

FATORES QUE AFETAM A REAÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO COMUM A***Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*****FACTORS AFFECTING COMMON BEAN PLANT REACTION TO *Curtobacterium******flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*****Carlos Agustín Rava^{1,2}, Joaquim Geraldo Cáprio da Costa^{1,2}****e Francisco José Pfeilstiker Zimmermann¹**¹Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO.

E-mail: rava@cnpaf.embrapa.br

²Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

RESUMO - A reação variável das plantas de uma cultivar de feijoeiro comum inoculadas com um isolado de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, constitui-se num sério problema em estudos da herança da resistência, devido a dificuldade para separar o efeito genético do ambiental na avaliação de cada indivíduo. Com o objetivo de reduzir esta variabilidade foram conduzidos dois experimentos, nos quais foram estudados a influência da idade da planta no momento da inoculação, do operador e do meio de cultura para a multiplicação da bactéria. Os resultados permitiram estabelecer que quando as plantas foram inoculadas aos 12 dias após o plantio (DAP) foram obtidos o maior valor médio de severidade de doença e a menor variação. Um operador foi desqualificado devido a alta variação na reação das plantas inoculadas aos 12 DAP que foi entre duas a cinco vezes maior às obtidas pelos outros. As plantas inoculadas com a bactéria desenvolvida em meio de cultura BDA apresentaram maior média de severidade de sintomas e redução do coeficiente de variação quando comparadas com as plantas inoculadas com a bactéria

desenvolvida em meio YDCA, mas somente houve redução na variabilidade da reação das plantas quando foi utilizado o meio NSA.

PALAVRAS-CHAVE: Idade da planta na inoculação, murcha-de-Curtobacterium, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT - The disease reaction variability in plants within a dry bean cultivar inoculated with one isolate of *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* can be a problem in inheritance studies due to the difficulty to separate genetic from environmental effects when evaluating each individual. Two experiments were conducted with the objective of reducing reaction variability. The influence of the operator, plant age at inoculation time and the culture medium used for cultivating the bacteria were studied. When plants were inoculated 12 days after sowing (DAS), the average disease severity were higher and disease severity variation was lower. One operator was disqualified for inoculation because the variation in disease reaction of plants inoculated 12 DAS was two to five times greater than that obtained by the others. Plants inoculated with the bacteria from PDA culture medium showed higher mean disease severity and reduced coefficient of variation to half when compared with those inoculated with the bacteria developed in YDCA, but only reduced the variability in disease reaction when compared with NSA.

KEY WORDS: Plant age for inoculation, bacterium wilt, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

A murcha-de-Curtobacterium (*Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*) foi inicialmente identificada no Estado de São Paulo por Maringoni & Rosa (1996) e, hoje, encontra-se distribuída em várias regiões produtoras de feijão, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Nos cultivos dos anos de 2001 a 2003 foi constatado um considerável aumento da referida doença nos Estados de São Paulo e Paraná.

Por ser uma doença de constatação recente, não são conhecidas as perdas na produção por ela ocasionadas na cultura do feijoeiro comum. Entretanto, apresenta grande importância potencial, devido ao fato do patógeno ser transmitido pelas sementes. O método de controle mais prático e econômico é a utilização de cultivares resistentes.

Até o presente, já foram realizados vários testes de inoculação de cultivares (Maringoni (2000), linhagens e acessos provenientes de coletas de germoplasma de feijoeiro comum (Rava & Costa, 2001; Rava et al., 2003).

Entretanto, nos testes de inoculação visando a identificação de genótipos resistentes, a constatação de efeito significativo entre blocos pode ser devido ao operador, já que cada bloco era disposto dentro da casa-de-vegetação em ambiente o mais uniforme possível e inoculado por um único operador.

Esta variabilidade da reação em plantas de uma mesma cultivar inoculadas com o mesmo isolado do patógeno, constitui-se num sério problema para estudos da herança da resistência quando se realiza a avaliação dos genitores, e das gerações F_1 , F_2 , RCP1 e RCP2, devido a impossibilidade de separar o efeito genético do ambiental na avaliação de cada indivíduo.

