilo após 20 dias da inoculação com água destilada estéril (testemunha). B – Vaso do xilema colonizado por <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> ; C – Vasos xilemáticos colonizados por <i>Cff</i> . PPS = placa de perfuração simples, P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário.....	52
Figura 4	Microscopia eletrônica de varredura na linhagem de feijoeiro comum CNFRS 11997 infectada por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> . A - Corte longitudinal do epicótilo ao 20 dias após inoculação com água destilada estéril (testemunha). B – Vaso do xilema colonizado por <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (Isolado CNPAFCff 25). P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário.....	54
Figura 5	Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Diacol Calima colonizada por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> . A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação o isolado <i>Cff</i> 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro comum inoculado com o isolado <i>Cff</i> 25. P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário; ER = estrutura rendilhada; X = xilema.....	55

- Figura 6** Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro IPA 9 colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado Cff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro comum inoculado com o isolado Cff 25. P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário; ER = estrutura rendilhada; X = xilema..... 57
- Figura 7** Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro IPA 9 colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado Cff 31. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro comum inoculado com o isolado Cff 31. P = pontoações; ER = estrutura rendilhada..... 58
- Figura 8** Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado Cff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro comum inoculado com o isolado Cff 25. ER = estrutura rendilhada..... 59
- Figura 9** Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado Cff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro comum inoculado com o isolado Cff 25. ER = estrutura rendilhada; P = pontoações; F = filamento..... 61
- Figura 10** Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Aglomerado de Cff 25. ER = estrutura rendilhada..... 62

- Figura 11** Resistência horizontal de genótipos inoculados com diferentes isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, indicando a resistência horizontal do hospedeiro na análise conjunta. 1- Coquinho; 2- BRS Cometa; 3- BRS Estilo; 4- Vermelho; 5- BRS Esplendor; 6- BRS Esteio; 7- CNFC 10408; 8- IAC Carioca Pyatã; 9- IAC Carioca Akytã; 10 -IAC Carioca Aruã; 11 – Pérola; 12- BRS Requite; 13 – Uirapuru; 14- BRS Campeiro; 15- A 211; 16- IPA 6; 17- Frijólica 0-3-1; 18- BAT 477; 19- IPA 1; 20- TU; 21- TO; 22- AND 277; 23- Widusa; 24- Michelite; 25- IPA 7419; 26- Cornell 49242; 27- PI 207 262; 28- IPA 9; 29- Ouro Branco; 30- CNFRS 11997..... 67
- Figura 12** Agressividade de oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* inoculados em 30 genótipos de feijoeiro-comum – Análise Conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25..... 69
- Figura 13** Resistência vertical dos genótipos inoculados com diferentes isolados do patógeno de acordo com o modelo IV de Griffing (1956) - Análise conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25..... 71
- Figura 14** Resistência vertical dos genótipos inoculados com diferentes isolados do patógeno de acordo com o modelo IV de Griffing (1956) - Análise conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala descritiva de severidade de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro comum	35
Tabela 2	Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de feijoeiro comum da Embrapa Arroz e Feijão.....	37
Tabela 3	Isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> com diferentes níveis de agressividade	38
Tabela 4	Procedência e data de coleta de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> de plantas de feijoeiro comum....	46
Tabela 5	Resumo da análise de variância de três cultivares inoculadas com 24 isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> ...	48
Tabela 6	Média da severidade dos isolados de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> inoculados nos genótipos Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP 10132.....	49
Tabela 7	Resumo da análise de variância individual para severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum.....	63
Tabela 8	Resumo da análise de variância individual para severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum.....	63
Tabela 9	Resumo da análise de variância conjunta da severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum.....	64
Tabela 10	Análise dialética da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – (Primeiro Ensaio).....	65
Tabela 11	Resumo da análise dialética da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – (Segundo Ensaio).....	65
Tabela 12	Análise dialética da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – Análise Conjunta dos dois ensaios.	66

Tabela 13	Estimativas da Capacidade Geral de Reação (CGR) oriunda da Resistência Horizontal dos 30 genótipos de feijoeiro-comum obtida a partir das médias das notas de severidade de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	68
Tabela 14	Estimativa da (Capacidade Geral de Agressividade) (CGA) de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> obtidas a partir das médias de severidade da doença em 30 genótipos de feijoeiro-comum.....	69
Tabela 15	Estimativa da Capacidade Específica de Interação (CEI) oriunda da interação da resistência vertical dos genótipos de feijoeiro-comum e da virulência dos isolados de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	74
Tabela 16	Estimativas da correlação de Pearson da severidade de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em 30 genótipos de feijoeiro-comum.....	80

RESUMO

LIMA, S.C.D.V. **Caracterização da variabilidade patogênica e interação diferencial de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro comum.** 2013. 108f. Dissertação (Mestrado em: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.^{1,2}

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado durante todo o ano em várias regiões do Brasil, em três épocas distintas de plantio resultando numa safra de 2012/2013 estimada em 3,4 milhões de toneladas. Em consequência de ser cultivada em vários ecossistemas esta cultura está exposta a diversos fatores abióticos o que acentua perdas tornando esta cultura mais suscetível a patógenos. Entre as doenças de grande importância econômica está a murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* que por meio da colonização dos vasos xilemáticos impedem a passagem de água e nutrientes para a parte superior da planta causando mosaico, flacidez, encarquilhamento de bordo, queima de bordo, nanismo, murcha e morte e consequentemente perdas de até 90% da produção. No Brasil, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi encontrada pela primeira vez em 1995, na safra das águas no Estado de São Paulo. Na atualidade, está distribuída por vários Estados brasileiros Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul. Para identificação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* os métodos morfológicos, bioquímicos foram eficientes como também os iniciadores CffFOR2-CffREV4 foram específicos em reação de PCR para os 24 isolados. Os métodos de preservação Castellani, papel filtro, tampão fosfato e glicerol foram eficientes para manter a viabilidade dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão que foram inoculados nas cultivares Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP10132 em que verificou-se a formação de quatro grupos de agressividade diferentes conforme o teste de Scott e Knott (1974). Dentre estes foram escolhidos oito isolados, dois de cada grupo de diferentes níveis de agressividade, para identificação de raças, estudos de interação diferencial e identificação de genótipos resistentes. Ao inocular 30 genótipos de feijoeiro comum foi possível identificar existência de interação diferencial entre os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e os genótipos de feijoeiro comum. Os genótipos IPA 9, Ouro Branco e Michelite foram os genótipos mais resistentes e os genótipos CNFRS 11997 e Frijólica 0-3-1 foram os mais suscetíveis. Os isolados CNPAFCff25 e CNPAFCff 04 foram os mais agressivos e os isolados CNPAFCff33 e CNPAFCff11 foram os isolados que apresentaram menor agressividade. A metodologia de dialelos parciais de Melo & Santos (1999) possibilitou a classificação de oito raças e quinze cultivares diferenciadoras. Observou-se em análise de imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura a formação de estruturas rendilhadas de resistência nos genótipos Ouro Branco e IPA 9, no genótipo Diacol Calima considerado moderado resistente e os genótipos CNFRS 11997 e CNFC 10429, suscetíveis, não foi observada a formação de estruturas de resistência após inoculação com o isolado mais agressivo CNPAFCff 25 e o menos agressivo CNPAFCff 31. Após inoculação com o isolado mais agressivo CNPAFCff 25 e o isolado menos agressivo CNPAFCff 31, a análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura revelou a formação de estruturas de resistência em genótipos de Ouro Branco e IPA 9,

¹Orientadora: Profa. Dra. Leila Garcês de Araújo

²Coorientadoras: Dra. Adriane Wendland

Profa. Dra. Patrícia Guimarães Santos Melo

ao passo que nenhuma dessas estruturas foram observadas no moderadamente genótipo resistente Diacol Calima e os genótipos suscetíveis CNFRS 11997 e CNFC 10429. Empregando a metodologia de estabilidade de Wricke foi possível apontar quais genótipos mais contribuíram para os efeitos de interação, portanto os genótipos indicados para compor a série diferenciadora. A metodologia de Lin e Binns possibilitou analisar o comportamento dos genótipos demonstrando que estes seguiram os princípios da teoria gene a gene.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., agressividade, resistência.

ABSTRACT

LIMA, S.C.D.V. Characterization of pathogenic variability and differential interaction of isolates *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in common bean. 2013. 108f. Dissertation (Master: Genetics and Plant Breeding) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.^{3,4}

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is cultivated throughout the year in many regions of Brazil, in three different growing seasons, resulting in a estimated harvest (2012/2013) of 3,4 million tons. As a consequence of being cultivated in many ecosystems, this crop is exposed to many abiotic factors, accentuating losses and making it more susceptible to pathogens. Among the economically relevant diseases, the bacterial wilt, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* can cause production losses of up to 90%. The *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* colonizes the xylematic vessels, blocking the transport of water and nutrients to the upper part of the plant and causing mosaic, flaccidity, wizen leaf board, wizen leaf burn, wilt and death. In Brazil, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* was found for the first time in 1995, during the “rainy season” in the State of São Paulo. Currently, it is found in many other States, Parana, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal and Mato Grosso do Sul. For identifying *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, morphological and biochemical methods were efficient, as well as the initiators CffFOR2-CffREV4 were specific in PCR reaction for the 24 isolates. The preservation methods Castellani, filter paper and phosphate-glycerol buffer were efficient to maintain the viability of Cff isolates (Multifunctional Microorganisms Collection, Embrapa Arroz e Feijao) inoculated in Ouro Branco, BRS Esplendor and CNFP10132. According to the Scott & Knott test (1974), four groups of different aggressiveness were formed. Among these, eight isolates were chosen, two from each aggressivity group, for “race” identification, diferential interaction studies and identification of resistant genotypes. The inoculation of 30 genotypes of common bean enabled the identification of a differential interaction between the *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolates and the genotypes of the common bean. The genotypes IPA 9, Ouro Branco and Michelite were the most resistant ones, and the genotypes CNFRS 11997 and Frijólica 0-3-1 were the most susceptible ones. The isolates CNPAFCff25 and CNPAFCff04 were the most aggressive ones, and the isolates CNPAFCff33 and CNPAFCff11 were the least aggressive ones. The methodology of partial diallel Melo & Santos (1999) allowed the classification of eight races and fifteen differential cultivars. After inoculation with the most aggressive isolate CNPAFCff 25 and the least aggressive isolate aggressive CNPAFCff 31, the analysis of scanning electron microscopy images revealed the formation of tangled structures resistance structures in genotypes Ouro Branco and IPA 9,

³Adviser: Profa. Dra. Leila Garcês de Araújo

⁴Co-adviser: Dra. Adriane Wendland

Profa. Dra. Patrícia Guimarães Santos Melo

whereas no such structures were observed in the moderately resistant genotype Diacol Calima and the susceptible genotypes CNFRS 11997 and CNFC 10429. Employing the methodology of stability Wricke was possible to identify genotypes which contributed most to the interaction effects, so the genotypes indicated to compose the differential series. The methodology of Lin and Binns possible to analyze the behavior of genotypes demonstrating that they have followed the principles of gene-gene theory.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., aggressiveness, resistance.

1 INTRODUÇÃO

O feijão foi cultivado na safra 2012/2013 em três épocas, nos estados do Pará, Tocantins, Ceará, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. A safra 2012/2013 estimada em 3,4 milhões de toneladas, segundo o quarto levantamento de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2013). O Brasil tem sido o maior produtor de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) dos últimos anos, com produção de 2,4 milhões de toneladas (Embrapa, 2012).

Segundo Sartorato (2006), esta cultura está sujeita a perdas por ser cultivada em vários ecossistemas, exposta a fatores bióticos e abióticos diversos, tornando-a mais suscetível a patógenos. Dessa forma, faz-se necessário o uso de cultivares resistentes como a forma de controle mais sustentável para o meio ambiente e economicamente viável ao produtor. Dentre os diversos patógenos, os de origem bacteriana como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Saettler, 1991), ocorrem em várias localidades do mundo, causando perdas consideráveis a cultura do feijão-comum.

A murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones (1983) (*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*), inicialmente descrita nos Estados Unidos da América (EUA) em Dakota do Sul (Hedges, 1922), recebeu este nome por causar murcha e consequente morte da planta (Hedges, 1926) por meio da colonização dos vasos xilemáticos, em que as células bacterianas impedem a passagem de água e nutrientes para a parte superior da planta de feijão-comum resultando em escurecimento dos vasos, murcha ou flacidez que se agrava nas horas mais quentes do dia (Saettler, 1991).

No Brasil, essa doença foi constatada em 1995, na safra das águas, no Estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1997) e atualmente, pode ser encontrada em vários Estados brasileiros: Paraná, Santa Catarina (Leite Jr. et al., 2002); Goiás, Distrito Federal (Uesugi et al., 2003) e Mato Grosso do Sul (Theodoro et al., 2010).

A disseminação e transmissão desta doença ocorrem por meio de sementes contaminadas oriundas de plantas doentes obtidas nos campos de produção, ferimentos e aberturas naturais nas plantas. Fitobactérias podem permanecer viáveis no interior de sementes por vários anos. (Schuster & Sayre, 1967; Saettler, 1991). Como o principal meio de sobrevivência e disseminação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ocorre pelas sementes, a adoção de sementes sadias, rotação de culturas e genótipos de feijão-comum resistentes são os métodos mais recomendáveis para o controle da murcha-de-curtobacterium (Hall, 1991).

A murcha-de-curtobacterium apresenta-se cada vez mais relevante nos programas de melhoramento do feijoeiro comum, visando garantir a produção e evitar a disseminação da doença para locais que ainda há a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* na cultura. O aumento gradativo da doença nas áreas de produção com a disseminação do patógeno através de sementes contaminadas é agravado pela dificuldade de identificação dos sintomas no campo, uma vez podem ser confundidos no campo com a murcha-de-fusarium, e pouco se conhece sobre o risco de perdas na produção por ela ocasionadas (Maringoni & Rosa, 1997). A avaliação da resistência a partir de escalas diagramáticas incorre em falhas decorrentes da falta de padronização da concentração da bactéria e do método de inoculação que resulta em variações na severidade e presença de sintomas (Coyne et al., 1963).

Portanto, esta doença apresenta-se cada vez mais relevante para os programas de melhoramento do feijoeiro e até o momento, inexistem relatos sobre a existência de interação diferencial entre isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e genótipos de feijoeiro comum, embora a variabilidade patogênica já tenha sido observada. Este trabalho objetivou identificar a variabilidade patogênica e interação diferencial dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* avaliando-se o grau de agressividade ou virulência do patógeno e o grau de resistência horizontal e vertical do hospedeiro, permitindo assim a identificação das diferentes raças de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. De posse dos dados deste trabalho, esse conhecimento será direcionado aos programas de melhoramento de feijão para seleção de cultivares com resistência genética a esta doença.

Uma cultivar considerada resistente em uma região comportar-se suscetível em outra, caracteriza a existência de raças fisiológicas do patógeno (Sartorato, 1989). O mapeamento da população do patógeno permite detectar novos genes de virulência e a efetividade dos genes de resistência utilizados nas cultivares melhoradas. O conceito de

raça fisiológica, os métodos de identificação, distribuição geográfica das raças e os mecanismos de variação são informações importantes no melhoramento genético visando resistência à doenças. O objetivo da identificação de raças é fornecer germoplasma com genes efetivos contra as raças do patógeno. Obtendo estas informações há possibilidade de incorporação de genes de resistência nas cultivares comerciais e o desenvolvimento de cultivares resistentes (Prabhu & Filippi, 2006). Barrus (1911) foi o primeiro a observar a especialização fisiológica em *Colletotrichum lindemuthianum* causador da antracnose em feijoeiro-comum. Após Stakman & Pimeisal (1917) mostram que o patógeno *Puccinia graminis* var. *tritici* causador da ferrugem no trigo possui diferentes raças e estas podem ser identificadas utilizando reações diferenciais entre cultivares e o patógeno. Orozco & Araya (2005) baseando-se na reação do grupo de diferenciadoras quando inoculadas com 61 isolados de *Phaeoisariopsis griseola*, causador da mancha angular oriundos de diferentes regiões da Costa Rica determinaram 21 patótipos, dos quais 19 provocaram doença nas diferenciadoras mesoamericanas e 17 o fizeram em ambos os grupos de diferenciadoras. Sartorato (2004) ao inocular doze diferenciadoras com 96 isolados de *P. griseola* identificou 13 patótipos, confirmando com estes resultados que este patógeno possui alta variabilidade patogênica. Ao inocular sete isolados provindos de Minas Gerais de *Uromyces appendiculatus* causador da ferrugem no feijoeiro comum Souza et al. (2005) verificaram que estes isolados foram classificados em sete patótipos distintos. Iqbal et al. (2006) inocularam nove isolados de *Ascochyta lentil*, oriundos do Paquistão, em dez cultivares de lentilha, verificaram que os isolados foram divididos em seis patótipos. Verificando a existência da variabilidade patogênica e diferentes níveis de agressividade e virulência.

A eficiência no uso de resistência genética em cultivares de feijoeiro-comum depende do conhecimento sobre a variabilidade patogênica do agente causal e sua distribuição geográfica. Logo, para o desenvolvimento de cultivares resistentes, faz-se necessário conhecer a estrutura genética das populações do patógeno em cada região de interesse (Orozco & Araya, 2005).

O controle por meio da resistência genética é a forma mais eficiente e econômica, porém exige um contínuo trabalho de melhoramento para fazer frente à variação genética do patógeno, que por sua vez possui habilidade em desenvolver novas raças a cada vez que é desafiado com um novo gene de resistência na cultura. Exigindo

portanto, monitoramento contínuo do quadro de raças e desenvolvimento de novas cultivares resistentes (Yorinori & Kihl, 2001).

Portanto faz-se necessário que uma série de cultivares diferenciadoras seja instituída para conhecimento da especialização patogênica dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e sua distribuição geográfica para recomendação de cultivares em regiões produtoras.

Estudos de patogenidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e análises de interação diferencial entre isolados e genótipos podem ser realizados por programas estatísticos. A análise de dialelos parciais é uma metodologia capaz de prover informações sobre a resistência horizontal e vertical do hospedeiro e a presença de virulência e/ou agressividade do patógeno causador da murcha-de-curtobacterium, baseado no modelo de interação poligênica do patógeno-hospedeiro descrito por Parlevliet & Zadoks (1977) e conforme estudo proposto por Melo & Santos (1999).

Este método permite a escolha de genótipos a partir da capacidade geral do hospedeiro inoculado com diferentes níveis de agressividade dos isolados, e na resistência vertical com diferentes níveis de virulência do patógeno, nunca antes utilizado no patossistema em estudo.

O conhecimento dos patótipos de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* que afetam genótipos de feijoeiro-comum no Brasil é importante para o programa de melhoramento, pois a resistência genética das cultivares pode ser suplantada. Existem métodos de estratificação ambiental, que não foram criadas para este fim, mas elas podem ser adaptadas para estudar a interação patógeno x hospedeiro como ecovalência de Wricke (1965) e Lin & Binns (1988) modificado por Carneiro (1998). A estimativa da ecovalência de Wricke (1965) foi utilizada para medir a contribuição de cada genótipo na interação de genótipo x isolado, por meio da decomposição da soma de quadrados da interação em frações relacionadas a esses genótipos e, assim, identificar quais foram mais instáveis. Utilizou-se o método de Linn e Binns com o objetivo de particularizar a recomendação de genótipos em condições de ocorrência de patótipos de alta ou baixa agressividade. Neste método procura-se identificar a estabilidade entre os genótipos resistentes. Também utilizado para decompor a reação dos genótipos dentro do grupo dos isolados mais e menos agressivos.

O objetivo foi estudar a interação diferencial entre diferentes genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

representativos de seis regiões brasileiras produtoras dessa cultura, utilizando a análise de dialelos parciais. Após a identificação de raças dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, foi possível também realizar a indicação de cultivares diferenciadoras de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* dentre os 30 genótipos inoculados, visando uma melhor obtenção de fontes de resistência a murcha-de-curtobacterium e avaliar a colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em vasos de xilema de feijoeiro-comum que apresentaram reações diferentes quanto a resistência quando inoculados com isolados com diferentes níveis de agressividade por meio de microscopia eletrônica de varredura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) desempenha um importante papel na alimentação humana, constituindo a principal fonte de proteína vegetal. A produção brasileira de feijão caracteriza-se pela sua diversidade de cultivo, podendo se encontrar desde lavouras altamente tecnificadas até aquelas conduzidas em pequenas áreas rurais, com pouco ou nenhum emprego de insumo (Theodoro, 2004).

O feijão é um dos alimentos básicos do povo brasileiro e de grande parte da América Latina, constituindo uma das principais fontes de proteína vegetal e de ferro. Os principais Estados produtores de feijão no Brasil são Paraná, Minas Gerais, Bahia e São Paulo, nesta ordem, sendo o feijoeiro cultivado em três épocas: safra das águas, da seca e de inverno (Ito, 2004).

O consumo médio do feijão é de 16,5 kg/hab/ano. Juntamente com o arroz é a base da alimentação brasileira, contém proteína vegetal e carboidratos essenciais na dieta dos brasileiros (Embrapa, 2012). Por ser uma fonte básica e barata de proteínas e calorias, sua importância tem grande destaque no âmbito internacional e nacional.

O feijoeiro pode ser cultivado em vários locais do país durante todo o ano em três épocas chamadas de safra da seca, safra de inverno e a safra das águas. A safra da seca, plantada em todos os estados produtores durante os meses de janeiro a abril. A safra de inverno, predominante na região Centro-Oeste é cultivada durante os meses de maio a agosto. A região Sul concentra a maior produção da safra das águas com plantio entre agosto e dezembro. Essa capacidade de cultivo em vários locais e épocas diferentes é possível devido o feijoeiro comum apresentar uma adaptação edafoclimática ampla (Borém & Carneiro, 2006; Wander, 2007).

2.1 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Pertencente ao Filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales e família Microbacteriaceae, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é uma

bactéria aeróbica, gram positiva, possui um ou mais flagelos polares ou subpolares. Apresenta-se em forma de bastonetes retos ou curvados levemente, podendo apresentar forma individual ou arranjada em forma de V, Y ou em paralelo. As colônias são brilhantes, circulares, de bordos lisos, sem viscosidade, semifluida. Pode apresentar coloração amarela, laranja ou rosa com tamanhos de 1 a 4 mm de diâmetro, após 48 horas de cultivo em meio ágar nutriente. Entre as temperaturas de 24 à 27°C o crescimento é ótimo. Apresenta reação negativa nos testes de solubilidade em hidróxido de potássio a 3%, oxidação/fermentação da glicose, redução de nitrato, urease, produção de indol, podridão em discos de batata, tirosinase e vermelho de metila. É tolerante ao cloreto de sódio a 7 e 9%, catalase positiva, produz gás sulfídrico a partir de cisteína e há produção de ácidos a partir de adonitol, amido, inositol, glicerol, glicose, melizitose, maltose e sacarose (Bradbury, 1986).

