

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL E DETECÇÃO DE**  
***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***  
**EM SEMENTES DE FEIJÃO**

**CAROLINA CARDOSO DEUNER**

**2007**

CAROLINA CARDOSO DEUNER

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL E DETECÇÃO DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

Deuner, Carolina Cardoso.

Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* em sementes de feijão / Carolina Cardoso Deuner. --  
Lavras : UFLA, 2007.

131 p. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. *Murcha-de-curtobacterium*. 2. Semente. 3. Inoculação. 4. PCR. 5.  
Restrição hídrica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 635.652932

CAROLINA CARDOSO DEUNER

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL E DETECÇÃO DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 21 de novembro de 2007.

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. José Rogério de Oliveira	UFV

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais Sintclair e Elaine, e a  
minha irmã Melissa, que sempre me  
apoiaram e incentivaram.

E ao meu marido Daniel, pelo apoio  
incondicional e por estar sempre ao  
meu lado nos bons e maus momentos.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido para a realização do curso.

À Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do Projeto (CAG-1603/06).

Ao professor Ricardo Magela de Souza, pela orientação, disponibilidade, críticas construtivas e empenho durante a realização deste trabalho.

Aos professores José da Cruz Machado, Antônia Figueira e Édila Vilela, pela orientação, disponibilidade e apoio.

Ao meu eterno mestre, professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelo carinho, palavras de incentivo para meu aprendizado e minha formação em bacteriologia de plantas.

Aos professores e pesquisadores Antônio Carlos Maringoni, Rui Leite e Carlos Hidemi Uesugui pela gentileza em doar isolados bacterianos.

A Fundacep, pela paciência em esperar pela conclusão deste projeto e liberação para defesa. Aos amigos e colegas, pela convivência agradável e ensinamentos diários, em especial ao Dr. Mario Bianchi, pela orientação na parte estatística.

A todos os colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, em especial a Ana Maria, Ana Beatriz, Juliana Barbosa e Alessandra Ishida, pela amizade, convivência agradável e colaboração em todas as fases deste trabalho.

Aos colegas de doutorado, Fátima, João de Cássia, Dejânia e Josimar, pela amizade.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

CAROLINA CARDOSO DEUNER, filha de Sintclair Edgar Deuner e Elaine Gomes Cardoso Deuner, nasceu em 19 de outubro de 1978, no município de Anápolis, estado de Goiás (GO).

Em abril de 1996 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. Em 1999, ingressou como estagiária no Laboratório de Bacteriologia, sob a orientação do Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro, com pesquisas desenvolvidas na área de controle biológico de enfermidades do tomateiro. Em setembro de 2000, tornou-se bolsista de iniciação científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com pesquisas na mesma área. Em agosto de 2001, obteve o título de Engenheiro Agrônomo e em abril de 2002 iniciou o curso de pós-graduação em Fitossanidade, na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), concentrando os seus estudos na área de Fitopatologia (Bacteriologia). Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob a orientação da professora Dra. Andréa Bittencourt Moura. Em fevereiro de 2004, obteve o título de “Mestre”. Em março do mesmo ano, iniciou o Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras (UFLA) continuando seus estudos na área de bacteriologia, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e, posteriormente, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Em 21 de dezembro de 2007, submeteu-se à defesa de Tese para a obtenção do título de “Doutor”.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
<b>CAPÍTULO 1 <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>: PARTICULARIDADES E PERSPECTIVAS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEMENTES .....</b>	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Murcha-de-curtobacterium .....	4
2.2 Detecção de fitobactérias em sementes .....	8
2.3 Inoculação artificial de patógenos em sementes .....	12
2.4 Crescimento de patógenos em condições de estresse hídrico .....	13
2.5 Uso da técnica de condicionamento fisiológico para a inoculação de patógenos em sementes .....	16
2.6 Qualidade fisiológica de sementes .....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
<b>CAPÍTULO 2 INOCULAÇÃO DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM SEMENTES DE FEIJÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO .....</b>	<b>38</b>
1 RESUMO .....	39
2 ABSTRACT .....	40
3 INTRODUÇÃO .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
4.1 Origem e qualidade das sementes de feijão .....	43
4.2 Obtenção e multiplicação do inóculo de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> .....	44
4.3 Patogenicidade e reação de hipersensibilidade dos isolados de <i>Cff</i> .....	44
4.4 Preparo do meio de cultura básico com restrição hídrica .....	45
4.5 Primeira etapa: pré-condicionamento de sementes de feijão em substrato agarizado com restrição hídrica .....	46
4.5.1 Tratamentos e instalação do ensaio .....	46
4.5.2 Avaliações .....	46
4.5.2.1 Percentagem de sementes germinadas durante o pré- condicionamento fisiológico .....	46
4.5.2.2 Teor de água nas sementes .....	47
4.5.2.3 Teste de germinação das sementes .....	47

4.5.2.4 Sistemas enzimáticos das sementes .....	48
4.5.2.5 Análise estatística .....	48
4.6 Segunda etapa: crescimento de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em substrato agarizado com restrição hídrica .....	49
4.6.1 Tratamentos e instalação do ensaio .....	49
4.6.2 Avaliações .....	50
4.6.2.1 Crescimento e características de colônias de <i>Cff</i> em meio 523 com diferentes potenciais hídricos .....	50
4.6.2.2 Análise estatística .....	50
4.7 Terceira etapa: uso de condicionamento fisiológico na inoculação de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em sementes de feijão .....	51
4.7.1 Tratamentos e instalação do ensaio .....	51
4.7.2 Avaliações .....	52
4.7.2.1 Teor de água nas sementes após a inoculação artificial .....	52
4.7.2.2 Teste de germinação das sementes após inoculação artificial .	52
4.7.2.3 Quantificação e localização do inóculo na semente nos diferentes tempos de exposição após inoculação artificial .....	52
4.7.2.4 Emergência de plântulas doentes originadas de inoculação artificial .....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1 Qualidade das sementes de feijão .....	54
5.2 Patogenicidade e reação de hipersensibilidade dos isolados de <i>Cff</i>	54
5.3 Primeira etapa: pré-condicionamento de sementes de feijão em substrato agarizado com restrição hídrica .....	55
5.3.1 Percentagem de sementes germinadas durante o pré-condicionamento fisiológico .....	55
5.3.2 Teor de água nas sementes .....	58
5.3.3 Teste de germinação das sementes .....	60
5.3.4 Sistemas enzimáticos das sementes .....	63
5.4 Segunda etapa: crescimento de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em substrato agarizado com restrição hídrica .....	72
5.4.1 Crescimento de colônias de <i>Cff</i> em meio 523 com diferentes potenciais hídricos .....	72
5.5 Terceira etapa: uso de condicionamento fisiológico na inoculação de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em sementes	

de feijão .....	75
5.5.1 Teor de água nas sementes após inoculação artificial .....	75
5.5.2 Teste de germinação das sementes após inoculação artificial ....	76
5.5.3 Quantificação e localização do inóculo na semente nos diferentes tempos de exposição após inoculação artificial .....	78
5.5.4 Emergência de plântulas e incidência de plantas doentes originadas de inoculação artificial .....	79
6 CONCLUSÕES .....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
<b>CAPÍTULO 3 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA A DETECÇÃO DE <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> EM SEMENTES DE FEIJÃO .....</b>	<b>99</b>
1 RESUMO .....	100
2 ABSTRACT .....	101
3 INTRODUÇÃO .....	102
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	104
4.1 Isolados de <i>Cff</i> .....	104
4.2 Lotes de sementes inoculadas artificialmente com <i>Cff</i> .....	104
4.3 <i>Primers</i> e reação de amplificação .....	104
4.4 Eletroforese e fotodocumentação .....	105
4.5 Preparo dos extratos de sementes para detecção de <i>Cff</i> .....	106
4.5.1 Extrato bruto de sementes .....	106
4.5.2 Extrato concentrado em membrana milipore .....	106
4.5.3 Extrato concentrado por centrifugação .....	106
4.5.4 Bio-PCR .....	107
4.6 Detecção de <i>Curtobacterium flaccumfacies</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em lotes comerciais .....	107
5 Resultados e Discussão .....	108
5.1 Otimização da técnica de PCR .....	108
5.2 Detecção de <i>Cff</i> nos extratos de sementes .....	109
5.3 Detecção de <i>Cff</i> em lotes comerciais de sementes de feijão .....	113
6 CONCLUSÕES .....	115
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116

## RESUMO

DEUNER, Carolina Cardoso. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão.** 2007. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), agente causal da murcha-de-curtobacterium, foi relatado pela primeira vez, no Brasil, em 1995. Apesar de relativamente novo no país, o patógeno está disseminado pelas principais regiões produtoras de feijão, causando grandes prejuízos econômicos. As sementes constituem a sua principal forma de sobrevivência e disseminação. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos desenvolver uma técnica eficiente de inoculação, baseada no condicionamento fisiológico do meio, e de detecção, utilizando-se a PCR, de Cff em sementes de feijão, para uso em pesquisas e em laboratórios de análise fitossanitária de sementes. Para o desenvolvimento da técnica de inoculação artificial utilizou-se o condicionamento fisiológico em substrato agarizado. Testaram-se quatro substratos (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose), quatro potenciais hídricos (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa) e cinco tempos de exposição da semente ao meio 523 (24, 48, 72, 96 e 120 horas). A inoculação artificial consistiu na exposição das sementes de feijão, por 48 horas, ao isolado de Cff, proveniente do estado de Santa Catarina (Cff SC - Feij-2928), no meio 523 com o restritor hídrico manitol no potencial hídrico de -0,95 MPa. Esse tratamento foi o que menos afetou a percentagem de germinação das sementes após o condicionamento fisiológico. Para a otimização da técnica de PCR, foram comparados dois pares de *primers* descritos na literatura para a detecção dessa bactéria. Um foi desenvolvido a partir de biblioteca cromossomal, construído em plamídeo (CF<sub>4</sub>-CF<sub>5</sub>) e o outro a partir do fragmento amplificado via PCR baseado na seqüência repetitiva (Rep-PCR) (CffFOR2-REV4). O par de *primers* CffFOR2-REV4 demonstrou maior repetibilidade e eficiência na detecção de Cff em sementes de feijão. Foram testados também quatro métodos de preparação do extrato de sementes para a obtenção do DNA de Cff a ser utilizado na PCR: extrato bruto, obtido diretamente das sementes; extrato concentrado em membrana milipore; extrato concentrado por centrifugação e extrato plaqueado em meio seletivo (BioPCR). Dentre esses métodos, tanto a Bio-PCR quanto o extrato concentrado por centrifugação, seja no volume de 20 ou 80 mL, amplificaram segmento de DNA de 306 pb, característico da presença de Cff. Essas duas técnicas apresentam boa sensibilidade, permitindo a detecção de até uma semente contaminada com Cff, em 999 sementes sadias. Portanto, foi possível desenvolver uma técnica rápida, sensível, confiável e de fácil execução para a detecção de Cff em sementes de feijão, constituindo-se em metodologia

potencial para uso rotineiro em laboratórios de análise fitossanitária de sementes.

\*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

## ABSTRACT

DEUNER, Carolina Cardoso. **Artificial inoculation and detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds.** 2007. 131p. Thesis (Doctorate in Agronomy. Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), causal agent of common bean bacterial wilt, was first reported in Brazil in 1995. In spite of its relative recent discovery in the country, the pathogen is disseminated throughout most bean producing fields causing high economically important losses. Seed represents the major mean of bacterial survival and dissemination. Thus, the present work aimed to develop an efficient inoculation technique based on a physiological conditioning medium and a *Cff* PCR-based detection technique for infested bean seeds, to attend research and routine phytosanitary seed analysis demands. For artificial inoculation a physiological conditioning technique in an agar-based medium was used, where four amended media were tested (523 medium, 523 medium+KCl, 523 medium+mannitol and 523 medium+sucrose), four water potentials (-0.55, -0.75, -0.95 and -1.15 MPa) and five exposure times 523 medium (24, 48, 72, 96 and 120 hours). The artificial inoculation consisted of a 48-hour seed exposure to a *Cff* strain from Santa Catarina state (*Cff* SC - Feij-2928), in 523 medium amended with mannitol to make a -0.95 MPa water potential. This treatment slightly affected the percent germination after physiological conditioning. To optimize the PCR technique, two primers described in the literature for this bacterium detection, one developed from the chromosomal library build in a plasmid (CF<sub>4</sub>-CF<sub>5</sub>) and another one designed from a fragment amplified via conserved repetitive sequence PCR (Rep-PCR) (*Cff*FOR2-REV4). In this study the primer pair *Cff*FOR2-REV4 demonstrated high reproductibility for *Cff* detection in bean seeds. Four methods of seed extract preparation were tested to obtain *Cff* DNA to be used in the PCR: rough extract, obtained directly from seeds; millipore or centrifuge concentrated extract; and media plated extract (BioPCR). Among those methods, either Bio-PCR or centrifuge concentrated extract, in a 20 or 80 mL total volume, all produced a 306 pb DNA fragment, peculiar to *Cff*. Those two techniques presented good sensitivity allowing the detection of 1 contaminated *Cff* seed in a total 999 healthy ones. Therefore, a rapid, sensitive and easily performed technique could be developed to detect *Cff* in bean seeds and will be used routinely in phytosanitary seed analysis.

\*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

## CAPÍTULO 1

### *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: PARTICULARIDADES E PERSPECTIVAS PARA A DETECÇÃO EM SEMENTES

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa de cultivo mais difundida no mundo, sendo de grande importância econômica e social para o Brasil (Chueire et al., 2003). A cultura está implantada em praticamente todo o território nacional, ocupando lugar de destaque na constituição da dieta do brasileiro, por ser, reconhecidamente, excelente fonte de proteínas e possuir bom conteúdo de carboidratos complexos, ferro (Vieira et al., 1998), ácido fólico (fonte de vitamina B), zinco, magnésio e potássio (CIAT, 2002).

Segundo dados do FAO (2007), o Brasil é o segundo maior produtor mundial, perdendo somente para a Índia, com área plantada, em 2005, de 3.748 hectares. Os maiores produtores nacionais são os estados de Minas Gerais, Paraná, Bahia, Goiás e São Paulo, nessa ordem. Minas Gerais é o maior produtor do país, produzindo 560 mil toneladas em uma área colhida de 433 mil hectares.

A cultura, tradicionalmente conduzida por pequenos agricultores na safra de verão, nos últimos anos, adquiriu alta rentabilidade, passando a ser cultivada em diversas épocas do ano, principalmente em cultivos irrigados no inverno, por grandes produtores e alta tecnologia (Uesugi et al., 2003). Entretanto, apesar de todo o desenvolvimento tecnológico, a cultura é considerada de risco econômico, devido à alta suscetibilidade às doenças e pragas e pouca tolerância à seca e ao frio.

No Brasil, as doenças constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade, podendo causar, dependendo das condições de ambiente, perdas totais, inviabilizando determinadas áreas para o cultivo (Vieira et al., 1998). Entre as doenças que afetam o feijoeiro as de origem bacteriana têm causado sérios prejuízos.

Bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes, tanto infectando-as como infestando-as. Como não há um padrão típico, pode uma

mesma bactéria estar associada às sementes nas duas formas, concomitantemente. Portanto, a semente é o principal veículo de disseminação e introdução de bactérias fitopatogênicas em novas áreas de cultivo, sendo essa, provavelmente, a forma de introdução de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) (Hedges, 1922; 1926; Collins & Jones, 1983), agente da murcha-de-curtobacterium no Brasil. A doença foi detectada, pela primeira vez no país, em 1995 (Maringoni & Rosa, 1997) e, mesmo sendo uma doença recente, tem trazido grande preocupação aos pesquisadores e produtores.

Para que estudos com alguns patógenos avancem, é necessário ter disponibilidade de sementes associadas a esses patógenos. Para isso, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficazes e confiáveis de inoculação e detecção desses patógenos. Até o momento, as técnicas de inoculação artificial disponíveis para a maioria das bactérias reduzem consideravelmente o poder germinativo das sementes (Valarini & Menten, 1991). Entretanto, vislumbra-se a possibilidade de que o uso da técnica de condicionamento fisiológico em meio agarizado para inoculação de *Cff* em sementes de feijão permita a produção de sementes uniformemente infestadas ou infectadas para uso em diversos estudos e que, com a otimização da técnica de PCR, haja maior rapidez e precisão na detecção da mesma.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A murcha-de-curtobacterium

De acordo com Saettler (1991), os principais patógenos bacterianos que incidem sobre o feijoeiro, em diversos locais do mundo, são: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Dos patógenos citados, somente *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) não eram relatados no Brasil (Robbs, 1982).

A primeira ocorrência mundial de *Cff* foi descrita por Hedges (1922), nos EUA, em Dakota do Sul. Em seguida, a bactéria foi constatada em outros estados americanos como Michigan, Virgínia, Maryland, Montana e Columbia, onde causou grandes perdas na produção (Hedges, 1922; 1926; Dowson, 1957; Coyne & Schuster, 1979; Venette et al., 1995). Posteriormente, a bactéria também foi relatada em áreas geográficas diversas dentro da Europa, Austrália, Ásia, América do Norte, América do Sul e África (Bradbury, 1986; Smith et al., 1997).

No Brasil, *Cff* foi considerada praga quarentenária até 1995, quando a sua ocorrência foi relatada no estado de São Paulo, por Maringoni & Rosa (1997). A partir daí, tornou-se de importância emergente para o cultivo do feijoeiro em diferentes regiões. Apesar de ser um patógeno relativamente recente no país, está se disseminando rapidamente para as regiões produtoras de feijão. Atualmente, já existem relatos de *Cff* nos estados do Paraná e Santa Catarina (Leite et al., 2001) e em Goiás e no Distrito Federal (Uesugi et al., 2003).

Segundo Maringoni & Rosa (1997), a murcha-de-curtobacterium pode estar ocorrendo há muito tempo na cultura do feijoeiro no Brasil, mas, devido à similaridade de sintomas com a murcha-de-fusarium, causada por *Fusarium*

*oxysporum* f.sp. *phaseoli*, pode ter sido confundida e não detectada anteriormente. De acordo com Hedges (1922, 1926), em alguns casos, podem-se também confundir as colônias amarelas de *Cff* com as de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é uma bactéria gram-positiva, aeróbia estrita, móvel, com um a três flagelos laterais peritríquios e não formadora de endósporo. Apresenta-se em forma de bastonete isolado ou em pares, com 0,4-0,6 x 0,6-3,0 µm de diâmetro. As colônias em meio de cultura podem ser amarelas, de forma circular, com bordos lisos, planas ou levemente convexas e de aspecto brilhante (Hayward & Waterston, 1965). No entanto, segundo Collins & Jones (1983), isolados de *Cff* apresentam variabilidade em relação à coloração das colônias, podendo ser de cor amarela, laranja e rósea e ainda produzirem pigmento extracelular de cor azul a púrpura em meio de cultura. A coloração da colônia está relacionada a fatores nutricionais, como a concentração de tiamina no meio e também com a temperatura de incubação (Schuster et al., 1959).

A principal forma de disseminação de *Cff* é por sementes contaminadas, oriundas de plantas doentes; não se dissemina por chuva e água de irrigação por ficar internamente nos tecidos vasculares. No entanto, dissemina-se rapidamente após chuva de granizo, devido aos ferimentos causados. Não existe relato de vetores para a disseminação dessa bactéria, porém, o nematóide *Meloidogyne incognita* pode favorecer a sua penetração através de ferimentos (Schuster & Christiansen, 1957).

Há poucos relatos sobre a sobrevivência desta bactéria no solo e em restos de cultura, mas, segundo Behlau & Leite (2003), *Cff* foi recuperada de amostras de solo analisadas imediatamente após a incorporação dos restos de cultura, mas não de amostras analisadas aos 30 e 60 dias após a incorporação. No entanto, Tegli et al. (2002) afirmaram que *Cff* pode sobreviver no solo por

até dois anos ou tanto quanto for a sobrevivência da semente armazenada. Schuster (1959) observou a sobrevivência de isolados virulentos da bactéria em plantas não-hospedeiras, como *Amaranthus retroflexus* e *Chenopodium album*.

Os principais sintomas da doença no feijoeiro são murchas e flacidez das folhas (Hedges, 1926), principalmente em períodos de estresse hídrico e temperaturas elevadas. Uma vez na planta, *Cff* coloniza os tecidos vasculares (Hedge, 1926; Zaumeyer, 1932; Zaumeyer & Thomas, 1957) e todas as partes da planta acima do solo podem ser afetadas, devido à falha no transporte de água e nutrientes, provocada pela degradação das paredes dos vasos do xilema (Dinesen, 1978). A doença inicia-se com a seca de folíolos apicais, com posterior amarelecimento e murcha total das folhas (Bianchini et al., 2000). Quando o patógeno coloniza mudas de feijoeiro ainda jovens, pode matá-las ou afetar seu desenvolvimento (Hedges, 1926). No entanto, quando as plantas sobrevivem, a produção é reduzida e o patógeno normalmente está associado às sementes (Hedges, 1926).

Em vagens contaminadas, *Cff* é mais evidente do que *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, podendo todas as sementes ser infectadas devido à ação sistêmica do patógeno. Em vagens novas, ocasionalmente, podem aparecer manchas e a área em volta dessas manchas se torna verde-amarelada ou escura. Em vagens maduras, as lesões são mais pronunciadas, sendo de coloração verde-oliva.

As sementes de feijoeiro infectadas apresentam coloração púrpura ou amarela. Schuster & Christiansen (1957) analisaram, durante anos, inúmeros lotes de sementes destinadas à instalação de campos comerciais em Nebraska, EUA. Observaram que sementes apresentando manchas alaranjadas, submetidas ao isolamento, originaram isolados patogênicos de *Cff* de colônias alaranjadas, sendo essas denominadas *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum*. Da mesma forma, Schuster & Sayre (1967) observaram que sementes de feijoeiro da cultivar U.I. 59, apresentando manchas púrpuras, ao serem

submetidas ao isolamento, produziram colônias amarelas, capazes de induzir hipertrofia e murcha nas plantas inoculadas. Esses isolados foram denominados de *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*. No ano seguinte, por meio de estudos, foi provado que os isolados da variedade *violaceum* produziram pigmentos extracelulares de coloração azul a púrpura em meio de cultura (Schuster et al., 1968).

Outras plantas são relacionadas como hospedeiras de *Cff*. Torres et al. (1982) descreveram, pela primeira vez, na América Latina (Colômbia), a presença de *Cff* em *Zornia* spp., uma leguminosa forrageira. Existem ainda relatos de outras espécies hospedeiras dessa bactéria em todo o mundo, como *Phaseolus coccineus*, *Vigna angularis*, *V. radiata*, *V. mungo*, *Pisum sativum* L. (Dunleavy, 1963 1983; EPPO/CABI, 1997; Zaumeyer, 1932; Zaumeyer & Thomas 1957), *P. lunatus* e *Vigna unguiculata* (Filho & Uesugi, 2004). Além disso, foi evidenciada, por meio de inoculação artificial, a susceptibilidade de soja, cultivar Ito San, a isolados de *Cff* procedentes de feijoeiro (Hedges, 1926) e também da cv. Bansei, *Phaseolus vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. calcaratus*, *P. lathyroides*, *P. lunatus*, *P. radiatus*, *Lupinus poluphullus*, *Vigna cylindrica*, *V. sesquipedalis*, ervilha cv. Alaska e Perfection a isolados obtidos de sementes de feijoeiro com manchas púrpuras, evidenciando sintomas de murcha (Schuster & Sayre, 1967).