O objetivo do trabalho foi estudar a influência do meio de cultura para a multiplicação da bactéria, do operador e da idade da planta no momento da inoculação, visando reduzir a reação variável de plantas de uma cultivar inoculadas com um isolado do patógeno, para aprimorar a metodologia de inoculação a ser utilizada nos testes de identificação de fontes de resistência, nos estudos da variabilidade patogênica da bactéria e, principalmente, da herança da resistência no feijoeiro comum à referida doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos utilizando a cultivar Pérola de feijoeiro comum e o isolado do patógeno CffCNF 04 obtido, durante o ano de 2000, de plantas desta cultivar

provenientes do município de Luziânia, GO. O primeiro experimento consistiu de um fatorial (2 x 3 x 4), cujos tratamentos resultaram da combinação de dois meios de cultura (batata dextrose agar - BDA e nutriente sacarose agar -NSA), três idades da planta no momento da inoculação (12, 14 e 16 dias após o plantio - DAP) e quatro operadores que executaram as inoculações. O segundo experimento foi um fatorial (2 x 4) e os tratamentos resultaram da combinação de dois meios de cultura (BDA e extrato de levedura dextrose agar - YDCA) e quatro operadores, sendo as plantas inoculadas aos 12 DAP. Ambos experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e cada unidade experimental consistiu de um vaso com duas plantas.

A bactéria foi semeada nas placas de Petri nos meios de cultura especificados e incubadas durante 72 horas a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para a inoculação foram utilizadas agulhas entomológicas com pontas que haviam sido previamente achatadas com um martelo, tomando forma lanceolada, para facilitar a operação de recolher o inoculo das placas. A inoculação foi realizada mediante duas punções perpendiculares no caule, entre as folhas cotiledonares e as primárias, posicionando a largura da ponta achatada da agulha no sentido longitudinal do caule. Após a inoculação e até a avaliação dos sintomas, as plantas permaneceram em casa de vegetação com uma temperatura de $26\pm 4^{\circ}\text{C}$.

As avaliações de sintomas foram realizadas aos 12 dias após a inoculação, utilizando uma escala de nove graus desenvolvida originalmente para avaliação da murcha-de-fusário (Rava et al., 1996).

A análise estatística foi efetuada segundo Zimmermann (2004), considerando cada planta como uma amostra dentro de cada parcela, para avaliar com maior precisão a variação entre plantas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, dos três fatores estudados apenas a idade da planta foi altamente significativa e, tanto as três interações duplas como a tripla, não foram significativas.

Entretanto, a finalidade destes experimentos não foi apenas identificar aqueles fatores que contribuem para obter maior intensidade de sintomas, mas também aqueles que possibilitam obter menor variabilidade na reação das plantas, o que se reflete num menor desvio padrão.

Com referência à idade da planta no momento da inoculação, o maior valor médio da severidade de doença e a menor variação foram obtidos quando as plantas foram inoculadas aos 12 DAP (Tabela 1). É possível que a severidade de doença seja maior e a variabilidade menor inoculando-se plantas ainda mais novas. Entretanto, plantas com idade inferior a 12 DAP possuem caule muito tenro, que quebra com facilidade no processo de inoculação. Este resultado coincide com os obtidos por Costa & Reifschneider (1991) e Matos et al. (1991), em outros patossistemas que constataram que a severidade da doença diminuiu com o aumento da idade da planta.

Tabela 1. Severidade da murcha-de-Curtobacterium na cultivar de feijoeiro comum Pérola em função da idade da planta no momento da inoculação.

Idade da planta	Severidade de doença		
	Média ¹	Desvio padrão	C.V. (%)
16 dias	5,99 b	1,82	30,44
14 dias	6,37 b	1,92	30,61
12 dias	7,86 a	0,90	11,44

¹Médias assinaladas pela mesma letra não diferem no nível de $P \leq 0,05$ segundo o teste de Tukey.

Quando foi considerada a interação operador x meio de cultura, embora as médias da severidade de doença tenham apresentado diferenças não significativas, a variação dentro de cada meio de cultura sempre foi menor nas plantas inoculadas com bactérias desenvolvidas no meio de cultura BDA em comparação com as inoculadas com bactérias desenvolvidas em NSA. (Tabela 2).

Tabela 2. Severidade da murcha-de-Curtobacterium na cultivar de feijoeiro comum Pérola em função do operador e do meio de cultura onde foi desenvolvida a bactéria.

Operador	Meio de cultura	Severidade de doença		
		Média	Desvio padrão	C.V. (%)
1	BDA	6,31	1,89	29,99
	NSA	6,47	2,19	33,91
2	BDA	6,45	1,54	20,02
	NSA	6,48	1,86	18,75
3	BDA	7,50	1,40	18,77
	NSA	7,03	1,74	24,76
4	BDA	6,55	1,52	23,28
	NSA	7,00	2,05	29,30