Foi descrita pela primeira vez por Hedges (1922) no Estado de Dakota do Sul (EUA) causando perdas de aproximadamente 90% da produção. Após esse período, foi relatada também nos Estados de Michigan, Virgínia, Maryland, Montana, no Distrito de Colúmbia, Connecticut, Iowa, Idaho, Montana, Nebraska, Ohio, Oregon e Wisconsin (Hedges, 1926). No Brasil, a *murcha-de-curtobacterium* foi relatada a primeira vez em 1995 (Maringoni & Rosa, 1997) durante a safra das águas, no Estado de São Paulo. Atualmente está presente em diferentes Estados brasileiros: Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul (Leite Jr. et al., 2002; Uesugi et al., 2003; Theodoro et al., 2010).

Para uma primeira identificação morfológica dessa espécie são utilizados o teste de solubilidade em hidróxido de potássio 2% (KOH) e o teste de Gram baseado na coloração diferencial devido à constituição da parede celular do patógeno. O teste de KOH consiste na mistura de colônias bacterianas crescidas em meio de cultura e KOH aquoso a 2% em uma lâmina de vidro utilizando uma alça bacteriológica. Colônias bacterianas que produzem uma reação KOH positivo, isto é, tornam-se uma suspensão viscosa após 5 a 60 segundos, submetidas à solução de KOH 2%, são gram-negativas, isso porque as paredes celulares destas bactérias são rompidas quando expostas a soluções alcalinas ocorre a liberação de segmentos de DNA não fragmentados com consequente formação de um “fio viscoso”. As paredes celulares das bactérias gram-positivas não são afetadas pelo KOH 2% e não formam esse “fio viscoso”, sendo negativas para este teste (Powers, 1995). O teste de Gram parte do princípio que a parede celular de procariotos é formada por peptidoglicano,

que confere rigidez a célula bacteriana. Essa parede possui espessura variável e esta característica é usada na identificação e classificação de bactérias, quando se aplica a coloração diferencial de Gram. Quando este critério é usado, as bactérias se classificam em gram-negativas e gram-positivas. As Gram-negativas apresentam parede mais fina e a proporção de peptidoglicano por peso é de 5 a 10%. As bactérias Gram-positivas possuem parede mais espessa com até 50% de peptidoglicano por peso. Ao submeter as colônias ao método de coloração de Gram, as bactérias Gram-positivas tem a capacidade de reter o corante cristal violeta durante a descoloração com álcool enquanto que as Gram-negativas não retém o corante no momento da descoloração, por consequência, o corante que é usado na etapa final do procedimento, a safranina, é que gera a coloração na parede celular bacteriana gram-negativa.. Ao observar as células bacterianas com auxílio de microscópio ótico, as Gram-positivas apresentarão cor violeta e as Gram-negativas, cor rósea (Romeiro, 1995).

A colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no sistema vascular da planta causa o escurecimento dos vasos xilemáticos e a obstrução dos feixes vasculares da planta doente responsável pelo padrão de sintomas-reflexo observados em toda a extensão das plantas como mosaico e flacidez das folhas, encarquilhamento e queima dos bordos foliares, nanismo, murcha e morte das plantas (Saettler, 1991; Wendland et al., 2008). A murcha-de-curtobacterium ocasiona perdas de até 90% na produção de feijoeiro comum (Hedges, 1922). Além do feijoeiro comum outras plantas têm sido relacionadas como hospedeiras de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: ervilha, soja, *Phaseolus lunatus*, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, *Dolichos lablab*, *Phaseolus radiatus*, *P. lathyroides*, *P. calcaratus* e *P. acutifolius* (Hedges, 1926; Schuster & Sayre, 1967).

Dunleavy (1983) relatou em 1975 (Iowa, EUA), a presença de manchas necróticas em folhas de soja que produziam uma aparência esburacada. Em soja, por não apresentarem sintomas de murcha como no feijoeiro comum, o autor denominou a doença de "tan spot". Ao inocular plantas de feijão com isolado obtido de soja, a planta apresentou sintomas de murcha. Na Colômbia, Torres et al. (1982) descreveram a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em *Zornia* spp. (leguminosa forrageira). Wood & Easdown (1990) constataram na Austrália a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em *Vigna radiata* e caupi e que isolados bacterianos provindos dessas plantas foram patogênicos ao feijoeiro e a soja. Em 2001, foi descrito na Espanha, a

presença da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro na cultivar Donna, sendo até então considerada uma doença causada por um patógeno quarentenário (Gonzalez et al., 2005).

Coyne et al. (1963) realizaram estudos para verificar a reação de 1067 genótipos de feijoeiro quando inoculados com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e verificaram que os genótipos PI 165.078 e G.N. Nebraska #1 apresentaram níveis satisfatórios de resistência à murcha-de-curtobacterium. Há indicação de níveis diferentes de resistência a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em alguns genótipos e linhagens de feijoeiro. Hsieh et al. (2005), analisando 124 genótipos de feijoeiro comum, inoculados com duas variantes de coloração amarelo (YSB-2) e laranja (OSB-3), por meio de imersão das sementes com o hilo injuriado em suspensão bacteriana de 1×10^8 UFC/mL, verificou que os genótipos L02E317, Resolute, L02B662 e 9995-2A não apresentaram sintomas, resultando numa alta resistência a estes isolados de coloração distinta.

Ao estudar 40 genótipos de feijoeiro comum, Maringoni (2002) utilizou dois isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; Feij - 2625 (colônias de cor salmão) e Feij - 2634 (colônias de cor amarela). Por meio de inoculação artificial, as cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã e IAC Carioca Pyatã foram resistentes. Utilizando o isolado FJ36, Theodoro et al. (2007) verificaram que as cultivares Mouro Piratuba e Vagem Amarela foram resistentes à murcha-de-curtobacterium, comparando-se a reação de 73 cultivares a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Para avaliação de 333 genótipos do banco de germoplasma de feijoeiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Souza et al. (2006) inoculou-os com o isolado *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* Feij 2634. Utilizando uma escala de notas da severidade média da doença (SMD) para cada genótipo, 8,7% foram classificados como altamente resistentes, 3,9% como resistentes, 5,4% como moderadamente resistentes e os 82% genótipos restantes como suscetíveis.

Em sementes, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* fica alojada nas células paliádicas que formam a testa e entra no sistema vascular das sementes em desenvolvimento, através do hilo, e forma uma massa de células bacterianas no tegumento. Durante a germinação ocorre a infecção da plântula, por ferimentos da radícula gerados pelo atrito com a casca (Schuster & Smith, 1983; Chavarro et al., 1985). Camara (2008) ao analisar a transmissão planta-semente de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* verificou que as cultivares resistentes IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Pyatã e IAC Carioca Tybatã obtiveram taxa de transmissão nula. Já as cultivares Pérola e IAC Carioca obtiveram taxas de 36,78% e 10,40% de transmissão planta-semente de *C.*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*, demonstrando a importância do uso de cultivares resistentes e sementes sadias no cultivo do feijoeiro comum. O uso de sementes sadias tem sido adotado na maioria dos países do mundo, por meio de certificação sanitária. Comprovando isto, a murcha-de-curtobacterium não havia sido constatada há 20 anos em áreas de produção de Dakota do Norte. Somente em 1994 em Minnessota, EUA foi isolado *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de sementes utilizadas por um agricultor da região (Venette et al., 1995). O controle de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* está baseado no uso de sementes sadias, rotação de culturas e cultivares resistentes (Hall, 1991). Entre as medidas de controle, o uso de genótipos resistentes ou tolerantes à murcha-de-curtobacterium tem se mostrado a mais eficiente e sustentável (Rava & Costa, 2001).

2.1.1 Agressividade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum

Conforme Agrios (2005) agressividade é a quantia de doença causada pelo patógeno no hospedeiro. Conforme Camargo & Bergamin Filho (1995) as variações que ocorrem a nível de doença devem-se às diferentes agressividades do patógeno. De acordo com Camargo (2011) quando o patógeno é inoculado em diferentes genótipos pode haver variantes do patógeno mais agressivas que outras.

Obter genótipos que possuem resistência genética a patógenos é o método de controle com menor impacto ambiental e pode ser usado em grandes lavouras com menor gasto quando comparado ao controle químico. Existem patógenos que podem ser controlados somente por este método, como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* em trigo. Com o surgimento de uma nova raça mais agressiva denominada Ug99, se fez necessário o desenvolvimento de uma nova cultivar de trigo com a inserção de genes de resistência nas variedades cultivadas na área afetada (Camargo, 2011). A doença do cacauero, vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosus* Stahel (Singer) (*Sin. Marasmius perniciosus* Stahel), conhecida desde 1898 na região Amazônica, é a causa de perdas de até 85% da produção brasileira. Para controle da doença e diminuição das perdas o centro de pesquisa do cacauero (CEPLAC/ERJOH, Itabuna, BA) busca no melhoramento a resistência genética à vassoura-de-bruxa por meio de seleção e propagação de clones resistentes e por avaliação de progênes oriundas de polinizações controladas ou abertas,

entre clones e matrizes selecionadas como resistentes, em plantações altamente infectadas pelo patógeno (Nass et al., 2001).

2.1.2 Variabilidade patogênica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

O controle de algumas doenças é feito pelo emprego de variedades resistentes. No entanto, a suplantação de resistência tem sido relatada em diversos países, sendo atribuída à variabilidade do patógeno e provocando consideráveis perdas para a cultura (Rott & Davis, 1996).

O fato de uma cultivar considerada resistente em uma região comportar-se com suscetível em outra, caracteriza a hipótese da existência de raças fisiológicas do patógeno considerado. Este fato torna-se mais evidente quanto maior for a diferença entre a resistência e a suscetibilidade manifestada pelas cultivares (Sartorato, 1989).

A especialização fisiológica foi inicialmente observada em *Colletotrichum lindemuthianum*, o agente causal da antracnose em feijoeiro comum por Barrus (1911). A variabilidade genética e patogênica do *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., dificulta a obtenção de cultivares com resistência efetiva e estável à antracnose (Fernandes, 2003). A determinação de acessos diferenciadores foi um esforço para padronizar a identificação da variabilidade patogênica do fungo (Chakraborty et al., 1990; Kelemu et al., 1996).

2.2 RESISTÊNCIA GENÉTICA DO FEIJOEIRO-COMUM E CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Novos mecanismos de ataque são criados pelo patógeno para colonização do hospedeiro, este por sua vez cria novos mecanismos de defesa. Estes mecanismos estão sob controle genético, e entender como os genes de resistência do hospedeiro interagem com os genes de virulência do patógeno é de suma importância para tomadas de decisão em um programa de melhoramento (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

A resistência é uma característica genética da planta hospedeira que pode impedir ou reduzir a incidência da doença. É obtida a partir de programas de melhoramento visando à incorporação de genes de resistência ou pela aplicação de indutores biológicos ou químicos que ativam sistemas de defesa na planta. A resistência de plantas foi classificada por Vanderplank (1963) como vertical (RV) e horizontal (RH) em função da interação diferencial significativa entre raças do patógeno e cultivares do hospedeiro. Conceitualmente, a RV verifica-se quando ocorre interação diferencial significativa entre raças e cultivares, sendo a resistência efetiva contra algumas raças e não a outras. Este tipo de resistência é conhecido como raça-específica, do tipo monogênica, resistência completa ou qualitativa, chamada assim por haver diferenças de suscetibilidade e resistência ser de fácil visualização. Geralmente tem expressão caracterizada quando não ocorrem sintomas da doença, inexistindo reações intermediárias quando a variação é somente genética. Em virtude de ocorrerem mudanças genéticas para patogenicidade nas populações do patógeno, os genes que conferem RV podem não ser efetivos em todas as regiões e, portanto, cultivares completamente resistentes em determinado local podem ser suscetíveis em outro. A RH caracteriza-se por não exibir interação diferencial entre raças e cultivares, sendo eficaz contra todas as raças do patógeno. A característica marcante deste tipo de resistência é a presença de uma variação contínua de graus de resistência, indo de totalmente suscetível até uma alta resistência. É denominada raça não-específica, parcial, poligênica, resistência de campo ou de planta adulta e qualitativa. A RH caracteriza-se pela proteção incompleta, onde a infecção ocorre, mas avança lentamente, resultando em perdas na produção, podendo ser significativas ou não (Camargo & Bergamin Filho, 1995; Agrios, 2005; (Vanderplank, 1968).

Estudos de patogenicidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e análises de interação diferencial entre isolados e genótipos podem ser realizados por programas estatísticos, como Genes 2009.7.0 (Cruz, 2006). A análise de dialelos parciais pode ser empregada para obtenção de informações sobre a resistência vertical e horizontal do feijoeiro em relação à virulência do patógeno causador da doença, conforme estudo proposto por Melo & Santos (1999). Ao utilizar o esquema de dialelos parciais, os dados são analisados pelo modelo IV de Griffing (1956), em que o grupo I é formado pelo hospedeiro e grupo II é formado pelo patógeno para obtenção da estimativa da capacidade geral de combinação do grupo I (C.G.C. I), capacidade geral de combinação do grupo II (C.G.C. II) e capacidade específica de combinação (C.E.C.). A capacidade específica de

combinação (C.E.C.) corresponde à capacidade específica de interação indicando interação entre os componentes dos dois grupos. Essa estimativa pode representar, portanto, a virulência da raça do patógeno e também a resistência vertical dos genótipos do hospedeiro.

Silva et al. (2010) verificou a interação diferencial entre 50 genótipos de feijoeiro e quatro isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli. Foi verificado que houve variação na agressividade do patógeno em relação aos diferentes genótipos inoculados. Constatou-se também que os genótipos CNFP 10120 e BRS Campeiro foram os mais resistentes ao cretamento bacteriano comum, apresentando resistência vertical e horizontal ao patógeno.

Ao analisar 16 genótipos de algodão inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. alvacearum e *Ramularia aréola*, Maranhã et al. (2002) concluíram que as cultivares de algodão BRS Antares e BRS Facual apresentaram resistência horizontal à *X. campestris* pv. alvacearum. A cultivar BRS Facual apresentou resistência horizontal para *R. aréola*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Amostras de feijoeiro-comum foram coletadas em regiões produtoras de várias localidades brasileiras. Em cada região, foram coletadas 2 a 3 plantas para realização do isolamento. O material foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão para proceder o isolamento de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Os fragmentos foram retirados de várias partes da planta e identificados, em seguida foram submetidos à assepsia em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por um minuto e água destilada estéril para lavagem dos fragmentos (Romeiro, 2001).

Foram realizados cortes longitudinais e o material interno dos fragmentos foi raspado com bisturi flambado, hidratado e macerado. O material macerado foi disposto em placa de Petri contendo meio ágar nutriente (extrato de carne – 3g; peptona – 5g; ágar – 15g; glicose – 2,5g; água destilada – 1000 mL) com auxílio de alça de platina. O macerado foi depositado próximo à borda da placa e foram traçadas três estrias paralelas espaçadas entre si para espalhar a suspensão da bactéria e permitir a formação de colônias isoladas. Este procedimento foi repetido, traçando-se mais três estrias em ângulo de 90°, em relação às primeiras. As placas foram incubadas em estufa de crescimento (Licití) a 28±1°C até o aparecimento de colônias bacterianas. Após o crescimento, foi realizada a purificação de colônias com auxílio de alça de platina em que foi retirada uma colônia individual da bactéria e repicada em nova placa de Petri contendo o meio ágar nutriente. As colônias puras após o crescimento foram preservadas para posteriores testes de identificação. Este método de isolamento foi utilizado para obtenção dos 24 isolados que compõem a Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão.

3.2 IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

3.2.1 Morfologia Celular

Foram realizados testes morfológicos, bioquímicos, moleculares e de patogenicidade para identificação dos isolados. Os testes morfológicos consistiram na observação da colônia quanto ao padrão de crescimento, coloração, fluidez, formato, tamanho, viscosidade e temperatura ideal de crescimento das colônias (Bradbury, 1986).

3.2.2 Teste de Patogenicidade

Para realização do teste de patogenicidade conforme os postulados de Koch (Camargo, 2011), foram instalados experimentos em casa de vegetação para inoculação dos isolados nos genótipos suscetíveis: Rosinha e CNFRS 11997, além da testemunha resistente Ouro Branco. Para preparo do inóculo, as colônias foram multiplicadas em placa de Petri contendo meio ágar nutriente e desenvolvidas a $28\pm1^{\circ}\text{C}$ em estufa de crescimento por 48 horas.

As plantas foram inoculadas dez dias após semeadura, utilizando agulha entomológica contendo de colônias bacterianas, por meio de duas punções feitas no caule da planta, entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias. As avaliações foram realizadas aos 14 e 21 dias após inoculação, conforme a escala de severidade de sintomas (Tabela 1). Havendo associação patógeno-hospedeiro, em que as colônias isoladas de áreas produtoras de feijoeiro-comum quando inoculados em genótipos suscetíveis em casa de vegetação, causaram os mesmos sintomas observados nas plantas doentes coletadas no campo, seguiu-se o reisolamento do patógeno para caracterização morfológica e confirmação de que o patógeno isolado foi o causador da doença.

3.2.3 Teste de Solubilidade em Hidróxido de Potássio 2%

A realização da solubilização das colônias consistiu na utilização de hidróxido de potássio 2% (KOH2%) para análise das colônias isoladas de feijoeiro-comum. Duas gotas de KOH2% foram depositadas em lâmina comum de microscopia e com auxílio de

alça de platina flambada, transferindo-se uma porção da colônia bacteriana e em movimentos circulares observou a formação de um fio viscoso ao afastar a alça de platina da lâmina. A formação do fio viscoso indica que houve solubilização da colônia ao ser submetida ao KOH2%, comprovando que esta é gram-negativa, indicando que houve o rompimento das paredes celulares bacterianas e a liberação de DNA, pois são facilmente rompidas quando submetidas a solução alcalina. O não aparecimento do fio viscoso indica que a colônia é gram positiva (Powers, 1995).

3.2.4 Teste de Coloração Diferencial de Gram

A análise da capacidade da célula bacteriana em reter ou não a coloração foi realizada pelo procedimento de teste de Gram. Colônias bacterianas de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com 48 horas de idade foram transferidas com auxílio de alça de platina para lâmina comum de microscopia, para o preparo e fixação de esfregaço bacteriano. Em seguida, o esfregaço na lâmina foi coberto com solução cristal violeta 10% por um minuto. O esfregaço foi lavado com água destilada estéril e posteriormente a lâmina foi secada com papel toalha, e logo após cobriu-se o esfregaço com lugol 1% por um minuto. Procedeu-se a lavagem com água destilada estéril e secou-se com papel toalha. Realizou-se a descoloração com álcool absoluto por 30 segundos, e posteriormente lavou-se com água destilada estéril e secou-se o esfregaço. Por cinco minutos o esfregaço ficou coberto com safranina 0,25% e foi lavado com água destilada estéril. O esfregaço foi seco em temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico (Nikon - Labophot-2). As colônias que apresentaram coloração vermelha foram consideradas gram negativas e as colônias que apresentaram coloração púrpura, gram positivas (Davies et al., 1983).

3.2.5 Confirmação da identidade dos isolados de *Curtobacterium*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* com os iniciadores CffFOR2 e CffREV4

Para detecção e confirmação da identidade dos isolados foi realizada a amplificação de fragmentos específicos do DNA de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por reação da polimerase em cadeia (PCR) com os iniciadores CffFOR2 5' GTTATGAACTTCACTCC 3' e CffREV4 5' GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3' (Tegli et al.,

2002). Os isolados foram crescidos em placa de Petri contendo meio ágar nutriente e incubados em estufa de crescimento por 48 horas à $28\pm 1^\circ\text{C}$. A suspensão de cada um dos isolados foi preparada pela transferência de duas porções de colônia bacteriana para 2 mL de água destilada esterilizada em microtubos de 2,5 mL, com auxílio de alça de platina, em seguida a suspensão foi homogeneizada em vortex.

A reação com volume total de 50 μL , foi composta por 5 μL de solução bacteriana, 5 μL de tampão (10X), 2 μL de MgCl_2 (50 mM); 0,5 μL de dNTPs (10mM); 0,5 μL de cada primer (0,4 mM) e 0,3 μL de Taq polimerase (5 U/ μL) (Fermentas), completando-se o volume com 36,2 μL de água ultra pura estéril. A amplificação por PCR foi realizada em termociclador (ESCO – Swift Max Pro) e consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos; 25 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O peso molecular de 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para comparação com os pesos moleculares das amostras amplificadas. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) por 50 minutos a 100 V/cm em tampão TBE 1,0X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 0,87 g de EDTA, 1000 mL de água destilada) utilizando cuba eletroforética (Bioneer – Agaro – PowerTM) e fonte PWSys – PW300. O gel foi corado com brometo de etídeo para análise dos produtos amplificados. Após 15 minutos, o gel foi fotodocumentado sob luz UV utilizando equipamento transiluminador (Gel Doc – Bio Rad) e programa computacional Quantity One (4.6.3).

3.2.6 Preservação dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os isolados foram preservados em tubos de ensaio contendo ágar nutriente, as colônias foram repicadas em formato de estrias simples e incubados a $28\pm 1^\circ\text{C}$ em estufa de crescimento. Para preservação nos métodos de Castellani (1963), tampão fosfato e glicerol 15%, os isolados foram multiplicados em placa de Petri contendo meio ágar nutriente, incubadas em estufa de crescimento a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e com 48 horas de idade.

Para a preservação em papel filtro, foi feita a adição de 1 mL de água destilada estéril na placa de Petri contendo o isolado a ser preservado, para o preparo de uma suspensão bacteriana com auxílio de alça de Drigalski. O papel filtro foi depositado sobre a suspensão e este absorveu toda a solução. Posteriormente o papel foi acondicionado em

placa de Petri contendo sílica gel para sua total desidratação. Após completa dessecação, cortou-se o papel filtro em pedaços de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm, posteriormente condicionados em microtubos com sílica gel e armazenados em freezer -20°C (Takatsu, 1980).

No método proposto por Castellani (1963), as colônias bacterianas foram transferidas por meio de duas alçadas repletas de bactéria, para microtubos contendo água destilada estéril, homogeneizadas com auxílio de vortex e armazenadas em geladeira 4°C. Para preservação em tampão fosfato duas alçadas do isolado a ser preservado foram transferidas para microtubo contendo tampão fosfato pH 6,8 (49,7 mL de 174,18 g de K₂HPO₄ diluído em 1000 mL de água + 50,3 mL de 136,09g de KH₂PO₄ diluído em 1000 mL de água) e armazenados em geladeira 4°C. Na criopreservação em glicerol 15% (850 mL de água destilada estéril; 2,5 gr de glicose; 3,0 gr extrato de carne; 5,0 gr de peptona; 150mL de glicerol) fez-se a transferência da colônia bacteriana para microtubos contendo glicerol 15%, a suspensão foi homogeneizada com auxílio de vortex e preservada em ultra-freezer - 80 °C. Todos os procedimentos de preservação foram realizados em ambiente estéril, de câmara de fluxo laminar Marconi (MA 1550) (Simione, 1998).

3.3 CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE 24 ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM TRÊS GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM

Os experimentos foram realizados em junho de 2011, no laboratório de Fitopatologia e nos telados da Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, Goiás a 16°28'00" de latitude Sul e 49°17'00" de longitude oeste, com altitude de 823m (Stone et al., 2006). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, utilizando-se três plantas por vaso. Cada vaso com capacidade de 2 litros, conteve a proporção de 2:1 (terra:substrato).

As cultivares Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP10132, consideradas como resistente, moderadamente resistente e suscetível, respectivamente (Rava & Costa, 2001; Wendland et al., 2012), foram inoculadas com os 24 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, utilizando o mesmo método de inoculação do teste de patogenicidade. Os isolados são oriundos de diferentes regiões produtoras de feijoeiro do Brasil e foram

preservados e disponibilizados pela Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, relacionados na Tabela 3.