Na literatura existem poucos relatos sobre práticas de controle dessa doença. Chaves & Uesugi (2004) verificaram a eficiência dos tratamentos térmico e químico na produtividade do feijoeiro cultivar Pérola, oriundo de grãos colhidos no campo com a bactéria *Cff*. Os tratamentos testados foram: semente básica (SB) como testemunha; grãos colhidos no campo (GR); grãos colhidos no campo e submetidos a 2 horas de imersão em água e 3 horas sob 60°C (GRT) e grãos colhidos no campo e submetidos ao tratamento químico com 10g/L de Agrimaicin® (GRA), por 2 horas. Segundo os autores, o

tratamento que proporcionou maior percentual de germinação foi SB, seguido de GRT, GR e GRA, com valores de 92%, 88%, 87% e 84%, respectivamente. Com relação ao peso de 100 sementes, os tratamentos GRT (26 g), SB (25 g) e GRA (25 g) foram estatisticamente superiores ao GRA (23g). A maior produtividade por hectare foi observada no tratamento GRT (2.180 kg), seguido de SB (2.140 kg), GRA (2.103 kg) e GR (1.933 kg), mostrando a eficiência dos tratamentos de semente.

Vários trabalhos foram desenvolvidos visando selecionar fontes de resistência em feijoeiro a *Cff*, no final da década de 1950 e início da de 1960. Apesar disso, até o momento, não existe nenhuma cultivar imune a essa bactéria, porém, foram encontradas várias cultivares com diferentes graus de tolerância ou resistência (Coyne & Schuster, 1974; Phang et al., 1974). Apesar desses estudos, as medidas de controle recomendadas para a maioria das doenças bacterianas são o uso de cultivares resistentes, quando disponíveis, e o uso de sementes sadias, visto que este patógeno sobrevive e é transmitido por sementes (Saettler & Perry, 1972). Esta última medida de controle foi tão eficaz que, durante vinte anos, a *murcha-de-curtobacterium* não foi constatada em áreas de produção de Dakota do Norte, em Minnessota, E.U.A. Somente em 1994, a *Cff* foi isolada de uma amostra de sementes utilizada por um agricultor daquela região (Venette et al., 1995), o que se tornou um problema para a agricultura. Isso porque, segundo Burkhoder (1995), essa bactéria é bastante resistente à seca, podendo sobreviver por 24 anos, em sementes de feijoeiro armazenadas sob condições de ambiente.

## **2.2 Detecção de fitobactérias em sementes**

Atualmente, diferentes técnicas são utilizadas para a detecção de bactérias em sementes, entre elas cultivo de sementes em meio de cultura seletivo, plaqueamento do extrato de sementes em meios seletivos ou semi-

seletivos, inoculação de extrato de sementes em plantas suscetíveis, ELISA, PCR, imunofluorescência, bacteriófagos, citometria de fluxo e outras. Estas técnicas são utilizadas isoladas ou combinadas e variam quanto ao custo, ao tempo para a obtenção de resultados, ao espaço físico, aos equipamentos necessários, ao grau de sensibilidade e à possibilidade de serem utilizadas em testes de rotina (Saettler et al., 1989).

Diversos pesquisadores têm estudado técnicas moleculares para a detecção de bactérias, como, por exemplo, as sondas de ácidos nucléicos e a reação da polimerase em cadeia (PCR). Os resultados têm sido animadores, principalmente com relação à PCR, uma vez que oferece vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais de diagnose, como alta sensibilidade, necessitando de pequena quantidade inicial de ácido nucléico para que ocorra a amplificação. Além disso, essa técnica é rápida, sensível, acurada e versátil na identificação de bactérias fitopatogênicas (Oh et al., 1999) e, em alguns casos, pode detectar bactérias sem a obtenção de cultura pura (Schaad et al., 1995; Reeves, 1997; Maddox, 1998).

*Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*, responsável pelo crestamento bacteriano da ervilha (Rasmussen & Wulff, 1990) e *P. savastanoi* pv. *Phaseolicola*, causador do crestamento bacteriano de halo do feijoeiro (Prosen et al., 1991), foram as primeiras bactérias a serem diagnosticadas por amplificação de DNA (PCR). Prosen et al. (1993) verificaram a possibilidade de se detectar *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão, utilizando *primers* do segmento do cluster *tox* (produção de phaseolotoxina) na amplificação. Como resultado, os autores observaram que, mesmo em presença de saprófitas, esses *primers* foram sensíveis o suficiente para detectar uma semente associada a *P. syringae* pv. *phaseolicola* em duas mil sementes sadias. *Xanthomonas vesicatoria*, em sementes de tomate e de pimentão, também foi detectada entre  $10^2$  a  $10^3$  ufc/mL, utilizando-se *primers* do cluster de genes *hrp*, mesmo em

lotes com níveis populacionais de saprófitas alto ( $10^7$ ) (Leite et al., 1995). Patovares de *X. campestris* associados a cereais foram detectados em extrato de sementes, utilizando-se *primers* de rDNA na amplificação, mesmo quando a população de saprófitas era duzentas vezes maior que a do patógeno (Maes et al., 1996).

O desenvolvimento de *primers* de rDNA da região de espaçamento intergênico, específico para *X. oryzae* pv. *Oryzae*, permitiu a detecção desta bactéria em sementes de arroz (Kim & Song, 1996) por meio da PCR, bem como a detecção de *Pantoea stewartii* em sementes de milho (Blakemore et al., 1999). Recentemente, foram desenvolvidos *primers* para a detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em cultura pura (Guimarães et al., 2001), em extrato de sementes (Tegli et al., 2002) e em resto de cultura, solo e sementes (Nunes et al., 2004).

Atualmente, a PCR é utilizada como método de rotina em laboratórios de diagnose de muitas doenças de plantas (Schaad et al., 2003), incluindo espécies de reduzida concentração populacional em materiais propagativos assintomáticos, tais como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, responsável pela podridão mole em tubérculos de batata (Van Der Wolf et al., 1996) e *Xylella fastidiosa*, responsável pela clorose variegada dos citros (CVC) em borbulhas de laranjeiras contaminadas (Coletta Filho et al., 2000).

Existe, ainda, a possibilidade de se combinar técnicas para a detecção de bactérias, como é o caso da Bio-PCR, um método relatado por Schaad et al. (1995), que combina amplificação biológica e enzimática, pelo uso do meio seletivo e técnica da PCR, respectivamente. Este método foi descrito para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em extrato de sementes de feijão, em que foram feitas as análises das colônias bacterianas primeiramente obtidas em meio seletivo, seguidas de lavagens das placas produzindo uma suspensão e, em seguida, amplificação do segmento da região do gene *tox*. A vantagem da

técnica de Bio-PCR sobre a técnica de PCR inclui a eliminação de falsos positivos, resultantes da presença de células mortas associadas às sementes, e de falsos negativos, devido aos inibidores potenciais da PCR presentes em extratos de sementes, aumentando, assim, a sensibilidade da detecção.

Manulis et al. (1998) compararam Bio-PCR e PCR modificada com a PCR clássica para detectar a presença de *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* em plantas de *Gypsophila paniculata*, utilizando *primers* específicos para *E. herbicola*, formadora de galhas. A bactéria pode ser detectada pela PCR modificada e pela Bio-PCR em plantas sem sintomas sete dias após a inoculação, sendo estas mais sensíveis que a PCR clássica. Wang et al. (1999) compararam a eficiência e a confiabilidade da PCR clássica e da Bio-PCR com o isolamento em meio semi-seletivo M-XAM para *Xanthomonas albilineans*, agente da escaldadura da folha da cana-de-açúcar. O meio semi-seletivo e a Bio-PCR foram consistentemente mais sensíveis que *dot immunobinding assay* (DIBA), ELISA ou PCR clássica. Por meio da PCR clássica são detectados  $2 \times 10^4$  UFC/mL, enquanto a Bio-PCR é cem vezes mais sensível. A utilização de meio semi-seletivo, normalmente, requer 7 dias para a identificação da bactéria, enquanto a Bio-PCR requer somente quatro dias e tem a vantagem de não requerer testes de patogenicidade para a confirmação das identidades das colônias.

Para *Cff*, já existem alguns estudos de detecção em sementes que incluem taxonomia numérica (Jones, 1975; Locci et al., 1989), kits de identificação (Zhao et al., 1997), análise de aminoácidos da parede da célula (Yamada & Komagata, 1972), proteína celular (Henningson & Gudmestad, 1991), poliaminas (Altenburger et al., 1997), serologia (Mizuno et al., 1995; McDonald & Wang, 2000), homologia de DNA (Starr et al., 1975), método de PCR fingerprinting (McDonald & Wang, 2000) e DNA ribossômico 16S fingerprinting (Felske et al., 1999). Em geral, esses métodos podem ser usados

para confirmar a identidade do isolado até gênero e espécie, mas, para a maioria, falta resolução para identificar isolados até patovar e, por isso, têm seu uso limitado. Além disso, as técnicas elaboradas para a detecção de bactérias em sementes apresentam limitações quanto a sensibilidade, especificidade, custo e tempo de execução.

Com o advento da técnica de PCR, surge um marco divisório na identificação molecular de fitobactérias, devido à elevada confiabilidade, especificidade, sensibilidade e simplicidade desta técnica, comparada aos métodos de identificação que a antecederam (Henson & French, 1993). Porém, no Brasil, esses estudos estão pouco desenvolvidos, não existindo um método para a detecção dessa bactéria que tenha características ideais para ser utilizado em rotina.

### **2.3 Inoculação artificial de patógenos em sementes**

Atualmente, existe grande necessidade de obtenção de sementes uniformemente associadas a patógenos para diversos estudos em fitopatologia, para melhor elucidação da interação entre patógeno e hospedeiro. A inoculação de plantas adultas visando à obtenção de sementes infectadas ou infestadas é uma forma ainda considerada no âmbito da fitopatologia. Porém, esse procedimento requer longos períodos de tempo, que vão do cultivo das plantas até a colheita. Esse procedimento, além de demorado, tem eficácia questionável, devido à transmissão do patógeno da planta para a semente constituir-se num processo dinâmico dependente de vários fatores inerentes ao patógeno, ao hospedeiro e ao meio ambiente e que nem sempre são passíveis de controle operacional (Neergaard et al., 1979; Machado, 2004b).

Patógenos associados a sementes podem ser obtidos de lotes naturalmente infectados ou por meio de métodos de inoculação artificial. Dentre os métodos artificiais utilizados para a inoculação de sementes, destacam-se: a

imersão das sementes em suspensão bacteriana, a pulverização da suspensão bacteriana precedida de ferimentos e o contato das sementes com a bactéria em substrato agarizado.

O método de imersão das sementes em suspensão de bactérias (Groth & Braun, 1989) é bastante utilizado, porém, segundo alguns autores, a associação da bactéria com a semente, provavelmente, é somente externa (Valarini & Menten, 1991). Com relação ao método de pulverização da suspensão bacteriana, Marques et al. (1994) verificaram, após a utilização de sete métodos diferentes, que a melhor técnica de inoculação de sementes com Xap foi a pulverização da suspensão bacteriana em ráculos de vagens imaturas precedidas de ferimentos, com taxa de recuperação da bactéria de 90,4% das sementes contaminadas. O método de contato das sementes com a bactéria em substrato agarizado (Kobayashi, 2002) é utilizado da mesma forma que para fungos (Tanaka et al., 1989), ou seja, as sementes são colocadas sobre o patógeno cultivado *in vitro*.

As técnicas de inoculação artificial apresentadas até o momento têm reduzido consideravelmente o poder germinativo das sementes. Valarini & Menten (1991), após 36 horas de contato bactéria-semente, obtiveram 100% de contaminação de sementes de feijão com a bactéria Xap pelo método de contato direto das sementes com o patógeno. Entretanto, esse tempo foi suficiente para reduzir significativamente o poder germinativo das mesmas.

#### **2.4 Crescimento de patógenos em condições de estresse hídrico**

O potencial hídrico ( $\Psi$ ) é a diferença entre o potencial químico da água em um sistema ou parte do sistema e o potencial químico da água livre, em condições iguais de pressão atmosférica e temperatura. Ao potencial químico da água pura atribui-se aleatoriamente o valor zero (Salisbury & Ross, 1991). As unidades de medida mais usadas para expressar o potencial hídrico são o bar (1

bar = 100 joules = 0,987 atmosferas) e o megapascal (1MPa = 10 bars) (Bewley & Black, 1994).

O ajuste osmótico, ou osmorregulação, é o fenômeno pelo qual as células ajustam-se a grandes mudanças no potencial osmótico do ambiente, por meio de regulação das quantidades de solutos osmoticamente compatíveis dentro das células (Salisbury & Ross, 1991). O acúmulo de solutos é encontrado em bactérias, fungos, plantas e animais, indicando que a maioria, ou todos os organismos, é capaz, até certo ponto, de ajustes osmóticos (Thomas et. al., 1995). Para substratos agarizados, o ajuste do potencial hídrico em relação ao desenvolvimento de microrganismos, normalmente, é feito pela adição de solutos osmoticamente ativos, como MgSO<sub>4</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicerol, manitol e polietileno glicol (PEG) (Pill, 1994). Sais e manitol têm sido extensivamente utilizados como solutos osmóticos, mas ambos podem ser absorvidos pelas sementes, resultando em alteração do gradiente de potencial hídrico. Embora PEG 6000 seja considerado ótimo agente osmótico, uma vez que é material inerte e não fitotóxico (Mexal et al., 1975), ele apresenta alto peso molecular, não é absorvido e suas soluções podem apresentar alta viscosidade que, somada à baixa difusão de O<sub>2</sub>, pode comprometer a disponibilidade de oxigênio para as sementes durante o processo germinativo (Hasegawa et al., 1984). Além disso, apresenta incompatibilidade com o ágar, ou seja, grande quantidade de PEG não permite a solidificação do meio contendo ágar (Mexal & Reid, 1973).

Gao & Shain (1995) monitoraram o crescimento micelial e a germinação de conídios de seis raças de *Cryphonectria parasitica* em meio contendo farinha de milho e ágar, osmoticamente ajustado com NaCl, KCl, sacarose ou mistura de sais de NaCl-KCl-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Houve crescimento micelial sobre os meios contendo KCl ou sacarose em potenciais osmóticos acima de -2 MPa, porém, foi inibido no meio contendo sódio. Entretanto, a germinação conidial foi mais sensível

quando comparada com o crescimento micelial sobre o meio com sódio; os conídios foram mais tolerantes se comparados com o micélio nos potenciais osmóticos menores que -2 MPa, quando o meio foi ajustado com KCl ou sacarose. Conídios de todas as raças germinaram sobre os meios ajustados a -6 MPa.

Alam et al. (1996) observaram que o diâmetro médio de colônias de *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*, cultivadas em meio de cultura modificado pela adição de vários solutos osmóticos, foi estimulado, na faixa de -0,36 MPa a -1 MPa; já em valores mais negativos, o diâmetro médio de colônias decresceu progressivamente. Segundo esses mesmos autores, o efeito estimulador no crescimento das colônias desses patógenos, nessa faixa de potencial hídrico, foi devido à absorção de solutos e ao melhor ajuste osmótico das células fúngicas, proporcionando maior turgor para a extensão celular.

Carvalho (1999), trabalhando no desenvolvimento de uma técnica para inoculação artificial de *Colletrotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão, verificou que o aumento da restrição hídrica do BDA com PEG 6000 afetou negativamente o crescimento radial das colônias; já com manitol, este crescimento foi estimulado até a restrição hídrica de -0,8 MPa, tendendo para o declínio após este nível. Isto ocorreu, provavelmente, porque o manitol foi facilmente metabolizado pelo patógeno. Meios de cultura com potenciais osmóticos entre -0,3 e -2,0 MPa também estimularam o crescimento micelial dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium moniliforme* e *F. graminearum*, enquanto meios de cultura com potenciais osmóticos mais negativos que -2,0 MPa reduziram o crescimento micelial desses fungos. Este autor concluiu que o uso do condicionamento fisiológico do BDA com manitol constituiu uma técnica viável para aumentar a eficiência de inoculação de *Colletrotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro, pois a associação do fungo com a semente aumentou com o período de

exposição das sementes ao inóculo. Por outro lado, Coutinho (2000) verificou que, para os principais fungos associados às sementes de arroz e feijão, o crescimento micelial não foi afetado pelas condições de restrição hídrica do meio BDA e pela adição dos solutos NaCl, KCl e manitol em potenciais osmóticos entre -0,4 e -0,9 MPa.

Machado, A. (2002) verificou que o condicionamento fisiológico em meio BDA, induzido pelos solutos manitol e NaCl, reduziu, de modo geral, a frutificação dos fungos *Fusarium* spp., *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *Cephalosporioides*, nos potenciais mais negativos que -0,8 MPa.

Além do trabalho desenvolvido por Kobayasti (2002) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em sementes de feijão, nenhum outro estudo envolvendo o uso do condicionamento fisiológico para inoculação artificial de bactérias fitopatogênicas em sementes foi encontrado na literatura.

## **2.5 Uso da técnica de condicionamento fisiológico para a inoculação de patógenos em sementes**

O crescente interesse por tratamentos que envolvam o início das atividades pré-germinativas levou ao desenvolvimento de várias técnicas que permitem controlar a hidratação e a geminação das sementes. Entre estas, destacam-se a técnica de condicionamento osmótico (Braccini, 1996), também referido como “priming” (Heydecker et al., 1975), o condicionamento fisiológico (Vasquez, 1995) ou, ainda, a restrição hídrica (Carvalho, 1999).

A técnica de condicionamento fisiológico em substrato agarizado é utilizada como um método de inoculação de sementes, mostrando ser eficiente na obtenção de patógenos associadas a sementes com vantagem, em relação aos outros métodos tradicionais, por inibir ou retardar a germinação das sementes inoculadas (Machado et al., 2001a, b, 2004a; Kobayasti, 2002; Costa et al.,

2003). Ela baseia-se no pré-condicionamento fisiológico modificado, sem o intuito de melhorar a germinação da semente, e em métodos de inoculação de patógenos em sementes (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991; Valarini & Menten, 1991).

O condicionamento fisiológico em substrato agarizado consiste em colocar as sementes, após o crescimento do patógeno, em substrato agarizado modificado pela adição de solutos, obtendo-se a restrição hídrica necessária ao impedimento ou ao retardamento da protrusão radicular das sementes, sem inibir o crescimento do patógeno e possibilitando o uso das sementes após a inoculação. Permite, ainda, prolongar o período de exposição das sementes ao patógeno, proporcionando, dessa forma, maior grau de associação do patógeno com a sementes, sem que haja a germinação dessas (Carvalho, 1999; Kobayashi, 2002).

Durante o condicionamento fisiológico, a semente hidrata-se lentamente, o que permite maior tempo para a reparação ou reorganização das membranas, dando possibilidade aos tecidos de se desenvolverem de maneira mais ordenada, reduzindo os riscos de danos ao eixo embrionário causados por embebição rápida (Smith & Coob, 1992). Quando o condicionamento das sementes é favorável, ocorre o processo de mobilização de reservas, ativação e síntese-de-novo de algumas enzimas e início e aumento da síntese de DNA e RNA, disponibilizando às sementes os precursores utilizados na síntese de macromoléculas. Essas sínteses podem estar relacionadas à remoção de certos agentes inibidores da germinação, como o ácido abscísico (ABA), ou à produção de fatores promotores, como o ácido giberélico. O estresse hídrico nas sementes aumenta a produção de ABA e induz à dormência, enquanto o condicionamento osmótico pode reduzir a produção de ABA (Khan, 1992).

Utilizando a metodologia de condicionamento fisiológico para inocular sementes de feijoeiro com *Colletotrichum lindemuthianum* em meio BDA

(batata dextrose ágar) controlado osmoticamente com manitol e PEG com potenciais hídricos de -0,8 e -1,0 MPa e períodos de tempo variados (30, 72, 120 e 168 horas), Carvalho (1999) verificou que o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo aumentou os sintomas nas plântulas de feijoeiro. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* também foi inoculado por essa técnica, mas as sementes de feijão foram mantidas em contato com a colônia fúngica desenvolvida em meio BSA (batata sacarose ágar) adicionado dos solutos sacarose, cloreto de potássio e manitol, em restrições hídricas de -0,8 e -1,0 MPa, durante os mesmos períodos de exposição do trabalho anterior, verificando-se níveis diferenciados de inóculo. O maior potencial para o período de exposição foi de 120 horas (Costa, et al., 2003).

Em condição elevada de restrição hídrica, foi possível prolongar o tempo de exposição de sementes de milho aos fungos *Diplodia maydis*, *Cephalosporium acremonium* e *Fusarium moniliforme*, sem a ocorrência de germinação, promovendo maior índice de associação do patógeno com as sementes e resultando em maior número de plântulas com lesões (Machado et al., 2001a). O mesmo comportamento foi verificado em experimentos com *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, em sementes de soja (Machado et al., 2001b), e com *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e *Botryodiplodia theobromae*, em sementes de algodão (Machado, J., 2002).

Sementes de milho foram inoculadas com *Stenocarpella maydis* pela técnica de condicionamento fisiológico, utilizando-se manitol ajustado para o potencial hídrico de -1,4 MPa, obtendo-se, após 96 horas de exposição das sementes à colônia fúngica, média de 67% desse fungo associado a sementes (Carvalho, 1999).

## **2.6 Qualidade fisiológica de sementes**

A qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica. A partir deste momento, processos degenerativos, de natureza física, fisiológica ou bioquímica, começam a ocorrer, caracterizando a deterioração, que é considerada toda e qualquer mudança degenerativa, após a semente ter atingido sua máxima qualidade (Santos et al., 2004). O componente fisiológico da qualidade de sementes diz respeito à viabilidade e ao vigor, parâmetros que possibilitam conhecer o potencial de emergência rápida e uniforme de um lote de sementes. A rapidez e a uniformidade de emergência são importantes para favorecer o estabelecimento das plantas, maximizar o período de cultivo e facilitar os tratamentos culturais, contribuindo para a obtenção de altas produtividades nas lavouras.

Os fatores que afetam a qualidade fisiológica das sementes iniciam-se na fertilização e ocorrem até o momento da semeadura. Entre esses fatores, podem-se citar genótipo, condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes, posição da semente na planta mãe, época e técnicas de colheita, condições de armazenamento e tratamentos pré-semeadura (Basu, 1995). Portanto, a qualidade fisiológica é adquirida durante os processos de desenvolvimento e pode ser perdida por processos deteriorativos, que podem iniciar ainda nessa fase. Quando as sementes deterioram, elas perdem vigor progressivamente, apresentando redução na velocidade e na uniformidade de emergência, menor resistência a condições adversas, decréscimo na proporção de plântulas normais e, finalmente, perdem a viabilidade ou a capacidade de germinar (Halmer & Bewley, 1984).

A deterioração é evidenciada por perda da integridade do sistema de membranas, redução da capacidade seletiva, peroxidação de lipídios, lixiviação de solutos, mudanças na atividade respiratória das sementes, modificações na atividade enzimática e síntese de proteínas, incapacidade de manutenção do

gradiente eletroquímico e perda da compartimentalização celular e acúmulo de substâncias tóxicas. Também observam-se alterações fisiológicas, tais como: atraso na germinação, decréscimo na tolerância às condições ambientais subótimas durante a germinação, redução no crescimento e ou vigor das plântulas, aumento do número de plântulas anormais, maior suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos, emergência desuniforme, redução na produtividade, modificações na coloração das sementes, diminuição do potencial de armazenamento, completa perda da capacidade germinativa e morte das sementes (Wilson & McDonald, 1986; Basavarajappa et al., 1991).

As perdas na qualidade de sementes estão relacionadas à degradação de macromoléculas, tais como: proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e, conseqüentemente, à diminuição de atividades bioquímicas das sementes (Coolbear, 1995). Segundo McDonald (1998), macromoléculas essenciais para a germinação degradam durante o envelhecimento.