Ao se analisar a interação operador x idade da planta apresentada na Tabela 3, pode-se constatar que o desvio padrão foi reduzido de três a oito vezes da maior à menor idade, quando foram considerados os operadores 1, 3 e 4, não ocorrendo o mesmo com o operador 2. Embora não tenham sido constatadas diferenças significativas entre as médias de severidade de doença para operadores, a alta variação obtida para a idade de 12 DAP nas plantas inoculadas pelo operador 2 (entre duas a cinco vezes maior às obtidas pelos outros operadores), o desqualificam para essa função. Portanto, devem ser tomados cuidados na escolha dos operadores, principalmente quando forem realizadas inoculações em populações segregantes tanto para o estudo de herança da resistência como para seleção de genótipos resistentes. Os valores dos coeficientes de variação compreendidos entre 4,96% e 7,18% obtidos com os operadores 1, 3 e 4 em plantas inoculadas com 12 DAP são aceitáveis e, seriam ainda menores considerando apenas as plantas inoculadas com a bactéria desenvolvida em BDA, pois este meio de cultura também contribuiu para se obter menor variação da reação entre plantas. Estes resultados permitem concluir que os operadores devem ser

bem treinados para evitar que deficiências da técnica de inoculação influenciem o desenvolvimento dos sintomas, afetando a avaliação da severidade de doença e, conseqüentemente, a definição da classe de reação das plantas.

Tabela 3. Severidade da murcha-de-Curtobacterium na cultivar de feijoeiro comum Pérola em função do operador e da idade em que a planta foi inoculada

Operador	Idade da Planta	Severidade de doença		
		Média	Desvio padrão	C.V. (%)
1	16 dias	5,45	2,01	39,92
	14 dias	5,90	2,20	37,25
	12 dias	7,89	0,57	7,18
2	16 dias	6,40	1,31	20,52
	14 dias	5,89	2,21	37,36
	12 dias	7,10	1,28	18,10
3	16 dias	6,70	1,45	21,71
	14 dias	6,70	1,78	26,57
	12 dias	8,47	0,51	6,05
4	16 dias	5,36	2,14	39,86
	14 dias	6,95	1,43	20,60
	12 dias	7,95	0,39	4,96

No segundo experimento foi constatada a existência de diferenças altamente significativas entre os meios de cultura e para a interação operador x meio.

A maior facilidade para retirar o inoculo com a agulha do meio BDA, possivelmente, foi responsável pela redução do coeficiente de variação quando comparadas com as plantas inoculadas com bactérias desenvolvidas nos meios NSA e YDCA (Tabela 2 e 4). Embora a interação operador x meio de cultura tenha sido altamente significativa (Tabela 5), em todos os casos houve uma

redução da variabilidade quando as plantas foram inoculadas com a bactéria desenvolvida em BDA, reforçando os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Severidade da murcha-de-Curtobacterium na cultivar de feijoeiro comum Pérola em função do meio de cultura onde foi desenvolvida a bactéria.

Meio de cultura	Severidade de doença		
	Média ¹	Desvio padrão	C.V. (%)
BDA	6,98 a	1,17	16,70
YDCA	5,23 b	1,81	34,67

¹Médias assinaladas pela mesma letra não diferem no nível de $P \leq 0,05$ segundo o teste de Tukey.

Tabela 5. Severidade da murcha-de-Curtobacterium na cultivar de feijoeiro comum Pérola em função do operador e do meio de cultura onde foi desenvolvida a bactéria.

Operador	Meio de cultura	Severidade de doença		
		Média ¹	Desvio padrão	C.V. (%)
1	BDA	7,50 a	1,08	14,40
	YDCA	5,00 c	1,56	31,27
2	BDA	7,60 a	0,84	11,08
	YDCA	5,67 b	1,50	26,45
3	BDA	6,70 a	0,95	14,16
	YDCA	4,20 c	2,04	48,67
4	BDA	6,10 b	1,20	19,63
	YDCA	6,10 b	1,73	28,34

¹Médias assinaladas pela mesma letra não diferem no nível de $P \leq 0,05$ segundo o teste de Tukey.

Concluindo, deve-se destacar a importância da utilização do meio de cultura BDA no desenvolvimento das bactérias por facilitar a retirada do inóculo das placas, de que os operadores sejam bem treinados e meticolosos na realização da inoculação das plantas e de utilizar plantas com

12 DAP no momento da inoculação para se obter baixa variabilidade na severidade de doença entre indivíduos da mesma cultivar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, G.O.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Efeito de isolado, idade da planta e diluição de inóculo na reação de pimentão (*Capsicum annum* L.) ao vírus Y da batata (PVY). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, n.3, p.161-164, 1991.

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

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv *flaccumfasciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, (Suplemento), p.336, 1996.

MATOS, F.S.A.; TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Inoculação de *Pseudomonas solanacearum* em *Capsicum annum* para avaliação de virulência de isolados do patógeno. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, n.3, p.171-173, 1991.

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

RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; COSTA, J.G.C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.296-300, 1996.

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

ZIMMERMANN, F.J.P. **Estadística para investigadores**. 1.ed. Bogotá: Universidad de la Sabana, 2004. 423p.

Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, ISSN 1808-8597, v.1, n.1, p. 70-78, jun. 2006