O preparo do inóculo consistiu na multiplicação dos isolados em placa de Petri contendo meio ágar nutriente, incubados em estufa de crescimento a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Aos dez dias após o plantio as plantas foram inoculadas da mesma forma citada no item 3.5.2.

As avaliações ocorreram aos 15 e 21 após inoculação utilizando a escala de notas de severidade da murcha-de-curtobacterium. Nesta, os sintomas recebem notas que vão crescendo conforme a severidade da doença (Tabela 1). Os dados foram submetidos à variância e ao teste F, utilizando o *software* Sisvar 5.3 (Ferreira, 1999). Ao verificar que os tratamentos diferiram entre si com teste F significativo, os dados foram submetidos ao teste de Scott & Knott (1974) com o intuito de constituir grupos em função da variabilidade entre estes grupos de médias com relação à agressividade.

Tabela 1. Escala descritiva de severidade de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro-comum*

Notas	Descrição
1	Ausência de sintomas;
2	Presença de mosaico nas folhas;
3	Flacidez nas folhas;
4	Flacidez e mosaico nas folhas;
5	Flacidez ou mosaico nas folhas associado a queima de bordos ou encarquilhamento de bordos das folhas;
6	Nanismo das plantas;
7	Nanismo da planta associados a outros sintomas, exceto murcha da planta ou apenas sintomas de murcha da planta;
8	Murcha da planta associados a outros sintomas;
9	Morte das plantas

* desenvolvida por Wendland (2009)

3.4 COLONIZAÇÃO DO XILEMA DE FEIJOEIRO-COMUM POR *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

A colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no xilema de feijoeiro foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os genótipos Ouro Branco, IPA 9 (resistentes), Diacol Calima (moderadamente resistente), CNFC 10429 e CNFRS 11997 (suscetíveis) pertencentes ao programa de melhoramento do feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão foram plantados em vasos com capacidade de dois litros na proporção de 2:1 (terra: substrato). Foram mantidas três plantas por vaso e aos dez dias após o plantio foram inoculados com os isolados CNPAFCff 31 e CNPAFCff 25, isolados da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, que apresentam menor e maior agressividade respectivamente. O procedimento de inoculação deste experimento é idêntico ao descrito para o estudo de interação diferencial.

As plantas foram coletadas vinte dias após inoculação e levadas ao laboratório para cortes 2 cm acima e 2 cm abaixo do local das injúrias causadas pela inoculação. Cortes longitudinais e transversais originaram fragmentos de aproximadamente 0,1 cm de espessura. Estas amostras foram fixadas por 24 horas em glutaraldeído 2,5% (diluído em solução tampão fosfato - 0,2M; pH 7,2). Após a fixação foi realizada lavagem no tampão cacodilato (0,1M; pH 7,0) por três vezes durante dez minutos cada lavagem. Seguida de desidratação alcoólica seriada de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e P.A. 100% durante 15 minutos cada série. Utilizou-se álcool P.A. 100% para secagem que foi procedida na condição de ponto crítico do dióxido de carbono (CO₂), realizada em aparelho de ponto crítico Autosamdri®, 815, Series A. As amostras foram arranjadas em stubs para metalização em Metalizador Denton Vacuum, Desk V., onde foram cobertas por ouro para posterior análise em MEV modelo Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging.

3.5 INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM FEIJOEIRO-COMUM

3.5.1 Instalação de experimento em casa de vegetação

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação da Embrapa Arroz e Feijão, localizados em Santo Antônio de Goiás, Goiás, a 16°28'00" de latitude Sul e 49°17'00" de longitude Oeste, com altitude de 823m (Stone et al., 2006). Os ensaios foram conduzidos com delineamento em blocos casualizado com esquema de parcela subdividida em que a parcela e a sub parcela foram compostas por isolados e genótipos respectivamente, com três repetições, e um controle não inoculado.

Os 30 genótipos avaliados são de diferentes origens com representantes da Europa, América do Norte e Sul. Estes genótipos integram o programa de melhoramento do feijoeiro desta instituição (Tabela 2). Foram realizados dois ensaios diferentes para análise da reação dos genótipos ao serem inoculados com os oito isolados (Tabela 3).

Tabela 2. Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de feijoeiro-comum da Embrapa Arroz e Feijão

ID	Genótipos	Instituição	Cidade	País
1	Coquinho	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
2	BRS Cometa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
3	BRS Estilo	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
4	Vermelho	-	-	-
5	BRS Esplendor	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
6	BRS Esteio	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
7	BRS Notável	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
8	IAC Carioca Pyatã	Instituto Agronômico de Campinas	Campinas	Brasil
9	IAC Carioca Akytã	Instituto Agronômico de Campinas	Campinas	Brasil
10	IAC Carioca Aruã	Instituto Agronômico de Campinas	Campinas	Brasil
11	Pérola	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
12	BRS Requite	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
13	Uirapuru	Instituto Agronômico do Paraná	Londrina	Brasil
14	BRS Campeiro	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
15	A 211	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
16	IPA 6	Instituto Agronômico de Pernambuco	Recife	Brasil
17	Frijólica 0-3-1	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
18	BAT 477	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
19	IPA 1	Instituto Agronômico de Pernambuco	Recife	Brasil
20	TU	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
21	TO	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
22	AND 277	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
23	Widusa	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia

Tabela 2. (Continuação)

ID	Genótipos	Instituição	Cidade	País
24	Michelite	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
25	IPA 7419	Instituto Agrônômico de Pernambuco	Recife	Brasil
26	Cornell 49242	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
27	PI 207 262	International Center for Tropical Agriculture	Cali	Colômbia
28	IPA 9	Instituto Agrônômico de Pernambuco	Recife	Brasil
29	Ouro Branco	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil
30	CNFRS 11997	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Santo Antônio de Goiás	Brasil

3.5.2 Preparo de inóculo e inoculação

Os isolados utilizados nos experimentos foram escolhidos após inoculação nos genótipos Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP 10132 e apresentaram diferentes níveis de agressividade, sendo agrupados em quatro grupos em função da variabilidade com relação à agressividade conforme o teste de Scott & Knott (1974). Foram escolhidos oito isolados, dois isolados de cada grupo, provindos de seis regiões brasileiras diferentes (Tabela 3.).

Tabela 3. Isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de regiões distintas com diferentes níveis de agressividade

ID	ISOLADOS	MÉDIAS DE SEVERIDADE (NOTAS)	ORIGEM
1	CNPAFCff 31	1,33	Angatuba – SP
2	CNPAFCff 11	1,66	Anápolis – GO
3	CNAPFCff 34 ¹	4,00	Campos Novos – SC
4	CNAPFCff 36 ¹	4,66	Pato Branco – PR
5	CNPAFCff 04	5,50	Luziânia – GO
6	CNPAFCff 27	6,16	Angatuba – SP
7	CNAPFCff 33 ²	8,66	Brasília - DF
8	CNPAFCff 25	9,00	Wenceslaw Braz - PR

¹Instituto Agrônômico do Paraná – donor: Rui Pereira Leite Jr.

²Departamento de Fitopatologia – Universidade de Brasília – donor: Carlos H. Uesugi

Para preparo do inóculo os isolados foram multiplicados em placa de Petri com meio ágar nutriente (extrato de carne – 3g; peptona – 5g; ágar – 15g; glicose – 2,5g; água destilada – 1000mL) e incubados em câmara de crescimento (Liciti) a 28°C por 48 horas. A suspensão bacteriana de cada isolado foi obtida utilizando água destilada estéril com auxílio de alça de Drigalsky. A suspensão obtida foi diluída até a concentração de 10^8 ufc.mL⁻¹, utilizando espectrofotômetro (FEMTO) calibrado com comprimento de ondas de 540 nm (nanômetros) com 1,0 ABS (absorbância) (Silva Júnior, 2011). O preparo do inóculo foi realizado minutos antes da inoculação em casa de vegetação. A inoculação foi realizada por duas aplicações de volume de 10µl do inóculo 10^8 ufc.mL⁻¹ no caule com perfuração, acima das folhas cotiledonares e abaixo das folhas primárias, com auxílio de seringa de 1mL (BD - Ultra-Fine – Agulha-12,7x0,33). A testemunha foi inoculada com duas perfurações e injetado 10µl de água destilada estéril em cada orifício.

3.5.3 Avaliação e análise de dados

As avaliações ocorreram aos 15 e 21 dias após inoculação. A reação das plantas à murcha-de-curtobacterium foi avaliada utilizando a escala de notas de severidade da doença variando de 1 a 9, desenvolvida por Wendland et al. (2009) baseando-se no tipo de reação da planta à colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Tabela 1).

Os dados fenotípicos, considerando o tipo de reação à murcha-de-curtobacterium, com as notas obtidas em avaliação aos 15 dias, foram submetidas à análises de variância individual e conjunta. As médias foram submetidas à análise de dialelos parciais para obtenção de informações sobre a resistência vertical e horizontal do feijoeiro em relação à virulência e agressividade do patógeno causador da murcha-de-curtobacterium, conforme estudo proposto por Melo & Santos (1999). A inoculação de 30 genótipos com 8 isolados originou um total de 1410 combinações. Um grupo foi formado por genótipos do hospedeiro e o outro grupo por diferentes isolados do patógeno. Considerando a interação patógeno-hospedeiro, a CGC I correspondeu à capacidade geral de reação (CGR) representando a resistência horizontal dos genótipos, dependente da nota média do hospedeiro de reação à inoculação com diferentes isolados (raças) do patógeno. Similarmente, a CGC II corresponde a capacidade geral de agressividade (CGA) do patógeno, representando a patogenicidade média de cada raça quando utilizada para inocular todos os genótipos do hospedeiro. A capacidade específica de combinação (CEC)

corresponde a capacidade específica de interação indicando interação entre os componentes dos dois grupos. Essa estimativa pode representar, portanto, a virulência da raça do patógeno e também a resistência vertical dos genótipos do hospedeiro. O modelo matemático proposto para analisar a interação poligênica patógeno-hospedeiro com utilização de dialelos parciais é a seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + r_i + a_j + s_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = severidade da doença apresentada pelo i_{esimo} hospedeiro quando inoculado com o j_{esimo} isolado (raça);

r_i = efeito da resistência horizontal do i_{esimo} hospedeiro;

a_j = efeito da agressividade do j_{esimo} isolado (raça);

s_{ij} = efeito da interação entre o i_{esimo} hospedeiro e o j_{esimo} isolado (raça), relativo ao efeito de virulência do j_{esimo} isolado (raça) com a resistência vertical do i_{esimo} hospedeiro.

3.6 INDICAÇÃO DE CULTIVARES DIFERENCIADORAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

As análises de estratificação da interação patógeno x hospedeiro foram realizadas na análise conjunta das duas épocas, utilizando-se o aplicativo Genes (Cruz, 2006) para estimar a ecovalência de Wricke (1965) e o método Lin & Binns (1988). Foram estimadas também as correlações de Pearson das médias dos genótipos para cada par de isolados, e estes foram considerados discrepantes quando a correlação foi baixa, não significativas ou negativas. Assim os pares de isolados com menores correlações foram considerados os mais informativos e discrepantes e onde existe maior interação patógeno x hospedeiro ou seja, interação gene-a-gene.

A ecovalência de Wricke (1965) foi utilizada no presente trabalho para medir a contribuição de cada genótipo para interação genótipo x isolado. Dessa forma o somatório dos (W_i^2) correspondem ao valor da soma de quadrados da interação genótipo x isolado. Deste modo, foi possível calcular a porcentagem da interação G x I devida a cada genótipo (W_i^2 %), dada por: $W_i^2 \% = (\omega_i / \sum \omega_i) \times 100$. O material genético mais estável é

considerado aquele com menor estimativa para a ecovalência, ou seja, com menor contribuição para a interação genótipos x isolados (Ramalho et al., 2012). Os genótipos candidatos às diferenciadoras foram os que apresentarem maior interação (W_i) com os oito isolados inoculados, possibilitando a diferenciação de patótipos entre eles. Para isso, decompôs-se a soma de quadrados da interação genótipo x isolado nas partes devidas a cada genótipo, de acordo a expressão:

$$W_i^2 = \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - Y_{i.} - Y_{.j} + Y_{..})$$

Em que:

Y_{ij} : média do genótipo i no isolado j ; $Y_{i.}$: média do genótipo i ;

$Y_{.j}$: média do isolado j ;

$Y_{..}$: média geral

O método de Lin & Binns (1988), modificado por Carneiro (1998) foi utilizado para estimar a estabilidade dos genótipos com a classificação dos isolados em graus de agressividade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Este método possibilita a identificação de um ou mais genótipos com desempenho mais distante em relação do genótipo mais suscetível nos isolados testados. Nesta metodologia a reação dos genótipos foi estimado pelo índice de estabilidade P_i , o qual é a estimativa do quadrado médio da distância entre a média do genótipo i e a média do genótipo mais suscetível para cada isolado. O genótipo que apresentou o maior valor de P_i foi o mais estável entre os resistentes. . Para obtenção desta estimativa utilizou-se a seguinte fórmula:

$$P_i = \sum_{j=1}^n \frac{(X_{ij} - M_j)^2}{2n}$$

em que:

P_i : estimativa do parâmetro estabilidade do genótipo i ;

Y_{ij} : reação do i -ésimo genótipo no j -ésimo isolado;

M_j : resposta observada máxima observada entre todos os genótipos no isolado j ; e

n : número de isolados

$P_i (+)$: número de isolados com média acima da média geral;

$P_i (-)$: número de isolados com média abaixo da média geral

Com a estimativa de P_i também foi possível verificar o comportamento individual dos genótipos quando inoculados com os isolados que causam doença acima da média de todos os isolados e com isolados que causam doença abaixo da média de todos os isolados. Os genótipos resistentes e suscetíveis apresentaram as maiores e menores estimativas (P_i), respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

O método de isolamento de (Romeiro, 2001) mostrou-se eficiente para obtenção de 24 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Após 48 horas do procedimento de isolamento cresceram várias colônias à $28\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após a purificação as colônias apresentaram coloração amarelada, brilhantes, com bordos lisos, circulares, sem viscosidade, semifluida, mediram 2 mm com 3 dias de idade em cultivo do meio ágar conforme descrito por Bradbury (1986). Foram obtidos 24 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* provindos de 11 regiões produtoras de feijoeiro-comum após isolamentos, caracterização morfológica e testes de identificação. Foram numerados conforme a entrada no caderno de registros de isolados. O isolado CNPAFCff 04, foi recuperado de papel filtro, purificado e incluído na coleção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* da Embrapa Arroz e Feijão. Os 24 isolados apresentaram colônias com coloração amarela, semifluidas, circulares, sem viscosidade e com crescimento entre 1 a 4 mm quando incubadas em BOD à $28\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Ao submeter as colônias aos testes bioquímicos foi confirmado tratar-se de bactéria gram positiva pelo teste de solubilidade de KOH 2%, pois não houve dissolução da parede celular demonstrando a eficiência deste teste na diferenciação de bactérias gram-negativas e positivas obtendo o mesmo resultado de Powers (1995) que obteve sucesso no teste de KOH 3% em 99,1% das bactérias analisadas.

No teste de coloração diferencial de Gram as colônias de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* apresentaram cor púrpura, concluindo que são Gram positivas. Estes resultados também foram obtidos por Uesugi et al. (2003), Maringoni & Rosa (1997) e Bradbury (1986) ao caracterizar os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidos de feijoeiro-comum. O teste de patogenicidade realizado em casa de vegetação com a inoculação dos genótipos Rosinha-G2 e CNFRS 11997 demonstrou que as plantas apresentaram os mesmos sintomas encontrados nos campos em que as amostras de feijoeiro comum foram coletadas. Os sintomas de flacidez, encarquilhamento de bordo, queima de bordo, nanismo, murcha e morte (Figura 1) foram observados nas plantas inoculadas. Estes resultados confirmaram a patogenicidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* esperada pelos Postulados de Koch no feijoeiro-comum (Rezende et al., 2011). A suscetibilidade observada nos genótipos utilizados no presente trabalho foi compatível com os resultados obtidos por Souza (2004) e Wendland et al. (2012). A cultivar Ouro Branco demonstrou-se resistente à murcha-de-curtobacterium, concordando com os resultados obtidos por Rava & Costa (2001).

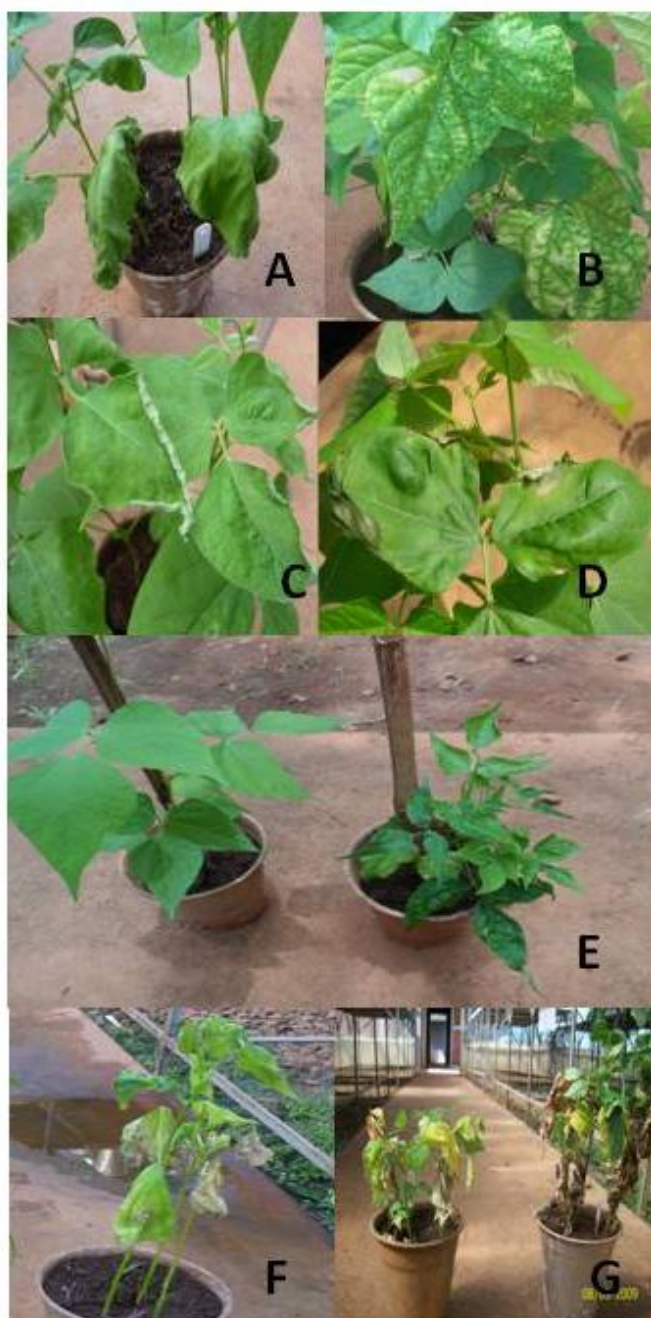


Figura 1. Sintomas da murcha-de-curtobacterium: A – flacidez; B - mosaico; C - encarquilhamento de bordo; D - queima de bordo; E – nanismo; F – murcha e G – morte.

Na amplificação dos produtos de PCR, foi observado que os isolados apresentaram um fragmento de 306pb (Figura 2), confirmando, portanto, os resultados obtidos por Tegli et al. (2002), em que o mesmo tamanho de fragmento foi obtido em todos os testes que foram utilizados os iniciadores *CffFOR2* e *CffREV4*. Tegli et al. (2002) ao realizar testes para confiabilidade dos iniciadores utilizou amostras de outras espécies, não

obtendo amplificação do DNA, demonstrando alta especificidade destes iniciadores para detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

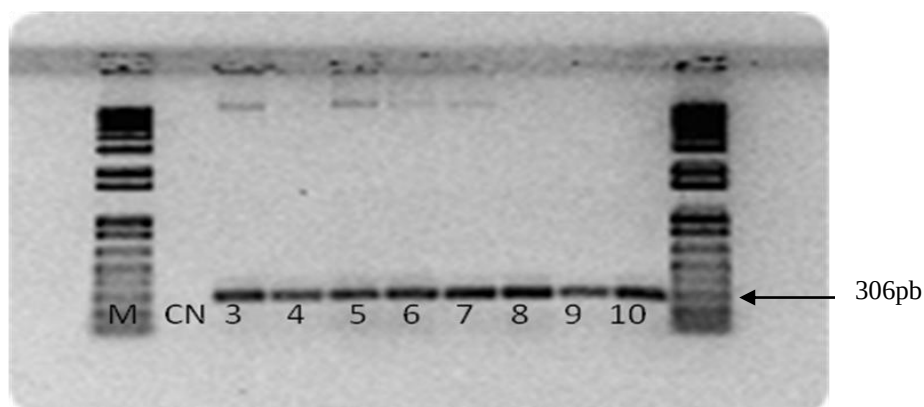


Figura 2. Análise eletroforética de 8 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidos com os iniciadores *Cff*FOR2 e *Cff*REV4 (M: marcador molecular 1kb Ladder; CN – controle negativo; 3-*Cff*04; 4-*Cff*11; 5-*Cff*25; 6-*Cff*27; 7-*Cff*31; 8-*Cff*33; 9- *Cff* 34; 10- *Cff* 36).

Por meio das caracterizações morfológicas, testes bioquímicos, patogênicos e identificação molecular foi possível confirmar a identidade dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e preservá-los em tubos de ágar nutriente inclinados a 28°C, papel filtro a -20°C, Castellani e tampão fosfato a 10°C e criopreservação em glicerol a -80°C. Os isolados estão disponíveis para uso na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, pois estes métodos de preservação são eficientes para manter a viabilidade do patógeno (Tabela 4) (Bandeira et al., 2011).