O processo pelo qual as sementes deterioram e morrem tem recebido atenção considerável na literatura. Em vários trabalhos têm sido descritas as mudanças fisiológicas que são, ao mesmo tempo, causa e conseqüência do envelhecimento (Coolbear, 1995; Smith & Berjak, 1995; Walters, 1998). Com o envelhecimento das sementes, as membranas se tornam fracas, as enzimas perdem a atividade catalítica e os cromossomos acumulam mutações. Tem sido também proposto que reservas nutritivas são esgotadas enquanto a semente se deteriora e que subprodutos de reações catabólicas são tóxicos, favorecendo a deterioração. Por meio de pesquisas recentes, foi apontado um conjunto de enzimas críticas, que são inativadas com o tempo e as proteínas, que são suscetíveis à degradação (Zhang et al., 1994; Sun & Leopold, 1995).

A técnica de eletroforese de proteínas pode auxiliar na detecção dos estádios iniciais de deterioração por meio da avaliação da atividade de enzimas associadas à degradação e à oxidação de substâncias de reserva, bem como a

biossíntese de novas substâncias (Spinola et al., 2000). Mesmo sendo um processo irreversível, alguns mecanismos de pré-condicionamento podem melhorar a germinação e o vigor de sementes. Chauhan et al. (1985), estudando variação eletroforética de proteínas de soja e cevada em relação à qualidade das sementes, observaram que bandas de enzimas (esterases, fosfatases e transaminases) funcionam como marcas moleculares na avaliação da qualidade. Também Vieira (1996) encontrou, como promissores indicadores do estágio de deterioração de sementes de algodoeiro, as variações eletroforéticas e das enzimas glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6-fosfagluconato. Reduções na atividade enzimática durante a germinação de sementes envelhecidas podem ser resultantes da diminuição da síntese protéica sendo que o início da deterioração das sementes geralmente está associado à redução na síntese de proteínas (Abdul-Baki & Anderson, 1972).

Em várias espécies, mudanças na atividade de enzimas em sementes secas e germinadas ocorrem concomitantemente com um decréscimo na qualidade da semente no armazenamento e no aumento na atividade de proteinases,  $\beta$ -amilases e nucleases foram relatadas por Basavarajappa et al. (1991), Bewley & Black (1994), Salinas et al. (1998) e Padilha et al. (2001). A susceptibilidade das sementes ao estresse durante o envelhecimento artificial pode ser correlacionada com a qualidade da semente. Foram observadas alterações nos lipídios e nas proteínas insolúveis em ácido em decorrência do envelhecimento artificial (Ferguson et al., 1990).

Diferentes mudanças na atividade enzimática, em consequência do envelhecimento artificial, foram observadas por Bock (1999), em sementes de soja, indicando que o envelhecimento promove desorganização nos sistemas enzimáticos da semente.

A deterioração de sementes pode resultar em mudanças acentuadas em reservas nutritivas e na atividade de enzimas capazes de degradá-la. Dependendo da espécie de sementes, a perda da capacidade de sintetizar hidrolases pode acompanhar a perda de viabilidade ou precedê-la. No entanto, a perda de reservas nutritivas principais não é uma consequência importante da deterioração, mas a capacidade de utilizar essas reservas pode ser. O estado de enzimas, que degradam reservas e de sua maquinaria sintética, não é normal em sementes deterioradas (Desai et al., 1997).

A maior parte das proteínas em sementes é metabolicamente inativa e serve meramente como reserva para ser utilizada para o crescimento do eixo embrionário durante a germinação. As proteínas metabolicamente ativas constituem uma pequena parcela do total, mas são extremamente importantes para o desenvolvimento e a germinação das sementes. Como enzimas, elas catalisam todos os processos metabólicos na digestão, translocação e utilização de reservas (Bewley & Black, 1994).

De acordo com Machado Neto et al. (2001), não está totalmente clara a forma como as proteínas das sementes são degradadas. A destruição de algumas estruturas, como lisossomos por lise de membranas ou dano de radicais livres, libera as enzimas hidrolases, que estão normalmente separadas do resto da célula. A falta de organização pode levar a uma degradação, principalmente de macromoléculas como proteínas, por endopeptidases ou proteases em sementes envelhecidas. Esses mesmos autores, trabalhando com sementes de feijão envelhecidas naturalmente e artificialmente, encontraram alterações nos padrões de bandas de proteína total, principalmente em sementes envelhecidas artificialmente a partir de 48 horas. Os autores concluíram que a degradação de proteínas é diferente em envelhecimento artificial e natural, sendo, provavelmente, dirigida por diferentes mecanismos fisiológicos.

Em estudos similares, Varier & Dadlani (1992) encontraram que o padrão de bandas de proteínas solúveis em algodão não foi afetado pelo envelhecimento natural, a despeito de considerável perda de viabilidade. Entretanto, sob envelhecimento artificial, diferenças marcantes nos perfis de proteína foram observadas, mesmo quando havia somente um decréscimo no vigor e não em viabilidade de sementes. De acordo com Copeland & McDonald (1995), os testes mais sensíveis para medir a deterioração de sementes são aqueles que medem a atividade de certas enzimas associadas com quebras de reservas nutritivas ou biossíntese de tecidos novos, durante a germinação.

Diversas mudanças na estrutura macromolecular das enzimas podem contribuir para a sua menor eficiência. Elas podem sofrer mudanças na composição por perda ou ganho de certos grupos funcionais, por oxidação de grupos sulfidrilas ou por conversão de aminoácidos dentro da estrutura protéica. Atividades diminuídas de enzimas, tais como: catalase, peroxidase, esterase, desidrogenase e glutamato descarboxilase, em sementes em deterioração, é bem documentado. Esse decréscimo geral, na atividade enzimática, diminui o suprimento nutricional para a semente em germinação (Smith & Berjak, 1995). Durante a germinação, enzimas hidrolizam reservas endospermicas em uma forma que possa ser utilizada pelo eixo em desenvolvimento. No início da hidratação, enzimas hidrolíticas, tais como amilases, proteinases e  $\beta$ -glucanases tornam-se ativadas no embrião (Ganguli & Sem-Mandi, 1993).

Portanto, analisando as tentativas de se correlacionar a redução na viabilidade de sementes, com alterações na atividade de diferentes grupos de enzimas específicas, é possível notar que existe uma coerência nos resultados obtidos de uma mesma espécie e, em muitos casos, entre espécies diferentes, para o comportamento de determinadas enzimas. O uso de alterações em enzimas constitui numa ferramenta de grande valor para o controle de qualidade

de sementes, permitindo diagnóstico do estado fisiológico da semente e, em determinados casos, inferir sobre causas da perda de viabilidade e vigor.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T.T. (Ed.). **Seed biology**. New York: Academic, 1972. Cap.4, v.2, p. 283-315.

ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.3, p.383-388, 1996.

ALTENBURGER, P.; KAMPFER, P.; AKIMOV, V.N.; LUBITZ, W.; BUSSE, H.J. Polyanine distribution in actinomycetes with group B peptidoblycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Tsukamurella*. **International Journal System Bacteriology**, v.47, p.270-277, 1997.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, v.19, n.2, p.279-286, 1991.

BASU, R.N. Seed viability. In: BASRA, A.S. **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Foods Products, 1995. p.1-42.

BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Estabelecimento de metodologia para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.301, 2003.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

BIANCHINI, A.; CARNEIRO, S.T.P.G.; LEITE JR., R.P. Doenças do feijoeiro e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Feijão: tecnologia de produção**. Londrina, PR: Instituto Agronômico do Paraná, 2000. p.55-75.

BLAKEMORE, E.J.A.; LAW, J.R.; REEVES, J.C. PCR identification of *Erwinia stewartii* and its comparison with two other methods. **Seed Science and Technology**, v.27, p.385-396, 1999.

BOCK, F.L. **Resposta a nível molecular do envelhecimento artificial, natural e pré-condicionamento de sementes de soja.** 1999. 27p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

BRACCINI, A.L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** 1996. 135p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria.** C.A.B. Kew: International Mycological Institute. 1986. 322p.

BURKHOLDER, W.H. The longevity of the pathogens causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, v.35, n.9, p.743-744, 1995.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Common bean improvement.** Cali, 2002. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/beans/index.htm>>. Acesso em: 31 ago. 2004.

CHAUHAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p.629-641, 1985.

CHAVES, R.C.; UESUGI, C.H. Eficiência do tratamento térmico e químico em sementes de feijão comum na redução de perdas causadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.102, 2004.

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; COMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbios recomendados para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento de gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.

COLETTA FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.327-334, 2000.

- COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium flaccumfaciens*. **Journal General of Microbiology**, v.129, p.3545-1358, 1983.
- COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1995. p.223-275.
- COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Seed science and technology**. New York: Chapman and Hall, 1995. 409p.
- COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* em sementes de feijoeiro através da técnica de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.5, p.1023-1030, 2003.
- COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. **Euphytica**, v.23, n.3, p.651-656, 1974.
- COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Bacterial disease of legumes: breeding and resistance. In: SUMMERFIELD, A.; BUNTING, H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew, Surrey, UK: Royal Botanical Gardens, 1979. p. 225-233.
- DESAI, B.B.; KOTECHA, P.M.; SALUNKHE, D.K. **Seeds handbook: biology, production, processing and storage**. New York: M. Dekker, 1997. 627p.
- DINENSEN, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: INRS, 1978. p.929-933.
- DOWSON, W.J. **Plant disease due to bacteria**. Cambridge: Cambridge University, 1957.

DUNLEAVY, J.M. A vascular disease of soybean caused by *Corynebacterium* sp. **Plant Disease Report**, v.47, p.612-613, 1963.

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

EPPO/CABI. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: SMITH, I.M.; MCNAMARA, D.G.; SCOTT, P.R.; HOLDERNESS, M. (Ed.). **Quarantine pests for Europe**. 2<sup>th</sup>ed. Wallingford, UK: CAB International, 1997. p. 991-994.

FELSKE, A.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; AKKERMANS, A.D.L. Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. **International Journal System. Bacteriology**, v.49, p.113-121, 1999.

FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II. Lipids. **Crop Science**, Madison, v.30, p.179-182, 1990.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION/STAT. **Database collection**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collection?subset=agriculture/2003>>. Acesso em: 10 ago. 2004.

GANGULI, S.; SEN-MANDI, S. Effects of ageing on amylase activity and scutellar cell structure during imbibition in wheat seed. **Annals of Botany**, v.71, n.5, p.411-416, 1993.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of potential on virulent and hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, v.25, n.6, p.1024-1029, 1995.

GROTH, D.E.; BRAUN, E.J. Survival, seed transmission, and epiphytic development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the North-Central United States. **Plant Disease**, v.73, n.4, p.326-330, 1989.

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

HALMER, P; BEWLEY, D. A physiological perspective on seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v.12, n.2, p.561-575, 1984.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S.; HANDA, A.K. Cellular mechanism of tolerance to water stress. **Hortscience**, v.19, n.3, p.371-377, 1984.

HAYWARD, A.C.; WATERSTON, J.M. *Corynebacterium flaccumfaciens*. **C.M.I. Description of pathogenic fungi and bacteria**. Kew, Surrey, 1965. n.43.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, v.55, p.433-4, 1922.

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

HENNINGSON, P.J.; GUDMESTAD, N.C. Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria. **Journal General of Microbiology**, v.137, p.427-440, 1991.

HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.81-109, 1993.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v.3, n.1, p.881-888, 1975.

JONES, D. A numerical taxonomy study of coryneform and related bacteria. **Journal General of Microbiological**, v.187, p.52-96, 1975.

KIM, H.M.; SONG, W.Y. Characterization of ribosomal RNA intergenic spacer of several seedborn bacterial pathogens of rice. **Seed Science & Technology**, v.24, p.571-580, 1996.

KHAN, A. A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Review**, Edinburgh, v.13, p.131-181, 1992.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 125p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LEITE, Jr., R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v.79, p.917-922, 1995.

LEITE, R.P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S.R.; BIANCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *Flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.303-304, 2001.

LOCCI, R.; FIRRAO, G.; PERTOLINI, B.; SARDEI, P. Numerical taxonomy of phytopathogenic corynebacterium. **Annual Microbiology Enzimology**, v.39, p.59-92, 1989.

FILHO, R.J.M.; UESUGI, C.H. Comportamento de diferentes espécies vegetais em relação a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolada de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.92, 2004.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.88-94, 2001a.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.95-101, 2001b.

MACHADO, A.Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MACHADO, J.C. Métodos de detecção de pragas não quarentenárias associadas às sementes, com potencial de regulamentação no Brasil. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTE, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Resumos e Palestras...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 198p.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.62-67, 2004a.

MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M. ; VIEIRA, M.G.G. C.; SOUZA, R M; POZZA, E.A. Use of water restriction technique in seed pathology. **Seed Testing International**, n.128, p.14-18, 2004b.

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C.; TAKAKI, M. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Seed Science and Technology**, v.29, n.1, p.137-149, 2001.

MADDOX, D.A. Implications of new technologies for seed health testing and the worldwide movement of seed. **Seed Science Research**, v.8, p.277-284, 1998.

MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.86, p.63-69, 1996.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; VALINSKY, L.; DROR, O.; KLEITMAN, F. Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* in gypsophila plants by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.85-91, 1998.

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

MARQUES, A.S.A.; PARENTE, P.M.G.; MACHADO, F.O.C.; SANTANA, C.R. Avaliação de métodos de inoculação na produção de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* para fins experimentais. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.2, p.178-182, 1994.

McDONALD, J.H.; WONG, E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.17-22, 2000.

MEXAL, J.; FISCHER, J.T.; OSTERYONG, J.; REID, C.P.P. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant water relations. **Plant Physiology**, v.55, n.1, p.20-24, 1975.

MEXAL, J.; REID, C.P.P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, v.51, n.9, p.1579-1588, 1973.

MIZUNO, A.; NOZU, Y.; KADOTA, I.; NISIYAMA, K. The monoclonal antibodies against protein complex derived from *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. **Annual Phytopathology Society Japan**, v.61, p.69-74, 1995.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan, 1979. 839p.

NUNES, L.M.; BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Especificidade de *primers* para identificação e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.243, 2004.

OH, C.; HEU, S.; CHOI, Y.; OH, C.S.; HEU, S.G.; CHOI, Y.C. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. **Plant Pathology Journal**, v.15, n.1, p.57-61, 1999.

PADILHA, L.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.198-204, 2001.

PILL, W.G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1994. Cap.10, p.319-359.

PHANG, P.D.; GUTENMAHER, P.; MOELA, I. Resistance to bacterial rots in some French bean. **Lucrari Stiintifice**, v.17, p.45-48, 1974.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.J.; SCHAAD, N.W. Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by DNA amplification. **Phytopathology**, v.81, p.1159, 1991.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W.; PANOPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, v.83, p.965-970, 1993.

RASSMUSEN, O.F.; WULFF, B.S. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* using PCR. In: INTERNATIONAL WORKING GROUP ON *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* PHATOVARS, 4., 1990, Stamperia Granducale. **Proceedings...** Stamperia Granducale, Florence, 1990. p.369-376.

REEVES, J.C. Comparative tests for the detection *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. In: KOENRAADT, H.; HUTCHINS, J.D. (Ed.). **Seed health testing: progress towards the 21<sup>st</sup> century**. Wallingford: CAB International, 1997. p.205-209.

ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R.L.D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial planta pathogens in Brasil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANTA PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1982, Cali. **Proceedings...** Cali: CIAT. 1982. p.601-613.

SAETTLER, A.W. Disease caused by bacteria. In: HALL, R. **Compendium of bean diseases**. St. Paul: APS: 1991. p.23-32.

SAETTLER, A.W.; PERRY, S.K. Seed- transmitted bacterial diseases in *Michigan navy* (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Report**, v.56, p.378-381, 1972.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. St. Paul: APS: 1989. 122p.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, v.3, n.2, p.106-118, 1998.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.M; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANAPOULOS, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopatology**, v.85, p.243-248, 1995.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W.L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M.D.; LUSTER, D.G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.305-324, 2003.

SCHUSTER, M.L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Report**, v.43, p.25-32, 1959.

SCHUSTER, M.L.; CHRISTIANSEN, D.W. An orange colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt. **Phytopathology**, v.47, p.51-53, 1957.

SCHUSTER, M.L.; SAYRE, R.M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and others leguminosae. **Phytopathology**, v.57, p.1064-6, 1967.

SCHUSTER, M.L.; VIDAVER, A.K.; MANDEL, M. A purple-pigment-producing bean bacterium *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, p.423-427, 1968.

SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with lost of viability of stored desiccations tolerant and desiccations sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Basel-Hang Yong, 1995. p.701-746.

SMITH, P.T.; COOB, B.G. Physiological and enzymatic characteristic of primed, re-dried air, and germinated pepper seeds. **Seed Science and Technology**, v.20, p.503-513, 1992.

SMITH, I.M.; McNAMARA, D.G.; SCOTT, P.R.; HOLDERNESS, M. (Ed.). **Quarantine pests for Europe: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. 2<sup>th</sup>ed. Wallingford: CAB International, 1997. p.991-994.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.263-270, 2000.

STARR, M.P.; MANDEL, M.; MURATA, N. The phytopathogenic bacteria in the light of Dna base composition and DNA-DNA segmental homology. **Journal General of Microbiology**, v.21, p.13-26, 1975.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.94-104, 1995.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MARIANO, M.I.A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção de sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v.15, p.233-237, 1989.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.3, p.218-226, 1991.

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

THOMAS, J.C.; SEPAHI, M.; ARENDALL, B.; BOHNERT, H.T. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v.18, n.7, p.801-806, 1995.

TORRES, G.C.; LENNE, JM.; VICTORIA, J.I.; LOZANO, J.C. Bacterial wilt of *Zornia* spp. Caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1981, Cali. **Anais...** Cali: CIAT, 1982. p.74-79.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, v.48, p.245-252, 1999.

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

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.1, p.227-231, 1991.

VAN DER WOLF, J.M.; IMÁN, L.J. JONES, D.A.; GREVESSE, C.; VAN BECKHOVEN, J.R.; VAN VUURDE, J.W.; PEROMBELON, M.C. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. **Journal Applied Bacteriology**, v.80, p.487-495, 1996.

VARIER, A.; DADLANI, M. Effects of ageing on profiles of soluble protein of cotton and esterase isoenzymes of pearl millet seeds. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.35, n.2, p.145-151, 1992.

VASQUEZ, G.H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento.** 1995. 138p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

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**, v.79, p.966, 1995.

VIEIRA, M. G. C. G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).** 1996. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, C.; PAULA, J.T.J.; BOREM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais.** Viçosa: UFV, 1998. 596p.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v.8, n.2, p.223-244, 1998.

WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, v.14, p.269-300, 1986.

YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on *Corynebacterium* bacteria: Parte IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics. Part V. Classification of coryneform bacteria. **Journal General Microbiological**, v.18, p.399-431, 1972.

ZAUMEYER, W.J. Comparative pathological histology of three bacterial disease of bean. **Journal of Agriculture Research**, v.44, p.605-632, 1932.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. **A monographic study of bean disease and methods of their control.** Washington: U.S. Department Agriculture Technical Bulletin, 1957. v.868, p.84-88.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORRAMURA, Y. I.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wellingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, Mar. 1994.

ZHAO, Y.F.; WEI, Y.; GAO, C.S.; ZHAO, L.Z.; HUANG, G.M.; HUANG, Q.L. Using the Biolog identificação system for rapid identification of bean wilt bacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*). **Acta Phytopathology Sínica**, v.27, p.139-144, 1997.

## **CAPÍTULO 2**

### **INOCULAÇÃO DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM SEMENTES DE FEIJÃO POR MEIO DA TÉCNICA DE CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO**

## 1 RESUMO

DEUNER, Carolina Cardoso. Inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão por meio da técnica de condicionamento fisiológico. In: \_\_\_\_\_. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão.** 2007. Cap.2, p.38-98. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O desenvolvimento de métodos eficazes e confiáveis de inoculação de patógenos em sementes é de grande utilidade para estudos de detecção e determinação de padrões de tolerância de patógenos em sementes. Portanto, neste estudo, foi utilizada a técnica de condicionamento fisiológico em meio agarizado para inoculação de *Cff* em sementes de feijão, visando à produção de sementes uniformemente infestadas para uso em pesquisa. Na primeira etapa, avaliou-se o comportamento das sementes de feijão cultivar Pérola, durante o pré-condicionamento osmótico em substrato agarizado com restrição hídrica. Os tratamentos consistiram em expor, por diferentes períodos de tempo, sementes de feijão desinfestadas a quatro níveis de restrição hídrica do meio 523 (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa), com o uso de quatro substratos (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose). Como testemunha, utilizou-se o meio 523 sem restrição hídrica (-0,55 MPa). Decorridos os respectivos tempos, avaliaram-se a percentagem de sementes com protrusão radicular e, posteriormente, o teor de água, a germinação e os padrões enzimáticos das sementes. Na segunda etapa do estudo, avaliou-se o crescimento de quatro isolados de *Cff* (*Cff* DF - Feij-2936, *Cff* PR - 12768, *Cff* SC - Feij-2928 e *Cff* SP - Feij-2634) em substrato agarizado com restrição hídrica. Os tratamentos da terceira etapa foram definidos com base na primeira etapa, em que o melhor tratamento foi o meio 523 com manitol no potencial hídrico de -0,95 MPa e com 48 horas de exposição das sementes no meio agarizado. Na segunda etapa, verificou-se que o isolado de *Cff* SC (Feij-2928), proveniente do estado de Santa Catarina apresentou o melhor crescimento no substrato e no potencial hídrico definido na primeira etapa. Portanto, foi possível a inoculação artificial de sementes de feijão com *Cff* por meio da técnica de condicionamento fisiológico em substrato agarizado, sem o comprometimento de sua qualidade fisiológica.

\*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

## 2 ABSTRACT

DEUNER, Carolina Cardoso. Inoculation of bean seeds with *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* by the physiological conditioning technique. In: \_\_\_\_\_. **Artificial inoculation and detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds.** 2007. Chapt.2, p.38-98. Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The development of efficient and reliable methods for the pathogen inoculation in seeds is of major importance to establish pathogen detection techniques and tolerance threshold in seeds. Thus, the objective of this study was to utilize the physiological conditioning technique in agar-based medium for *Cff* inoculation in bean seeds aiming the production of uniformly infected seeds for research purposes. In the first step of this study seed performance, bean cv. Pérola was evaluated when submitted to a physiological conditioning in a water restriction agar-based medium. Treatments encompassed disinfested bean seed exposure to the bacterium for different time periods in four water restriction levels in 523 medium (-0.55, -0.75, -0.95 and -1.15 MPa), and four substrates (523 medium, 523 medium+KCl, 523 medium+mannitol and 523 medium+sucrose) and an additional of 523 medium without osmotic restriction (-0,55 MPa) was used as the control. After the set time periods, the number of germinated seeds in the medium was evaluated and later the variables water content, germination and seed enzymatic patterns were assessed. In the second study, growth was assessed for four *Cff* strains (*Cff* DF - Feij-2936, *Cff* PR - 12768, *Cff* SC - Feij-2928 e *Cff* SP - Feij-2634) in different water restriction 523 medium. Treatments in the third step were defined on the basis of the first one, where the best combination was mannitol amended 523 medium set for -0,95 MPa water potential and 48 hours exposure to the pathogen. In the second step, *Cff* SC (Feij-2928) strain, from Santa Catarina state, presented the best growth in agar-based medium and water potential defined in the first step. Thus, *Cff* artificial inoculation in bean seeds was accomplished by using the physiological conditioning technique in agar-based medium without detectable changes in physiological quality patterns.

