

# Sanidade de Sementes de Feijão a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

56

Merilin Gabrieli Dal Ben Ferreira<sup>1</sup>, Jacqueline Dalbello Puia<sup>2</sup>, Sandra Cristina Vigo<sup>3</sup>, Leandro Camargo Borsato<sup>4</sup>

---

## RESUMO

O feijão comum, tido como uma importante fonte proteica e de carboidratos, é suscetível a uma grande variedade de doenças por ser cultivado em diversificados sistemas de produção e ecossistemas, em todas as regiões brasileiras, durante o ano. A murcha de curtobacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), está atualmente presente em vários estados do país. Seu principal meio de sobrevivência, disseminação e introdução em novas áreas de cultivo é via sementes infectadas. Pesquisas que relacionam o comportamento da transmissão de Cff por sementes são escassas na literatura. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi verificar a incidência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* presente em sementes de feijão, provenientes da safra de 2016-2017. Sementes de linhagens de feijão Carioca foram coletadas e passaram por identificação quanto ao seu aspecto, posteriormente foi efetuado o isolamento da bactéria, utilizando o procedimento de maceração, do qual a suspensão resultante foi submetida a crescimento em meio AN, em seguida fez-se a caracterização molecular que foi realizada a partir da extração do DNA, realização de PCR e gel de eletroforese. Os resultados confirmaram a presença de Cff em seis das sete linhagens.

Palavras-chave: Doença; Bactéria; Murcha de Curtobacterium.

---

<sup>1</sup> Discente de Agronomia-Universidade Norte do Paraná - UNOPAR,

<sup>2</sup> Bolsista Técnica-Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR,

<sup>3</sup> Pesquisadora-Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina-PR

<sup>4</sup> Técnico de Laboratório-Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina-PR.

## INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), pertencente à família *Fabaceae*, é uma leguminosa de grande importância nos países em desenvolvimento. No Brasil, o cultivo do feijão é realizado em todo território nacional. Os grãos apresentam relevância econômica e social, por serem a base da alimentação dos brasileiros (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Entretanto, existem diversos fatores que comprometem sua produção, sendo que perdas significativas estão associadas à ocorrência de doenças.

Tais doenças que ocorrem no cultivo de feijão podem ser causadas por diferentes microrganismos, entre eles patógenos de origem fúngica, bacteriana e virótica. Em relação às doenças de origem bacteriana, a murcha de *Curtobacterium*, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), tem adquirido grande importância no Brasil.

A bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é gram-positiva e aeróbica (HALL, 1991). Em plantas de feijão, causa sintomas de flacidez dos tecidos foliares e murcha generalizada da planta, podendo levar a planta à morte, provocando, conseqüentemente, significativas perdas de produção (HEDGES, 1926).

Com base em conhecimentos já existentes, a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pode sobreviver em sementes, no solo, em restos culturais e em plantas hospedeiras alternativas, por diferentes períodos de tempo.

A bactéria é disseminada por sementes infectadas e/ou infestadas, sendo estas a principal fonte de inóculo inicial (VALENTINI et al., 2010). Além disso, o patógeno pode infectar a planta via ferimentos ou mesmo por aberturas naturais (BEDENDO, 2011).

As vagens verdes provenientes de plantas doentes podem se apresentar aparentemente normais ou encharcadas, indicando infecção pela bactéria que causa a murcha de *Curtobacterium* (BIANCHINI et al., 2005). As sementes dessas vagens adquirem cor amarelada na região dos cotilédones podendo estar infectadas mesmo quando as vagens se mostram aparentemente sadias (BIANCHINI et al., 2005; HARVESON et al., 2005).

Tendo em vista a ampla disseminação do patógeno em diversas regiões produtoras de feijão e sobrevivência por vários anos em sementes contaminadas, indicam sua adaptabilidade ambiental, sendo necessário um amplo estudo do patógeno para a adoção de medidas apropriadas, visando a prevenção e o manejo da doença.

Este trabalho visou determinar a incidência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* presentes em sementes de feijão, provenientes de plantas cultivadas a campo na safra de 2016/2017.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Patologia de Sementes do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) - Londrina. Sementes de feijão da safra 2016/2017 foram coletadas em campos experimentais, localizado na cidade de Londrina, com suspeita de incidência de murcha bacteriana. As sementes utilizadas são provenientes das linhagens IC 127 ST (lote 1 e 2), IC 139 ST (lote 1, 2 e 3), VB 128 ST e IC 128 ST.

Para identificação de Cff nas linhagens, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito a 1% por dois minutos, após lavadas duas vezes em água destilada para lavar o resíduo do hipoclorito, sendo realizado a seguir a maceração das sementes.

Com auxílio de cadinho e pistilo as sementes foram maceradas, e adicionando-se aproximadamente 500 µL de H<sub>2</sub>O destilada, até se obter uma solução aquosa. Posteriormente, pipetou-se 100 µL da solução aquosa e espalhou em placa contendo meio AN. Cada amostra foi composta por quatro repetições.