Tabela 4. Procedência e data de coleta de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de plantas de feijoeiro-comum

Número na Coleção	Data da Coleta	Município da Coleta	Latitude	Longitude	Altitude	Variedade do Hospedeiro
<i>Cff</i> 1	24/01/08	Ponta Grossa - PR	25° 05' 42" S	50° 09' 43" W	969m	CNFC 10758
<i>Cff</i> 2	24/01/08	Ponta Grossa - PR	25° 05' 42" S	50° 09' 43" W	969m	CNFC 10758
<i>Cff</i> 3	24/01/08	Ponta Grossa - PR	25° 05' 42" S	50° 09' 43" W	969m	CNFC 10758
<i>Cff</i> 4	-	Luziânia	16° 15' 09" S	47° 57' 01" W	930m	-
<i>Cff</i> 5	25/01/08	Ponta Grossa - PR	25° 05' 42" S	50° 09' 43" W	969m	CNFC 11970
<i>Cff</i> 6	10/10/08	Anápolis - GO	16° 19' 36" S	48° 57' 10" W	1017m	Light Red Kidney
<i>Cff</i> 7	10/10/08	Anápolis - GO	16° 19' 36" S	48° 57' 10" W	1017m	Dark Red Kidney
<i>Cff</i> 11	-	Anápolis - GO	16° 19' 36" S	48° 57' 10" W	1017m	Pérola
<i>Cff</i> 14	21/04/09	Ponta Grossa - PR	25° 05' 42" S	50° 09' 43" W	969m	Grão Carioca

Tabela 4. (Continuação)

Número na Coleção	Data da Coleta	Município da Coleta	Latitude	Longitude	Altitude	Variedade Do Hospedeiro
Cff 25	13/10/09	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	Rubi
Cff 26	13/10/09	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	Bola Cheia
Cff 27	14/10/09	Angatuba - SP	23° 29' 23" S	48° 24' 46" W	624m	Pérola
Cff 28	14/10/09	Taguarituba - SP	23° 31' 59" S	49° 14' 40" W	618m	-
Cff 29	14/10/09	Paranapanema - SP	23° 23' 19" S	48° 43' 22" W	610m	Iapar
Cff 30	14/10/09	Santana do Itaré - PR	23° 45' 18" S	49° 37' 45" W	545m	Cometa
Cff 31	14/10/09	Angatuba - SP	23° 29' 23" S	48° 24' 46" W	624m	Pérola
Cff 32	15/11/10	-	-	-	-	Rubi
Cff 33	-	Brasília - DF	-	-	-	-
Cff 34	2000	Campos Novos - SC	27° 24' 06" S	51° 13' 30" W	934m	-
Cff 35	2000	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	-
Cff 36	2000	Pato Branco - PR	26° 13' 43" S	52° 40' 14" W	761m	-
Cff 37	2002	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	-
Cff 38	2002	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	-
Cff 39	2002	Wenceslau Braz - PR	23° 52' 26" S	49° 48' 10" W	841m	-

4.3 CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE 24 ISOLADOS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM TRÊS GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO-COMUM

As notas foram atribuídas de acordo com as reações que cada genótipo apresentou ao ser submetido à inoculação de cada um dos 24 isolados. A partir das notas foram calculadas as médias da primeira e segunda avaliação para análise das reações das cultivares aos 15 e 21 dias após inoculação. Os resultados obtidos nas avaliações foram submetidos à análise de variância (Tabela 5). De acordo com o teste t, foram observadas diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% de probabilidade entre genótipos, isolados, épocas.

Tabela 5. Resumo da análise de variância de três cultivares inoculadas com 24 isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	3,877315	0,375	0,6891 ^{ns}
Genótipos	2	248,016204	24,009	0,0000*
Isolado	23	39,921095	3,864	0,0000*
Erro 1	46	10,330213		
Época	1	96,333333	39,205	0,0000*
Cultivar*Isolado	46	10,330213	4,204	0,0000*
Cultivar*Época	2	2,270833	0,924	0,3983 ^{ns}
Época*Isolado	23	2,859903	1,164	0,2792 ^{ns}
Cultivar*Época*Isolado	46	2,884360	1,174	0,2216 ^{ns}
Erro 2	240	2,457176		
CV 1 (%)	63,81			
CV 2 (%)	31,12			
Média Geral	5,0370370			

* significativo à 5% de probabilidade

O teste de Scott & Knott (1974) classificou os isolados em quatro grupos de acordo com a agressividade apresentada pela inoculação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nas cultivares Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP 10132 (Tabela 6). Houve diferença de virulência entre os isolados, mostrando diferença de intensidade dos sintomas quando inoculados na mesma cultivar. Por exemplo, o isolado CNPAFCff 14 não causou sintomas na cultivar Ouro Branco. Já o isolado CNPAFCff 25 causou morte nesta cultivar considerada resistente a *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* conforme Rava & Costa (2001), sendo este isolado o mais agressivo da coleção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. O isolado CNPAFCff 14 apresentou sintomas apenas na cultivar BRS Esplendor com nota média de 5,7. O isolado CNPAFCff 31 foi menos virulento ao genótipo CNFP 10132, considerado suscetível (Wendland et al., 2012), quando comparado ao genótipo BRS Esplendor, moderado resistente. Dos 24 isolados, oito classificaram os genótipos Ouro Branco como resistente, BRS Esplendor como ou moderadamente resistente e CNFP 10132 como suscetível. Os demais isolados se comportaram diferentemente, sendo mais agressivo ao genótipo resistente e menos agressivo ao suscetível, ou apresentando o mesmo grau de agressividade aos três genótipos inoculados.

Tabela 6. Média da severidade dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* inoculados nos genótipos Ouro Branco, BRS Esplendor e CNFP 10132

ISOLADOS	MÉDIAS DE SEVERIDADE (NOTAS)	SCOTT E KNOTT*
CNPAFCff 14	2,6	a
CNPAFCff 31	2,5	a
CNPAFCff 11	2,8	a
CNAPFCff 35	5,2	b
CNAPFCff 34	5,0	b
CNAPFCff 38	4,3	b
CNAPFCff 36	6,4	b
CNPAFCff 04	5,8	c
CNPAFCff 30	5,0	c
CNPAFCff 07	5,7	c
CNPAFCff 27	6,6	c
CNPAFCff 26	8,0	c
CNAPFCff 37	7,0	c
CNPAFCff 01	6,1	c
CNPAFCff 05	7,3	c
CNPAFCff 03	6,1	c
CNPAFCff 29	6,9	c
CNPAFCff 32	6,5	c
CNAPFCff 39	7,4	d
CNPAFCff 02	6,0	d
CNPAFCff 06	6,3	d
CNAPFCff 33	7,2	d
CNPAFCff 28	7,0	d
CNPAFCff 25	9,0	d

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott

Os isolados menos agressivos foram CNPAFCff 11, CNPAFCff 14 e CNPAFCff 31 procedentes de Goiás, Paraná e São Paulo, respectivamente, pois não causaram sintomas ou apenas o início de mosaico. O isolado IAPAR 13215, procedente de Santa Catarina, e os isolados CNAPFCff 35 e CNAPFCff 36 procedentes do Paraná, foram mais agressivos, comparados aos do grupo citado anteriormente. Estes isolados causaram flacidez, mosaico ou os dois sintomas simultaneamente. Os isolados CNPAFCff 01,

CNPAFCff 03, CNPAFCff 04, CNPAFCff 26, CNPAFCff 29, CNPAFCff 32 e CNAPFCff 37 isolados de amostras providas do Paraná, CNPAFCff 05 e CNPAFCff 07 isolados de feijoeiro de Goiás, CNPAFCff 27 e CNPAFCff 30 provenientes de São Paulo, formaram o terceiro grupo de agressividade. Neste as plantas apresentaram sintomas de flacidez, mosaico, queima e encarquilhamento de bordo simultaneamente e também nanismo, associado ou não aos demais sintomas citados, com nota média de severidade variando de 5,5 a 7,0. O quarto grupo foi formado pelos isolados CNPAFCff 02, CNPAFCff 25 e CNAPFCff 39 oriundos do Paraná, CNPAFCff 06 de Goiás, CNPAFCff 28 procedente de São Paulo e CNPAFCff 33 isolado de feijoeiro cultivado no Distrito Federal. Estes isolados causaram murcha e morte das plantas, foram considerados os mais agressivos. Não houve correlação entre o grau de agressividade e a região de origem dos isolados (Tabela 6).

Os isolados incitaram comportamentos diferentes quando inoculados em cultivares diferentes e também se diferiram quando inoculados na mesma cultivar. Confirmando os resultados do presente trabalho em que isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* originados de diferentes locais, apresentaram variabilidade na agressividade. Wendland et al. (2012) inoculou 11 genótipos com 8 isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e estes apresentaram diferentes comportamentos, onde as notas variaram de 1,2 para o genótipo IPA 9 a 7,0 para o genótipo CNFRS 11997. Houve também diferença de comportamento de 48 genótipos quando inoculados com os isolados CNPAFCff 25 e CNAPFCff 33 em que a cultivar Pérola obteve nota 9 para o isolado Cff25 e nota 5 para o isolado UnB 1252. Confirmando a suscetibilidade da cultivar Pérola, Maringoni (2002) ao analisar o comportamento de 26 cultivares de feijoeiro-comum inoculadas com os isolados Feij-2625 e Feij-2634 obteve a nota 9,0 para o primeiro isolado e 8,67 para o segundo. As cultivares que apresentaram resistência foram IAC Carioca Pyatã, IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Aruã, as demais cultivares foram suscetíveis. Os dados apresentados na literatura corroboram com os do presente trabalho em que houve diferenças na agressividade em isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* quando inoculados em feijoeiro-comum não havendo correlação de onde estes se originaram e o grau de agressividade de cada isolado. Com o conhecimento dos diferentes níveis de agressividade obtidos neste trabalho o programa de melhoramento de feijoeiro-comum poderá obter cultivares resistentes à murcha-de-curtobacterium, fazendo com que estas cultivares mantenham a estabilidade e durabilidade da resistência genética.

4.4 COLONIZAÇÃO DO XILEMA DE FEIJOEIRO-COMUM POR *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

As testemunhas inoculadas com água destilada estéril apresentaram os vasos do xilema livres de qualquer bactéria (Figuras 3A e 4A). As linhagens CNFC 10429 e CNFRS 11997 aos 20 dias após inoculação não apresentaram estrutura de resistência à *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como as cultivares resistentes tais como IPA 9 e Ouro Branco que após inoculação apresentaram estruturas rendilhadas envolvendo as células bacterianas. Souza (2004) também observou estruturas rendilhadas nas cultivares Ac-297, Ac-405 e Ac-592 que foram consideradas resistentes e estas estruturas não foram encontradas nas cultivares suscetíveis Ac-586 e Ac-546. A cultivar Diacol Calima apresentou estruturas de resistência, mas com menor expressão quando comparados aos genótipos Ouro Branco e Ipa 9. Em citrus infectado por *Xylella fastidiosa* observou-se as estruturas de resistência ocorrendo oclusão dos vasos e também uma agregação de células bacterianas por meio de fios produzidos pela planta (Alves et al., 2009).

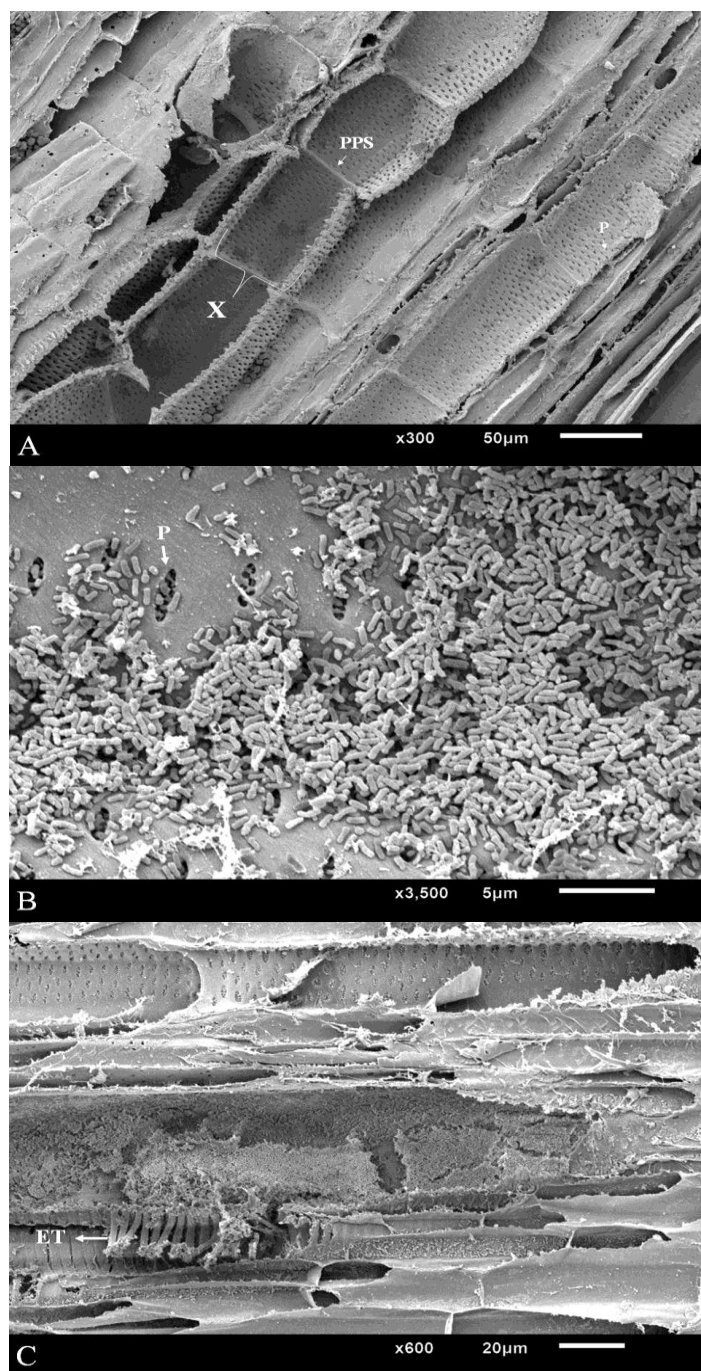


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura na linhagem de feijoeiro-comum CNFC 10429 infectada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo após 20 dias da inoculação com água destilada estéril (testemunha). B - Vaso do xilema colonizado por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; C - Vasos xilemáticos colonizados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. PPS = placa de perfuração simples, P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário.

Nos genótipos suscetíveis CNFC 10429, CNFRS 11997 e moderadamente resistentes Diacol Calima inoculados com o isolado CNPAFCff 25 foram verificados grande quantidade de células bacterianas presente nas pontoações dos vasos do xilema e próximo aos elementos traqueais do xilema primário (Figuras 3C, 4B, 5A). No genótipo CNFRS 11997, há colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sem barreiras físicas de resistência (Figura 4B) e nos genótipos resistentes IPA 9 e Ouro Branco (Figuras 6B e 8B) responderam à colonização com formação de filamentos. Ao observar a figura 5B conclui-se que a colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é diferencial nos diferentes vasos do xilema do genótipo Diacol Calima que apresentou estruturas de resistência (Figura 5A), sugerindo que as células bacterianas não multiplicaram para outros locais da planta.

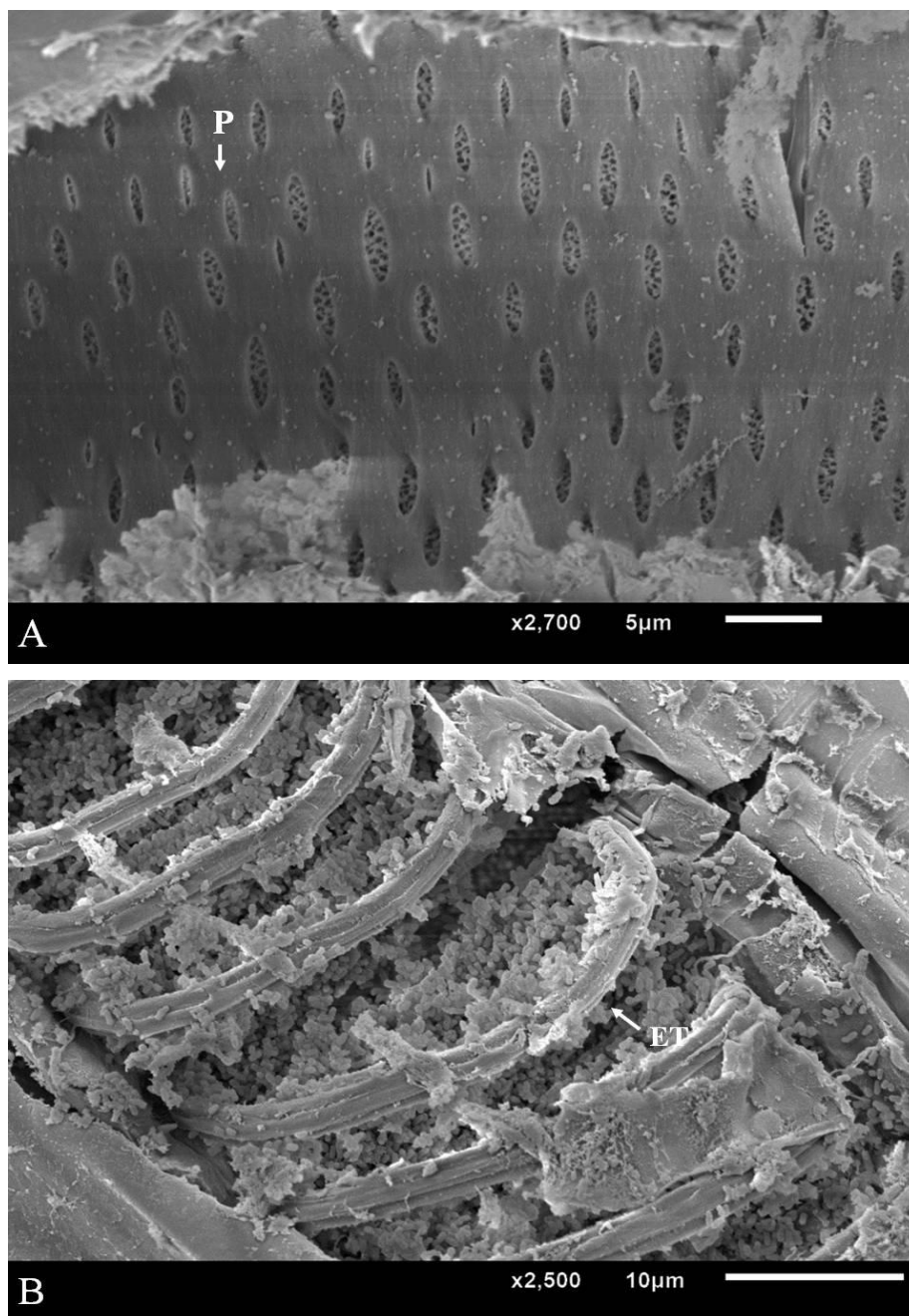


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura na linhagem de feijoeiro-comum CNFRS 11997 infectada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo ao 20 dias após inoculação com água destilada estéril (testemunha). B – Vaso do xilema colonizado por *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Isolado CNPAFCff 25). P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário.

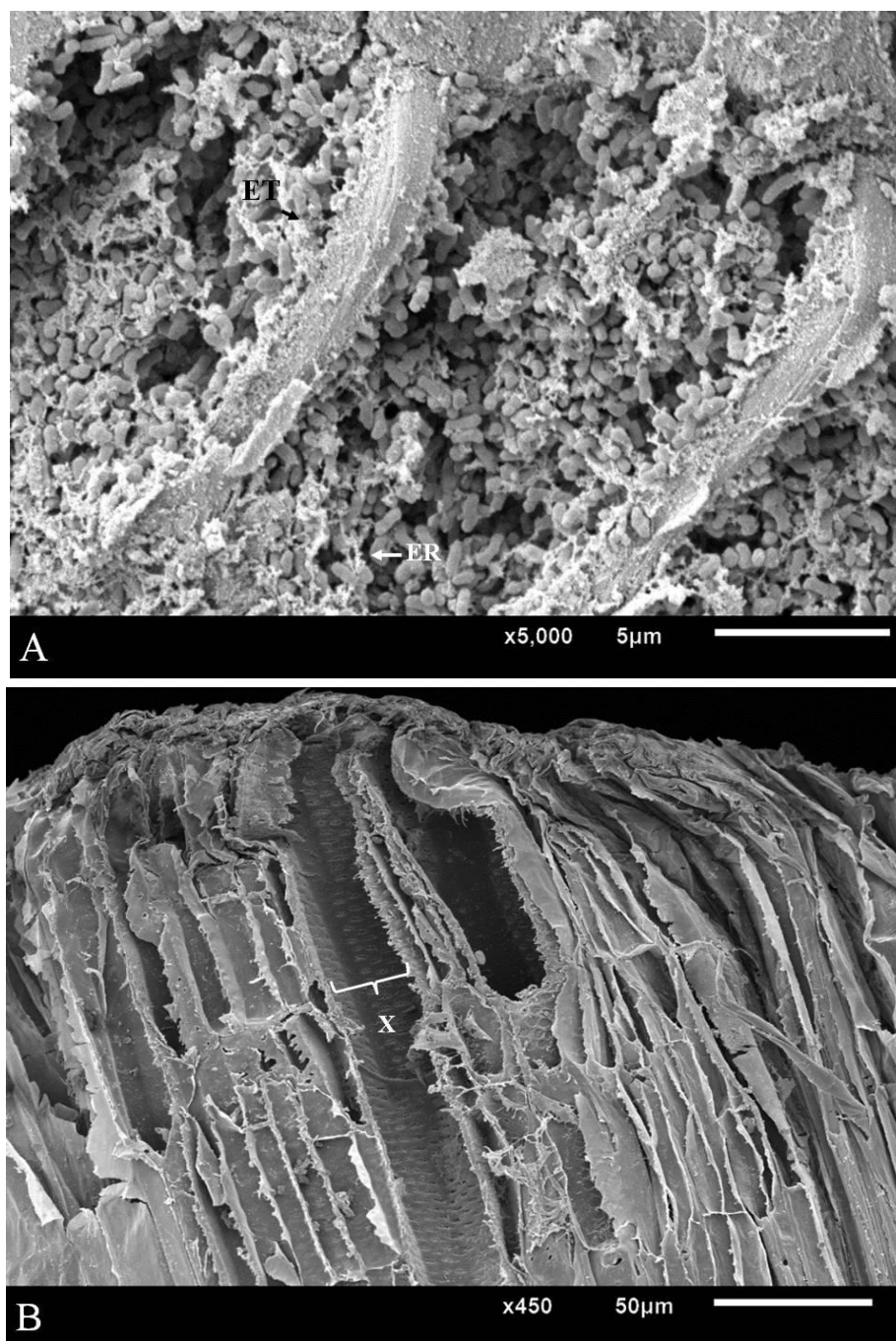


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Diacol Calima colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação o isolado *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro-comum inoculado com o isolado *Cff* 25. ET = elementos traqueais do xilema primário; ER = estrutura rendilhada; X = xilema.

Observou-se formação de estruturas rendilhadas sobre as pontuações das paredes dos vasos do xilema do genótipo resistente IPA 9 inoculado com o isolado CNPAFCff 25 e CNPAFCff 31 e o mesmo ocorreu para Ouro Branco inoculado com CNPAFCff 25 (Figuras 6A, 7B e 8A). Estas estruturas são respostas de defesa estruturais pós-formados que ocorreram somente em genótipos de feijoeiro resistentes pelo fato de que os genótipos suscetíveis não apresentaram tais estruturas. Esse mecanismo de defesa ocorre na tentativa de impedir a proliferação da bactéria para demais regiões da planta, diminuindo portanto a população bacteriana. Tais estruturas indicam que este é um mecanismo de resistência de defesa física pós-formado em genótipos de feijoeiro resistente pelo fato que as testemunhas inoculadas com água destilada estéril não possuem estruturas rendilhadas nas pontuações do xilema. Ao comparar a colonização do genótipo IPA 9 inoculado com isolado CNPAFCff 31 menos agressivo (Figura 7B), com o isolado CNPAFCff 25, mais agressivo (Figura 6B), observa-se que o isolado mais agressivo possui mais células bacterianas no vaso que está sendo colonizado. Contudo os dois isolados incitaram a formação de estruturas de rendilhamento nas pontuações do xilema (Figuras 6A e 7B).