\*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Métodos eficazes e confiáveis para a inoculação de sementes são de grande utilidade em estudos de detecção e transmissão de patógenos por sementes, comportamento epidemiológico de doenças transmitidas por sementes e determinação e sensibilidade de métodos de detecção, dentre outros (Valarini & Menten, 1991).

Existe grande dificuldade em se obter níveis adequados de patógenos em sementes, o que torna necessário o desenvolvimento de métodos que garantam a associação do patógeno com as mesmas, sem, no entanto, provocar perdas significativas na qualidade fisiológica. As técnicas de inoculação artificial de patógenos em sementes, em sua maioria, reduzem consideravelmente o seu poder germinativo (Valarini & Menten, 1991), revelam baixa eficiência na obtenção de índices satisfatórios de transmissibilidade do patógeno para as plântulas (Oliveira, 1991) e são ineficientes em evidenciar os efeitos do patógeno na semente (Silva, 1997).

A análise enzimática é uma ferramenta que indica a qualidade fisiológica das sementes submetidas ao condicionamento osmótico. Esse tipo de estudo é capaz de detectar os eventos deteriorativos iniciais nas sementes por meio da avaliação da atividade de enzimas associadas aos vários eventos que ocorrem na semente, como degradação e oxidação de substâncias de reserva (Spinola et al., 2000). A capacidade de avaliação e a correta interpretação da variação eletroforética nos perfis de proteínas e enzimas podem ser eficientes ferramentas na determinação de mudanças bioquímicas resultantes do processo deteriorativo (Carraro, 1990).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica eficiente e prática de inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*, em

sementes de feijão, por meio de condicionamento fisiológico, mantendo-se a qualidade fisiológica das mesmas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados nos laboratórios de Bacteriologia de Plantas, Patologia de Sementes e Virologia Vegetal, no Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Análises de Sementes e de Eletroforese, no Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

### 4.1 Origem e qualidade das sementes de feijão

Foram utilizadas amostras de sementes básicas do cultivar Pérola, as quais foram armazenadas em câmara fria e seca (10°C e 50% UR), no Laboratório de Patologia de Sementes, até a realização dos experimentos.

O teste de germinação foi realizado em rolo de papel com 200 sementes, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

O teste de sanidade de sementes foi realizado em papel filtro, utilizando-se 400 sementes dispostas em recipientes gerbox, previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram mantidas em câmara de incubação, à temperatura de 23±2°C, em regime alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, pelo período de sete dias (Brasil, 1992). Para identificação da microflora, as sementes foram examinadas individualmente com auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, microscópio ótico. Os resultados de incidência foram expressos em percentagens de fungos presentes nas sementes.

Para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*, foi realizado plaqueamento em meio de cultura CNS (Schaad et al., 2001).

#### 4.2 Obtenção e multiplicação do inóculo de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os isolados de *Cff*, provenientes de lavoura comercial de feijão e utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. Todos os isolados foram preservados e estão armazenados no Laboratório de Bacteriologia de Plantas. A multiplicação do inóculo foi realizada, inicialmente, por meio da repicagem das bactérias para tubos contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido inclinado e, em seguida, foram incubadas por 48-72 horas, em BOD, a 28°C. A partir desses inóculos, foram realizados todos os ensaios.

**TABELA 1** Origem dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Isolado	Origem	Doador	Ano	Código
Feij-2936	Distrito Federal	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> DF
12768	Paraná	R.P. Leite Jr. (IAPAR)	2000	<i>Cff</i> PR
Feij-2928	Santa Catarina	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SC
Feij-2634	São Paulo	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SP

#### 4.3 Patogenicidade e reação de hipersensibilidade dos isolados de *Cff*

Sementes de feijão do cultivar Pérola foram semeadas em copos plásticos (500 mL) contendo substrato Plantimax<sup>®</sup> para a determinação da patogenicidade dos isolados. Realizou-se a inoculação dos isolados de *Cff* no nó cotiledonar durante o estágio de folhas primárias, por meio de ferimentos provocados por uma agulha (Richard & Walker, 1965) com suspensão bacteriana na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. As plantas foram submetidas à câmara úmida um dia antes e um após a inoculação e, em seguida, levadas à casa de vegetação. Para o preparo da suspensão, cada isolado foi cultivado em meio 523, por 24 horas e, em seguida, preparou-se a suspensão com água de torneira. Como testemunha utilizou-se somente água na inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições, tendo cada

unidade experimental sido constituída por quatro plantas. A avaliação foi realizada 20 dias após a inoculação, quando foram observadas plantas com sintomas da doença.

Para a determinação da reação de hipersensibilidade, os isolados foram inoculados nas plantas de tomate, fumo e pimentão, que são plantas não-hospedeiras, sendo o inóculo preparado da mesma maneira que para o teste de patogenicidade. As sementes de cada hospedeiro foram semeadas em bandejas contendo vermiculita estéril e as mudinhas transplantadas para vasos de 2 litros contendo Plantimax®. Vinte dias após o transplante, foi realizada a inoculação, por pressão, com uma seringa.

#### 4.4 Preparo do meio de cultura básico com restrição hídrica

O meio de cultura básico utilizado foi o 523 (Kado & Heskett, 1970) (10 g de sacarose, 8 g de caseína ácida hidrolizada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de  $K_2HPO_4$  anidro, 0,3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g de ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada q.s.p), cujo potencial hídrico é de -0,546 MPa. Para calcular as quantidades dos solutos no preparo das soluções (Tabela 2), nos diferentes níveis de potencial hídrico (-0,75, -0,95 e -1,15 MPa), utilizou-se o software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995).

**TABELA 2** Quantidade dos solutos, cloreto de potássio (KCl), manitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) e sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) utilizados para a obtenção dos potenciais hídricos, em 1.000 mL do meio 523 (Kado & Heskett, 1970). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Solutos	Níveis de restrição hídrica		
	-0,75	-0,95	-1,15
KCl	12,1	15,4	18,7
Manitol	52,7	66,1	79,3
Sacarose	52,7	66,1	79,3

Os solutos foram adicionados ao meio 523, completando-se o volume para 1000 mL e, em seguida, autoclavados. Como testemunha, utilizou-se o meio 523, sem adição de soluto.

#### **4.5 Primeira etapa: pré-condicionamento de sementes de feijão em substrato agarizado com restrição hídrica**

##### **4.5.1 Tratamentos e instalação do ensaio**

Os tratamentos consistiram em expor sementes de feijão desinfestadas, por diferentes períodos de tempo (24, 48, 72, 96 e 120 horas), a quatro substratos diferentes (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose), em quatro potenciais de restrição hídrica do meio 523 (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa). Como testemunha, utilizou-se o meio 523 sem restrição hídrica (-0,55 MPa). A desinfestação superficial das sementes consistiu em emergi-las em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 0,5%) por 2 minutos, lavá-las três vezes em água destilada esterilizada e secá-las em câmara de fluxo laminar por uma hora. Na seqüência, foram colocadas 20 sementes por placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 40 mL de meio, tendo cada tratamento sido composto por 20 placas, totalizando 400 sementes. As placas foram incubadas por diferentes períodos de tempo (24, 48, 72, 96 e 120 horas), à temperatura de 28°C, em escuro contínuo. Decorridos os respectivos tempos, parte das sementes, que não emitiram a radícula, foi utilizada para a determinação do teor de água e a outra parte foi secada a 35°C, em estufa com circulação de ar, até atingir 13% de teor de água.

##### **4.5.2 Avaliações**

###### **4.5.2.1 Percentagem de sementes germinadas durante o pré-condicionamento fisiológico**

Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de pré-condicionamento osmótico, foi avaliado o número total de sementes germinadas por placa. As sementes foram consideradas germinadas quando se observaram sinais da protrusão da radícula (comprimento  $\geq 0,1$  cm).

#### **4.5.2.2 Teor de água nas sementes**

O teor de água foi determinado imediatamente após cada período de exposição das sementes ao substrato agarizado. As sementes, que não apresentaram protrusão radicular, foram amostradas aleatoriamente nas repetições, formando duas subamostras de, aproximadamente, 10 g de sementes (peso úmido), totalizando 20 g de sementes/repetição/tratamento. O método utilizado para a determinação do teor de água foi o da estufa, a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 24 horas, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

#### **4.5.2.3 Teste de germinação das sementes**

O teste de germinação foi realizado após cada período de exposição da semente ao substrato agarizado, utilizando-se quatro repetições com cinquenta sementes. A semeadura foi realizada em papel de germinação previamente umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida, os rolos foram acondicionados em germinador previamente regulado a  $25^\circ\text{C}$ , por 7 dias.

As avaliações foram realizadas no 5º e no 7º dias, computando-se o número de plântulas normais, anormais e sementes mortas, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais das quatro repetições.

#### **4.5.2.4 Sistemas enzimáticos das sementes**

As análises eletroforéticas de isoenzimas das sementes de feijão foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado por Vieira et al. (2001), nos tratamentos 24 e 120 horas de exposição em todos os substratos e potenciais hídricos, mais testemunha sem condicionamento osmótico, totalizando 19 tratamentos solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 0,5%), por 2 minutos.

Vinte sementes de feijão, divididas em duas subamostras foram maceradas sobre gelo. Utilizaram-se cem miligramas de cada subamostra, adicionando-se tampão de extração correspondente a 2,5 vezes o seu peso adicionado de 0,05 g do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidone). Os tampões usados foram Tris-HCl 0,2M+0,01% de  $\beta$ -mercaptoetanol pH 8 e tampão fosfato (0,034 M de fosfato de sódio bi-básico, 0,2 M de sacarose, 2,56% de PVP 40, 3 M de DDT, 5,7 mM L ácido ascórbico, 2,5 mM de borato de sódio, 1% de PEG 6000, 0,002% de  $\beta$ -mercaptoetanol), tendo este último sido utilizado para a extração da enzima peroxidase.

Após a maceração, as amostras foram deixadas à temperatura de 4°C, por 24 horas e, depois, centrifugadas, a 16.000g, por 60 minutos, a 4°C. Em seguida, 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra foram aplicados no gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizada a 4°C, por quatro horas, na voltagem de 150 v. Decorrido esse tempo, os géis foram revelados e corados para os sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), catalase (CAT) e peroxidase (PO), segundo metodologia descrita por Alfenas (1991).

#### **4.5.2.5 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos referentes à emissão de radículas consistiram

um fator quantitativo (restrição hídrica) em quatro potenciais hídricos do meio 523 (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa) e um fator qualitativo (substratos) meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose. A variável resposta se referiu à proporção de emissão de radículas de sementes de feijoeiro, acumulada em vários tempos de exposição das mesmas (24, 48, 72, 96 e 120 horas).

O delineamento utilizado no teste de germinação das sementes secas, após o tempo de exposição das mesmas aos diferentes substratos, foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial entre quatro níveis de restrição hídrica (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa), quatro substratos (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose), sendo a testemunha o meio 523 sem restrição hídrica (-0,55MPa).

#### **4.6 Segunda etapa: crescimento de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em substrato agarizado com restrição hídrica**

##### **4.6.1 Tratamentos e instalação do ensaio**

Os tratamentos foram constituídos por quatro tipos de substratos (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose), em quatro potenciais de restrição hídrica do meio 523 (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa). Como testemunha, utilizou-se o meio 523 sem restrição hídrica (-0,55 MPa).

Para estudo do crescimento bacteriano em meio 523 com diferentes potenciais de restrição hídrica, foram utilizados quatro isolados de *Cff* provenientes de lavoura comercial de feijão, sendo cada isolado de um estado brasileiro diferente (*Cff* DF - Feij-2936, *Cff* PR - 12768, *Cff* SC - Feij-2928 e *Cff* SP - Feij-2634). Para a padronização do inóculo, os isolados foram, inicialmente, cultivados em meio 523 líquido e incubados por 48 horas. Em seguida, foi realizada a diluição serial fator 10 em solução salina estéril (0,85%)

(Romeiro, 2001), plaqueando-se as diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ ) e sendo as placas incubadas em BOD, a 28°C, por 72 horas. Decorrido esse tempo, uma única colônia da diluição  $10^{-4}$  foi transferida novamente para o meio 523 líquido, incubada por 48 horas sob agitação e plaqueada nos diferentes substratos e potenciais hídricos dessa mesma diluição.

Esse ensaio foi realizado em blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. Em cada placa, foram adicionados 40 mL de substrato e, após a solidificação, 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana foram plaqueados e espalhados com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD, a 28°C, por 72 horas.

#### **4.6.2 Avaliações**

##### **4.6.2.1 Crescimento e características de colônias de *Cff* em meio 523 com diferentes potenciais hídricos**

Foram observadas as características típicas das colônias e contou-se o número de colônias em todas as placas da diluição de  $10^{-4}$ , após 72 horas.

##### **4.6.2.2 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados. Os tratamentos seguiram o arranjo fatorial com um fator quantitativo, quatro potenciais hídricos do meio 523 (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa) e dois fatores qualitativos: tipo de substratos (meio 523, meio 523+KCl, meio 523+manitol e meio 523+sacarose) e diluição ( $10^{-4}$ ), sendo a testemunha, o meio 523 sem restrição hídrica (-0,55 MPa).

Como o objetivo nessa etapa foi avaliar os substratos, compararam-se os tratamentos dados pela combinação dos fatores potenciais hídricos e isolados.

Após a construção da análise de variância e determinação dos principais efeitos ou interações significativas, realizou-se o teste de médias Duncan para os

isolados. No estudo dos efeitos dos potenciais hídricos, por serem quantitativos, determinaram-se os modelos de regressão lineares ou quadráticos.

#### **4.7 Terceira etapa: uso de condicionamento fisiológico na inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão**

##### **4.7.1 Tratamentos e instalação do ensaio**

Os tratamentos dessa etapa foram definidos com base na primeira etapa. Foram utilizados o melhor substrato e o potencial de restrição hídrica no pré-condicionamento das sementes de feijão, ou seja, o meio 523 com manitol no potencial hídrico de -0,95 MPa. O isolado de *Cff* escolhido foi aquele que melhor cresceu no substrato e no potencial hídrico definido na primeira etapa, sendo esse o isolado proveniente do estado de Santa Catarina (*Cff* SC - Feij-2928).

Para determinar o tempo de exposição das sementes ao isolado de *Cff* SC (Feij-2928), selecionado na segunda etapa, foi crescido em meio 523 líquido por 48 horas em BOD, a 28°C. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana do isolado foram plaqueados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com 20 mL contendo os substratos. Os tratamentos foram constituídos por meio 523, meio 523+manitol e meio 523+manitol+*Cff*. As placas foram incubadas em BOD, a 28°C, por 72 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se à inoculação, em condições assépticas, das sementes desinfestadas, colocando-se 20 sementes por placa. Em seguida, as placas foram agitadas manualmente, por 30 segundos, até que todas as sementes estivessem cobertas pela bactéria. Cada tratamento foi constituído de 30 placas. As sementes permaneceram em contato com o inóculo por 24, 48, 72, 96 e 120 horas, em BOD, à temperatura de 28°C. Ao fim do período de exposição, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água e as restantes foram secadas até atingir 13% de umidade, em estufa com circulação de ar e à temperatura de 35°C, para posteriores avaliações.

## **4.7.2 Avaliações**

### **4.7.2.1 Teor de água nas sementes após a inoculação artificial**

O teor de água foi determinado imediatamente após cada período de exposição da semente ao isolado, em que essas foram amostradas aleatoriamente nas repetições, formando duas subamostras de, aproximadamente, 10 g de sementes (peso úmido), totalizando 20 g de sementes/repetição/tratamento. O método utilizado para a determinação do teor de água foi o da estufa, a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

### **4.7.2.2 Teste de germinação das sementes após inoculação artificial**

O teste de germinação foi realizado, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais das quatro repetições.

### **4.7.2.3 Quantificação e localização do inóculo na semente nos diferentes tempos de exposição após inoculação artificial**

Foram utilizadas 50 sementes inoculadas artificialmente nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de exposição ao patógeno. Essas sementes foram divididas em duas subamostras, nas quais metade foi submetida à desinfecção superficial e a outra metade não. As sementes com desinfecção superficial foram imersas em solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$  0,5%) durante 2 minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente, sementes, com e sem desinfestação superficial, foram colocadas individualmente em tubos de ensaio com 9 mL de solução salina estéril ( $\text{NaCl}$  0,85%) e incubadas por 18 horas à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Decorrido esse tempo, procedeu-se à diluição serial, na qual 100  $\mu\text{L}$  da suspensão da diluição  $10^{-4}$  foram plaqueados em meio seletivo CNS (Schaad et al., 2001) (Tabela 3). Em seguida, as placas

foram incubadas a 28°C, em incubadora BOD, por 72 horas e contou-se o número de colônias nas quatro repetições.

**TABELA 3** Composição e preparo do meio CNS (Schaad et al., 2001), seletivo para a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades</b>
Caldo nutriente	4,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
LiCl	5,0 g
Agar	7,5 g
Água destilada	440 mL
<b>Soluções estoque*</b>	<b>Quantidades</b>
Cicloeximida (1 g/100 mL)	2 mL
NaOH 1N	3 mL
Ácido nalidíxico (0,1 g/7 mL)	1,25 mL
Sulfato de polimixina <i>b</i> (0,1 g/100 mL)	1,6 mL
Daconil 500 (1,2 mL/58,8 mL ou 0,2 mL/9,8 mL)	30 mL

\*Adicionar após autoclavagem.

#### 4.7.2.4 Emergência de plântulas doentes originadas de inoculação artificial

O teste de emergência de plântulas foi realizado em bandejas plásticas contendo areia e solo misturados na proporção de 2:1. Semearam-se 50 sementes em cada bandeja por tratamento, distribuídas em cinco fileiras de dez sementes com quatro repetições por tratamento. Após a semeadura, as bandejas foram distribuídas ao acaso, em casa de vegetação, à temperatura de 28±2°C e alta umidade relativa. A irrigação do substrato foi realizada de acordo com a necessidade, sendo distribuídos volumes iguais de água em todas as bandejas. As avaliações foram realizadas aos 7 e 21 dias após a semeadura, contando-se o número de plântulas normais e a incidência dos sintomas causados pelo patógeno em estudo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Qualidade das sementes de feijão

A germinação inicial das sementes de feijão cultivar Pérola foi de 94%.

No teste de sanidade, constatou-se a presença dos seguintes gêneros de fungos: *Aspergillus* spp. (1,5%), *Colletotrichum* spp. (1,25%), *Fusarium* spp. (2%) e *Penicillium* spp. (1,75%).

Com relação a *Cff*, não foi encontrada a presença dessa bactéria por meio do plaqueamento do extrato das sementes em meio de cultura CNS (Schaad et al., 2001).

### 5.2 Patogenicidade e reação de hipersensibilidade dos isolados de *Cff*

Todos os isolados de *Cff* (*Cff* DF - Feij-2936, *Cff* PR - 12768, *Cff* SC - Feij-2928 e *Cff* SP - Feij-2634) foram patogênicos às plantas de feijoeiro.

A reação de hipersensibilidade em plantas de tomate, fumo e pimentão foram todas positivas (Tabela 4). Segundo Romeiro (2001), esse teste pode ser utilizado como um teste rápido de patogenicidade e somente células bacterianas vivas são capazes de induzir a HR. Entretanto, existem exceções, como é o caso de algumas espécies de *Xanthomonas*, que não induzem HR em plantas não-

**TABELA 4** Teste de patogenicidade e reação de hipersensibilidade dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Isolado	Hospedeiro	Ano	Patogenicidade em feijão	HR		
				Fumo	Tomate	Pimentão
Feij-2936	<i>P. vulgaris</i> <sup>1</sup>	2005	+	+	+	+
Feij-2910	<i>P. vulgaris</i>	2005	+	+	+	+
Feij-2928	<i>P. vulgaris</i>	2005	+	+	+	+
Feij-2634	<i>P. vulgaris</i>	2005	+	+	+	+

(+) = resultado positivo; <sup>1</sup>*Phaseolus vulgaris*

hospedeiras. De acordo com estudos de Barbosa (2007) com a bactéria *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, observou-se que o tomateiro foi a melhor planta não-hospedeira para a comprovação da patogenicidade dos isolados de Xam quando comparado com pimentão e fumo, concordando com Romeiro (2001) que afirma ser necessária a utilização de mais de uma planta teste nos ensaios de HR.

### **5.3 Primeira etapa: pré-condicionamento de sementes de feijão em substrato agarizado com restrição hídrica**

#### **5.3.1 Percentagem de sementes germinadas durante o pré-condicionamento fisiológico**

Nesse ensaio foram observados menores percentuais de protrusão radicular das sementes de feijão durante o pré-condicionamento osmótico em tratamentos com maiores potenciais hídricos, independentes do substrato. Sendo assim, o processo de germinação ocorreu mais tardiamente. Nos potenciais mais negativos, tenderam a diminuir o processo germinativo das sementes de feijão no substrato, enquanto que, nos tratamentos com potenciais menores, a germinação iniciou-se mais cedo (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com os de outros autores (Carvalho, 1999; Coutinho 2000), os quais mostraram que a velocidade de absorção de água pelas sementes diminui à medida que o potencial hídrico do meio externo torna-se mais negativo, aumentando, conseqüentemente, o período necessário para que ocorra a emissão da radícula (Prisco & Oleary, 1970; Bradford, 1986; Bewley & Black, 1994).

Todos os três substratos testados na protrusão radícula foram estatisticamente superiores à testemunha para a maioria dos tempos, exceto para o tempo de 24 horas. Na maioria dos tratamentos, houve redução considerável da germinação das sementes de feijão no pré-condicionamento, ou seja, os solutos não permitiram a absorção ideal de água para que ocorresse o processo

de protrusão radicular. No tratamento testemunha, meio 523 (-0,55 MPa), o início da emissão da radícula ocorreu com 48 horas de exposição das sementes e, após 96 horas, 98% das sementes estavam germinadas.

**TABELA 5** Média da percentagem das sementes de feijão germinadas durante o pré-condicionamento osmótico em meio 523 contendo cloreto de potássio (KCl), manitol e sacarose, nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 horas). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substrato	$\Psi$ (MPa)	Tempo				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Meio 523	-0,55	0 a <sup>1</sup>	93 a	95 a	98 a	98 a
Meio 523+KCl	-0,75	0 a	4 b	20 b	69 b	33 b
Meio 523+KCl	-0,95	0 a	0 c	1 c	5 c	9 c
Meio 523+KCl	-1,15	0 a	0 c	0 c	0 d	1 d
Meio 523+Man	-0,75	0 a	0 c	4 c	10 c	28 b
Meio 523+Man	-0,95	0 a	0 c	1 c	4 c	9 c
Meio 523+Man	-1,15	0 a	0 c	0 c	0 d	4 d
Meio 523+Sac	-0,75	0 a	0 c	0 c	0 d	3 d
Meio 523+Sac	-0,95	0 a	0 c	0 c	0 d	1 d
Meio 523+Sac	-1,15	0 a	0 c	0 c	0 d	1 d

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

No tratamento meio 523+KCl, foram observadas as maiores percentagens de germinação das sementes quando comparado ao meio 523+manitol e ao meio 523+sacarose. Para o menor potencial hídrico, - 0,75 MPa, o início da emissão da radícula deu-se com 48 horas de exposição da semente ao meio e atingiu 4% de sementes germinadas. Para -0,95 MPa de potencial, a emissão da radícula iniciou-se a 72 horas de exposição, apresentando 12% de sementes germinadas. Para o maior potencial hídrico, o de -1,15 MPa, a germinação no meio iniciou-se com 120 horas, apresentando média de sementes germinadas de 1%.

Para o tratamento meio 523+manitol, as sementes nos potenciais -0,75 e -0,95 MPa iniciaram o processo germinativo a partir de 72 horas, tendo as percentagens de sementes germinadas sido de 4% e 1%, respectivamente. Com relação ao maior potencial hídrico, a germinação das sementes iniciou-se com 120 horas, apresentando 4% de sementes germinadas.