As placas foram incubadas a 25 ± 27 °C em câmara climatizada, até obter-se o crescimento do patógeno. Em seguida, as bactérias do qual obteve crescimento, foram submetidas a testes fisiológicos, morfológicos e molecular para caracterização de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Os testes realizados foram os seguintes: teste de coloração Gram, solubilidade em hidróxido de potássio (KOH) a 3 % (fisiológicos); a identificação morfológica foi realizada a partir de observações utilizando-se como base as características descritas na literatura quanto ao aspecto da colônia de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Em seguida foi utilizado o método da extração de DNA Genômico (LI e DE BOER, 1995) para a comprovação da espécie de Cff. Para a extração do DNA genômico foi utilizado um volume aproximado de 2,4 mL de meio líquido contendo células bacterianas de cada amostra obtida, que foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. Descarta-se o sobrenadante de cada amostra e procede-se a lavagem do pellet com adição de 1 mL de água destilada estéril, seguidos de centrifugação 13.000 rpm por 5 min. Este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet foi submetido a -20 °C por uma hora. Após o descongelamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de acetona (-20 °C), e as amostras homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos.

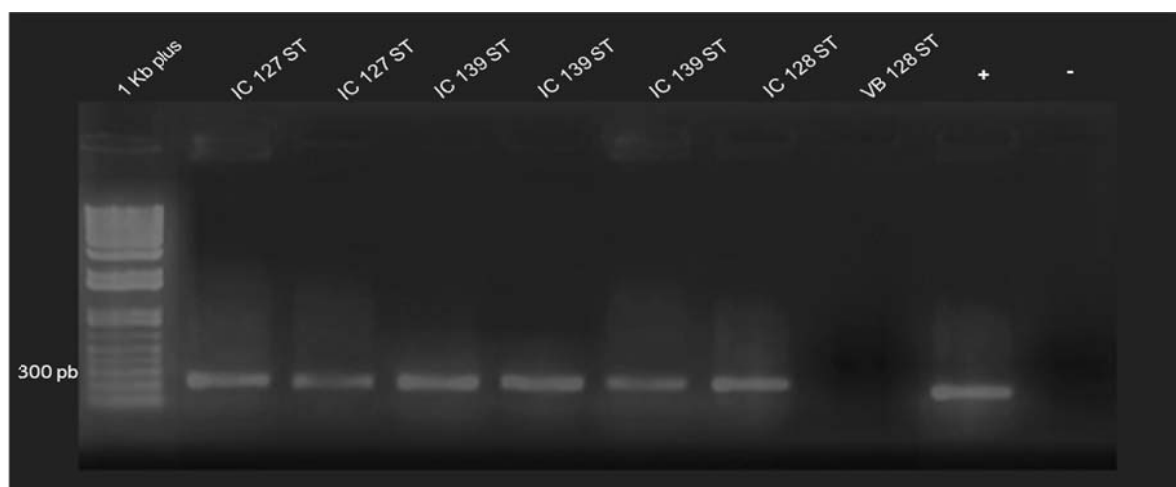
Em seguida ressuspendidas em 500 µL de tampão de extração TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 50 µL de 500 mM EDTA pH 8,0 + 50 µL de dodecyl sulfato de sódio SDS a 14% + 10 µL de proteinase K (0,1%), seguidos de homogeneização e incubação por 1 hora a 55 °C. Adiciona-se igual volume de acetato de amônio (7,5 M), seguidos de homogeneização e centrifugação 13.000 rpm por 20 min. Foram retirados

900 µL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para um novo microtubo, adicionando 540 µL de isopropanol, para homogenização e precipitação a (20 °C) por uma hora. As amostras foram centrifugadas 13.000 rpm por 30 min. a 4 °C. O pellet lavado com etanol 70% (-20 °C), centrifugado por 13.000 rpm por 5 min. e deixado secar. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de água destilada estéril.

Após esses procedimentos foram utilizadas técnicas moleculares para a confirmação da espécie dos isolados, pelos iniciadores Cff FOR2 GTTATGAACTTCACTCC 3' e Cff REV4 5' GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3' descritos por Tegli et al (2002). Visualizando por meio do gel de agarose aproximadamente 300 pares de base. Em seguida os isolados positivos para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, foram preservados em tampão fosfato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme caracterização realizada estes isolados se apresentaram Gram positivas, crescimento em meio contendo 7% de NaCl e fragmento esperado (300 pb), quando utilizada a técnica de PCR com os iniciadores espécie específica (Figura 1).



**FIGURA 1.** Perfil eletroforético de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, obtido com o iniciadores Cff FOR2 e Cff REV4. 1 Kb: Marcador de peso molecular, - Controle negativo. + controle positivo.

Com a amplificação dos produtos de PCR, pode ser observado que os isolados apresentaram o fragmento de 300 pb, como demonstrado acima, confirmando assim os resultados obtidos por Tegli et al. 2002, onde o mesmo tamanho de fragmento foi alcançado em todos os testes que foram utilizados dos iniciadores Cff FOR2 e Cff REV4. Ao realizar esses testes Tegli et al 2002, demonstrou que estes iniciadores apresentam alta especificidade para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, e também confiabilidade, uma vez que fragmentos de outras bactérias não apresentaram amplificação de DNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, F.R.; GONZAGA, A.C.O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. 2012. 248 fls. Documento. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2012.

BEDENDO, I.P. Bactérias fitopatogênicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 207-225.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.185-196. v. 2.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 1991. 31p.

HARVESON, R. M.; VIDAVER, A. K.; SCHWARTZ, H. F. **Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska**. Lincoln University of Nebraska: Cooperative Extension; Institute of Agriculture and Natural Resources, 2005.

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.

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