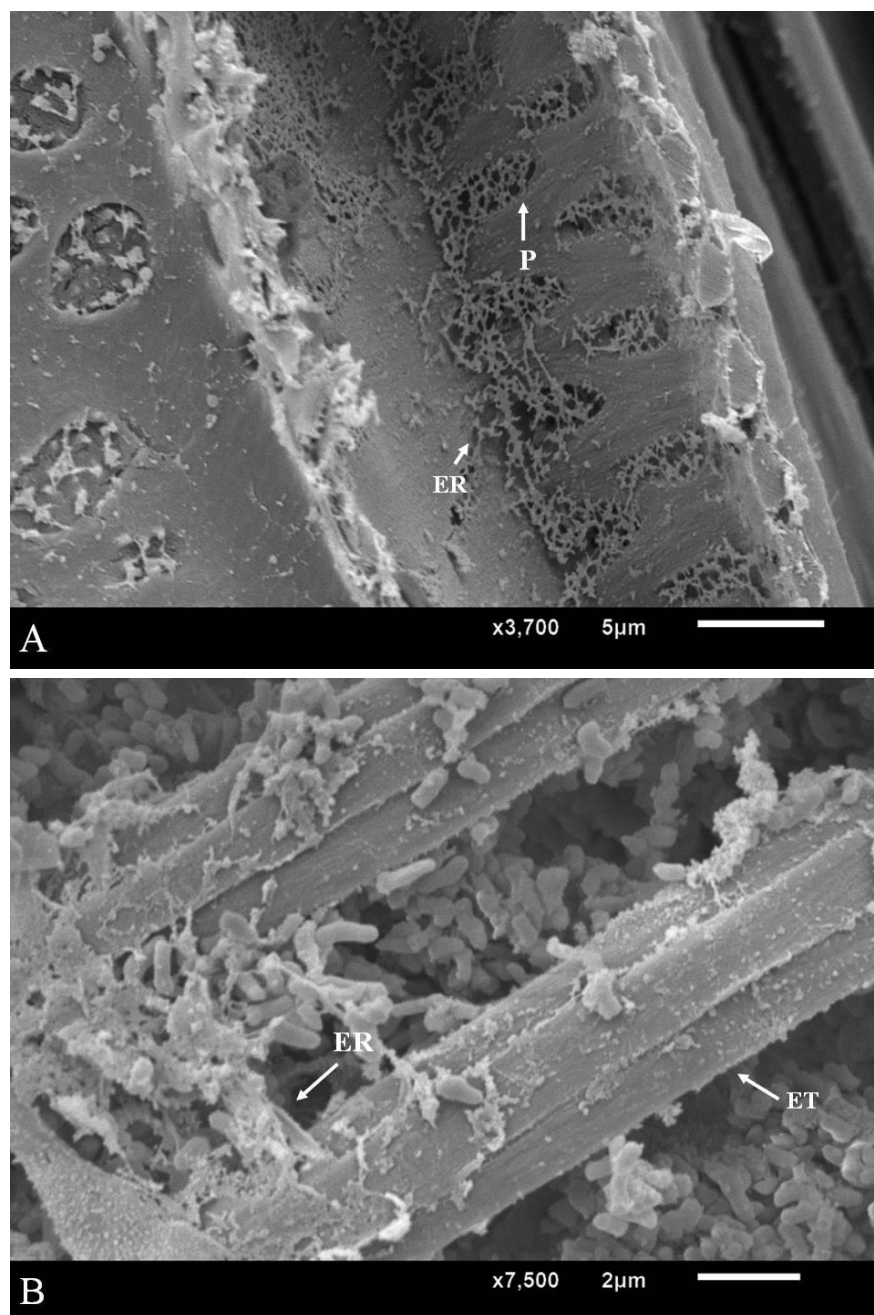


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro IPA 9 colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado CNPAFCff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro-comum inoculado com o isolado CNPAFCff 25. P = pontoações; ET = elementos traqueais do xilema primário; ER = estrutura rendilhada; X = xilema.

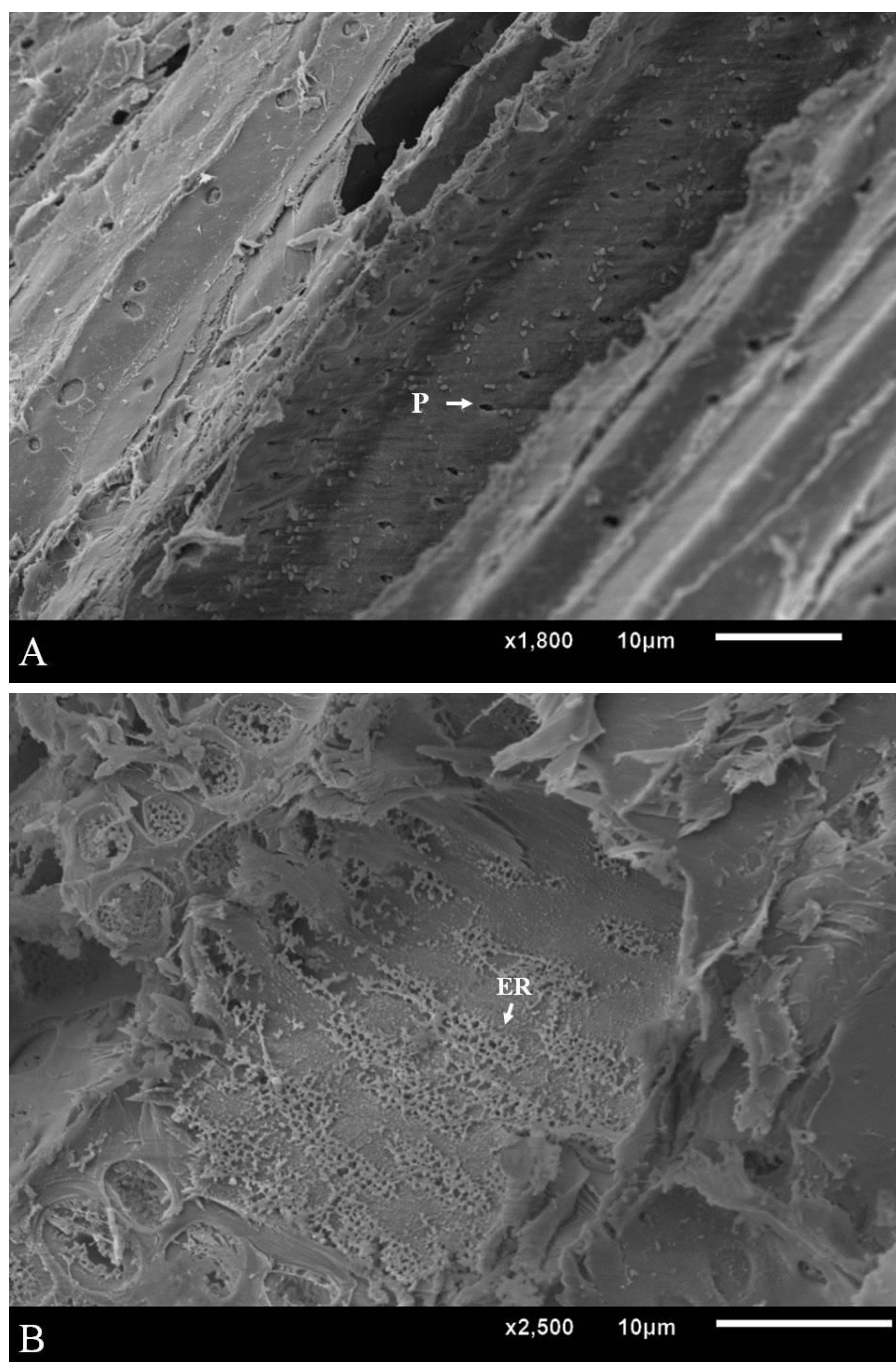


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro IPA 9 colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado *Cff* 31. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro-comum inoculado com o isolado CNPAFCff 31. P = pontoações; ER = estrutura rendilhada.

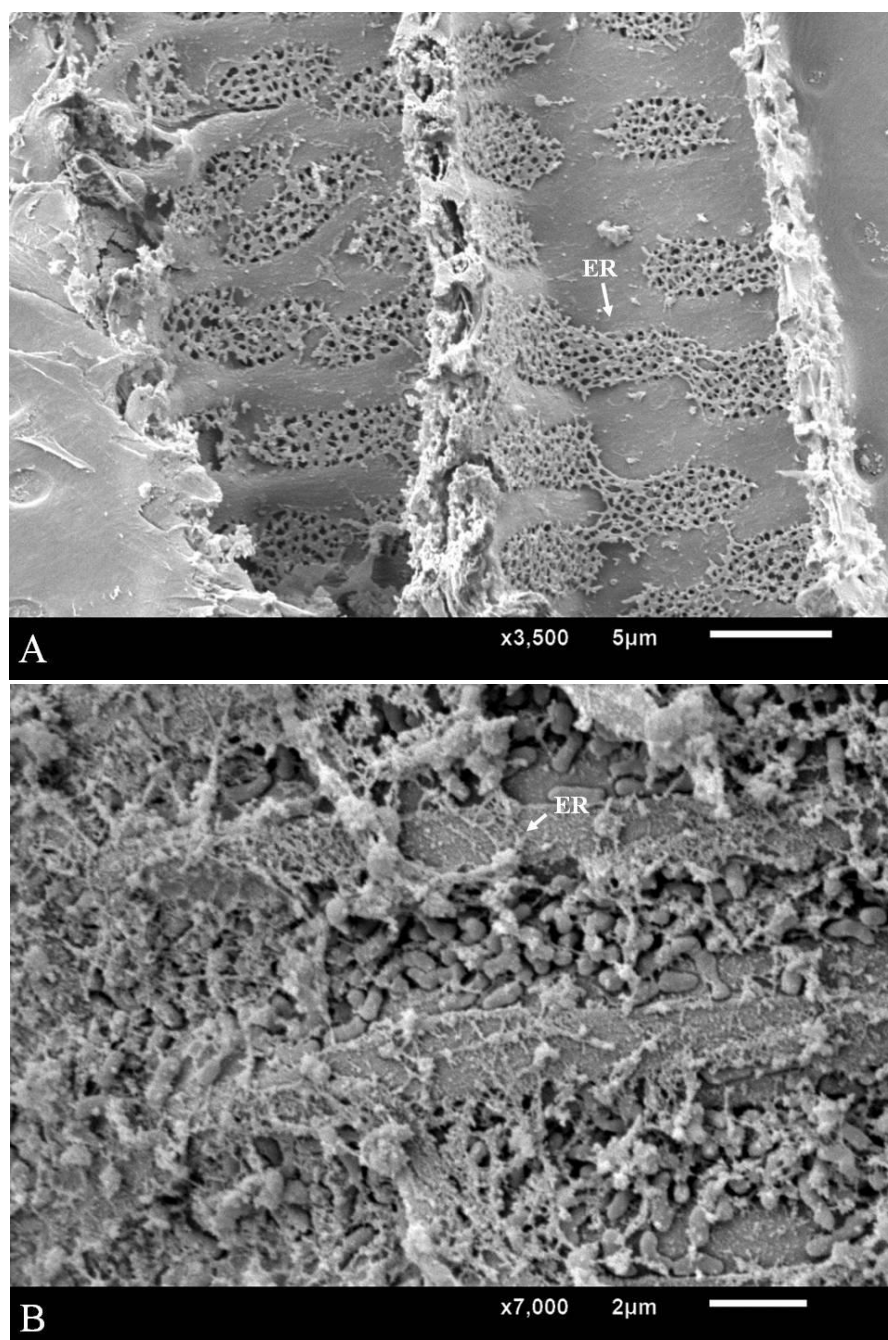


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado CNPAFCff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro-comum inoculado com o isolado CNPAFCff 25. ER = estrutura rendilhada.

Verificou-se a formação de filamentos sobre a superfície da bactéria com ligações entre as células próximas. Estes filamentos provavelmente dificultam a proliferação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* para outras regiões do vaso do xilema, a partir do ponto de inoculação, em genótipos de feijoeiro resistentes como o Ouro Branco (Figura 9A). A figura 9B sugere que as células foram aderidas à parede do xilema que, aparentemente, impossibilitou o avanço e a proliferação da bactéria para regiões adjacentes e para vasos vizinhos, limitando assim também a população bacteriana. Na figura 10 pode-se observar as células bacterianas envoltas por estruturas rendilhadas e filamentos unindo as células bacterianas em um único ponto, limitando a dispersão e redução do inóculo neste genótipo. Portanto as observações de MEV corroboraram os de interações compatíveis e incompatíveis obtidos nos experimentos de interação diferencial entre genótipos e isolados. Souza (2004) ao analisar o genótipo Ac-297 inoculado com o isolado de *Cff* Feij 2634 observou a formação de aglomerados de células bacterianas neste genótipo resistente, concluindo que as observações realizadas sugerem a atuação de mecanismos de resistência física pós-formado em genótipos de feijoeiro resistentes. No patossistema entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* - feijoeiro em genótipos resistentes verificou-se o encapsulamento das células bacterianas. Em genótipos moderadamente resistentes observaram poucas bactérias nos espaços intercelulares e a formação de vesículas entre o plasmalema e a parede celular. Nos genótipos suscetíveis, houve maior número de bactérias colonizando os espaços intercelulares (Contreras et al., 2001). Souza (2004), realizando análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) em genótipos resistente e suscetível verificou também comportamentos diferentes em genótipos com níveis de resistência diferentes. A formação de filamentos, grânulos e estruturas rendilhadas nas paredes dos vasos do xilema em genótipos altamente resistentes à *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram observados. Já os genótipos suscetíveis não apresentaram defesa ou apresentaram tardiamente reações quanto à colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Portanto, estudos detalhados de MEV em genótipos resistentes de feijoeiro poderão fornecer informações sobre formação de estruturas de resistência pós-formadas em genótipos resistentes à *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

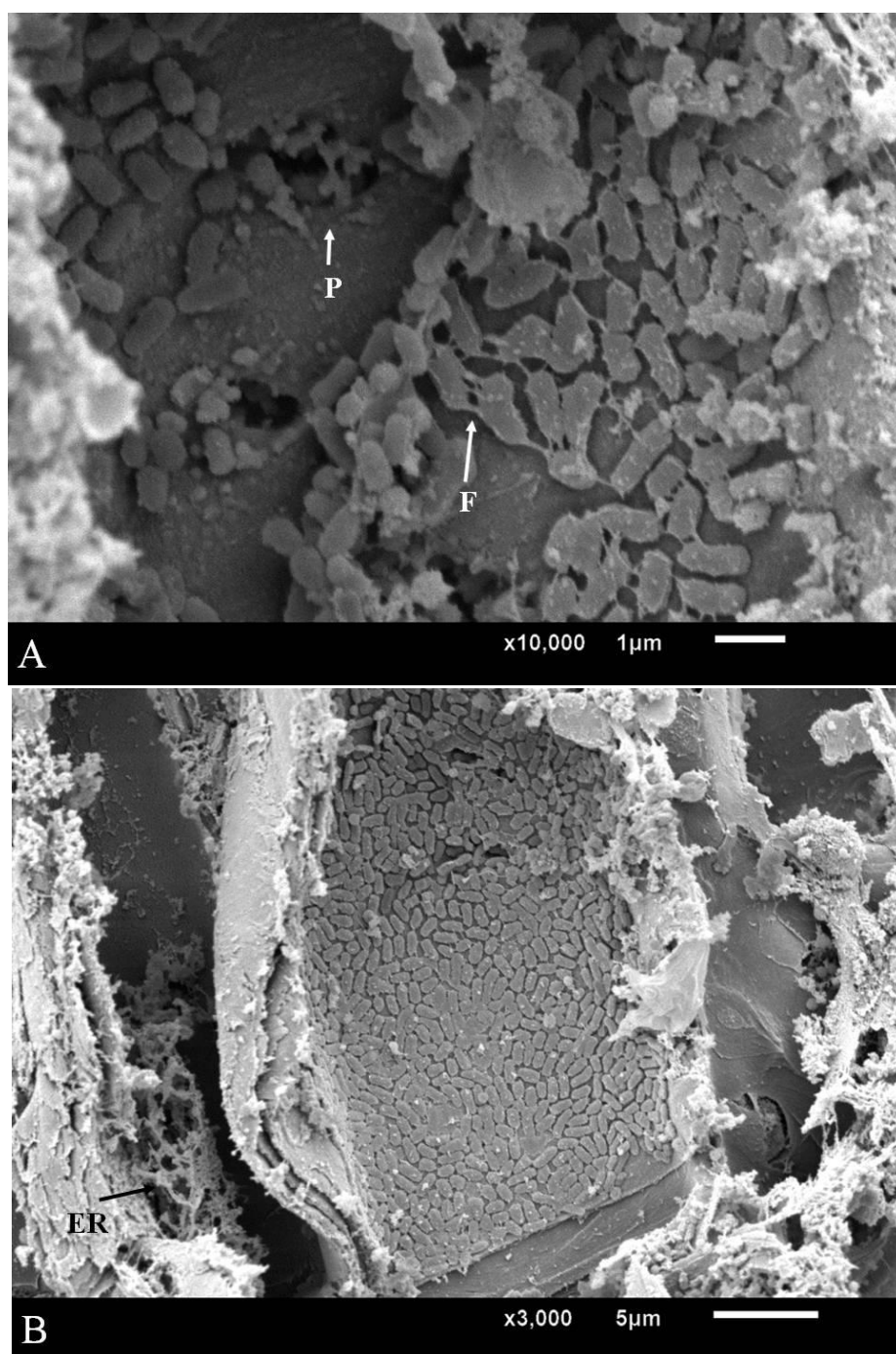


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A - Corte longitudinal do epicótilo aos 20 dias após inoculação com isolado CNPAFCff 25. B - Corte longitudinal do epicótilo de feijoeiro-comum inoculado com o isolado CNPAFCff 25. ER = estrutura rendilhada; P = pontoações; F = filamento.

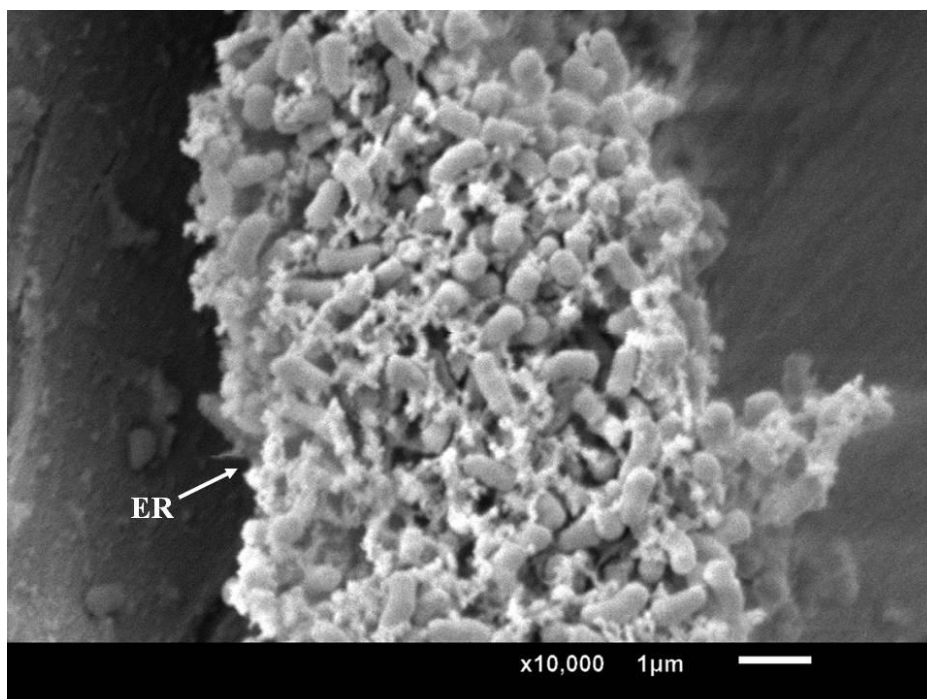


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura na cultivar de feijoeiro Ouro Branco colonizada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Aglomerado de CNPAFCff 25. ER = estrutura rendilhada.

4.5 INTERAÇÃO DIFERENCIAL DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM FEIJOEIRO-COMUM

Os resultados da avaliação da reação de genótipos inoculados com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em casa de vegetação revelaram a existência de variações nas notas de severidade da doença, possibilitando a distinção entre genótipos resistentes e suscetíveis. Os dados obtidos do primeiro ensaio e segundo ensaio foram submetidos à análise de variância individual e conjunta (Tabelas 7, 8 e 9; respectivamente). Posteriormente, com a severidade média foi realizada a análise de dialelos parciais (Tabelas 10, 11 e 12; respectivamente), obtenção da estimativa da capacidade geral de reação (CGR) dos genótipos (Tabela 13) e capacidade geral de agressividade (CGA) dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Tabelas 14) conforme modelo proposto por Melo & Santos (1999).

Nas análises individuais das duas épocas foi observada interação significativa entre isolados e genótipos, como também na análise de variância conjunta. Nesta análise foram detectadas diferenças significativas entre isolados, indicando que estes possuem diferentes níveis de agressividade. Os genótipos apresentaram diferenças significativas, comportando-se diferentemente quando submetidos à inoculação dos oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Também houve efeito significativo da interação isolados com genótipos

Tabela 7. Resumo da análise de variância individual para severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Repetição	2	0,904167	0,944	0,4126
Isolado	7	36,844444	38,454	0,0000
Erro 1	14	0,958135	-	-
Genótipo	29	2,969540	20,216	0,0000
Isolado*Genótipo	203	4,107581	6,403	0,0000
Erro 2	455	0,641535	-	-
CV 1 (%)	32,58			
CV 2 (%)	26,66			
Média geral:	3,0042194			

Tabela 8. Resumo da análise de variância individual para severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Repetição	2	4,022222	4,854	0,0250
Isolado	7	4,716667	5,693	0,0029
Erro 1	14	0,828571		
Genótipo	29	5,496360	8,567	0,0000
Isolado*Genótipo	203	2,797947	4,361	0,0000
Erro 2	440	0,641591		
CV 1 (%)	31,58			
CV 2 (%)	27,79			
Média geral:	2,8821839			

Tabela 9. Resumo da análise de variância conjunta da severidade da murcha-de-curtobacterium de 8 isolados em 30 genótipos de feijoeiro-comum

FV	GL	QM	Fc	Pr > Fc
Ensaio	1	11,736111	20,838	0,0448
Isolado	7	27,759921	49,290	0,0200
Ensaio*Isolado	7	13,801190	24,505	0,0398
Repetição (Ensaio)	4	2,463194	4,374	0,1947
Erro 1	2	0,563194		
Genótipo	29	11,317433	16,934	0,0000
Genótipo*Ensaio	29	7,148467	10,696	0,0000
Genótipo*Isolado	203	4,311029	6,451	0,0000
Genótipo*Isolado*Ensaio	203	2,594499	3,882	0,0000
Erro 2	924	0,668324		
CV 1 (%)	25,55			
CV 2 (%)	27,83			
Média geral:	2,9375887			

Na análise dialélica para diferentes genótipos e isolados, todas as fontes de variação foram significativas ($p < 0.05$), tanto nas análises individuais quanto na conjunta. Observou-se diferenças significativas para resistência horizontal dos genótipos, o que indica que alguns destes genótipos possuem maior grau de resistência média para os isolados testados. Verificou-se que a maior parte da variação foi devida à patogenicidade média, isto se deve à agressividade dos isolados do patógeno. Houve diferença significativa entre virulência/ resistência vertical, indicando diferenças na resistência vertical dos genótipos (Tabela 12). Ao analisar as estimativas da resistência horizontal dos genótipos inoculados com oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, observou-se que todas foram significativas (análise conjunta). Os 30 genótipos avaliados formaram três grupos com estimativas variando de -1,552917 a 0,972083 (Tabela 13). O primeiro grupo foi composto pelos genótipos IPA 9 e Ouro Branco, que apresentaram as maiores estimativas negativas (alta resistência horizontal) dentre as reações dos 30 genótipos para murcha-de-curtobacterium. Por outro lado, os genótipos Cornell 49242, Michelite, TO, TU, Uirapuru, BRS Requite e IAC Carioca Pyatã foram agrupados como genótipos intermediários para resistência horizontal à esta doença. Os genótipos Coquinho, BRS

Cometa, BRS Estilo, Vermelho, BRS Esplendor, BRS Esteio, BRS Notável, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã, Pérola, BRS Campeiro, A211, IPA 6, Frijólica 0-3-1, BAT 477, IPA 1, AND 277, IPA 7419, PI 207 262, Widusa e CNFRS 11997 apresentaram as maiores estimativas positivas (Tabela 13), indicando baixa resistência horizontal, não contribuindo como material genético resistente à murcha-de-curtobacterium. As diferentes estimativas de resistência horizontal indicam que os genótipos apresentam diferentes composições alélicas para a resistência, sendo assim, os genótipos que apresentaram menor magnitude de resistência horizontal possivelmente possuem menor número de alelos de resistência.