O tratamento com o meio 523+sacarose apresentou melhor desempenho em controlar a emissão de radícula pela semente no substrato agarizado. A germinação de sementes para esse tratamento iniciou-se com 120 horas, para os potenciais hídricos, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa, apresentando 3, 1 e 1% de sementes germinadas, respectivamente.

Nos períodos compreendidos entre 24 e 96 horas, não houve emissão da radícula nas sementes. Isso ocorreu, provavelmente, porque a restrição hídrica do substrato permite que as sementes absorvam água até um determinado nível, em que todos os processos preparatórios para a germinação ocorram sem atingir a fase de alongamento celular e, conseqüentemente, a emissão da radícula (Bradford, 1986).

O prolongamento das fases que antecedem a germinação de sementes em substratos osmoticamente modificados com solutos iônicos e não iônicos foi atribuído à diminuição do metabolismo das sementes em função da menor disponibilidade de água para digestão das reservas e translocação dos produtos metabolizados (Bewley & Black, 1994). Segundo Wenkert et al. (1978), para cada espécie existe um valor de potencial hídrico, abaixo do qual a germinação não acontece, porque o estresse hídrico atua, geralmente, reduzindo a velocidade e restringindo a percentagem de germinação, além de afetar o alongamento celular e a síntese da parede.

As diferenças verificadas entre os solutos utilizados com relação à eficiência em inibir ou retardar a germinação das sementes podem estar relacionadas à toxidez dos solutos e diferenças de potencial hídrico de equilíbrio

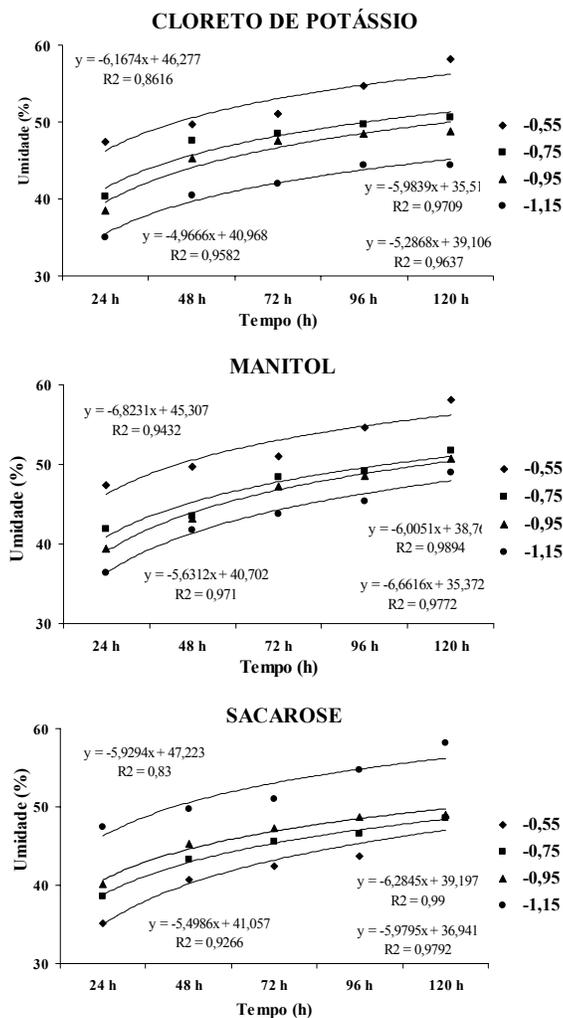
entre a semente e o meio externo. Segundo Bradford (1986), essas diferenças podem variar amplamente em função das características das sementes de cada espécie e ou cultivar e, possivelmente, entre lotes de uma mesma cultivar. Portanto, os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Campos & Assunção (1990), que constataram redução na germinação de sementes de arroz e feijão à medida que decresceram os níveis de potencial hídrico das soluções preparadas com manitol, PEG 1540, PEG 6.000, NaCl e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### **5.3.2 Teor de água nas sementes**

O teor de água atingido pelas sementes de feijão variou em função do tempo, do substrato e do potencial de restrição hídrica, porém, ele cresceu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao substrato. Sementes da testemunha, meio 523 sem restrição hídrica, apresentaram maiores teores de água, independente dos substratos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 1). Sementes que apresentam maior teor de água sofrerão maiores efeitos deletérios do estresse, devido à intensificação da sua atividade metabólica. Essas sementes apresentam menor integridade do seu sistema de membranas e ou seletividade, permitindo a entrada de água mais rapidamente nas células (Santos et al., 2004).

À medida que se aumenta o potencial hídrico, independente do tempo e do substrato, existe uma tendência em reduzir a absorção de água. Sementes expostas por 24 e 120 horas, independente do substrato e do potencial hídrico, apresentaram menores e maiores teores de água, respectivamente. Para os substratos contendo manitol e sacarose para o tempo de 120 horas, não houve diferença estatística entre os potenciais -0,75 e -0,95 MPa, o que não aconteceu para os demais tempos, em que todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si. Esses resultados concordam com os dados encontrados por

Souza et al. (1996), ao verificarem, em sementes de calopogônio, que, no final do período de embebição, os lotes que exibiram maiores proporções de sementes intumescidas eram os lotes de menor qualidade fisiológica. Portanto, foram as sementes que apresentam maior teor de água.



**FIGURA 1** Análise de regressão para teor de água médio nas sementes de feijão após o pré-condicionamento osmótico em meio 523 contendo cloreto de potássio (KCl), manitol e sacarose, nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 horas). UFLA, Lavras, MG, 2007.

De acordo com Bradford (1995), a germinação da semente ocorre quando ela atinge um valor crítico de umidade alcançado em função do potencial hídrico do ambiente e do período de hidratação das sementes. Shioga (1990) relata que sementes de feijoeiro necessitam de um mínimo de 48% a 50 % de teor de água para que ocorra a germinação. Além disso, observou-se que as menores percentagens de teor de água foram encontradas em sementes submetidas aos meios contendo restrição hídrica, independente do substrato, quando comparadas com a testemunha. Sementes da testemunha apresentaram maiores percentagens de teor de água, concordando com os resultados obtidos por Bradford (1986).

### **5.3.3 Teste de germinação das sementes**

Após o pré-condicionamento nos diferentes substratos e potenciais hídricos, sementes de feijão que não apresentaram protrusão radicular foram submetidas ao teste de germinação em rolo de papel. Todos os três substratos testados nesse ensaio, independente do potencial hídrico, demonstraram ser estatisticamente superiores à testemunha, na qual foi observada redução na germinação das sementes à medida que se aumentou o tempo de exposição (Tabela 6), apresentando germinação em torno de 50%, às 120 horas de exposição das mesmas.

Para o tempo de 24 horas, os substratos contendo cloreto de potássio e manitol se comportaram de maneira semelhante nos potenciais hídricos de -0,75 e -0,95 MPa não diferindo estatisticamente entre si. Os valores de germinação das sementes desses tratamentos foram de 92% e 91%, 92% e 92%, respectivamente. Para o substrato composto por sacarose não houve diferença estatística na germinação das sementes submetidas aos potenciais -0,75 e -0,95 MPa, em nenhum dos tempos. O potencial de -1,15 MPa, em todos os tempos e

substratos, demonstrou ser, dentre os potenciais testados, o que mais reduziu a germinação (Figura 2).

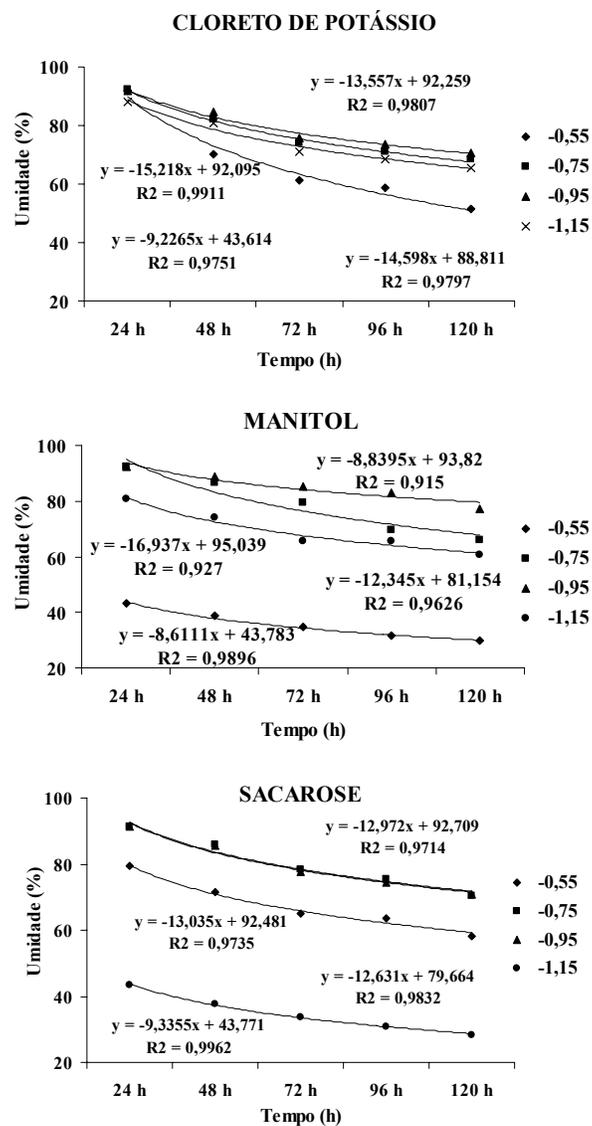
**TABELA 6** Germinação média das sementes de feijão após o pré-condicionamento osmótico em meio 523 contendo cloreto de potássio (KCl), manitol e sacarose, nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 horas). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substrato	$\Psi$ (MPa)	Tempo				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Meio 523	-0,55	91 a <sup>1</sup>	70 d	61 d	58 d	51 d
Meio 523+KCl	-0,75	92 a	82 b	73 b	70 b	68 b
Meio 523+KCl	-0,95	91 a	84 a	75 a	73 a	70 a
Meio 523+KCl	-1,15	88 b	80 c	71 c	68 c	65 c
Meio 523+Man	-0,75	92 a	86 b	79 b	69 b	65 b
Meio 523+Man	-0,95	92 a	88 a	85 a	82 a	77 a
Meio 523+Man	-1,15	80 b	74 c	65 c	65 c	60 c
Meio 523+Sac	-0,75	91 a	85 a	77 a	74 a	70 a
Meio 523+Sac	-0,95	91 a	85 a	78 a	75 a	70 a
Meio 523+Sac	-1,15	79 b	71 b	65 b	63 b	58 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Em estudos com sementes de soja, Braccini et al. (1996) constataram que potenciais hídricos mais negativos, induzidos por soluções osmóticas de NaCl e manitol reduziram a germinação de sementes. Os mesmos resultados foram descritos no trabalho de Moraes & Menezes (2003), no qual a germinação das sementes de soja foi reduzida acentuadamente com a diminuição dos potenciais osmóticos das soluções contendo NaCl. O excesso dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> tende a causar intumescência protoplasmática, afetando a atividade enzimática, ou seja, absorção de água e, conseqüentemente, do soluto, resultando na produção inadequada de energia e distúrbios na assimilação de nitrogênio (Larcher, 1986). De acordo com Delouche (2002), a perda da capacidade de

germinação é a consequência ou efeito final da deterioração, sendo o último atributo da qualidade fisiológica da semente que é perdido.



**FIGURA 2** Análise de regressão da germinação médias das sementes de feijão após o pré-condicionamento osmótico em meio 523 contendo cloreto de potássio (KCl), manitol e sacarose, nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 horas). UFLA, Lavras, MG, 2007.

A diferença de desempenho observada entre sementes submetidas ou não ao pré-condicionamento osmótico em meio agarizado se deve ao fato de que são iniciados vários processos como mobilização das reservas, ativação e síntese-de-novo de várias enzimas, síntese de DNA e RNA, produção de ATP, além de reparo de danos no sistema de membranas (Bradford, 1986; McDonald, 1998). Além disso, a qualidade fisiológica das sementes após o condicionamento osmótico dependerá da quantidade de água absorvida durante esse processo.

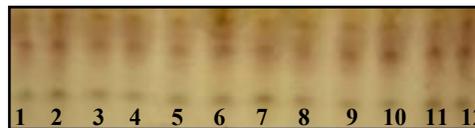
Quanto maior a quantidade de água perdida durante o processo de secagem, menores serão os percentuais de germinação, concordando com o trabalho de Bewley & Black (1994). Esses autores afirmaram que sementes submetidas a elevados percentuais de perdas de água podem provocar rompimento de membranas, comprometendo, dessa forma, o processo de germinação e reduzindo o vigor das mesmas. Além disso, o tempo de exposição nos substratos também pode afetar a germinação e o vigor.

Portanto, é importante que, nos trabalhos que envolvam a inoculação artificial de sementes, os tratamentos proporcionem baixa germinação durante o processo de inoculação, por meio do pré-condicionamento fisiológico em meio agarizado e que, após esse processo, a semente esteja fisiologicamente viável e associada ao patógeno.

#### **5.3.4 Sistemas enzimáticos das sementes**

A qualidade fisiológica das sementes após o condicionamento osmótico foi acompanhada pelas alterações nos padrões isoenzimáticos específicos, empregando-se a técnica de eletroforese. A atividade da enzima esterase, para alguns tratamentos, não foi alterada, pois não houve mudança no padrão de bandas, nem nas sementes das testemunhas e nas sementes submetidas ao condicionamento fisiológico (FIGURAS 3A e 3B). Para outros, como meio 523+manitol -0,75MPa a 120 horas, meio 523 (testemunha, semente

condicionada osmoticamente) a 24 e 120 horas e meio 523+sacarose 0,75MPa a 24 horas (Figura 3C), meio 523+sacarose 0,95MPa nos tempos de 24 e 120 horas e meio 523+sacarose 1,15MPa nos tempos de 24 e 120 horas (Figura 3D), houve aumento na atividade dessa enzima.



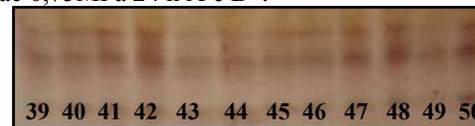
**FIGURA 3A** Zimograma referente atividade da enzima esterase em sementes de feijão (1,2) \*Testemunha A e B, (3,4) meio 523 24h A e B, (5,6) meio 523+KCl 0,75MPa 24h A e B, (7,8) meio 523+KCl 0,95MPa 24h A e B, (9,10) meio 523+KCl 1,15MPa 24h A e B, (11,12) meio 523 120 h A e B.



**FIGURA 3B** (13,14) meio 523+KCl 0,75MPa 120h A e B, (15,16) meio 523+KCl 0,95MPa 120h A e B, (17,18) meio 523+KCl 1,15 MPa 120h A e B, (19,20) meio 523 24h A e B, (21,22) meio 523+man 0,75MPa 24h A e B, (23,24) meio 523+man 0,95MPa 24h A e B, (25,26) meio 523+man 1,15MPa 24h A e B.



**FIGURA 3C** (27,28) meio 523 120h A e B\*, (29,30) meio 523+man 0,75MPa 120h A e B\*, (31,32) meio 523+man 0,95MPa 120h A e B, (33,34) meio 523+man 1,15 120 h A e B, (35,36) meio 523 24h A e B\*, (37,38) meio 523+sac 0,75MPa 24 h A e B\*.



**FIGURA 3D** (39,40) meio 523+sac 0,95MPa 24h A e B\*, (41,42) meio 523+sac 1,15MPa 24h A e B\*, (43,44) meio 523 120h A e B, (45,46) meio 523+sac 0,75MPa 120h A e B, (47,48) meio 523+sac 0,95MPa 120h A e B\*, (49,50) meio 523+sac 1,15MPa 120h A e B\*

\* Sementes sem condicionamento osmótico;

Esses resultados concordam com os encontrados por Padilha et al. (2001), que verificaram alteração no padrão de bandas para os estresses mais drásticos em sementes de milho e por Bock (1999), que verificam aumento no número de bandas desta enzima em sementes de soja.

A maior atividade dessa enzima na semente está relacionada com a maior peroxidação de lipídios de membrana, causando um aumento na permeabilidade das membranas. O aumento na sua atividade evidencia a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação de sementes à medida que são aumentados os níveis de fatores adversos de temperatura e do teor de água das sementes.

Relacionando a atividade dessa enzima com a germinação e o teor de água nas sementes, de maneira geral, houve redução da germinação e aumento do teor de água, à medida que se aumentou o potencial hídrico e o tempo de exposição das sementes aos meios osmoticamente modificados (Santos et al., 2004). Estudos realizados por Silva (1997), Vieira (1996) e Brandão-Júnior (1996) mostraram alterações dos padrões de proteínas e enzimas em razão de fatores, como a presença de microrganismos e o nível de deterioração.

A enzima catalase, independente do restritor hídrico (KCl, manitol e Sacarose) e do potencial hídrico (-0,75, -0,95 e -1,15 MPa), apresentou maior atividade no tempo de 120 horas de exposição das sementes, ao contrário do que se observou para os demais tratamentos (Figura 4A, 4B, 4C). Os dados obtidos neste trabalho concordam com os de Bailly et al. (2000) que, ao analisar sementes de girassol, observaram associação do condicionamento osmótico à maior atividade da catalase, tendo a germinação das sementes sido reduzida com o aumento da atividade dessa enzima, sugerindo que ela não foi capaz de realizar a desintoxicação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Basavarajappa et al., 1991; Jeng & Sung, 1994; McDonald, 1999; Bailly et al., 2002).



**FIGURA 4A** Zimograma referente à atividade da enzima catalase em sementes de feijão (1) \*Testemunha, (2) meio 523 24h, (3) meio 523+KCl 0,75MPa 24h, (4) meio 523+KCl 0,95MPa 24h, (5) meio 523+KCl 1,15MPa 24h, (6) meio 523 120h, (7) meio 523+KCl 0,75MPa 120h\*, (8) meio 523+KCl 0,95MPa 120h\*, (9) meio 523+KCl 1,15MPa 120h\*.



**FIGURA 4B** (10) \*Testemunha, (11) meio 523 24h, (12) meio 523+man 0,75MPa 24h, (13) meio 523+man 0,95MPa 24h, (14) meio 523+man 1,15MPa 24h, (15) meio 523 120h, (16) meio 523+man 0,75MPa 120h\*, (17) meio 523+man 0,95MPa 120h\* e (18) meio 523+man 1,15MPa 120h\*.



**FIGURA 4C** (19) \*Testemunha, (20) meio 523 24h, (21) meio 523+sac 0,75MPa 24h, (22) meio 523+sac 0,95MPa 24h, (23) meio 523+sac 1,15MPa 24h, (24) meio 523 120h, (25) meio 523+sac 0,75MPa 120h\*, (26) meio 523+sac 0,95MPa 120h\* e (27) meio 523+sac 1,15MPa 120h\*.

\* Sementes sem condicionamento osmótico;

Por outro lado, existem trabalhos demonstrando redução na atividade da catalase em sementes em deterioração, sendo que esse decréscimo diminui o suprimento nutricional para a semente em germinação (Smith & Berjak, 1995). Drochioiu et al., (1993) verificaram que alta umidade relativa, temperatura elevada e aumento do tempo de envelhecimento reduziram a atividade da catalase. Alguns autores (Puntaralo & Boveris, 1990; Sung & Chiu, 1995) correlacionaram a queda na viabilidade de sementes envelhecidas natural ou artificialmente com alterações nas atividades das enzimas do sistema antioxidante. Em alguns trabalhos, os autores correlacionaram alterações em padrões eletroforéticos de enzimas e deterioração de sementes. Constatou-se que, na maioria deles, ocorreu decréscimo nas atividades dessas enzimas,

concomitante ao envelhecimento, confirmando a ineficiência do sistema de proteção antioxidante das sementes como causa de perda de vigor.

Observou-se, na maioria dos tratamentos, maior atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) nos restritores hídricos KCl (Figura 5A) e sacarose (Figura 5C), ao contrário do observado para o restritor manitol (Figura 5B). Isso, provavelmente, ocorreu em função de uma restrição de oxigênio por esses solutos e a conseqüente redução na qualidade fisiológica das sementes.



**FIGURA 5A** Zimograma referente à atividade da enzima álcool desidrogenase em sementes de feijão (1) \*Testemunha, (2) meio 523 24h\*, (3) meio 523+KCl 0,75MPa 24h\*, (4) meio 523+KCl 0,95MPa 24h\*, (5) meio 523+KCl 1,15MPa 24h\*, (6) meio 523 120h\*, (7) meio 523+KCl 0,75MPa 120h\*, (8) meio 523+KCl 0,95MPa 120h\* e (9) meio 523+KCl 1,15MPa 120h\*.



**FIGURA 5B** (10) \*Testemunha, (11) meio 523 24h, (12) meio 523+man 0,75MPa 24h, (13) meio 523+man 0,95MPa 24h, (14) meio 523+man 1,15MPa 24h, (15) meio 523 120h, (16) meio 523+man 0,75MPa 120h, (17) meio 523+man 0,95MPa 120h e (18) meio 523+man 1,15MPa 120h.



**FIGURA 5C** (19) \*Testemunha, (20) meio 523 24h\*, (21) meio 523+sac 0,75MPa 24h\*, (22) meio 523+sac 0,95MPa 24h\*, (23) meio 523+sac 1,15MPa 24h\*, (24) meio 523 120h\*, (25) meio 523+sac 0,75MPa 120h\*, (26) meio 523+sac 0,95MPa 120h\* e (27) meio 523+sac 1,15MPa 120h\*.

\* Sementes sem condicionamento osmótico;

É provável que essa maior atividade da enzima esteja associada ao acúmulo de produtos tóxicos formados pela rota anaeróbia, como acetaldeído

que, possivelmente, foi ativada em função dos maiores tempos em que as sementes ficaram submersas. Nesse sentido, Alves et al. (1997) destacam que os produtos finais da fermentação (acetaldeído, etanol e ácido lático) são fitotóxicos, acumulam-se rapidamente e provocam distúrbios na organização celular, podendo levar a célula à morte, além de solubilizar lipídios das membranas citoplasmáticas e das organelas pela ação do etanol. Ainda segundo esses autores, a anoxia causa grande aceleração no consumo de glicose, diminuindo drasticamente a sua disponibilidade para a célula. Em condições anaeróbicas, para a célula produzir a mesma quantidade de energia (ATP) do que em condições aeróbicas, há necessidade de aumentar o consumo de glicose, pois a produção de ATP por molécula de glicose metabolizada é baixa (2 ATP/mol de glicose).

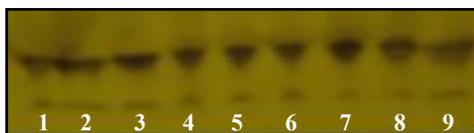
Durante o condicionamento fisiológico, injúrias devido à anoxia, ou seja, diminuições da oxigenação nas sementes, podem ocorrer, prejudicando a qualidade das sementes. Nas situações em que o suprimento de oxigênio é deficiente ou a sua absorção é dificultada devido à maior concentração de soluto osmótico, a respiração anaeróbia toma lugar e a enzima ADH passa a apresentar maior atividade. Essa enzima atua no metabolismo anaeróbio de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoi et al., 1987). Essa atividade da ADH pode ainda resultar em um suprimento adequado de ATP, via fermentação alcoólica. Dessa maneira, a via fermentativa torna-se fundamental para a manutenção da viabilidade da semente nessas condições (Alves et al., 1997).