Observou-se também diferenças significativas entre os oito isolados, demonstrando que ocorrem variações nos níveis de agressividade. Os isolados CNPAFCff25 e CNPAFCff04 foram os mais agressivos e os isolados CNPAFCff 33 e CNPAFCff 11 foram os menos agressivos (Tabela 14).

Tabela 10. Análise dialélica da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – (Primeiro Ensaio)

FV	GL	QM
Tratamentos (Isolados x Genótipos)	239	6,053705*
CGR (Resistência Horizontal)	29	12,056483*
CGA (Agressividade)	7	35,167071*
CEI (Virulência/Resistência vertical)	203	4,192256*
Resíduo	234	0,65
Média (u) :	3,0275	
DP(u) :	0,514862	

*significativo a 5% pelo teste F.

Tabela 11. Resumo da análise dialélica da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – (Segundo Ensaio)

FV	GL	QM
Tratamentos (Isolados x Genótipos)	239	3,490732*
CGR (Resistência Horizontal)	29	5,375039*
CGA (Agressividade)	7	13,490839*
CEI (Virulência/Resistência vertical)	203	2,876714*
Resíduo	227	0,647

Tabela 11. (Continuação)

FV	GL	QM
Média (u) :	2,892083	
DP(u) :	0,526928	

*significativo a 5% pelo teste F.

Tabela 12. Análise dialélica da severidade da murcha-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro-comum – Análise Conjunta dos dois ensaios

FV	GL	QM
Tratamentos (Isolados x Genótipos)	239	3,201126*
CGR (Resistência Horizontal)	29	5,885091*
CGA (Agressividade)	7	17,952839*
CEI (Virulência/Resistência vertical)	203	2,309022*
Resíduo	463	0,914634
MÉDIA (u) :	2,965417	
DP(u) :	0,035642	

*significativo a 5% pelo teste F.

Segundo Melo & Santos (1999), a resistência horizontal de um genótipo está altamente correlacionada com o valor de CGR. Quanto maior o valor de CGR menor é a resistência horizontal. Isso ocorre por que a avaliação foi realizada com notas, em que maiores notas significam menor resistência do feijoeiro à murcha-de-curtobacterium.

Foram verificadas diferenças significativas entre a capacidade geral de reação dos genótipos inoculados com oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. As maiores estimativas negativas foram observadas para os genótipos IPA 9, Ouro Branco, (n. 29 e 28 – Figura 11) que apresentaram maior resistência horizontal e as cultivares mais suscetíveis foram BRS Cometa, Coquinho, BRS Esteio, Frijólica 0-3-1 e CNFRS 11997 (n. 2, 1, 6, 17 e 30 – Figura 11). Por definição pode-se inferir que a resistência horizontal é inespecífica e atua reduzindo o desenvolvimento de várias raças do patógeno onde os isolados diferem quanto à agressividade.

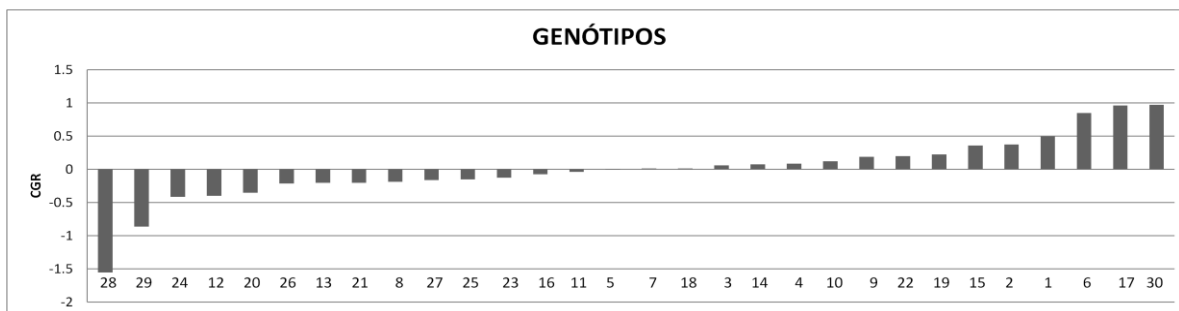


Figura 11. Resistência horizontal de genótipos inoculados com diferentes isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, indicando a resistência horizontal do hospedeiro na análise conjunta. 1- Coquinho; 2- BRS Cometa; 3- BRS Estilo; 4- Vermelho; 5- BRS Esplendor; 6- BRS Esteio; 7- CNFC 10408; 8- IAC Carioca Pyatã; 9- IAC Carioca Akytã; 10 -IAC Carioca Aruã; 11 – Pérola; 12- BRS Requite; 13 – Uirapuru; 14- BRS Campeiro; 15- A 211; 16- IPA 6; 17- Frijólica 0-3-1; 18- BAT 477; 19- IPA 1; 20- TU; 21- TO; 22- AND 277; 23- Widusa; 24- Michelite; 25- IPA 7419; 26- Cornell 49242; 27- PI 207 262; 28- IPA 9; 29- Ouro Branco; 30- CNFRS 11997.

Na maioria das vezes, é um tipo de resistência oligo/poligênica, pois é condicionada por vários genes, que individualmente, têm efeito reduzido, porém, quando em conjunto, são efetivos para várias raças. Também é conhecida como resistência quantitativa, em que a reação do hospedeiro ao patógeno pode variar de 0 a 100%. Além disso, é afetada por vários fatores ambientais, tais como temperatura, umidade radiação solar, pH do solo (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

Conforme Melo & Santos (1999), a capacidade geral de agressividade está relacionada com a patogenicidade potencial do agente causal da doença, ao estimar a CGA, constatou-se diferenças significativas entre os oito isolados demonstrando que ocorre variações nos níveis de agressividade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Análise Conjunta). Os isolados CNPAFCff25 e CNPAFCff04 foram os mais agressivos e os isolados CNPAFCff 33 e CNPAFCff 11 foram os menos agressivos, segundo os resultados da análise de dialelos parciais (Figura 12). Contudo, a classificação de agressividade deste isolado no ensaio presente diferiu do anterior, se tornando o segundo menos agressivo (Tabela 14). Esta mudança é possivelmente devido ao maior número de genótipos inoculados.

Tabela 13. Estimativas da Capacidade Geral de Reação (CGR) oriunda da Resistência Horizontal dos 30 genótipos de feijoeiro-comum obtida a partir das médias das notas de severidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Capacidade Geral de Combinação do Grupo 1 - Genótipos					
1ª Ensaio		2ª Ensaio		Análise Conjunta	
Genótipo	Efeito	Genótipo	Efeito	Genótipo	Efeito
IPA 9	-1,69	IPA 9	-1,392083	IPA 9	-1,552917*
BRS Requite	-0,9025	Ouro Branco	-0,929583	Ouro Branco	-0,865417*
Ouro Branco	-0,79	IAC Carioca Aruã	-0,729583	Michelite	-0,415417*
TU	-0,715	IAC Carioca Pyatã	-0,567083	BRS Requite	-0,402917*
Michelite	-0,615	IAC Carioca Akytã	-0,267083	TU	-0,352917*
Uirapuru	-0,4775	BRS Notável	-0,242083	Cornell 49242	-0,215417*
TO	-0,465	Michelite	-0,229583	Uirapuru	-0,202917*
WIDUSA	-0,4525	BRS Estilo	-0,192083	TO	-0,202917*
IPA 7419	-0,4525	BAT 477	-0,154583	IAC Carioca Pyatã	-0,190417*
PI 207 262	-0,44	IPA 6	-0,079583	PI 207 262	-0,165417*
Cornell 49242	-0,3775	Cornell 49242	-0,067083	IPA 7419	-0,152917*
Vermelho	-0,2025	TU	0,007917	Widusa	-0,127917*
Pérola	-0,19	TO	0,020417	IPA 6	-0,077917*
BRS Esplendor	-0,115	CNFRS 11997	0,032917	Pérola	-0,040417*
IPA 6	-0,115	Pérola	0,070417	BRS Esplendor	-0,002917*
AND 277	-0,04	IPA 7419	0,095417	BRS Notável	0,009583*
BRS Campeiro	0,06	PI 207 262	0,095417	BAT 477	0,009583*
BAT 477	0,135	BRS Esplendor	0,107917	BRS Estilo	0,059583*
IAC Carioca Pyatã	0,185	BRS Requite	0,107917	BRS Campeiro	0,072083*
BRS Cometa	0,21	Uirapuru	0,107917	Vermelho	0,084583*
IPA 1	0,2225	BRS Campeiro	0,107917	IAC Carioca Aruã	0,122083*
BRS Notável	0,2975	Widusa	0,182917	IAC Carioca Akytã	0,184583*
BRS Estilo	0,31	IPA 1	0,232917	AND 277	0,197083*
A 211	0,385	Coquinho	0,357917	IPA 1	0,222083*
Coquinho	0,635	Vermelho	0,357917	A 211	0,359583*
IAC Carioca Akytã	0,6725	A 211	0,370417	BRS Cometa	0,372083*
Frijólica 0-3-1	0,7975	AND 277	0,432917	Coquinho	0,497083*
IAC Carioca Aruã	1,01	BRS Esteio	0,482917	BRS Esteio	0,847083*
BRS Esteio	1,2225	BRS Cometa	0,520417	Frijólica 0-3-1	0,959583*
CNFRS 11997	1,8975	Frijólica 0-3-1	1,157917	CNFRS 11997	0,972083*
DP (Gi):				0,16	
DP(Gi-Gi'):				0,23	

*valores significativos diferentes de zero pelo teste t.

DP: desvio padrão da estimativa da CGR

Tabela 14. Estimativa da (Capacidade Geral de Agressividade) (CGA) de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidas a partir das médias de severidade da doença em 30 genótipos de feijoeiro-comum

Capacidade Específica de Combinação do Grupo 2 - Patógeno					
Primeiro Ensaio		Segundo Ensaio		Análise Conjunta	
Isolado	Efeito	Isolado	Efeito	Isolado	Efeito
CNPAFCff 25	0,719167	CNPAFCff 25	0,91125	CNPAFCff 25	0,807917*
CNPAFCff 27	0,4325	CNPAFCff 04	0,097917	CNPAFCff 04	0,234583*
CNPAFCff 04	0,369167	CNPAFCff 36	-0,02208	CNPAFCff 27	0,12125*
CNPAFCff 31	0,3325	CNPAFCff 31	-0,12542	CNPAFCff 31	0,10125*
CNPAFCff34	0,0925	CNPAFCff34	-0,15875	CNPAFCff34	-0,02875*
CNPAFCff 33	-0,3075	CNPAFCff 27	-0,19542	CNPAFCff 36	-0,21542*
CNPAFCff 36	-0,4075	CNPAFCff 11	-0,23208	CNPAFCff 33	-0,29208*
CNPAFCff 11	-1,230833	CNPAFCff 33	-0,27542	CNPAFCff 11	-0,72875*
DP (Gj):				0,08	
DP(Gj-Gj')				0,12	

*valores significativos diferentes de zero pelo teste t.
DP: desvio padrão da estimativa da CGA

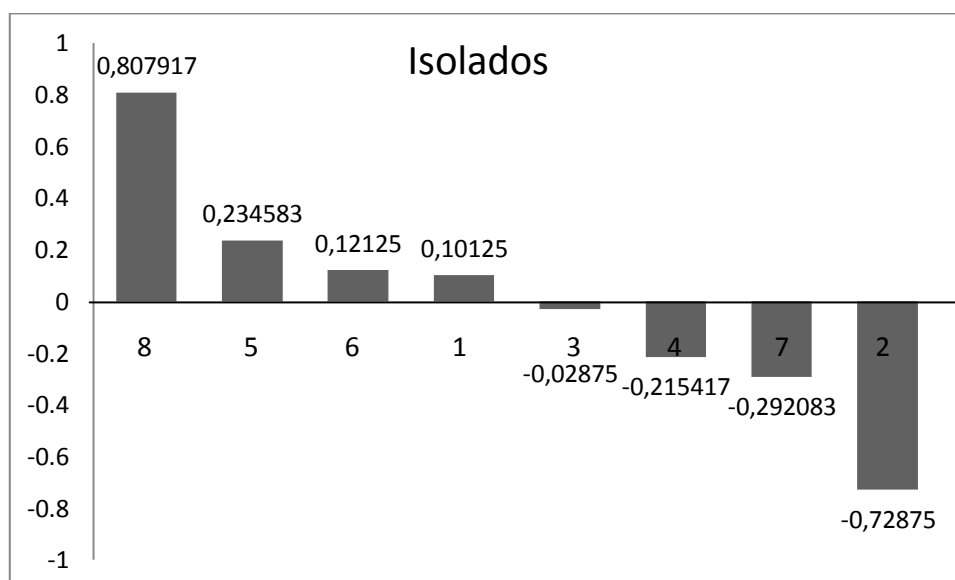


Figura 12. Agressividade de oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* inoculados em 30 genótipos de feijoeiro-comum – Análise Conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25

Foram geradas 240 combinações pela interação virulência/ resistência vertical entre isolados e genótipos, em que 50% foram significativas, isto indica que houve interação entre patótipos do patógeno e o hospedeiro (Tabela 15). Esta estimativa assume valores negativos ou positivos indicando presença ou ausência de resistência vertical dos genótipos aos isolados, respectivamente. Destas estimativas, 64 foram negativas, indicando a presença de resistência vertical dos genótipos. As combinações que apresentaram as menores estimativas na virulência/ resistência vertical foram AND 277 x CNPAFCff27; BRS Esteio x CNPAFCff11; TU x CNPAFCff25; CNFC 10408 CNPAFCff36 e Coquinho x CNPAFCff11, indicando que estes genótipos apresentaram maior resistência vertical, a esses isolados específicos. Por outro lado, foi observado 176 estimativas positivas, em que os genótipos não apresentaram resistência vertical a isolados virulentos.

. Nos genótipos CNFRS 11997 e Frijólica 0-3-1, os mais suscetíveis, também apresentaram resistência vertical (Figura 13). Portanto há interação diferencial, indicando que há especialização do patógeno a nível intraespecífico do hospedeiro. A resistência vertical é também conhecida como resistência qualitativa, em vista da reação do hospedeiro à raça do patógeno: há ou não doença. Não é afetada por fatores de ambientes, como temperatura, umidade, radiação solar, pH do solo. Entretanto, este tipo de resistência é passível de ser vencida dentro da capacidade microevolutiva do patógeno (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

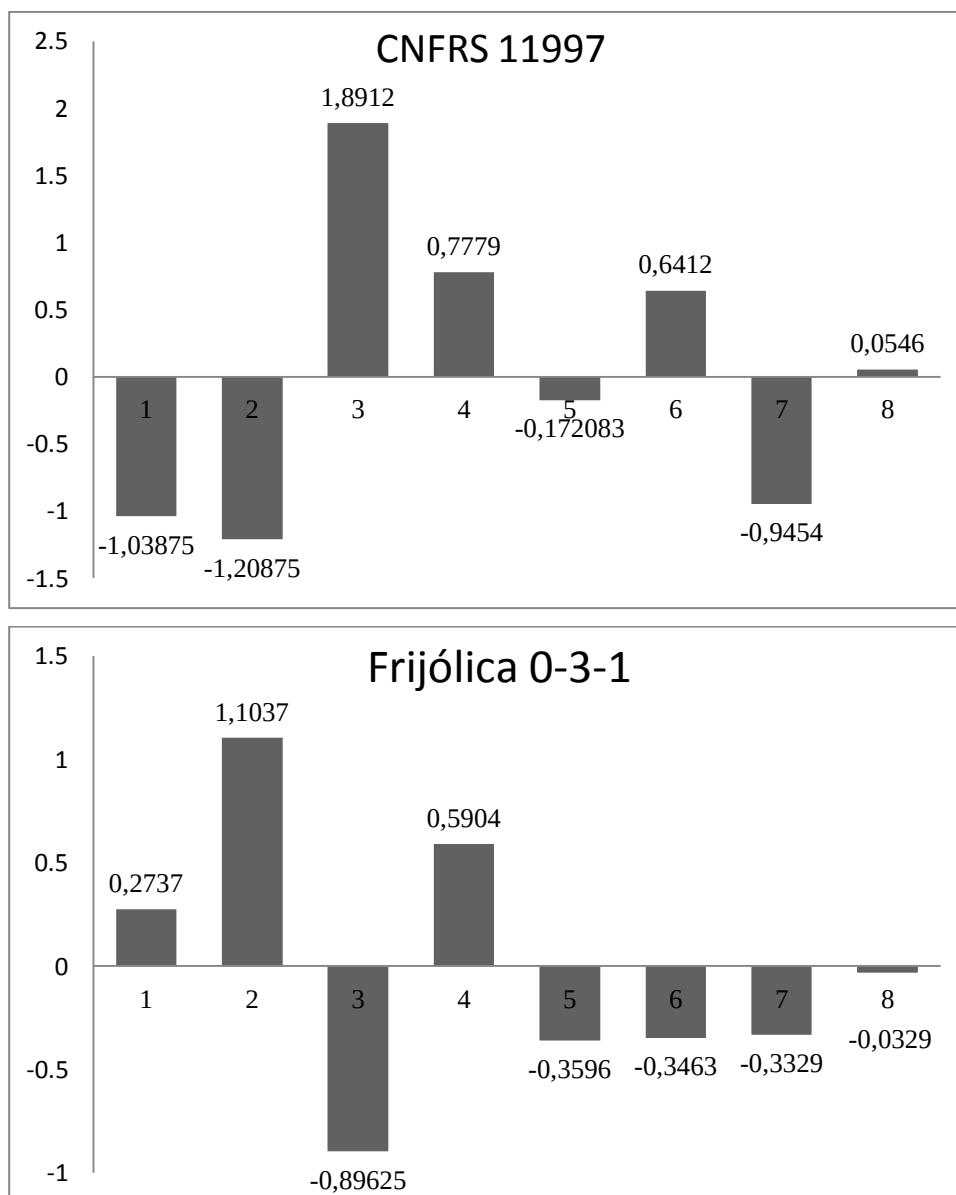


Figura 13. Resistência vertical dos genótipos inoculados com diferentes isolados do patógeno de acordo com o modelo IV de Griffing (1956) - Análise conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25

Maranha et al. (2002) constataram, utilizando o método de Melo & Santos (1999), concluíram que as cultivares de algodão BRS Antares e BRS Facual foram as mais resistentes a *Xanthomonas campestris*. Para a BRS Facual indicaram resistência horizontal. Com relação à *Ramularia areola*, esta cultivar foi a mais resistente e essa resistência foi predominantemente horizontal. Davide & Souza (2009) ao trabalhar com o patossistema *Colletotrichum lindemuthianum* – feijoeiro, constataram diferença significativa na virulência dos isolados da raça 65, sendo os isolados CL 837 e CL 844 os

mais virulentos. Estas autoras não detectaram resistência horizontal no patossistema. Para a caracterização da reação dos genótipos a esses patógenos, empregaram-se os parâmetros dos cruzamentos dialélicos parciais. Ao inocular 50 genótipos com quatro isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, Silva et al. (2010) identificaram que houve interação diferencial entre os genótipos e os isolados e que agressividade dos isolados variaram de acordo com o genótipo avaliado por meio de análise de dialelos parciais. Constatou-se que a metodologia de Melo & Santos (1999) foi informativa em todos os trabalhos revelando a existência de interação diferencial entre genótipos e isolados e seu emprego deve ser estimulado.

O isolado CNFPAFCff 25 foi o mais agressivo (Figura 12) porém 18 genótipos (Tabela 15) apresentaram-se resistente a este isolado. Contudo o isolado CNPAFCff 11, menos agressivo conforme CGA, mostrou-se altamente patogênico aos genótipos IPA6, Frijólica 0-3-1, AND 277, Widusa, Michelite e Cornell 49242, indicando presença de resistência vertical, sendo que estes genótipos obtiveram boas estimativas da CGR em relação ao isolado mais agressivo (tabela 15). Os genótipos IPA 9 e Ouro Branco foram os que apresentaram maior resistência horizontal, e também a presença de resistência vertical (Figura 14).

Os genótipos Ouro Branco e IPA 9 são bons candidatos para cruzamento visando resistência à murcha-de-curtobacterium uma vez que apresentaram resistência horizontal aos oito isolados inoculados. Quanto a resistência vertical estes genótipos obtiveram respostas diferentes a estes isolados, portanto seriam bons candidatos para o programa de melhoramento visando resistência a esta doença.

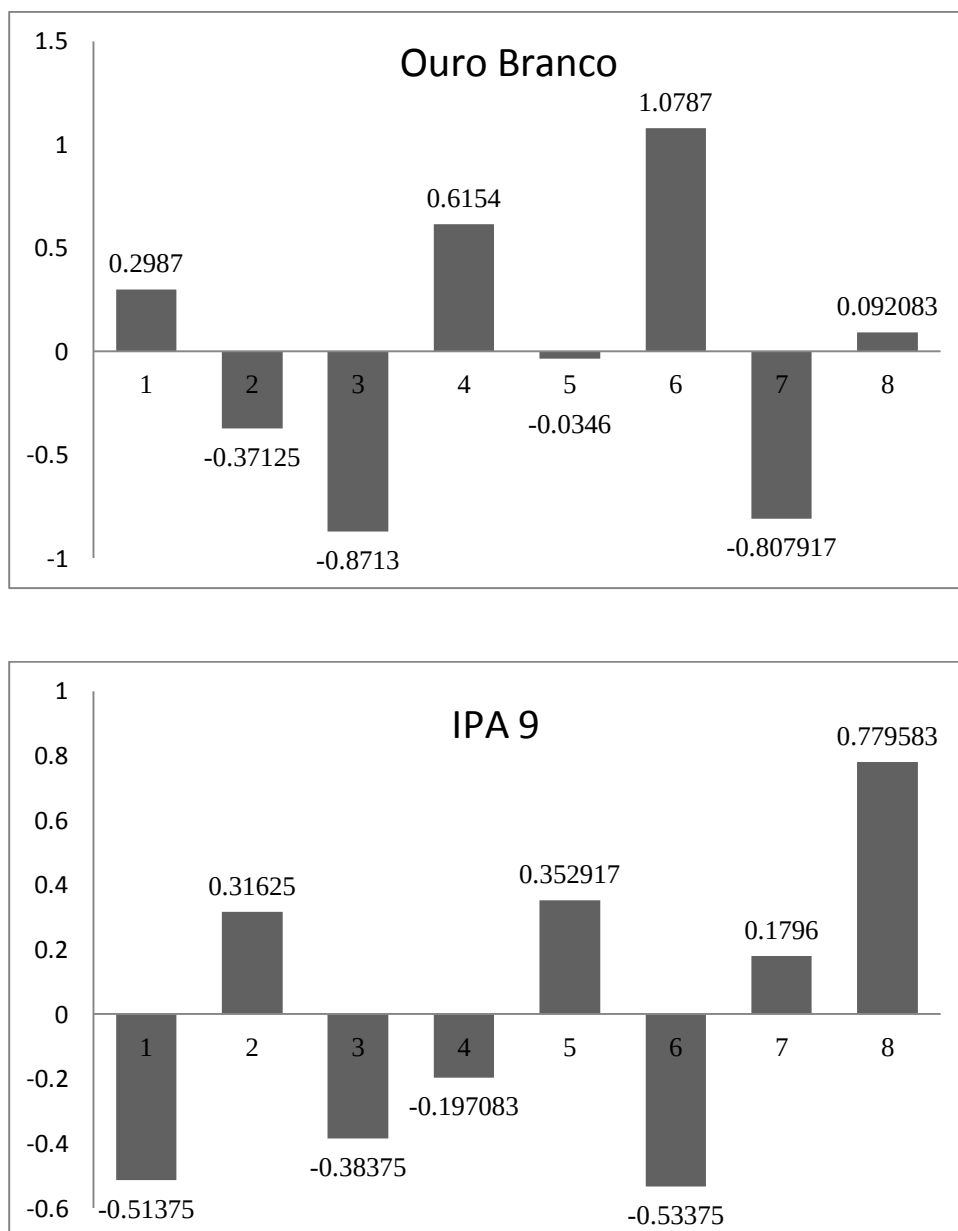


Figura 14. Resistência vertical dos genótipos inoculados com diferentes isolados do patógeno de acordo com o modelo IV de Griffing (1956) - Análise conjunta. 1 – CNPAFCff 31; 2 – CNPAFCff11; 3 – CNPAFCff34; 4 – CNPAFCff36; 5 – CNPAFCff04; 6 – CNPAFCff27; 7 – CNPAFCff33; 8 – CNPAFCff25

Tabela 15. Estimativa da Capacidade Específica de Interação (CEI) oriunda da interação da resistência vertical dos genótipos de feijoeiro-comum e da virulência dos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Genótipos\ Isolados	Ensaio	CNPAFCff 31	CNPAFCff11	CNPAFCff34	CNPAFCff36	CNPAFCff04	CNPAFCff27	CNPAFCff33	CNPAFCff 25
Coquinho	1ª Ensaio	0,305	-1,431667	-0,755	-0,255	-1,7317	1,605	-0,355	2,618333
	2ª Ensaio	2,5754	-2,017917	-0,09125	-0,227917	-0,347917	-0,054583	-0,6746	0,83875
	Análise Conjunta	1,43625*	-1,73375*	-0,43375 ^{ns}	-0,247083 ^{ns}	-0,9971*	0,7162*	-0,4704*	1,729583*
BRS Cometa	1ª Ensaio	0,73	-1,006667	0,67	-0,53	-0,606667	0,63	-0,63	0,7433
	2ª Ensaio	-0,287083	-2,180417	-0,25375	0,9096	-0,510417	-0,217083	-0,137083	2,67625
	Análise Conjunta	0,2612 ^{ns}	-1,60875*	0,1912 ^{ns}	0,1779 ^{ns}	-0,572083*	0,2412 ^{ns}	-0,3454 ^{ns}	1,6546*
BRS Estilo	1ª Ensaio	0,33	-1,106667	1,27	0,07	-0,706667	-0,77	-0,73	1,6433
	2ª Ensaio	0,425417	-1,467917	-0,2412	0,322083	-0,4979	0,495417	0,575417	0,38875
	Análise Conjunta	0,3737 ^{ns}	-1,29625*	0,5037*	0,190417 ^{ns}	-0,5596*	-0,14625 ^{ns}	-0,0329 ^{ns}	0,9671*
Vermelho	1ª Ensaio	0,1425	-0,594167	-0,6175	-0,7175	0,1058	0,4425	-0,2175	1,455833
	2ª Ensaio	-0,124583	-2,017917	-0,09125	-0,227917	-0,347917	-0,054583	0,025417	2,83875
	Análise Conjunta	0,0487 ^{ns}	-1,32125*	-0,3213 ^{ns}	-0,5346*	-0,0846 ^{ns}	0,1287 ^{ns}	-0,0579 ^{ns}	2,142083*
BRS Esplendor	1ª Ensaio	-0,245	-0,681667	1,995	-0,805	-0,281667	0,955	-0,605	-0,3317
	2ª Ensaio	0,125417	-1,767917	0,15875	0,022083	-0,097917	0,195417	0,275417	1,08875
	Análise Conjunta	-0,06375 ^{ns}	-1,23375*	1,06625*	-0,4471*	-0,197083 ^{ns}	0,6162*	-0,1704 ^{ns}	0,4296 ^{ns}
BRS Esteio	1ª Ensaio	0,4175	-2,019167	0,6575	-0,8425	0,380833	2,3175	-0,9425	0,030833
	2ª Ensaio	-0,249583	-2,142917	-0,21625	-0,352917	-0,472917	-0,179583	-0,099583	3,71375
	Análise Conjunta	0,08625 ^{ns}	-2,08375*	0,21625 ^{ns}	-0,597083*	-0,047083 ^{ns}	1,06625*	-0,520417*	1,8796*

Tabela 15. (Continuação)

Genótipos\ Isolados	Ensaio	CNPAFCff 31	CNPAFCff11	CNPAFCff34	CNPAFCff36	CNPAFCff04	CNPAFCff27	CNPAFCff33	CNPAFCff 25
BRS Notável	1ª Ensaio	0,6425	-1,094167	-1,1175	-1,9175	1,9058	-2,0575	0,6825	2,955833
	2ª Ensaio	-0,2246	-1,417917	-0,1912	-1,627917	-1,1479	0,545417	0,625417	3,43875
	Análise Conjunta	0,2237 ^{ns}	-1,24625*	-0,6463*	-1,759583*	0,3904 ^{ns}	-0,7963*	0,6171*	3,217083*
IAC Carioca Pyatã Tabela	1ª Ensaio	-0,545	-0,981667	0,395	-0,505	2,418333	-0,645	0,795	-0,931667
	2ª Ensaio	-0,4996	0,2071	0,1338	0,697083	-0,1229	-1,129583	0,950417	-0,23625
	Análise Conjunta	-0,5763*	-0,3463 ^{ns}	0,25375 ^{ns}	0,1404 ^{ns}	1,1904*	-0,89625*	0,8171*	-0,582917*
IAC Carioca Akytã	1ª Ensaio	-1,0325	-1,469167	-0,0925	-2,2925	1,5308	2,8675	1,9075	-1,419167
	2ª Ensaio	-0,7996	0,607083	0,53375	0,397083	-0,722917	0,570417	-0,0496	-0,53625
	Análise Conjunta	-0,9513*	-0,42125 ^{ns}	0,1787 ^{ns}	-0,934583*	0,4154 ^{ns}	1,72875*	0,9421*	-0,957917*
IAC Carioca Aruã	1ª Ensaio	-1,37	-1,806667	1,17	0,07	1,1933	2,53	-0,03	-1,756667
	2ª Ensaio	-1,037083	-0,930417	0,99625	0,859583	-0,6604	1,032917	1,112917	-1,3737
	Análise Conjunta	-1,18875*	-1,35875*	1,1412*	0,4279 ^{ns}	0,2779 ^{ns}	1,79125*	0,5046*	-1,5954*
Pérola	1ª Ensaio	-0,47	-0,606667	-1,93	-0,43	-0,206667	3,73	0,47	-0,556667
	2ª Ensaio	0,162917	-0,4304	0,19625	1,3596	-0,060417	0,5329	-0,3871	-1,3737
	Análise Conjunta	-0,2263 ^{ns}	-0,4963*	-0,89625*	0,4904*	-0,159583 ^{ns}	2,1537*	0,0671 ^{ns}	-0,9329*
BRS Requite	1ª Ensaio	-1,4575	0,105833	0,7825	0,2825	0,505833	0,4425	-0,8175	0,155833
	2ª Ensaio	0,125417	0,232083	0,15875	0,022083	-0,097917	0,195417	0,275417	-0,91125
	Análise Conjunta	-0,66375*	0,16625 ^{ns}	0,46625*	0,1529 ^{ns}	0,202917 ^{ns}	0,31625 ^{ns}	-0,270417 ^{ns}	-0,370417 ^{ns}
Uirapuru	1ª Ensaio	0,1175	-0,319167	0,0575	0,8575	0,080833	0,0175	-1,2425	0,4308
	2ª Ensaio	0,125417	0,232083	0,15875	0,022083	-0,097917	0,195417	0,275417	-0,91125
	Análise Conjunta	0,13625 ^{ns}	-0,03375 ^{ns}	0,0662 ^{ns}	0,452917*	0,002917 ^{ns}	0,11625 ^{ns}	-0,470417*	-0,2704 ^{ns}

Tabela 15. (Continuação)

Genótipos\ Isolados	Ensaio	CNPAFCff 31	CNPAFCff11	CNPAFCff34	CNPAFCff36	CNPAFCff04	CNPAFCff27	CNPAFCff33	CNPAFCff 25
BRS Campeiro	1ª Ensaio	1,58	-0,1567	-0,88	1,32	0,543333	-0,52	-0,78	-1,1067
	2ª Ensaio	0,125417	1,5321	0,15875	0,022083	-0,097917	-1,1046	0,275417	-0,91125
	Análise Conjunta	0,86125*	0,69125*	-0,3088 ^{ns}	0,6779*	0,2279 ^{ns}	-0,8588*	-0,2454 ^{ns}	-1,0454*
A 211	1ª Ensaio	-0,745	0,818333	-0,505	-0,005	-0,781667	-0,845	-0,805	2,868333
	2ª Ensaio	-0,137083	0,6696	0,5963	-0,240417	-0,360417	-0,067083	0,012917	-0,4737
	Análise Conjunta	-0,42625 ^{ns}	0,7037*	0,0037 ^{ns}	-0,109583 ^{ns}	-0,559583*	-0,44625*	-0,3329 ^{ns}	1,1671*
IPA 6	1ª Ensaio	-0,245	1,318333	-0,005	0,495	-0,9817	-0,345	0,395	-0,631667
	2ª Ensaio	0,312917	1,7196	-0,3537	0,209583	-0,6104	0,382917	-0,2371	-1,4237
	Análise Conjunta	0,01125 ^{ns}	1,5412*	-0,1588 ^{ns}	0,327917 ^{ns}	-0,8221*	-0,00875 ^{ns}	0,1046 ^{ns}	-0,9954*
Frijólica 0-3-1	1ª Ensaio	0,8425	0,405833	-0,9175	0,8825	-1,194167	0,0425	0,1825	-0,2442
	2ª Ensaio	-0,2246	1,8821	-0,89125	0,2721	0,5521	-0,854583	-0,774583	0,03875
	Análise Conjunta	0,2737 ^{ns}	1,1037*	-0,89625*	0,5904*	-0,3596 ^{ns}	-0,3463 ^{ns}	-0,3329 ^{ns}	-0,0329 ^{ns}
BAT 477	1ª Ensaio	0,805	1,068333	-0,255	0,245	-0,531667	-0,595	0,145	-0,881667
	2ª Ensaio	0,387917	0,494583	-0,2787	-0,4154	0,164583	-0,2421	0,537917	-0,64875
	Análise Conjunta	0,6237*	0,75375*	-0,2463 ^{ns}	-0,0596 ^{ns}	-0,209583 ^{ns}	-0,3963 ^{ns}	0,317083 ^{ns}	-0,782917*
IPA 1	1ª Ensaio	0,7175	0,980833	-0,3425	0,1575	0,0808	-0,6825	0,0575	-0,969167
	2ª Ensaio	0,000417	0,107083	0,03375	-0,102917	0,777083	0,070417	0,150417	-1,03625
	Análise Conjunta	0,4112 ^{ns}	0,54125*	-0,15875 ^{ns}	0,027917 ^{ns}	0,3779 ^{ns}	-0,30875 ^{ns}	0,104583 ^{ns}	-0,995417*
TU	1ª Ensaio	0,355	1,2183	0,595	0,395	0,9183	-0,445	-1,005	-2,031667
	2ª Ensaio	0,225417	-1,0679	-1,1412	-0,5779	3,002083	0,9954	0,375417	-1,81125
	Análise Conjunta	0,28625 ^{ns}	0,11625 ^{ns}	-0,2838 ^{ns}	-0,0971 ^{ns}	1,9529*	0,26625 ^{ns}	-0,320417 ^{ns}	-1,9204*

Tabela 15. (Continuação)

Genótipos\ Isolados	Ensaio	CNPAFCff 31	CNPAFCff11	CNPAFCff34	CNPAFCff36	CNPAFCff04	CNPAFCff27	CNPAFCff33	CNPAFCff 25
TO	1ª Ensaio	0,105	0,9683	-0,355	0,145	0,068333	-0,695	0,745	-0,9817
	2ª Ensaio	0,212917	0,319583	0,24625	0,109583	-0,010417	0,282917	-1,637083	0,4763
	Análise Conjunta	0,13625 ^{ns}	0,6662*	-0,0338 ^{ns}	0,1529 ^{ns}	0,002917 ^{ns}	-0,1838 ^{ns}	-0,470417*	-0,2704 ^{ns}
AND 277	1ª Ensaio	0,98	3,243333	-0,78	-1,58	-0,356667	-2,42	1,62	-0,706667
	2ª Ensaio	-0,8996	1,907083	-0,16625	-0,302917	-0,422917	-2,129583	1,2504	0,76375
	Análise Conjunta	0,0362 ^{ns}	2,56625*	-0,4338 ^{ns}	-0,947083*	-0,397083 ^{ns}	-2,28375*	1,4296*	0,029583 ^{ns}
Widusa	1ª Ensaio	0,0925	1,655833	0,3325	-1,1675	-0,6442	-0,7075	0,7325	-0,294167
	2ª Ensaio	0,050417	1,4571	0,08375	-0,052917	-0,172917	-0,5796	0,200417	-0,98625
	Análise Conjunta	0,06125 ^{ns}	1,5912*	0,19125 ^{ns}	-0,622083*	-0,3721 ^{ns}	-0,6588*	0,454583*	-0,645417*
Michelite	1ª Ensaio	0,255	1,1183	-0,805	0,995	-0,4817	-1,845	0,895	-0,131667
	2ª Ensaio	-0,2371	1,2696	-0,2037	-0,3404	0,9396	0,532917	-0,6871	-1,2737
	Análise Conjunta	0,0487 ^{ns}	1,17875*	-0,52125*	0,3654 ^{ns}	0,215417 ^{ns}	-0,67125*	0,0421 ^{ns}	-0,6579*
IPA 7419	1ª Ensaio	0,0925	1,655833	-0,3675	0,8325	-0,6442	-2,0075	0,7325	-0,294167
	2ª Ensaio	-0,5621	0,244583	0,17125	-0,6654	1,914583	0,207917	0,287917	-1,5987
	Análise Conjunta	-0,2138 ^{ns}	0,91625*	-0,0838 ^{ns}	0,1029 ^{ns}	0,6529*	-0,93375*	0,479583*	-0,9204*
Cornell 49242	1ª Ensaio	0,0175	0,8808	0,2575	0,7575	-0,7192	-0,7825	-0,0425	-0,369167
	2ª Ensaio	0,300417	1,7071	-0,3662	0,197083	-0,6229	0,370417	-1,549583	-0,0362
	Análise Conjunta	0,14875 ^{ns}	1,2787*	-0,0213 ^{ns}	0,465417*	-0,6846*	-0,1713 ^{ns}	-0,7579*	-0,2579 ^{ns}
PI 207 262	1ª Ensaio	0,08	-0,356667	1,02	0,82	0,043333	-2,02	0,72	-0,306667
	2ª Ensaio	0,137917	1,5446	0,17125	0,034583	-0,085417	-0,4921	0,287917	-1,5987
	Análise Conjunta	0,09875 ^{ns}	0,6287*	0,5287*	0,415417 ^{ns}	-0,034583 ^{ns}	-1,2213*	0,492083*	-0,9079*

Tabela 15. (Continuação)

Genótipos\ Isolados	Ensaio	CNPAFCff 31	CNPAFCff11	CNPAFCff34	CNPAFCff36	CNPAFCff04	CNPAFCff27	CNPAFCff33	CNPAFCff 25
IPA 9	1ª Ensaio	-0,67	0,893333	-0,43	0,07	-0,706667	-0,77	0,67	0,943333
	2ª Ensaio	-0,374583	-0,267917	-0,34125	-0,477917	1,402083	-0,304583	-0,224583	0,58875
	Análise Conjunta	-0,51375*	0,31625 ^{ns}	-0,38375 ^{ns}	-0,197083 ^{ns}	0,352917 ^{ns}	-0,53375*	0,1796 ^{ns}	0,779583*
Ouro Branco	1ª Ensaio	0,43	-0,006667	-1,03	0,17	0,393333	0,93	-0,93	0,043333
	2ª Ensaio	0,162917	-0,730417	-0,7037	1,059583	-0,4604	1,232917	-0,687083	0,12625
	Análise Conjunta	0,2987 ^{ns}	-0,37125 ^{ns}	-0,8713*	0,6154*	-0,0346 ^{ns}	1,0787*	-0,807917*	0,092083 ^{ns}
CNFRS 11997	1ª Ensaio	-2,2575	-2,694167	1,9825	2,4825	0,4058	1,6425	-1,6175	0,0558
	2ª Ensaio	0,200417	0,307083	1,7338	-0,902917	-0,7229	-0,4296	-0,3496	0,16375
	Análise Conjunta	-1,03875*	-1,20875*	1,8912*	0,7779*	-0,172083 ^{ns}	0,6412*	-0,9454*	0,0546 ^{ns}
DP (Sij):	0,434012								
DP(Sij-Sik):	0,656164								
DP(Sij-Skj):	0,624278								
DP(Sij-Skl):	0,612272								

*valores significativos diferentes de zero pelo teste t

DP: desvio padrão da estimativa da CEI

4.6 INDICAÇÃO DE CULTIVARES DIFERENCIADORAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Neste trabalho utilizou-se o método de dialelos parciais proposto por Melo & Santos (1999) e foi possível medir a interação entre *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* x feijão, demonstrando variabilidade neste patossistema. Este é o primeiro relato de uso dessa metodologia para este patossistema. Utilizando-se os métodos de estratificação ambiental de Wricke (1965) e Lin & Binns (1988) foi possível propor genótipos capazes de identificar patótipos neste patossistema sendo também o primeiro relato na literatura.

Quando surge um genótipo mutante do patógeno que quebra um gene R, este genótipo pode ser estabelecer na população, se tornando uma raça. Raças são variantes dentro de uma mesma espécie, definidas com base em seu espectro de ação contra um conjunto de genótipos (Camargo, 2011).

Conforme se verifica na Tabela 16, na correlação com 30 genótipos, quatro pares de isolados, CNPAFCff31 e CNPAFCff25; CNPAFCff34 e CNPAFCff36; CNPAFCff34 e CNPAFCff27; CNPAFCff36 e CNPAFCff27 apresentaram altas correlações significativas positivas, indicando que estes classificaram os genótipos da mesma forma, ou seja, não se diferenciaram. Os isolados CNPAFCff 04, CNPAFCff11 e CNPAFCff33 não estão correlacionados, portanto possivelmente são aleatórios e apresentaram interações fortes, indicando a existência de patótipos específicos. O isolado CNPAFCff 11 apresentou quatro correlações negativas, indicando que é o mais discrepante dos oito isolados. Ao realizar a correlação de Pearson com os quatro genótipos extremos, isto é, os que obtiveram as menores (IPA 9 e Ouro Branco) e as maiores (Frijólica 0-3-1 e CNFRS 11997) médias de severidade, a correlação foi alta (0,7969), indicando que estes genótipos possivelmente possuem genes de grande efeito e não é possível detectar a interação gene-a-gene. Ao utilizar os 26 genótipos intermediários, isto é, genótipos com média de severidade mediana, a correlação foi baixa (0.003054) indicando que há presença de genes de pequeno, médio e grande efeitos, o que possibilitou a classificação dos isolados em patótipos, o que pode ser verificado na maior ocorrência de correlações negativas permitindo detectar mais pares de isolados discrepantes entre si.

Tabela 16. Estimativas da correlação de Pearson da severidade de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em 30 genótipos de feijoeiro-comum

ISOLADOS	CORRELAÇÃO		
	4 GENÓTIPOS	26 GENÓTIPOS	30 GENÓTIPOS
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 11	0,87	-0,08	0,1691
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 34	0,50	0,002	0,25
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 36	0,89	0,18	0,43
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 04	0,81	-0,14	0,16
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 27	0,77	0,03	0,21
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 33	0,81	-0,009	0,30
<i>Cff</i> 31 x <i>Cff</i> 25	0,78	0,53**	0,51**
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 34	0,37	-0,38	-0,06
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 36	0,70	-0,02	0,19
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 04	0,74	-0,26	-0,03
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 27	0,44	-0,62**	-0,41
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 33	0,90	0,13	0,31
<i>Cff</i> 11 x <i>Cff</i> 25	0,77	-0,46*	-0,32
<i>Cff</i> 34 x <i>Cff</i> 36	0,83	0,24	0,56**
<i>Cff</i> 34 x <i>Cff</i> 04	0,89	0,04	0,40
<i>Cff</i> 34 x <i>Cff</i> 27	0,80	0,40*	0,50**
<i>Cff</i> 34 x <i>Cff</i> 33	0,71	0,22	0,42
<i>Cff</i> 34 x <i>Cff</i> 25	0,87	0,24	0,30
<i>Cff</i> 36 x <i>Cff</i> 04	0,966*	-0,18	0,23
<i>Cff</i> 36 x <i>Cff</i> 27	0,93	0,26	0,46**
<i>Cff</i> 36 x <i>Cff</i> 33	0,84	-0,33	0,07
<i>Cff</i> 36 x <i>Cff</i> 25	0,92	-0,22	0,01

Tabela 16. (Continuação)

ISOLADOS	CORRELAÇÃO	CORRELAÇÃO	CORRELAÇÃO
	4 GENÓTIPOS	4 GENÓTIPOS	4 GENÓTIPOS
<i>Cff</i> 04 x <i>Cff</i> 27	0,84	0,11	0,27
<i>Cff</i> 04 x <i>Cff</i> 33	0,92	0,22	0,43
<i>Cff</i> 04 x <i>Cff</i> 25	0,99**	-0,13	0,005
<i>Cff</i> 27 x <i>Cff</i> 33	0,60	-0,02	0,10
<i>Cff</i> 27 x <i>Cff</i> 25	0,76	0,18	0,24
<i>Cff</i> 33 x <i>Cff</i> 25	0,95*	0,16	0,22
Média das Correlações	0,7969	0,003054	0,214

Com a correlação de Pearson (Tabela 16) verificou-se que é necessário fazer uma amostragem significativa, não só de genótipos de feijoeiro-comum como dos isolados em estudo. Ao se realizar a correlação somente com os quatro genótipos extremos, dois mais resistentes e os dois mais suscetíveis, obteve-se resultados totalmente discrepantes, com correlação média de 0, 7969. Isso comprova a importância de uma boa amostragem para que as conclusões do patossistema sejam consistentes. Verifica-se a presença de interação diferencial quando predomina os genes de efeitos intermediários de resistência horizontal. Os genótipos que possuem genes de maior efeito não contribuem para detecção da interação porque eles exibem resistência a maioria dos patótipos, assim como aqueles que não apresentam genes de resistência horizontal nem de resistência vertical (suscetíveis). Eles não interagem por não possuir resistência a nenhum patótipo, então não é capaz de discriminar os isolados em patótipos. Ao realizar a correlação com os 26 genótipos intermediários a correlação foi baixa (0,003054), sugerindo que os genótipos intermediários contribuem mais para a interação, do que os genótipos extremos, sugerindo a que os genes de resistência horizontal de efeito médio são mais importantes para interação

genótipo x isolado. Assim para estudos de interação diferencial, indica-se a escolha de genótipos que apresentam reações intermediárias e não genótipos extremos, pois estes não representam toda variação patogênica existente.