Camargo (1998) observou aumento na intensidade de bandas dessa enzima com a elevação das concentrações de PEG 6000, as quais correlacionaram-se com os piores desempenhos das sementes. De modo contrário, o autor encontrou diminuição na atividade da malato desidrogenase (MDH), enzima envolvida na rota aeróbia da respiração, comprovando a anaerobiose ocorrida com o aumento da concentração osmótica. Pertel (2001) e

Lima (2001), trabalhando com café, também utilizaram as enzimas da rota anaeróbia (ADH) e aeróbia (MDH e IDH- isocitrato desidrogenase), para inferir sobre a eficiência dos tratamentos de condicionamento fisiológico e sobre a qualidade das sementes.

A enzima malato desidrogenase (MDH) não apresentou aumento na atividade em nenhum dos tratamentos (Figura 6A, 6B e 6C). O aumento no número e ou intensidade de coloração de bandas dessa enzima em sementes submetidas a períodos mais longos de condicionamento osmótico ocorre em função do aumento na respiração das sementes, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (Shatters et al., 1994). Esses relatos concordam com Vieira (1996) que afirma que enzimas envolvidas na respiração podem apresentar alta atividade em sementes de qualidade reduzida e ser um possível marcador molecular para deterioração. Portanto, para essa enzima, nenhum dos tratamentos comprometeu seriamente a qualidade fisiológica das sementes.

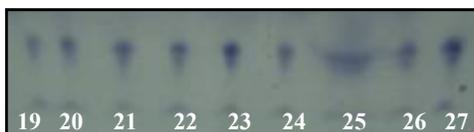
A MDH atua com a fosfoenolpiruvato carboxilase, para a redução de oxaloacetato a malato, utilizando NAD como doador ou receptor de elétrons nessa reação, tendo uma importante função no Ciclo de Krebs para a produção de NADH. As mitocôndrias constituem o centro da respiração, por isso fica evidente a importância dos efeitos da deterioração sobre o desempenho germinativo das sementes quando são consideradas as modificações ocorridas nessa organela. Conforme Salinas et al. (1998), as mitocôndrias dos eixos embrionários são responsáveis pelo fornecimento da energia usada no alongamento dos eixos raiz/caule e, se a taxa respiratória diminuir nos eixos, a emergência e o crescimento das plântulas também diminuirão.



**FIGURA 6A** Zimograma referente à atividade da enzima malato desidrogenase (1) \*Testemunha, (2) meio 523 24h, (3) meio 523+KCl 0,75MPa 24h, (4) meio 523+KCl 0,95MPa 24h, (5) meio 523+KCl 1,15MPa 24h, (6) meio 523 120h, (7) meio 523+KCl 0,75MPa 120h, (8) meio 523+KCl 0,95 120h e (9) meio 523+KCl 1,15MPa 120 h.



**FIGURA 6B** (10) \*Testemunha, (11) meio 523 24h, (12) meio 523+man 0,75MPa 24h, (13) meio 523+man 0,95MPa 24h, (14) meio 523+man 1,15MPa 24h, (15) meio 523 120h, (16) meio 523+man 0,75MPa 120h, (17) meio 523+man 0,95MPa 120h e (18) meio 523+man 1,15MPa 120h.



**FIGURA 6C** (19) \*Testemunha, (20) meio 523 24h, (21) meio 523+sac 0,75MPa 24h, (22) meio 523+sac 0,95MPa 24h, (23) meio 523+sac 1,15MPa 24h, (24) meio 523 120h, (25) meio 523+sac 0,75MPa 120h, (26) meio 523+sac 0,95MPa 120h e (27) meio 523+sac 1,15MPa 120h.

\* Sementes sem condicionamento osmótico;

Para enzima peroxidase, observou-se que, no caso dos restritores hídricos manitol (Figura 7B) e sacarose (Figura 7C), houve aumento de atividade nos potenciais hídricos (-0,75, -0,95 e -1,15 MPa) no tempo de exposição de 120 horas, o que não ocorreu com o restritor KCl (Figura 7A). Essa enzima é removedora de peróxido e a diminuição da sua atividade pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de  $O_2$  e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana, o que provoca a degeneração de suas membranas e parece interferir na germinação e vigor das sementes.



**FIGURA 7A** Zimograma referente à atividade da enzima peroxidase em sementes de feijão (1) \*Testemunha, (2) meio 523 24h, (3) meio 523+KCl 0,75MPa 24h, (4) meio 523+KCl 0,95MPa 24h, (5) meio 523+KCl 1,15MPa 24h, (6) meio 523 120h, (7) meio 523+KCl 0,75MPa 120h, (8) meio 523+KCl 0,95MPa 120h e (9) meio 523+KCl 1,15MPa 120h.



**FIGURA 7B** (10) \*Testemunha, (11) meio 523 24h, (12) meio 523+man 0,75 24h, (13) meio 523+man 0,95MPa 24h, (14) meio 523+man 1,15MPa 24h, (15) meio 523 120h, (16) meio 523+man 0,75MPa 120h\*, (17) meio 523+man 0,95MPa 120h\* e (18) meio 523+man 1,15MPa 120h\*.



**FIGURA 7C** (19) \*Testemunha, (20) meio 523 24h, (21) meio 523+sac 0,75MPa 24h, (22) meio 523+sac 0,95MPa 24h, (23) meio 523+sac 1,15MPa 24 h, (24) meio 523 120h, (25) meio 523+sac 0,75MPa 120h\*, (26) meio 523+sac 0,95MPa 120h\* e (27) meio 523+sac 1,15 MPa 120 h\*.

\* Sementes sem condicionamento osmótico;

Como o aumento da atividade de peroxidase está associado às sementes deterioradas, esses resultados enzimáticos são comparáveis à germinação concordam com os dados de germinação, em que, à medida que se aumentou o tempo de exposição e o potencial de restrição hídrica, a germinação foi reduzida e a atividade da referida enzima aumentada. Constatou-se que, na maioria deles, ocorreu decréscimo nas atividades dessas enzimas, concomitante ao envelhecimento, confirmando a ineficiência do sistema de proteção antioxidante das sementes como causa de perda de vigor (Faria et al., 2003). Com a menor atividade da enzima peroxidase em sementes, pode-se esperar maior sensibilidade aos efeitos de  $O_2$  e de radicais livres, o que parece interferir nos

valores de germinação e de vigor das sementes submetidas aos referidos tratamentos.

#### **5.4 Segunda etapa: crescimento de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em substrato agarizado com restrição hídrica**

##### **5.4.1 Crescimento de colônias de *Cff* em meio 523 com diferentes potenciais hídricos**

Com relação às características morfológicas, foi possível verificar que em todos os substratos, independente do potencial hídrico, a morfologia típica das colônias de *Cff* foi mantida. As colônias apresentavam formato circular, bordos lisos, aspecto brilhante, levemente convexo, com coloração variando de amarela a laranja, conforme as características descritas para o gênero (Romeiro, 2000). Segundo Alam et al. (1996), a cor típica das colônias de alguns patógenos pode ou não ser influenciada pelos solutos osmóticos nos diferentes potenciais hídricos, concordando com os resultados obtidos nesse ensaio, em que a cor original de cada isolado de *Cff* não foi alterada.

Quanto ao tamanho das colônias, observou-se relação entre diâmetro da colônia e potenciais hídricos, ou seja, à medida que se diminuiu o potencial hídrico do substrato, o diâmetro das colônias também diminuiu. Esse mesmo comportamento foi verificado por Kobayasti (2002) com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, que apresentou redução no tamanho da colônia, provavelmente devido ao potencial hídrico do meio e à alta concentração de manitol, uma vez que este patógeno não utiliza manitol como fonte de carbono, assim com para a maioria dos patógenos (Halfeld-Vieira & Souza, 2000).

Para número de colônias, não houve diferença estatística entre os quatro isolados nos diferentes substratos e potencial hídricos (Tabela 7). Esses dados

concordam com aqueles encontrados por Barbosa (2007), em seu estudo de inoculação artificial de sementes de algodão com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

**TABELA 7** Número médio das colônias de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com 72 horas de idade em meio 523 contendo cloreto de potássio, manitol e sacarose, nos diferentes potenciais hídricos (-0,55, -0,75, -0,95 e -1,15 MPa). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Substrato	$\Psi$ (MPa)	Isolados			
		<i>CffDF</i>	<i>CffPR</i>	<i>CffSC</i>	<i>CffSP</i>
Meio 523	-0,55	55,87 a <sup>1</sup>	56,33 a	67,18 a	60,37 a
Meio 523+KCl	-0,75	55,33 a	55,87 a	65,43 a	60,59 a
Meio 523+KCl	-0,95	54,45 a	55,45 a	66,93 a	59,40 a
Meio 523+KCl	-1,15	55,11 a	54,67 a	65,23 a	59,18 a
Meio 523+Man	-0,75	54,75 a	54,56 a	64,18 a	61,12 a
Meio 523+Man	-0,95	55,93 a	56,00 a	67,12 a	58,98 a
Meio 523+Man	-1,15	56,72 a	56,25 a	65,00 a	60,18 a
Meio 523+Sac	-0,75	54,22 a	57,11 a	65,32 a	60,98 a
Meio 523+Sac	-0,95	54,45 a	56,23 a	64,99 a	57,12 a
Meio 523+Sac	-1,15	53,98 a	55,12 a	64,43 a	59,83 a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Por outro lado, em alguns trabalhos, foi observada diferença no crescimento de patógenos em meios agarizados com restritores. Sommers et al. (1970), trabalhando com o fungo *Phytophthora megasperma* e Alam et al. (1996), com os fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*, observaram que o substrato contendo manitol apresentou maior número de colônias quando comparado com outros substratos. Esse estímulo deve-se, provavelmente, à absorção de solutos e ao melhor ajuste osmótico das células dos patógenos. Segundo Duniway (1979), os efeitos combinados da permeabilidade seletiva da membrana ou toxidez de solutos, tanto internamente quanto externamente à membrana celular, provavelmente respondem, em grande parte, pelo

crescimento diferenciado de patógenos em vários solutos osmóticos. O crescimento desses patógenos em meios de cultura ajustados osmoticamente com diferentes potenciais hídricos é variável para cada espécie.

O comportamento de fungos com relação ao crescimento em substratos com restrição hídrica também é variável. Gao & Shain (1995) constataram maior crescimento micelial de *Cryphonectria parasitica* em meio de cultura ajustado osmoticamente com sacarose do que em meios de cultura ajustados com NaCl, KCl e NaSO<sub>4</sub> em potenciais osmóticos semelhantes. Além da utilização da sacarose como fonte adicional de energia pelo fungo, esses autores atribuíram o crescimento diferenciado de *C. parasitica* aos efeitos tóxicos dos sais utilizados, principalmente em potenciais osmóticos mais negativos. Alam et al. (1996) também constataram os efeitos tóxicos dos sais NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizados isoladamente ou em mistura, para ajustar o potencial osmótico de meios de cultura utilizados no crescimento de *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*. Em ambos os estudos, os sais foram tóxicos em potenciais osmóticos mais negativos que -1MPa.

Segundo Machado (2002a), a restrição hídrica em meio BDA, induzida pelos solutos manitol e NaCl, reduziu, de modo geral, a frutificação de *Fusarium* spp., *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nos potenciais hídricos mais negativos que -0,8 MPa. De modo contrário, Coutinho (2000) verificou que, para os principais fungos associados às sementes de arroz e feijão, o crescimento micelial não foi afetado em meio BDA, nos diferentes substratos contendo KCl, NaCl e manitol, entre potenciais de -0,4 a -0,9 MPa. Carvalho (1999) relatou que, para *Colletotrichum lindemuthianum*, a adição de manitol ao meio BDA favoreceu o aumento do diâmetro médio das colônias até o potencial de -0,8 MPa e, a partir desse nível, ocorreu o decréscimo do diâmetro.

Tomando por base os resultados acima descritos quanto ao substrato, o meio contendo manitol propiciou baixa germinação das sementes durante o pré-condicionamento osmótico, boa germinação das sementes pré-condicionadas e menor número de fungos e bactérias saprófitas nas placas, explicado pelo fato de muitos microrganismos não utilizarem manitol como fonte de carbono ao contrário da sacarose, largamente utilizada. O potencial hídrico de -0,95 MPa, dentre os vários potenciais hídricos no substrato com manitol, foi o que propiciou maior germinação das sementes pré-condicionadas, uma das menores absorções de água e os melhores resultados enzimáticos. O isolado de *Cff* escolhido foi o *Cff* SC (Feij-2928), que apresentou o maior número de colônias crescidas nos diferentes substratos e potenciais hídricos, uma vez que não houve diferença estatística entre os isolados nos diferentes substratos e potenciais hídricos. Esse isolado não teve seu crescimento reduzido pelo uso do manitol e apresentou alta virulência quando inoculado em plantas de feijoeiro. Por isso, foram escolhidos o substrato meio 523+manitol, no potencial hídrico de -0,95 MPa e o isolado *Cff* SC (Feij-2928) para a terceira etapa do trabalho.

## **5.5 Terceira etapa: uso de condicionamento fisiológico na inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão**

### **5.5.1 Teor de água nas sementes após inoculação artificial**

O teor de água atingido pelas sementes nos diferentes tratamentos variou significativamente, em função da presença e da ausência da bactéria *Cff*. O teor de água nas sementes expostas ao tratamento meio 523+manitol sem bactéria foi o de maior valor, seguido pelo tratamento meio 523+manitol com bactéria (TABELA 8). As sementes expostas às colônias da bactéria atingiram menor teor de água em todos os tempos, quando comparadas às sementes não inoculadas. Essa diferença, provavelmente, ocorreu devido à presença das colônias da bactéria em atividade que, pelo metabolismo dos açúcares presentes

no substrato, pode ter acarretado aumento do potencial hídrico do ambiente de hidratação das sementes, proporcionando maior disponibilidade de água para a germinação das mesmas (Carvalho, 1999). As sementes do meio 523 sem restrição hídrica, ou seja, a testemunha, foi estatisticamente superior aos demais tratamentos, em todos os tempos, com relação à absorção de água.

**TABELA 8** Teor de água médio das sementes de feijão inoculadas artificialmente com *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* em meio 523 contendo manitol, no potencial de restrição hídrica de -0,95 MPa. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamentos	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>Meio 523</b>	46 a <sup>1</sup>	49 a	58 a	55 a	57 a
<b>Meio 523 + manitol</b>	39 c	44 c	46 c	48 c	49 c
<b>Meio 523 + manitol + Cff</b>	42 b	46 b	49 b	51 b	53 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

O potencial hídrico de um substrato é um fator importante no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos em geral. Dessa forma, o teor de água das sementes é um fator que pode condicionar a ação de um fitopatógeno por ocasião do processo de inoculação, podendo comprometer a viabilidade e a ação de uma bactéria fitopatogênica.

### 5.5.2 Teste de germinação das sementes após inoculação artificial

De acordo com a análise estatística, os tratamentos composto pelo meio 523, meio 523+manitol e Cff e meio 523+manitol diferiram estatisticamente entre si quanto à germinação das sementes de feijão. Sementes submetidas ao meio 523+manitol sem bactéria apresentaram maior percentagem de germinação em todos os tempos, comparadas àquelas submetidas ao meio 523+manitol e ao meio 523 sem restrição hídrica (Tabela 9). Com relação ao tratamento meio 523+manitol e bactéria, houve redução na percentagem de germinação, comparado ao meio 523+manitol e sem bactéria. A germinação das sementes

diminuiu à medida que aumentou o tempo de permanência sobre o substrato, independente do tratamento. Porém, a redução da germinação não foi drástica, evidenciando, dessa forma, que a presença da referida bactéria não afetou a viabilidade da semente, possibilitando sua secagem e aproveitamento em estudos posteriores.

**TABELA 9** Germinação média das sementes de feijão inoculadas artificialmente com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em meio 523 + manitol -0,95 MPa. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamentos	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Meio 523	42 c <sup>1</sup>	40 c	36 c	32 c	28 c
Meio 523 + manitol	91 a	88 a	84 a	81 a	74 a
Meio 523 + manitol + <i>Cff</i>	81 b	77 b	73 b	59 b	51 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Segundo Vieira & Sartorato (1984), sementes de feijão portadoras de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, quando são colocadas para germinar, podem ter o meristema apical das plântulas destruído, acarretando-lhes a morte ou dando origem a plantas doentes, as quais produzirão poucas vagens, porém, com sementes viáveis. Weller & Saettler (1980) relataram que sementes severamente atacadas por essa mesma bactéria apresentaram taxas reduzidas de germinação e produziram plântulas deformadas. Valarini & Menten (1991), utilizando sementes inoculadas artificialmente, constataram redução no poder germinativo das sementes, concordando com os resultados obtidos neste estudo com a bactéria *Cff*.

### 5.5.3 Quantificação e localização do inóculo na semente nos diferentes tempos de exposição após inoculação artificial

Os extratos obtidos de sementes expostas por 24 horas ao inóculo e desinfestadas superficialmente com NaOCl em substrato contendo manitol a -0,95 MPa (Tabela 10) resultaram em 50% de sementes infectadas, tendo o tempo de 48 horas sido suficiente para obter 100% de sementes infectadas por *Cff*. Resultados similares foram obtidos por Valarini & Menten (1991), em que suspensões de sementes de feijão previamente inoculadas artificialmente com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e desinfestadas foram inoculadas em plantas com 8 dias de idade por incisão com tesoura. Observou-se que a suspensão de sementes expostas por 24 horas ao inóculo de Xap resultou em 60% de sementes infectadas e, após 36 horas, 100% das sementes estavam infectadas. Segundo os autores, as fitobactérias podem localizar-se tanto externamente quanto internamente às sementes, constituindo importantes fontes de inóculo.

**TABELA 10** Número e localização de colônias de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão, inoculadas artificialmente, nos diferentes tempos de exposição de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Períodos de exposição	Interna <sup>1</sup> (%)	Número de colônias	Interna + externa <sup>2</sup> (%)	Número de colônias
<b>24 horas</b>	50 b <sup>3</sup>	35 b	100 a	50 b
<b>48 horas</b>	100 a	61 a	100 a	75 a
<b>72 horas</b>	100 a	68 a	100 a	77 a
<b>96 horas</b>	100 a	68 a	100 a	77 a
<b>120 horas</b>	100 a	68 a	100 a	78 a

<sup>1</sup>Com desinfestação superficial; <sup>2</sup>Sem desinfestação superficial; <sup>3</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Segundo Valarini & Menten (1991), a técnica de inoculação por contato direto da semente com o patógeno em meio de cultura sem condicionamento fisiológico, permitiu em 48 horas de contato, obtenção de 100% de sementes

infestadas e infectadas, formas de associação mais comuns em sementes que transportam naturalmente patógenos. Além disso, outros autores obtiveram sucesso utilizando essa mesma técnica em sementes de algodão e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Tanaka et al., 1989) e em feijão com *Alternaria* sp. (Rolim et al., 1990).

Portanto, a técnica de inoculação por contato direto da semente com o patógeno em meio de cultura com restrição hídrica, além de possibilitar a ocorrência de sintomas nas plântulas, é eficiente, prática e de fácil execução para estudos relacionados à transmissão de *Cff* pelas sementes, resistência de hospedeiros, controle e importância epidemiológica, visando obtenção de padrões de tolerância, assim como a determinação da sensibilidade de métodos de detecção desse patógeno em sementes.

#### **5.5.4 Emergência de plântulas e incidência de plantas doentes originadas de inoculação artificial**

A percentagem de emergência de plântulas oriundas de sementes inoculadas com *Cff* pela técnica de condicionamento fisiológico utilizando solutos, como o manitol, foi sempre menor, se comparado à testemunha (Tabela 11). Neste ensaio, a restrição hídrica no substrato com manitol proporcionou menor vigor às sementes. A menor percentagem de emergência, verificada aos 7 dias foi da testemunha, meio 523, a 120 horas de exposição, seguida pelo tempo de 24 horas de exposição, apresentando de 26% e 34% de sementes emergidas, respectivamente. Aos 21 dias após emergência, houve a recuperação da testemunha, que apresentou maior percentagem de emergência, com valor de 97%.

Para o tratamento meio 523+manitol com bactéria, a partir de 72 horas de exposição, observou-se a diminuição da emergência de plântulas com o aumento do período de exposição. As avaliações aos 7 e 21 dias após

emergência tiveram o mesmo comportamento, tendo, no tempo de 24 horas, sido observada maior percentagem de emergência, com valores de 28% e 86%, seguido pelo tempo de 48 horas, com valores de 20% e 78%, respectivamente. O tempo de 120 horas propiciou a menor percentagem de emergência de plântula, sendo estatisticamente inferior aos demais valores observados nos tempos de exposição.

**TABELA 11** Valores médios de emergência de plântulas de feijão provenientes de sementes inoculadas artificialmente com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 horas). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamentos	Dap <sup>1</sup>	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Meio 523	7	34 aB <sup>2</sup>	48 aA	46 aA	46 aA	26 aC
Meio 523+man+Cff	7	28 bA	20 bB	8 bD	14 bC	18 bC
Meio 523	21	97 aA	96 aA	91 aB	90 aB	80 aC
Meio 523+man+Cff	21	86 bA	78 bB	64 bD	70 bC	62 bD

<sup>1</sup>Dap: dias após o plantio; <sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Esses resultados reforçam aqueles obtidos no teste de germinação das sementes após o condicionamento osmótico, no qual a incubação das sementes de feijoeiro por maiores tempos de exposição, em substrato agarizado, tanto na presença como na ausência de *Cff*, acelera o processo de deterioração das sementes, prejudicando o posterior desempenho das mesmas, ou seja, a sua qualidade fisiológica. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho (1999), em que períodos de 30, 72 e 120 horas de exposição das sementes ao fungo *C. lindemuthianum* em BDA+manitol não afetaram a emergência das plântulas, ao passo que em 168 horas de exposição houve redução nos valores de emergência de plântulas.

## 6 CONCLUSÕES

O meio 523+manitol, no potencial hídrico de -0,95 MPa, no tempo de 48 horas, foi eficiente para a inoculação artificial de sementes de feijão com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

A técnica de inoculação por contato direto da semente com o patógeno em meio de cultura com restrição hídrica é eficiente em associar a bactéria com a semente, não comprometendo a sua qualidade fisiológica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.3, p.383-388, 1996.
- ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M.; GOMIDE, M.B. **Fisiologia vegetal**. Lavras: UFLA, 1997. 131p.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, v.10, n.1, p.35-42, 2000.
- BAILLY, C.; BOGATEK-LESZCZYNSKA, R.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**, v.12, n.1, p.47-55, 2002.
- BARBOSA, J.F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2007. 137p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, v.19, n.2, p.279-286, 1991.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.
- BOCK, F.L. **Resposta a nível molecular do envelhecimento artificial, natural e pré-condicionamento de sementes de soja**. 1999. 27p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
- BRACCINI, A.L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 135p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hortscience**, v.21, n.5, p.1105-1112, 1986.

BRADFORD, K.J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853p. Cap.13, p.351-396.

BRANDÃO JÚNIOR, D.E. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**: Brasília: DNDV/SNAD/CLAV, 1992. 365p.

BURKHOLDER, W.H. The longevity of the pathogens causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, v.35, n.9, p.743-744, 1995.

BURR, T.J.; REID, C.L.; ADAMS, C.E.; MOMOL, E.A. Characterization of *Agrobacterium vitis* strain from feral *Vitis riparia*. **Plant Disease**, v.83, p.102-107, 1999.

CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMPOS, I.S.; ASSUNÇÃO, M.V. Estresse salino e hídrico na germinação e vigor do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.6, p.857-862, 1990.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.)**. 1990. 121p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Common bean improvement**. Cali, 2002. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/beans/index.htm>>. Acesso em: 31 ago. 2007.

CHAVES, R.C.; UESUGI, C.H. Eficiência do tratamento térmico e químico em semetes de feijão comum na redução de perdas caudadas por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.102, 2004.

CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, v.13, n.3, p.629-41, 1985.

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; COMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Classificação toxonômica das estirpes de rizóbios recomendados para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento de gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.

CIRVILLERI, G.; CATARA, V.; CAÇDARERA, G.; CARISP, P. Genomic fingerprinting o some *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* strains from sicily. **Journal of Plant Pathology**, v.80, p.187-195, 1998.

COLETTA FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.327-334, 2000.

COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium flaccumfaciens*. **Journal General of Microbiology**, v. 129, p.3545-3548, 1983.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através da técnica de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.5, p.1023-1030, 2003.

COUTINHO, W.M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade**. 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. **Euphytica**, v.23, n.3, p.651-656, 1974.

COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Bacterial disease of legumes: breeding and resistance. In: SUMMERFIELD, A.; BUNTING, H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew, Surrey, UK: Royal Botanical Gardens, 1979. p.225-233.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology**, v.1, p.19-21, 1983.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerate aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

DELOUCHE, J.C. Deterioração de sementes. **Seed News**, Pelotas, v.6, n.6, p.24-31, 2002.

DINENSEN, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: INRS, 1978. p.929-933.

DOWSON, W.J. **Plant disease due to bacteria**. Cambridge: Cambridge University, 1957.

DREIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, v.85, n.4, p.462-468, 1995.

DROCHIOIU, G.; CRISTEA, M.; STRAJERU, S. Catalase activity of maize seeds in the process of forced aging. **Cercetari Agronomice in Moldova**, v.26, n.1, p.19-25, 1993.

DUNIWAY, J.M. Water relations of water molds. **Annual Review of Phytopathology**, v.17, n.1, p.431-460, 1979.

DUNLEAVY, J.M. A vascular disease of soybean caused by *Corynebacterium* sp. **Plant Disease Report**, v.47, p.612-613, 1963.

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

EPPO/CABI. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: SMITH, I.M.; MCNAMARA, D.G.; SCOTT, P.R.; HOLDERNESS, M. (Ed.). **Quarantine pests for Europe**. 2<sup>th</sup>ed. Wallingford, UK: CAB International, 1997. p.991-994.

FARIA, M.A.V.R.; VON PINHO, R.G.; VON PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, R.M. **Marcadores moleculares da qualidade de fisiológica das sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003.

FELSKE, A.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; AKKERMANS, A.D.L. Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. **International Journal System. Bacteriology**, v.49, p.113-121, 1999.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION/STAT. **Database collection**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collection?subset=agriculture/2003>>. Acesso em: 10 ago. 2007.

GAO, S.; SHAIN, L. Effect of potential on virulent and hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **Canadian Journal of Forest Research**, v.25, n.6, p.1024-1029, 1995.

GROTH, D.E.; BRAUN, E.J. Survival, seed transmission, and epiphytic development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the North-Central United States. **Plant Disease**, v.73, n.4, p.326-330, 1989.

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

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; SOUZA, R.M. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.94-102, 2000.

HALMER, P.; BEWLEY, D. A physiological perspective on seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v.12, n.2, p.561-575, 1984.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S.; HANDA, A.K. Cellular mechanism of tolerance to water stress. **Hortscience**, v.19, n.3, p.371-377, 1984.

HAYWARD, A.C.; WATERSTON, J.M. *Corynebacterium flaccumfaciens*. **C.M.I. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria**. Kew, Surrey, 1965. n.43.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, v.55, p.433-4, 1922.

- HEDGES, F. Bacterial wilt of bean (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, v.16, n.1, p.1-22, 1926.
- HENNINGSON, P.J.; GUDMESTAD, N.C. Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria. **Journal General of Microbiology**, v.137, p.427-440, 1991.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.81-109, 1993.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v.3, n.1, p.881-888, 1975.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Zürich, 1996. 44p
- JAUNET, T.S.; WANG, J.F. Variation in fenotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, v.89, p.320-327, 1999.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, v.22, n.3, p.531-539, 1994.
- JONES, D. A numerical taxonomy study of coryneform and related bacteria. **Journal General of Microbiological**, v.187, p.52-96, 1975.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KIM, H.M.; SONG, W.Y. Characterization of ribosomal RNA intergenic spacer of several seedborn bacterial pathogens of rice. **Seed Science & Technology**, v.24, p.571-580, 1996.
- KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 125p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 319p.
- LI, X.; DE BOER, S.H. Selection of polimerase chain reaction *primers* from an RNA intragenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* sub. *sepedonicus*. **Phytophatology**, v.85, p.837-842, 1995.
- LEITE Jr, R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v.79, p.917-922, 1995.
- LEITE, R.P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S.R.; BIANCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *Flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.303-304, 2001.
- LIMA, S.M.P. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro: efeitos na germinação, vigor e formação de mudas**. 2001. 161p. (Mestrado em Agronomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LOCCI, R.; FIRRAO, G.; PERTOLINI, B.; SARDI, P. Numerical taxonomy of phytopathogenic corynebacterium. **Annual Microbiology Enzimology**, v.39, p.59-92, 1989.
- LODHI, M.A.; GUANG-NING Y.E.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.6-13, 1994.
- FILHO, R.J.M.; UESUGI, C.H. Comportamento de diferentes espécies vegetais em relação a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolada de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.92, 2004.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.88-94, 2001a.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.95-101, 2001b.
- MACHADO, A.Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002a. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- MACHADO, J.C. Métodos de detecção de pragas não quarentenárias associadas às sementes, com potencial de regulamentação no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTE, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e Palestras...** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2002b. 198p.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.62-67, 2004a.
- MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M. ; VIEIRA, M.G.G.C. ; SOUZA, R M; POZZA, E.A. Use of water restriction technique in seed pathology. **Seed Testing International**, n.128, p.14-18, 2004b.
- MADDOX, D.A. Implications of new technologies for seed health testing and the worldwide movement of seed. **Seed Science Research**, v.8, p.277-284, 1998.
- MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.86, p.63-69, 1996.
- MANULIS, S.; KOGAN, N.; VALINSKY, L.; DROR, O.; KLEITMAN, F. Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* in gypsophila plants by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.85-91, 1998.
- MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Mariano, 2000. 171p.
- MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, v.23, p.160-2, 1997.
- MARINGONI, A.C. **Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à *murchade-curtobacterium***. 2000. 73p. Tese (Livre-Docência) – Universidade De São Paulo, Botucatu, SP.

MARQUES, A.S.A.; PARENTE, P.M.G.; MACHADO, F.O.C.; SANTANA, C.R. Avaliação de métodos de inoculação na produção de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* para fins experimentais. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.2, p.178-182, 1994.

McDONALD, M.B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v.8, p.265-275, 1998.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.27, n.1, p.177-237, 1999.

McDONALD, J.H.; WONG, E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.17-22, 2000.

MEXAL, J.; FISCHER, J.T.; OSTERYONG, J.; REID, C.P.P. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant water relations. **Plant physiology**, v.55, n.1, p.20-24, 1975.

MEXAL, J.; REID, C.P.P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. **Canadian Journal of Botany**, v.51, n.9, p.1579-1588, 1973.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, n.1, p.126-130, 1995.

MIZUNO, A.; NOZU, Y.; KADOTA, I.; NISIYAMA, K. The monoclonal antibodies against protein complex derived from *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. **Annual Phytopathology Society Japan**, v.61, p.69-74, 1995.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.219-226, 2003.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.

NUNES, L.M.; BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Especificidade de *primers* para identificação e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* por PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.243, 2004.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London, Mac Millan, 1979. 839p.

OH, C.; HEU, S.; CHOI, Y.; OH, C.S.; HEU, S.G.; CHOI, Y.C. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris pv. glycine* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. **Plant Pathology Journal**, v.15, n.1, p.57-61, 1999.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PADILHA, L.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.198-204, 2001.

PERTEL, J. **Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PILL, W.G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: BARSA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1994. Cap.10, p.319-359.

PHANG, P.D.; GUTENMAHER, P.; MOELA, I. Resistance to bacterial rots in some French bean. **Lucrari Stiintifice**, v.17, p.45-48, 1974.

PRISCO, J.T.; OLEARY, J.W. Osmotic and 'toxic:' effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, v.20, n.2, p.177-184, 1970.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.J.; SCHAAD, N.W. Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by DNA amplification. **Phytopathology**, v.81, p.1159, 1991.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W.; PANOPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.965-970, 1993.

PUNTARALO, S.; BOVERIS, A. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxyde metabolism of soybean embrionic axes. **Plant Science**, Amsterdam, v.68, n.1, p.27-32, 1990.

RASSMUSEN, O.F.; WULFF, B.S. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* using PCR. In: INTERNATIONAL WORKING GROUP ON *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* PHATOVARS, 4., 1990, Stamperia Granducale. **Proceedings...** Stamperia Granducale, Florence, 1990. p.369-376.

REEVES, J.C. Comparative tests for the detection *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. In: KOENRAADT, H.; HUTCHINS, J.D. (Ed.). **Seed health testing: progress towards the 21<sup>st</sup> century**. Wallingford: CAB International, 1997. p.205-209.

RICHARD, S.F.; WALKER, J.C. Mode of inoculation and host nutrition in relation to bacterial wilt of bean. **Phytopathology**, v.55, p.174-178, 1965.

ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R.L.D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial planta pathogens in Brasil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANTA PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1982, Cali. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1982.

ROLIM, P.R.R.; CENTURION, M.A.P.C.; MENTEN, J.O.M. *Alternaria* sp. em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*): incidência na semente, tipos morfológicos, patogenicidade e transmissibilidade de diferentes isolados. **Summa Phytopatologica**, v.16, p.130-139, 1990.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 2000. 283p

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 297p.

SAETTLER, A.W.; PERRY, S.K. Seed-transmitted bacterial diseases in *Michigan navy* (pea) beans, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease Report**, v.56, p.378-381, 1972.

SAETTLER, A.W. Disease caused by bacteria. In: HALL, R. **Compendium of bean diseases**. APS: St. Paul, 1991. p.23-32.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. APS: St. Paul, 1989. 122 p.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, v.3, n.2 p.106-118, 1998.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SAMBROOK, J.; FRISTSH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.2.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

SCHOONHOVEN, V.A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijól**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. 56p.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANAPOULOS, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, v.85, p.243-248, 1995.

SCHAAD, N.W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373p.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W.L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M.D.; LUSTER, D.G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.305-324, 2003.

SILVA, E.A.A. **Interferência de microorganismos nos padrões isoenzimáticos e protéicos de sementes e coleótilos de milho.** 1997. 78p. Dissertação (Mestrado em Agromomia. Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SHATTERS JR, R.G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, v.4, n.1, p.33-41, 1994.

SHIOGA, P.S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1990. 106p. Dissertação (Mestrado em Agromomia. Fitotecnia) – Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

SCHUSTER, M.L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. **Plant Disease Report**, v.43, p.25-32, 1959.

SCHUSTER, M.L.; CHRISTIANSEN, D.W. An orange colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt. **Phytopathology**, v.47, p.51-53, 1957.

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

SCHUSTER, M.L.; VIDAVER, A.K.; MANDEL, M. A purple-pigment-producing bean bacterium *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, p.423-427, 1968.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with lost of viability of stored desiccations tolerant and desiccations sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination.** New York: Basel-Hang Yong, 1995. p. 701-746.

SMITH, I.M.; McNAMARA, D.G.; SCOTT, P.R.; HOLDERNESS, M. (Ed.). **Quarantine Pests for Europe: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*.** 2<sup>th</sup>ed. Wallingford: CAB International, 1997. p.991-994.

SOMMERS, L.E., HARRIS, R.F., DALTON, F.N.; GARDNER, W.R. Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora* species.

**Phytopathology**, v.60, p.932-934, 1970.

SOUZA, F.H.D.; MARCOS FILHO, J.; NOGUEIRA, M.C. Características físicas das sementes de *Calopogonium mucunoides* Desv. associadas à qualidade fisiológica e ao padrão de absorção de água. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, n.1, p.33-40, 1996.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v.57, n.2. p.263-270, 2000.

STARR, M.P.; MANDEL, M.; MURATA, N. The phytopathogenic bacteria in the light of Dna base composition and DNA-DNA segmental homology. **Journal General of Microbiology**, v.21, p.13-26, 1975.

SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T.; TSUYUMU, S.; IEKI, H. Comparison of 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**, v.84, p.15-18, 2000.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.94-104, 1995.

SUNG, J.M.; CHIU, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, Clare, v. 110, n. 1, p. 45-52, 1995.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MARIANO, M.I.A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção de sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v.15, p.233-237, 1989.

TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.3, p.218-226, 1991.

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

- THOMAS, J.C.; SEPAHI, M.; ARENDALL, B.; BOHNERT, H.T. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v.18, n.7, p.801-806, 1995.
- TORRES, G.C.; LENNE, JM.; VICTORIA, J.I.; LOZANO, J.C. Bacterial wilt of *Zornia* spp. Caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5, 1981, Cali. **Anais...** Cali: CIAT, 1982. p.74-79.
- UESUGI, C.H.; FREITAS, M.A.; MENESES, J.R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.3, p.324, 2003.
- VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.1, p.227-231, 1991.
- VAN DER WOLF, J.M.; IMÁN, L.J. JONES, D.A.; GREVESSE, C.; VAN BECKHOVEN, J.R.; VAN VUURDE, J.W.; PEROMBELON, M.C. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. **Journal Applied Bacteriology**, v.80, p.487-495, 1996.
- VANSCHOONHVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Sistema estándar para la evolución de germoplasma de frijol**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. 56p.
- VASQUEZ, G.H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja**: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento. 1995. 138p. Dissertação (Mestrado em Agromomia. Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- VANTOAI, T. T.; FAUSEY, N. R.; MCDONALD JUNIOR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, v.102, n.1, p.33-39, 1987.
- 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**, v.79, p.966, 1995.

VIEIRA, C.; PAULA, J.T.J.; BOREM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MANN, R.S. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores moleculares de proteínas e enzimas visando à certificação da pureza genética. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n.2, p.35-42, 2001.

VIEIRA, M. G. C. G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 127p. Tese (Doutorado em Agromonia. Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, R.F.; SARTORATO, A. **Recomendações técnicas para produção de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) de alta qualidade**. Goiânia: EMBRAPA/CNPAP, 1984. 46p. (Circular Técnica, 10).

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v.8, n.2, p.223-244, 1998.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, v.48, p.245-252, 1999.

WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, v.70, n.2, p.148-152, 1980.

WENKERT, W.; LEMON, E. R.; SINCLAIR, T.R. Leaf elongation and turgor pressure in field; grown soybean. **Agronomy Journal**, v.70, n.5, p.761-764, 1978.

YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on *Corynebacterium* bacteria: Parte IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics. Part V. Classification of coryneform bacteria. **Journal General Microbiological**, v.18, p.399-431, 1972.

ZAUMEYER, W.J. Comparative pathological histology of three bacterial disease of bean. **Journal of Agriculture Research**, v.44, p.605-632, 1932.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. A monographic study of bean disease and methods of their control. **U.S. Department Agriculture Technical Bulletin**, v.868, p.84-88, 1957.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORRAMURA, Y. I.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wellingford, v.4, n.1, p. 49-56, Mar. 1994.

ZHAO, Y.F.; WEI, Y.; GAO, C.S.; ZHAO, L.Z.; HUANG, G.M.; HUANG, Q.L. Using the Biolog identificação system for rapid identification of bean wilt bacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*). **Acta Phytopathology Sínica**, v.27, p.139-144, 1997.

## **CAPÍTULO 3**

### **OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA A DETECÇÃO DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

## 1 RESUMO

Deuner, Carolina Cardoso. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão. In: \_\_\_\_\_. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão.** 2007. Cap.3. p.99-118. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O objetivo deste trabalho foi otimizar uma técnica para detecção de *Cff* em sementes de feijão, empregando-se PCR. Dois pares de *primers* descritos na literatura para a detecção dessa bactéria foram comparados: CF<sub>4</sub>-CF<sub>5</sub>, desenvolvido a partir de biblioteca cromossomal e construído em plamídeo e *Cff*FOR2-REV4, desenhado a partir do fragmento amplificado via PCR baseado na seqüência repetitiva (Rep-PCR). O par de *primers* *Cff*FOR2-REV4 foi selecionado neste estudo por demonstrar maior repetibilidade e eficiência na detecção dos isolados de *Cff* em sementes de feijoeiro. Avaliaram-se também quatro métodos de preparação dos extratos de sementes de feijão para a obtenção de *Cff* por meio da PCR: 1) extrato bruto de sementes; 2) extrato concentrado por filtração em membrana milipore (0,22 $\mu$ m de diâmetro) e ressuspensão em água; 3) extrato concentrado por centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos e 4) Bio-PCR. Dentre esse métodos, tanto a Bio-PCR quanto a concentração do extrato por centrifugação, seja no volume de 20 ou de 80 mL, amplificaram o segmento de DNA de 306 pb, característico de *Cff*. Essas duas técnicas, além de detectar a bactéria, apresentam alta sensibilidade, detectando até uma semente contaminada artificialmente com *Cff* em meio com restrição hídrica em 999 sementes sadias. Portanto, foi possível otimizar uma técnica para a detecção de *Cff* rápida, sensível, confiável e de fácil execução, que poderá vir a ser utilizada rotineiramente em laboratórios de análises de sementes.

\*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

## 2 ABSTRACT

Deuner, Carolina Cardoso. Optimizing PCR technique to detect *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. In: \_\_\_\_\_. **Artificial inoculation and detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds**. 2007. Chap.3, p.99-118. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The objective of this work was to optimize a technique to detect *Cff* in bean seeds using PCR. Two pairs of primers described in the literature for the detection of this bacterium were compared: CF<sub>4</sub>-CF<sub>5</sub>, developed from the chromosomal library and built in a plasmid and *Cff*FOR2-REV4, designed from an PCR amplified fragment of the conserved repetitive sequence (Rep-PCR). The primer pair *Cff*FOR2-REV4 was selected in this study, because demonstrated higher reproducibility and efficacy in the detection of *Cff* strains in bean seeds. Four methods were also evaluated in the seed extract preparation for PCR: 1) rough seed extract; 2) millipore membrane filter (0.22 $\mu$ m diameter) concentrated seed extract and subsequently resuspended in water; 3) centrifuge concentrated seed extract (8,000 RPM for 15 minutes; 4) Bio-PCR. Among those methods, either Bio-PCR or centrifuge concentrated extract, in a total 20 or 80 mL suspension volume, produced a 306bp DNA fragment, diagnostic for *Cff*. Those two techniques detected the bacterium and presented high sensitivity, detecting up to 1 *Cff* physiological conditioning artificially contaminated seed in a total 999 healthy ones. Therefore, a technique for *Cff* detection could be optimized resulting in a rapid, sensitive, reliable and easy-to-perform technique recommended for routine use in seed laboratory analysis.

\*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Antonia dos Reis Figueira – UFLA e José da Cruz Machado – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

As sementes constituem um meio ideal de sobrevivência de fitobactérias, as quais podem permanecer viáveis em seu interior por vários anos (Basu & Wallen, 1966; Schuster & Sayre, 1967) e serem disseminadas, de forma eficiente, a longas distâncias, podendo ser introduzidas em áreas onde a enfermidade não existe (Watson, 1970) ou servir como fonte de inóculo inicial para o progresso de epidemias sob condições de campo (Neergaard, 1979).

O uso de sementes livres do patógeno é uma das estratégias mais eficientes de controle da murcha-de-*Curtobacterium* em feijão, porém, esse processo é dependente da confiabilidade dos métodos empregados para a sua detecção.

Atualmente, existe a necessidade de se desenvolver métodos rápidos e precisos para a detecção de fitobactérias em sementes. Para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, existem poucos métodos descritos na literatura. Os mais adotados atualmente são: exame visual, isolamento direto, testes de aglutinação e imunofluorescência, avaliação da patogenicidade em plantas hospedeiras (Tegli et al., 2002), plaqueamento de sementes em meio seletivo (Behlau & Leite, 2003) e inoculação de plantas de feijoeiro com o líquido de maceração de sementes (European and Mediterranean Plant Pathology Organization, EPPO, 1994).

Esses métodos, embora ainda em uso, apresentam vários inconvenientes, como, por exemplo, baixa sensibilidade, consumo excessivo de tempo e espaço físico, podendo, ainda, ocorrer resultados falso-positivos. Além disso, outras características limitam o uso de algumas técnicas, como custo de implantação, tempo dispensado para obtenção dos resultados, espectro de uso ou dificuldade para diferenciar isolados em patovares. Além disso, a análise de um grande número de sementes requer grande quantidade de materiais e espaço, além de

consumir tempo e dinheiro para ser empregada como rotina em laboratórios de sanidade de sementes (Sheppard et al., 1989). Portanto, a sensibilidade e a rapidez nos resultados são importantes ferramentas na escolha de um método de detecção, principalmente para análises de rotinas em laboratórios credenciados (Machado, 2002).

Avanços recentes na biologia molecular estão permitindo o desenvolvimento de métodos para a detecção de patógenos em plantas e sementes com o objetivo de serem usados como rotina em laboratórios de diagnose. Esses métodos têm a característica de serem rápidos, sensíveis e específicos, permitindo economia de tempo e dinheiro nas identificações. Alguns pesquisadores têm utilizado a técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (PCR), para a detecção e diagnóstico de algumas fitobactérias.

Sua aplicação é fundamental para a certificação de sementes e as inspeções quarentenárias, em que a sensibilidade é um requisito fundamental e a diferenciação dos patógenos é requerida em nível intraespecífico.

Atualmente existem dois pares de *primers* para a detecção de *Cff*: um desenvolvido por Guimarães et al. (2001) (CF4-CF5), a partir de biblioteca cromossomal, construído em plamídeo, e outro desenhado por Tegli et al. (2002) a partir do fragmento amplificado via PCR baseado na seqüência repetitiva (Rep-PCR).

O objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de PCR para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão, utilizando-se a PCR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolados de *Cff*

Foram utilizados neste estudo sete isolados brasileiros de *Cff*, sendo um isolado proveniente dos estados de Goiás, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal e dois de Minas Gerais, dos municípios de Patrocínio e Unaí (Tabela 1). Esses isolados foram preservados em peptona glicerol, a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987).

**TABELA 1** Origem dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Isolado	Origem	Doador	Ano	Código
Unb-1252	Goiás	C.F. Uesugui (UNB)	2005	<i>Cff</i> GO
Feij-2936	Distrito Federal	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> DF
<i>Cff</i> 001	Minas Gerais	C.C.Deuner (UFLA)	2005	<i>Cff</i> MGP
<i>Cff</i> 002	Minas Gerais	C.C.Deuner (UFLA)	2005	<i>Cff</i> MGU
12768	Paraná	R.P. Leite Jr. (IAPAR)	2000	<i>Cff</i> PR
Feij-2928	Santa Catarina	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SC
Feij-2634	São Paulo	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SP

### 4.2 Lotes de sementes inoculadas artificialmente com *Cff*

As sementes de feijão foram inoculadas artificialmente com *Cff*, conforme descrito no item 5.4 do capítulo 2.

As amostras analisadas consistiram de 1.000 sementes. Foram aplicados 3 tratamentos, sendo o primeiro composto de 1.000 sementes sadias, o segundo por 1 semente inoculada artificialmente com *Cff* para 999 sadias e o terceiro por 2 sementes inoculadas artificialmente com *Cff* para 998 sadias.

### 4.3 Primers e reação de amplificação

Neste estudo compararam-se dois *primers* descritos na literatura para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão, aqueles desenvolvidos por Tegli et al. (2002), *Cff*FOR2-5'

TTATGACTGAACTTCACTCC 3' e *Cff*REV4-5'  
GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3' e os desenhado por Guimarães et al. (2001),  
CF4-5' CACAGCCACCTACATGC 3' e CF5-5' ATCGGGAGTCCGAG 3'

Suspensões de cada um dos sete isolados foram testadas com os dois pares de *primers* descritos na literatura para a detecção de *Cff*.

As reações de amplificação do DNA para os dois *primers* CF4-CF5 e *Cff*FOR2-REV4 foram realizadas em volume de 50 µL, sendo 5 µL do DNA da amostra, 5 µL do Tampão PCR 1X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 2 µL de dNTPs (200 µM), 2 µL de cada *primer* (0,4 µM) e 1 µL de Taq polimerase (5 U/µL), completando-se o volume com água ultrapura.

Para os *primers* de Guimarães et al. (2001), o ciclo utilizado para a amplificação foi de 2 minutos, a 96°C, desnaturação inicial; 30 segundos, a 94°C, desnaturação; 30 segundos, a 55°C, anelamento; 30 ciclos de 30 segundos, a 72°C, extensão e 10 minutos, a 72°C, para extensão final. Para os *primers* de Tegli et al. (2002), o ciclo utilizado foi de 3 minutos, a 96°C, desnaturação inicial; 30 ciclos de 3 minutos, a 94°C, desnaturação; 45 segundos, a 62°C, anelamento; 30 segundos, a 72°C; extensão e 5 minutos, a 72°C, para extensão final.

#### 4.4 Eletroforese e fotodocumentação

Ao final da reação de amplificação, testaram-se dois volumes diferentes do produto da PCR, 5µL e 20 µL de cada amostra, acrescidos de 4 µL do corante azul de bromofenol, por eletroforese em gel de poliacrilamida (1%). O gel foi submetido à coloração com corante fluorescente para ácidos nucleicos em água (Uniscience do Brasil) para a visualização das bandas e fotodocumentação. A visualização e a documentação do gel foi realizada pelo programa de captura de imagens LisCap Version 2.0. Foi utilizado um marcador de peso molecular de

1.000 pb (Jena Bioscience) para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados.

#### **4.5 Preparo dos extratos de sementes para detecção de *Cff***

Nesses ensaios, foram utilizadas sementes de feijão cultivar Pérola inoculados artificialmente pelo método de condicionamento fisiológico utilizando-se o restritor manitol no potencial hídrico de -0,95 MPa, no tempo de 48 horas de exposição.

##### **4.5.1 Extrato bruto de sementes**

Para a obtenção dos extratos brutos, amostras de 1.000 sementes de feijão de cada tratamento foram imersas em 500 mL de água destilada esterilizada, por, aproximadamente, 18 horas, à temperatura de 4°C. Após esse procedimento, 5 µL dos extratos obtidos foram utilizados diretamente para amplificação por PCR, conforme itens 4.3 e 4.4.

##### **4.5.2 Extrato concentrado em membrana milipore**

Dos extratos brutos de sementes, retiraram-se 20 mL, os quais foram filtrados em membrana Millipore com 0,22 µm de diâmetro de poro. Em seguida, essas membranas foram lavadas com 3 mL de água ultrapura, visando recuperar as células bacterianas. Após esse procedimento, 5 µL da suspensão obtida da lavagem das membranas foram utilizados diretamente na reação de PCR, conforme itens 4.3 e 4.4.

##### **4.5.3 Extrato concentrado por centrifugação**

Para a obtenção dos extratos concentrados por centrifugação, foram utilizados dois volumes diferentes dos extratos brutos, 20 mL e 80 mL, os quais foram centrifugados, a 8.000 rpm, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, os

sobrenadantes foram descartados e os sedimentados ressuspendidos em 3 mL de água ultrapura, sendo 5 µL utilizados diretamente na reação de PCR, conforme itens 4.3 e 4.4.

#### 4.5.4 Bio-PCR

Alíquotas de 500 µL dos extratos brutos foram retiradas e, a partir desse volume, procedeu-se a diluição em série. Posteriormente, 100 µL das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foram plaqueados no meio seletivo CNS (Schaad et al., 2001). As placas foram incubadas a 28°C, por 48-72 horas. Após o crescimento das colônias típicas, adicionaram-se às placas de Petri 3 mL de água ultrapura, obtendo-se as suspensões bacterianas. Após esse procedimento, 5 µL das suspensões bacterianas foram utilizados diretamente para amplificação por PCR, conforme itens 4.3 e 4.4.

#### 4.6 Detecção de *Curtobacterium flaccumfacies* pv. *flaccumfaciens* em lotes comerciais

Foram utilizados, neste trabalho, lotes comerciais de sementes de feijão cultivar Carioca, provenientes de municípios do estado de Minas Gerais (Tabela 2). Os métodos de detecção de DNA de *Cff* serão escolhidos após otimização da técnica.

**TABELA 2** Procedência de lotes comerciais de sementes de feijão analisados para a presença de *Curtobacterium flaccumfacies* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Lote	Município	Lote	Município
1	Janaúba - “Piranhas”	6	Grão Mogol - “Extrema”
2	Taiobeiras - “Rocha”	7	Botumirim - “Canastra”
3	Porteirinha- “Áreas”	8	Salinas
4	Jaíba - “Projeto Jaíba”	9	Rio Pardo de Minas
5	Espinosa	10	Riacho dos Machados - Tapera”

## 5 RESULTADOS E DISCUSÃO

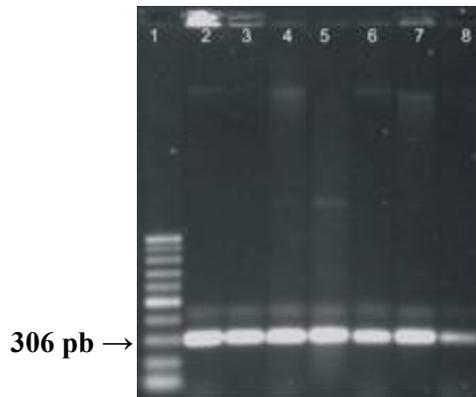
Nos ensaios nos quais utilizou-se *Cff*FOR2-REV4 houve maior repetibilidade dos resultados, além de se observar a presença de bandas mais visíveis nos sete isolados de *Cff* testados, quando comparado com o outro *primer*. Aqueles desenvolvidos por Guimarães et al. (2001) (CF<sub>4</sub>-CF<sub>5</sub>), em alguns casos, não detectaram o isolado proveniente do estado de São Paulo (Feij-2634), comprometendo, assim, a repetibilidade do estudo.

Os resultados obtidos neste estudo concordam com aqueles observados por Souza et al. (2004, 2006), que também compararam esses dois pares de *primers* e concluíram que *Cff*FOR2-REV4 foi altamente específico na detecção de todos os isolados de *Cff* de feijoeiro, não detectando os isolados endofíticos de citros, mostrando que esses são os *primers* mais indicados para a detecção de isolados fitopatogênicos de *Cff*.

### 5.1 Otimização da técnica de PCR

Amplificações realizadas com os *primers* *Cff*FOR2 e *Cff*REV4, em condições ótimas de PCR, confirmaram a presença de fragmentos específicos de DNA com 306 pb em alguns tratamentos. Esses *primers* foram eficientes na identificação de *Cff*, após a adaptação do protocolo utilizado por Tegli et al. (2002), pois a temperatura de desnaturação de 96°C, utilizada pelos autores, não permitiu a repetibilidade dos resultados. Porém, quando se reduziu a temperatura de desnaturação para 94°C, verificou-se a amplificação do fragmento específico de DNA com 306 pb, obtendo-se repetibilidade nos resultados. Essas adaptações foram necessárias, pois as condições de reação e os isolados utilizados nos dois trabalhos são distintos.

Na Figura 1, observa-se a análise eletroforética dos produtos amplificados por PCR para a confirmação da identidade dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* utilizados neste trabalho.



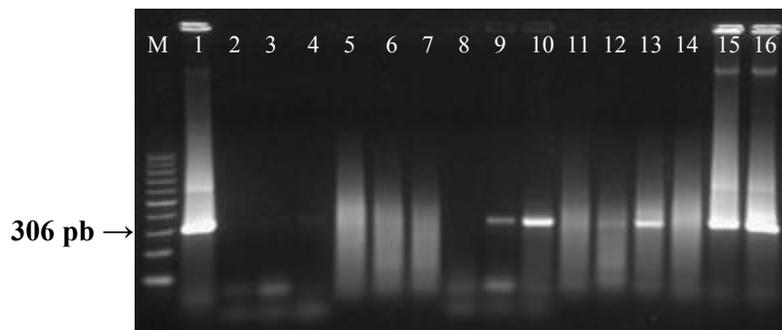
**FIGURA 1** Análise eletroforética em gel de agarose (1%) de 5 $\mu$ L dos produtos amplificados por PCR para a confirmação da identidade dos isolados *Cff* utilizando-se os *primers* descritos por Tegli et al. (2003). Legenda: 1 marcador de DNA (Jena Bioscience); 2 *Cff* SP - Feij-2634; 3 *Cff* SC - Feij-2928; 4 *Cff* DF - Feij-2936; 5 *Cff* PR - 12768; 6 *Cff* GO - Unb-1252; 7 *Cff* MGP - *Cff* 001; 8 *Cff* MGU - *Cff* 002. UFLA, Lavras, MG, 2007.

## 5.2 Detecção de *Cff* nos extratos de sementes

A utilização do extrato bruto de sementes na PCR não permitiu detectar a presença da bactéria *Cff*, independente do número de sementes infectadas (Figura 2). Provavelmente, a presença de inibidores da PCR nesse extrato impediu o resultado positivo.

Fato semelhante foi observado por Schaad et al. (1997), ao tentarem detectar a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* diretamente do extrato de sementes. Entretanto, essa inibição pode ser superada e ter a sensibilidade aumentada por meio do cultivo da bactéria em meio de cultura antes da PCR. Esta técnica foi descrita por Schaad et al. (1995) e tem como terminologia a sigla BIO-PCR. No presente trabalho, a Bio-PCR permitiu a amplificação do segmento de DNA de 306 pb de até 1 semente sadia em 999 inoculadas

artificialmente com *Cff*. Segundo Audy et al. (1996), a utilização de kits específicos para a purificação dos extratos de sementes e posterior detecção pela PCR é possível, entretanto, trata-se de uma técnica onerosa e que requer certo período de tempo.



**FIGURA 2** Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) de 5 $\mu$ L dos produtos amplificados pelos diferentes métodos de obtenção de *Cff*; M, marcador de DNA (Jena Bioscience); 1. *Cff* SC - Feij-2928; 2. Test<sup>1</sup> eb; 3. (1:1000)<sup>2</sup> eb; 4. (2:1000)<sup>3</sup> eb; 5. Test ef; 6. (1:1000) ef; 7. (2:1000) ef; 8. Test C80; 9. (1:1000) C80; 10. (2:1000) C80; 11. Test C20; 12. (1:1000) C20; 13. (2:1000) C20; 14. Test BioPCR; 15. (1:1000) BioPCR; 16. (2:1000) BioPCR. <sup>1</sup>Test=1000 sementes sadias; 2(1:1000)=1 semente contaminada em 999 sadias; 3(2:1000)=2 sementes contaminadas em 998 sementes sadias, eb=extrato bruto, ef=extrato filtrado em milipore, C80=80 mL de extrato centrifugado, C20=20 mL de extrato centrifugado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Com relação à concentração por filtração em membrana milipore, acredita-se que as células ficaram presas na membrana, apresentando, assim, resultados negativos. Porém, novos estudos serão feitos visando superar esse problema, como, por exemplo, proceder a agitação da membrana em tampão por mais tempo após as filtrações, permitindo a liberação das células bacterianas.

A concentração do extrato por centrifugação, no volume de 80 mL, permitiu a amplificação do segmento de DNA de 306 pb, indicando que essa técnica, bem como a BioPCR, além de detectar a bactéria, apresenta alta sensibilidade, permitindo a detecção até de uma semente contaminada

artificialmente com *Cff* em 999 sementes sadias. Já a concentração do extrato por centrifugação, no volume de 20 mL, mostrou ser menos sensível por detectar somente duas sementes contaminadas artificialmente com *Cff* em 998 sementes sadias. Esses resultados corroboram com os de Prosen et al. (1993) que relataram a detecção da bactéria *P. syringae* pv. *phaseolicola* em extratos de sementes de feijão contendo uma semente inoculada artificialmente em 2.000 consideradas sadias. Essa detecção foi realizada por meio da técnica de PCR, a partir de colônias crescidas em meio de cultura semi-seletivo.

Para a detecção de *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura da folha da cana-de-açúcar, foram comparadas a eficiência e a segurança da PCR, BIO-PCR, ELISA e o isolamento clássico. As suspensões de *X. albilineans* foram preparadas a partir de extratos de toletes e de folha de cana-de-açúcar. A PCR clássica e a BIO-PCR apresentaram como vantagem a não necessidade dos testes de patogenicidade para se confirmar a identidade das colônias. O meio semi-seletivo foi tão sensível quanto a BIO-PCR, entretanto, sete dias foram necessários para a obtenção dos resultados, além da necessidade de se confirmar a identidade das colônias (Wang et al., 1999).

Na literatura, existem alguns protocolos de BIO-PCR desenvolvidos para várias bactérias, como *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Schaad et al., 1995), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Kobayashi, 2002), *Clavibacter michigenensis* subsp. *sepedonicus* (Schaad et al., 1999), *Ralstonia solanacearum* (Weller et al., 2000 a; b), *Xanthomonas albilineans* (Wang et al., 1999), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Schaad et al., 2001), *Agrobacterium tumefaciens* (Weller & Stead, 2002) e *E. coli* (Sharma & Carlson, 2000).

Neste estudo, quando se analisa a detecção de *Cff*, observa-se que a BIO-PCR foi tão eficiente e sensível quanto o método de concentração do extrato por centrifugação. Entretanto, sete dias foram necessários para a obtenção dos mesmos resultados. A Bio-PCR é uma técnica precisa, sensível e fácil de ser

executada em exames de rotina. Detecta apenas células viáveis, devido ao fato de que células fisiologicamente enfraquecidas, injuriadas e mortas não podem se multiplicar no meio de cultura (Schaad et al., 1995; 1997; Wang et al., 1999). Porém, requer, na confecção do meio de cultura, reagentes e antibióticos importados e de custos elevados, tornando seu custo bastante elevado. Segundo Schaad et al. (1995), a principal vantagem da técnica de Bio-PCR sobre a PCR clássica é a eliminação de inibidores presentes em extratos de sementes, além de aumentar a sensibilidade da detecção em lotes de sementes com baixos níveis de bactérias.

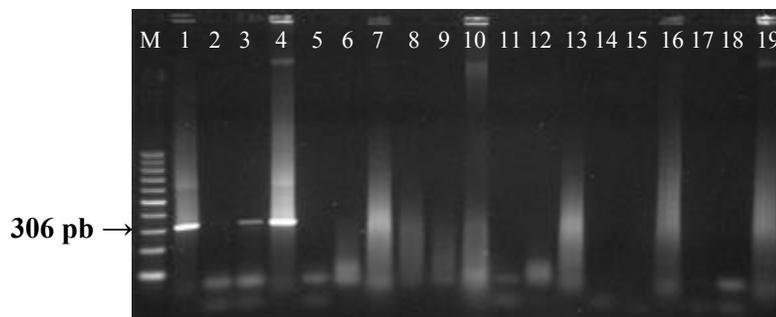
O enriquecimento de células viáveis de bactérias em meio líquido ou sólido permite a detecção do patógeno, mesmo quando presente em baixos níveis nas sementes ou outros materiais de propagação (Schaad et al., 1995). Para o preparo de uma amostra, o extrato da planta é depositado sobre o meio líquido ou sólido, incubado de 15 a 72 horas, dependendo do organismo e as colônias resultantes usadas diretamente na PCR. Não é necessária a extração do DNA das bactérias, uma vez que a lise das células ocorrerá naturalmente durante a desnaturação inicial da amplificação (Schaad et al., 1995).

No presente trabalho, a concentração do extrato de sementes por centrifugação e a posterior ressuspensão em tampão minimizaram os efeitos dos inibidores da PCR, surgindo, portanto, como uma técnica bastante viável e promissora na detecção da bactéria em lotes de sementes.

Apesar das vantagens da Bio-PCR, este trabalho mostra que a técnica de concentração do extrato por centrifugação é mais vantajosa por não requerer reagentes caros para o meio de cultura e por demandar menos tempo para a obtenção dos mesmos resultados. Portanto, quando o tempo é mais importante do que a sensibilidade da técnica, BIO-PCR não é recomendado (Schaad et al., 1995). Sendo assim, fica evidente que as técnicas de detecção devem se adequar ao objetivo do estudo, considerando, sempre, eficiência e rapidez nos resultados.

### 5.3 Detecção de *Cff* em lotes comerciais de sementes de feijão

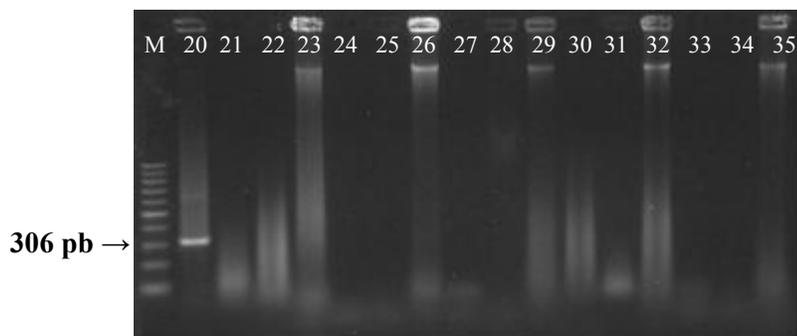
Observa-se, na Figura 3, que, para o isolado proveniente do estado de Santa Catarina (*Cff* SC) e os tratamentos, no qual se utilizou 1 semente inoculada artificialmente com *Cff* para 999 sementes sadias (1:1000), independente da técnica de extração de DNA de *Cff* utilizada, houve amplificação do segmento de DNA de 306 pb. Para as amostras de lotes comerciais de sementes de feijão, nenhuma das técnicas detectou a presença da bactéria. Isso pode ter ocorrido devido à ausência dessa bactéria nos lotes comerciais. Na Figura 4, também não foi detectada a presença de *Cff* nos lotes comerciais.



**FIGURA 3** Análise eletroforética, em gel de agarose (0,7%), de 5 $\mu$ L dos produtos amplificados pelos diferentes métodos de obtenção de *Cff*; M, marcador de DNA (Jena Bioscience); 1. *Cff* SC - Feij-2928; 2. (1:1000)<sup>2</sup> eb; 3. (1:1000) C80; 4. (1:1000) BioPCR; 5. Lote 1 eb; 6. Lote 1 C80; 7. Lote 1 BioPCR; 8. Lote 2 ep; 9. Lote 2 C80; 10. Lote 2 BioPCR; 11. Lote 3 eb; 12. Lote 3 C80; 13. Lote 3 BioPCR; 14. Lote 4 eb; 15. Lote 4 C80; 16. Lote 4 BioPCR; 17. Lote 5 eb; 18. Lote 5 C80; 19. Lote 5 BioPCR. <sup>1</sup>Test=1000 sementes sadias; 2(1:1000)=1 semente contaminada em 999 sadias; C80=80 mL de extrato centrifugado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Prosen et al. (1993) relataram a detecção de *P. syringae* pv. *phaseoli* em extratos de sementes de feijão contendo uma semente inoculada artificialmente em 2.000 consideradas sadias. A partir da extração do DNA de seis lotes testados, dois lotes não apresentaram amplificações, sendo possível que a semente infectada adicionada a esses lotes apresentasse baixa população do

patógeno. Estes mesmos autores relataram que o limite de detecção para esses extratos foi de 10-20 u.f.c./mL e que a possibilidade de epífitas presentes até concentrações  $\geq 10^4$  u.f.c./mL não interferiu na detecção, mesmo quando o patógeno estava presente em concentrações  $\leq 30$  u.f.c./mL.



**FIGURA 4** Análise eletroforética, em gel de agarose (0,7%), de 5 $\mu$ L dos produtos amplificados pelos diferentes métodos de obtenção de *Cff*; M, marcador de DNA (Jena Bioscience); 20. *Cff* SC - Feij-2928; 21. Lote 6 eb; 22. Lote 6 C80; 23. Lote 6 BioPCR; 24. Lote 7 eb; 25. Lote 7 C80; 26. Lote 7 BioPCR; 27. Lote 8 eb; 28. Lote 8 C80; 29. Lote 8 BioPCR; 30. Lote 9 eb; 31. Lote 9 C80; 32. Lote 9 BioPCR; 33. Lote 10 eb; 34. Lote 10 C80; 35. Lote 10 BioPCR. <sup>1</sup>Test=1000 sementes sadias; 2(1:1000)=1 semente contaminada em 999 sadias; C80=80 mL de extrato centrifugado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Portanto, as técnicas moleculares surgem como importantes ferramentas para a detecção da bactéria *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, principalmente quando se têm disponíveis *primers* específicos que detectam eficientemente o patógeno alvo, sem detectar os patógenos geneticamente próximos. Isso é o que se observa quando se utilizam os *primers* desenvolvidos por Tegli et al. (2002).

## 6 CONCLUSÕES

A utilização do extrato bruto de sementes e do extrato concentrado em membrana milipore não permitiu a detecção de *Cff* em sementes contaminadas.

A concentração do extrato bruto de sementes por centrifugação e a Bio-PCR permitiram a detecção de *Cff* em sementes contaminadas.

Não foi detectada a presença de *Cff* em nenhuma das amostras de lotes comerciais de sementes de feijão.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, v.86, p.361-366, 1996.

BASU, P.K.; WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence, and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* *in vivo* and *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.44, p.1229-1245, 1966.

BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Estabelecimento de metodologia para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.301, 2003.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PATHOLOGY ORGANIZATION. **Phytosanitary procedure: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. Paris, 1994. p.329-331. (Bulletin 24).

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

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 125p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LAZO, G.R.; E GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.77, p.448-453, 1987.

MACHADO, J.C. Métodos de detecção de pragas não quarentenárias associadas às sementes, com potencial de regulamentação no Brasil. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTE, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e Palestras...** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 198p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan, 1979. 839p.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W.; PANOPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, v.83, p.965-970, 1993.

SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SAETTLER, A.W. **Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean.** St. Paul: APS, 1989. p.11-29.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.P. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, v.85, p.243-248, 1995.

SCHAAD, N.W.; BONDE, M.R.; HATZILOUKAS, E. Bio-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria. In: HUTCHINS, J.D.; REEVES, J.C. (Ed.). **Seed health testing**. Cambridge: Cab International, p.159-164. 1997.

SCHAAD, N.W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.1095-1100, 1999.

SCHAAD, N.W.; GAUSH, P.; POSTNIKOVA, E.; FREDERICK, R. On-site one hour PCR diagnosis of bacterial diseases. **Phytopathology**, v.91, p.79-89, 2001.

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

SHARMA, V.; CARLSON, S.A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* 0157:7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5472-5476, 2000.

SOUZA, V.L.; MARINGONI, A.C.; KRAUSE-SAKATE, R. Detecção via PCR de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phythopatologica**, v.30, p.89, 2004.

SOUZA, V.L.; MARINGONI, A.C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phythopatologica**, v.32, n.2, p.170-176, 2006.

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

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, v.48, p.245-252, 1999.

WATSON, D.R.W. Bean common blight and fuscous blight in New Zeland. **Plant Disease Reporter**, v.54, n.12, p.1068-1072, 1970.

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR. **OEPP/EPPB Bull**, v.30, p.381–383, 2000a.

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; BOONHAM, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2853–2858, 2000b.

WELLER, S.A.; STEAD, D.E. Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. **Journal Applied Microbiology**, v.92, p.118–112, 2002.