Os genótipos que apresentaram maiores estimativas da ecovalência de Wricke (1965) foram CNFRS 11997 (9,651605) e IAC Carioca Akytã (9,222052), portanto foram os que mais contribuíram para os efeitos da interação, seguido dos genótipos BRS Notável, Pérola, IAC Carioca Aruã e Coquinho foram os mais instáveis com estimativas acima de 7% (Tabela 17). Os genótipos IPA 1, Vermelho e BRS Requite obtiveram menor estimativa da ecovalência, portanto estes foram os que menos interagiram com os isolados.

Tabela 17. Estimativa de estabilidade de 30 genótipos do feijoeiro-comum, avaliados quando inoculados com oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, com base no método da Ecovalência (Wi)

Genótipo	Ecovalência (Wi)	Wi (%)
CNFRS 11997	79,3311	9,651605
IAC Carioca Akytã	75,8004	9,222052
BRS Notável	71,3403	8,679426
Pérola	60,1671	7,320069
IAC Carioca Aruã	58,4475	7,110858
Coquinho	58,0575	7,06341
A 211	36,1374	4,39656
BRS Esteio	33,758717	4,107164
AND 277	30,0759	3,659104
IAC Carioca Pyatã	29,1729	3,549243
IPA 7419	27,0705	3,29346
TU	25,2525	3,072278
PI 207 262	23,0574	2,805217
Widusa	22,8528	2,780325
Michelite	22,8339	2,778025
BRS Estilo	22,4877	2,735906
IPA 6	17,6682	2,149554
BRS Campeiro	16,1445	1,964177
TO	13,8291	1,68248
IPA 9	11,7525	1,429836
BRS Cometa	10,9023	1,326399

Tabela 17 (Continuação)

Genótipo	Ecovalência (Wi)	Wi (%)
Frijólica 0-3-1	10,4163	1,267271
BRS Esplendor	10,1118	1,230225
Ouro Branco	9,2445	1,124707
BAT 477	9,0744	1,104013
Cornell 49242	8,9331	1,086822
Uirapuru	8,3472	1,01554
IPA 1	8,1354	0,989772
Vermelho	6,2856	0,764721
BRS Requite	5,258717	0,639788

Para classificação de isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em patótipos é necessário compor uma série de genótipos diferenciadores que sejam capazes de classificar os isolados do patógeno quanto à reação fenotípica dos genótipos ao serem inoculados. Ao estimar a estabilidade, por meio da equivalência de Wricke (1965) (Tabela 17), foi possível apontar quais genótipos mais contribuíram para os efeitos de interação. O genótipo que mais contribuiu foi o CNFRS 11997 pois obteve a maior estimativa para este parâmetro (79,3311) e portanto, o que mais discriminou os diferentes genótipos (9,65). Em segundo lugar, o genótipo IAC Carioca Akytã contribuiu com 9,22% para a interação e, na sequência os genótipos BRS Notável (8,67%), Pérola (7,32%), IAC Carioca Aruã (7,11%) e Coquinho (7,06%). Portanto estes genótipos comportaram-se com elevada quando inoculado com diferentes raças, pois foram os que mais interagiram com os isolados. Assim sendo, conforme a ecovalência de Wricke (1965), estes genótipos serão capazes de classificar os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em patótipos pois foram os genótipos que mais interagiram com os isolados, diferente dos genótipos IPA 1, Vermelho e BRS Requite que obtiveram estimativas de ecovalência abaixo de zero. Portanto, os genótipos IAC Carioca Akytã, BRS Notável, Pérola, IAC Carioca Aruã e Coquinho são indicados para serem utilizados como diferenciadoras de patótipos de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Observa-se que o genótipo BRS Requite obteve a menor estimativa de ecovalência de Wricke (1965) (Tabela 17) e uma das maiores estimativas negativas de resistência horizontal (-0.402917). Foi observado que os genótipos que mais contribuíram

para os efeitos de interação com os isolados obtiveram as menores estimativas de resistência horizontal, e os que menos contribuíram para esta interação são resistentes à *murcha-de-curtobacterium*, conclui-se que os genótipos suscetíveis possivelmente não possuem genes de maior efeito para resistência e interagem mais com os diferentes isolados, sendo assim, capazes de discriminá-los em patótipos.

Hsieh et al. (2005) utilizando 15 genótipos de feijoeiro-comum e dois isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não detectaram diferenças entre os genótipos e isolados, contudo no presente estudo, com as estimativas de estabilidade de Lin e Binns (1988) (Tabela 18) pode-se observar a interação dos genótipos com os isolados. Portanto, o uso de poucos genótipos de feijoeiro-comum e isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* não é o suficiente para abranger toda variabilidade tanto do hospedeiro quanto do patógeno.

Na Tabela 18 encontram-se os valores das estimativas de estabilidade dos 30 genótipos, obtidas de acordo com a metodologia de Lin e Binns (1988) que no presente estudo, os resultados obtidos mostram o comportamento dos genótipos em relação aos isolados. Os isolados, foram classificados em mais agressivos (*Pi* (+)) os que apresentaram média acima da média geral (2,93) e menos agressivos (*Pi* (-)) com média abaixo da média geral. Dessa forma, os isolados mais agressivos foram CNPAFCff 31, CNAPFCff 34, CNPAFCff 04, CNPAFCff 27 e CNPAFCff 25 e os menos agressivos foram CNPAFCff 11, CNPAFCff 36 e CNPAFCff 33.

Tabela 18. Estimativa de estabilidade de 30 genótipos de feijoeiro-comum, avaliados com oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, com base na metodologia de Lin e Binns (1988)

Genótipos	Média (Notas)	<i>Pi</i> (+)	C ¹	<i>Pi</i> (-)	C
IPA 9	1,3375	12,90	1	8,82	2
TO	2,15	7,92	8	9,16	1
Ouro Branco	2,1875	7,46	11	7,91	5
BRS Requite	2,25	6,60	13	7,91	4
Michelite	2,325	10,10	2	3,63	22
AND 277	2,3625	8,59	5	6,83	9
Widusa	2,45	8,07	7	6,88	7
PI 207 262	2,4625	8,28	6	4,21	20
TU	2,5375	8,62	4	4,64	16
IPA 7419	2,5375	9,30	3	3,54	27

Tabela 18. (Continuação)

Genótipos	Média (Notas)	Pi (+)	C¹	Pi (-)	C
Uirapuru	2,55	5,83	16	6,41	11
BRS Esplendor	2,6125	4,76	21	8,01	3
Cornell 49242	2,65	7,17	12	4,24	17
Vermelho	2,725	5,08	19	6,84	8
Pérola	2,725	7,48	9	5,71	13
IPA 6	2,7875	7,46	10	3,54	24
BRS Campeiro	2,9625	6,15	14	3,59	23
BAT 477	3,0875	5,86	15	3,54	25
IAC Carioca Pyatã	3,125	5,01	20	4,77	15
BRS Cometa	3,1625	3,22	27	5,84	12
IPA 1	3,175	5,49	17	3,54	26
BRS Notável	3,2125	5,31	18	7,09	6
BRS Estilo	3,275	3,42	26	4,83	14
A 211	3,4125	4,50	22	4,16	21
Coquinho	3,625	4,03	23	4,21	18
IAC Carioca Akytã	3,625	3,42	25	6,66	10
Frijólica 0-3-1	3,7375	4,00	24	1,64	29
IAC Carioca Aruã	3,925	2,79	28	2,90	28
BRS Esteio	4,125	1	29	4,21	19
CNFRS 11997	4,925	0,57	30	1,54	30

¹ Classificação dos genótipos baseado na estabilidade pelo método Linn e Binns (1988)

Conforme a média geral obtida segundo o método de Linn e Binns (1988) os isolados mais agressivos foram *Cff* 31, *Cff* 34, *Cff* 04, *Cff* 27 e *Cff* 25, entretanto, estes isolados foram menos virulentos para os genótipos IPA 9, Michelite, AND 277, PI 207 262, TU, IPA 7419, Cornell 49242, Pérola, IPA 6, BRS Campeiro, BAT 477, IPA 1 e Frijólica 0-3-1. O contrário foi observado com os isolados menos agressivos *Cff* 11, *Cff* 36 e *Cff* 33 por se apresentarem virulentos aos genótipos TO, Ouro Branco, BRS Requite, Uirapuru, BRS Esplendor, Vermelho, IAC Carioca Pyatã, BRS Cometa, BRS Notável, BRS Estilo, A211, Coquinho, IAC Carioca Akytã e BRS Esteio. Estes resultados seguem os princípios da teoria gene-a-gene de Flor (1971). Para estes genótipos, os isolados menos agressivos possivelmente possuem genes de virulência que os genes de resistência do hospedeiro não conseguiram reconhecer.

Na espécie de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* existem variantes que quebram genes R de diferentes genótipos (Tabela 19). Para propor genótipos de feijoeiro

diferenciadores de raças de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram utilizados dados obtidos nas avaliações dos genótipos quando inoculados com oito isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A raça cinco é capaz de causar sintomas da doença no genótipo Ouro Branco. Já a raça três difere da cinco por quebrar a resistência do genótipo BAT 477. A raça dois se difere da raça três por quebrar a resistência do genótipo IAC Carioca Aruã. A raça 8 quebra a resistência de dez genótipos, exceto dos genótipos IAC Carioca Aruã, BRS Campeiro, Ouro Branco, BAT 477 e IPA 9, logo é considerada mais agressiva que as demais. O contrário ocorre com a raça um, que quebra a resistência de somente cinco genótipos dos quinze avaliados, portanto a raça menos agressiva. Corroborando com estes dados, Camargo (2011) cita que o fungo *Podosphaera xanthii*, agente causal do oídio do meloeiro possui variantes que quebram vários genes de resistência dos genótipos genes de resistência de genótipos. Este autor menciona sete genótipos capazes de diferenciar cinco raças do patógeno.

Tabela 19. Raças de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultivares suscetíveis e resistentes de feijoeiro-comum.

ISOLADOS								
GENÓTIPOS	CNPAF <i>Cff</i> 11	CNPAF <i>Cff</i> 33	CNPAF <i>Cff</i> 31	CNPAF <i>Cff</i> 36	CNPAF <i>Cff</i> 27	CNPAF <i>Cff</i> 34	CNPAF <i>Cff</i> 04	CNPAF <i>Cff</i> 25
CNFC 10429	S	S	S	S	S	S	S	S
Frijólica 0-3-1	S	S	S	S	S	R	S	S
BRS Cometa	R	R	S	S	S	S	R	S
CNFRS 11997	R	R	R	S	S	S	S	S
IAC Carioca Aruã	R	S	R	S	S	S	S	R
BRS Esteio	R	R	S	R	S	S	S	S
BRS Notável	R	S	S	R	R	R	S	S
AND 277	S	S	S	R	R	R	R	S
BRS Esplendor	R	R	R	R	S	S	R	S
BRS Campeiro	R	R	S	S	R	R	S	R
A 211	S	R	R	R	R	S	R	S
Cornell 49242	S	R	R	R	R	R	R	S
Ouro Branco	R	R	R	R	S	R	R	R
BAT 477	R	R	S	R	R	R	R	R
IPA 9	R	R	R	R	R	R	R	R
RAÇAS	1	2	3	4	5	6	7	8

A classificação de raças descrita acima pode mudar se for considerado um conjunto diferente de genótipos. Pois novas raças do patógeno podem ser descritas e a durabilidade da resistência vertical destes genótipos pode ser quebrada dentro de uma escala microevolutiva do patógeno (Camargo, 2011).

5. CONCLUSÕES

- Existe variabilidade na virulência dos 24 isolados quando inoculados em três genótipos de feijoeiro;
- A interação diferencial entre genótipos e isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi identificada por meio de análise de dialelos parciais;
- A virulência do patógeno variou de acordo com o genótipo;
- Dentre os oito isolados inoculados, o CNPAFCff 25 apresentou maior agressividade;
- Os genótipos mais resistentes à murcha-de-curtobacterium foram o IPA 9 e Ouro Branco;
- As cultivares mais suscetíveis foram Frijólica 0-3-1 e CNFRS 11997, contudo pode ser observada existência de uma Resistência Vertical;
- Foi possível propor quinze genótipos diferenciadores de raças para murcha-de-curtobacterium;
- Foram identificadas oito raças de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pela inoculação em 15 genótipos de feijão comum;
- A análise de genótipos suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes à *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sob MEV revelou formação de estruturas de resistência pós-formados em cultivares resistentes o que não foi observado em genótipos suscetíveis;
- As análises de MEV mostraram estruturas de defesa estruturais pós-formados somente nas cultivares resistentes.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2005, 922 p.
- ALVES, E.; LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; ISHIDA, M. L.; ANDERSEN, P. C. *Citrus sinensis* leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 2, p. 218-224, 2009.
- BANDEIRA, M. H. A.; WENDLAND, A.; CÔRTEZ, M. V. D. C. B.; JUNIOR, M. L.; PEREIRA, R. J., A coleção de culturas de microrganismos fitopatogênicos: importante fonte de informação para a pesquisa do feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 10,2011, Goiânia. **Anais...** Embrapa Arroz e Feijão.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, St. Paul, v. 1, n. 6, p. 190-195, 1911.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 13-18.
- BRADDBURY, J. F. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. London: Farhan House C.A.B. International, 1986, 332 p.
- CAMARA, R. D. C. **Transmissão planta - semente de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultivares de feijoeiro**. 2008. 41 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- CAMARGO, L. E. A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. (Ed.). **Manual de Fitopatologia. Volume I: Princípios e Conceitos**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres Ltda, 2011. p. 325-341.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle Genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1995.
- CARNEIRO, P. C. S. **Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento**. 1998. 168 f. Tese (Doutorado)–, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic

fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 20, n. 1-2, p. 1-6, 1963.

CHAKRABORTY, S.; RATCLIFF, D.; MACKAY, F. J. Anthracnose of *Stylosanthes scabra*: effect of leaf surface wetness on disease severity. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 5, p. 379-384, 1990.

CHAVARRO, C. A.; LOPEZ, G. C. A.; LENNE, J. M. Características y pathogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto em el rendimiento de *Z. glaba*. CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. **Acta Agronomica**, Palmira, v. 35, n. 2, p. 64-79, 1985.

COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccum faciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsttia* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 129, n. 11, p. 3545-3548, 1983.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, fevereiro 2013**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2013, 27 p.

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

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L.; AL-YASIRI, S. Reaction studies of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 47, p. 534-537, 1963.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: Editora UFV, 2006, 382 p.

DAVIDE, L. M. C.; SOUZA, E. A. D. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2009.

DAVIES, J. A.; ANDERSON, G. K.; BEVERIDGE, T. J. Chemical mechanism of the Gram stain and Synthesis of a new electron-opac marker for electron microscopy which replaces the idione mordant of the stain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, n. 2, p. 837, 1983.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Socioeconomia**. Date Published, Volume v., Pages p. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: Dezembro, 2012.

FERNANDES, C. D. **Resistência de progênies de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* à antracnose causada por *Colletotrichum gloesporioides***. 2003. 90 f. Tese

(Doutorado)–Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu, 2003.

FERREIRA, D. F. **Sistema Para Análise De Variância Para Dados Balanceados (SISVAR)**. Lavras: UFLA, 1999, 92 p.

FLOR, H. H. Current status of the gene-to-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, n. 1, p. 275-296, 1971.

GONZALEZ, A. J.; TELLO, J. C.; RODICIO, M. R. Bacterial wilt of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in southeastern Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 12, p. 1361, 2005.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, Canberra, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1991, 73 p.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* Nov. Sp. **Science**, Washington, v. LV, n. 1425, p. 433-434, 1922.

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

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; MÜNDEL, H.-H.; CONNER, R. L.; ERICKSON, R. S.; BALASUBRAMANIAN, P. M. Resistance of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Bacterial Wilt Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 153, n. 4, p. 245–249, 2005.

IQBAL, S. M.; RAUF, C. A.; ALI, S. Pathogenic Variability Among the Isolates of *Ascochyta lentis*. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 8, n. 5, p. 618–620, 2006.

ITO, M. A. **PATOGENICIDADE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, ADUBAÇÃO NITROGENADA E PRODUTIVIDADE DE FEIJÃO**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestre em Agronomia)–Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KELEMU, S.; BADEL, J. L.; MORENO, C. X.; MILES, J. W. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on selected *Stylosanthes guianensis* genotypes. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1355-1358, 1996.

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

LIN, C. S.; BINNS, M. R. A superiority measure of cultivar performance for cultivar x

location data. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v. 68, n. 68, p. 193-198, 1988.

MARANHA, F. G. C. B.; RAMALHO, M. A. P.; FARIAS, F. J. C. ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE DA REAÇÃO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO A PATÓGENOS. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 565-575, 2002.

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

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

MELO, L. C.; SANTOS, J. B. D. Identification of resistant genotypes considering polygenic Systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 22, n. 4, p. 601-608, 1999.

NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. D.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, 1183 p.

OROZCO, S.; ARAYA, C. M. Variabilidade patogênica de *Phaeoisariopsis griseola* na Costa Rica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 589-593, 2005.

PARLVEVLIT, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance, a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 26, n. 1, p. 5-21, 1977.

POWERS, E. M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3756-3758, 1995.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. D. **Brusone em Arroz: Controle genético, progresso e perspectivas**. 1ª ed. Santo Antônio de Goiás, 2006, 388 p.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. D. F. B.; SANTOS, J. B. D.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da Genética Quantitativa no Melhoramento de Plantas Autógamas**. 1ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2012, 522 p.

RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. D., Reação de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*Curtobacterium*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1,2001, Goiânia. **Anais...** Embrapa Arroz e Feijão.

ROMEIRO, R. D. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: UFV, 2001, 279 p.
ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Editora UFV, 1995, 367 p.

ROTT, P.; DAVIS, M. J., Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. In: International Society of Sugarcane Technologists Congress, 22,1996, Cali. **Proceedings**. p. 498-503.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; HALL, R.; FORSTER, R. L. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2 ed. St. Paul: APS Press, 1991. p. 109.

SARTORATO, A. **Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc.** 1989. 131 f. Tese (Doutor em Agronomia)–Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goiás, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 7, p. 385–390, 2004.

SARTORATO, A., Desafios no controle de doenças na cultura do feijoeiro na região Centro-Oeste. In: VI SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico. p. 15-17.

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

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. D. ***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: Sobrevivência, gama de hospedeiras e efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da doença.** 2011. 98 f. Tese (Doutor em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

SILVA, L. L. D.; ZAMBOLIM, L.; WENDLAND, A. **VARIABILIDADE PATOGENICA DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* EM FEIJOEIRO COMUM.** 2010. 26 f. Monografia (Pós-Graduação Lato Sensu em Proteção de Plantas)–CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual**. Rochester: Nalge Nunc International Corp, 1998, 15 p.

SOUZA, T. L. P. O. D.; ALZATE-MARIN, A. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. D. Análise comparativa da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 143-149, 2005.

SOUZA, V. L. D. **Reação de genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, agressividade e variabilidade molecular de isolados.** 2004. 75 f. Tese

(Doutor em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

STAKMAN, E. C.; PIMEISAL, F. J. Biologic forms of *Puccinia graminis* on cereal and grasses. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 10, p. 429-495, 1917.

STONE, L. F.; SILVA, S. C. D.; GUIMARÃES, C. M. **Características climáticas e atributos dos solos dos sítios de fenotipagem para tolerância à seca da Embrapa Arroz e Feijão**. 21 ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, 19 p.

TAKATSU, A. Preservação das bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 461, 1980.

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.

THEODORO, G. D. F. **Murcha-de-Curtobacterium do feijoeiro: ocorrência em Santa Catarina, comportamento de genótipos e efeito de nitrogênio e potássio**. 2004. 105 f. Tese (Doutor em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

THEODORO, G. D. F.; HERBES, D. H.; MARINGONI, A. C. Fonte de resistência à murcha-de-Curtobacterium em cultivares locais de feijoeiro, coletadas em Santa Catarina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1333-1339, 2007.

THEODORO, G. D. F.; MARINGONI, A. C.; CHUMPATI, A. A.; CORREIA, H. C.; THEODORO, J. V. C.; NOGUEIRA, R. J. First report of bacterial wilt of common bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in Mato Grosso do Sul. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 4, p. 107, 2010.

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

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

VANDERPLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. Academic Press, 1963, 349 p.

VANDERPLANK, J. E. **Disease Resistance in Plants**. Academic Press, 1968, 206 p.

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

WANDER, A. E. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. **Informações**

Econômicas, v. 37, n. 2, p. 7-21, 2007.

WENDLAND, A.; ALENCAR, N. E.; MELO, L. C.; COSTA, J. G. C. C.; DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; FERREIRA, E. P. D. B.; CÔRTEZ, M. V. C. B. Symptom pattern of common bean genotypes inoculated with different isolates of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 52, p. 70-71, 2009.

WENDLAND, A.; ALENCAR, N. E.; MELO, L. C.; COSTA, J. G. C. D.; DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C. D.; CÔRTEZ, M. V. D. C. B.; BRONDANI, R. P. V. Embrapa Arroz e Feijão, 2008. **Padrão de sintomas de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em dois genótipos de feijoeiro comum**. 2008.

WENDLAND, A.; MODA-CIRINO, V.; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C. D.; OLIVEIRA, M. I. S.; LIMA, S. C. D. V.; ARAÚJO, L. G. D. Murcha-de-curtobacterium. In: JÚNIOR, T. J. D. P.; WENDLAND, A. (Ed.). **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2012. p. 111-124.

WOOD, B. A.; EASDOWN, W. J. A new bacterial disease of Mung bean and Cowpea for Australia. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 16-21, 1990.

WRICKE, G. Zur Berechnung der Ökovalenz bei Sommerweizen und Hafer. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, v. 52, p. 127-138, 1965.

YORINORI, J. T.; KIHIL, R. A. D. S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. D.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.