



MELINA KORRES RAIMUNDI

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E
PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Pseudomonas spp.*
PROVENIENTES DE CAFEEIROS EM MINAS GERAIS**

**LAVRAS - MG
2017**

MELINA KORRES RAIMUNDI

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Pseudomonas spp.* PROVENIENTES DE CAFEEIROS EM MINAS
GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Raimundi, Melina Korres.

Identificação bioquímica, molecular e patogenicidade de
isolados de *Pseudomonas spp.* provenientes de cafeeiros em
Minas Gerais / Melina Korres Raimundi. - 2017.

94 p. : il.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.
Bibliografia.

1. Bactéria. 2. Virulência. 3. *Pseudomonas syringae* pv
garcae. I. de Souza, Ricardo Magela. . II. Título.

MELINA KORRES RAIMUNDI

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE
ISOLADOS DE *Pseudomonas spp.* PROVENIENTES DE CAFEEIROS EM MINAS
GERAIS**
**BIOCHEMICAL, MOLECULAR IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF
ISOLATES OF *Pseudomonas spp.* FROM COFFEE TREES IN MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de julho de 2017.

Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Dra. Flávia Mara Vieira Lelis	
Dra. Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa	PROPLAC/UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2017**

*Aos meus amados pais, Teresa e Geraldo e irmão Henrique,
Com todo carinho
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa conquista, por me iluminar e dar forças durante essa jornada.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de recursos financeiros para execução dos projetos de pesquisa.

Ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza, pela orientação, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação e por disponibilizar recursos para realização dos trabalhos.

À professora Dr^a Antônia dos Reis Figueira, pelas valiosas sugestões e por disponibilizar equipamentos do seu laboratório para realização dos trabalhos.

À Dr^a Flávia Mara Vieira Lelis, pelos ensinamentos, colaboração nos trabalhos, pela atenção e valiosas sugestões.

À Dr^a Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa, pelos ensinamentos, pela atenção e valiosas sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Ana Maria, Bruna, Moysa, Rosemary, Marina, Ana Luiza, Flávia, Gustavo e Daniel pela amizade, colaboração nos trabalhos e pela convivência agradável.

Às minha amigas Ângela, Fabiana e Fiorita pela amizade, companheirismo e pela agradável convivência.

À minha mãe, Teresa, meu pai Geraldo e meu irmão Henrique, por todo amor, incentivo e compreensão, imprescindíveis durante o período de realização deste trabalho. Vocês são a razão da minha vida.

Ao meu futuro esposo, Petrus, por todo amor a mim dedicado, pela compreensão devido a distância, por me dar forças e incentivo. O seu apoio foi fundamental para que eu pudesse suportar tudo. E também agradeço a toda sua família, principalmente à Rose, Isabela e Dona Maria, pelo imenso carinho e apoio de sempre.

À minha família maravilhosa, meus queridos avós, tios e primos, por sempre torcerem por mim.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente Adriana, Angélica e Luana, pelo carinho e amizade.

A todos os colegas de pós graduação com os quais eu convivi durante estes anos, principalmente, àqueles que, de certa forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

As doenças de etiologia bacteriana estão entre os principais fatores que afetam a produtividade da cultura do cafeeiro, dentre elas, a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* – Psg), tem se destacado nos últimos anos. Além desta bacteriose ocorrem no cafeeiro a mancha bacteriana (*P. syringae* pv. *tabaci* – Psta), o crestamento bacteriano (*P. cichorii* – Pc) e a mancha escura (*Burkholderia andropogonis* – Ba). Entretanto, os relatos recentes tem sido quase exclusivamente atribuídos a *P. syringae* pv. *garcae*. A diagnose dessas doenças tem sido baseada nos sintomas e testes bioquímicos os quais não têm sido suficientes para a identificação dos patógenos aos níveis de espécie e patovar. Portanto, métodos mais precisos na diagnose dessas doenças são necessários. Assim, os objetivos com este trabalho foram os de identificar e diferenciar os isolados bacterianos provenientes de cafeeiros das principais regiões produtoras de Minas Gerais, utilizando técnicas moleculares, análises filogenéticas, caracterização bioquímica e de patogenicidade. Tais objetivos poderão contribuir para o esclarecimento do recente surto no campo da mancha aureolada do cafeeiro depois de mais de 50 anos de sua detecção. A caracterização bioquímica dos isolados, associada às técnicas de PCR, rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR) e identificação filogenética utilizando o *locus rpoD*, permitiu diferenciar e identificar 73 isolados obtidos de cafeeiro como Psg, cinco como Psta e seis como Pc, bem como analisar a diversidade genética entre eles. As técnicas moleculares e testes bioquímicos relatados neste estudo poderão ser utilizadas em análises de rotina na diagnose destas bacterioses em cafeeiros, pois discriminam as espécies e patovares de *Pseudomonas* sp que ocorrem na cultura. Este é o primeiro relato da ocorrência de mancha foliar bacteriana (Psta) em lavoura no Estado de Minas Gerais e do crestamento bacteriano (Pc) em viveiro e lavouras do Estado, após a descrição da doença no Brasil. Nos testes de virulência, foi verificada alta diversidade patogênica entre os isolados de Psg testados. O isolado referência e oito isolados de Psg considerados os mais virulentos causaram doença nos hospedeiros de Psta *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Desmodium canum*, *Aster* sp, *Celosia plumosa* e *Phaseolus vulgaris*. Todos os isolados referência de Psta, independentemente do hospedeiro de origem causaram doença em mudas de cafeeiro.

Palavras-chave: Bactéria. Virulência. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. ERIC-PCR. BOX PCR. *RpoD*.

ABSTRACT

The bacterial diseases etiology comprise the main factors that affect a productivity of the coffee crop, among them, the coffee halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg), has gained significant importance in the recent years. In addition to this bacteriosis, the Brazilian coffee crops are also threatened by the coffee bacterial leaf spot, caused by *P. syringae* pv. *tabaci* - Psta, coffee bacterial blight, and coffee bacterial dark spot caused by *P. cichorii* - Pc and *Burkholderia andropogonis* - Ba, respectively. However, recent reports have been almost exclusively attributed to *P. syringae* pv. *garcae*. The diagnosis of these diseases has been mainly based on the visual symptoms and biochemical tests which have not been enough to correctly identify the pathogens in the species and pathovar levels. Therefore, more accurate methods for a reliable diagnosis of bacterial diseases of coffee are needed. Thus, the objectives of this work were to identify and differentiate the bacterial isolates from coffee crops of Minas Gerais state, by molecular techniques, phylogenetic analyzes, biochemical characterization and pathogenicity. These objectives will contribute to the clarification of the recent outbreak in the field of bacterial halo blight of coffee after more than 50 years later its detection. The biochemical characterization of the isolates, associated with PCR techniques, rep-PCR (REP, ERIC and BOX-PCR) and phylogenetic identification of *rpoD* locus, allowed to differentiate and identify 73 Psg, five Psta and six Pc strains, as well analyze the genetic diversity among them. The molecular techniques and biochemical tests reported in this study could be used in routine diagnosis of bacterial pathogens in coffee plants, since they discriminate the different pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars that naturally occur in coffee crops. This is the first report of the occurrence of coffee bacterial leaf spot (Psta) under field conditions in Minas Gerais and the first report of coffee bacterial blight (Pc) outbreaks in nursery and field, since its first occurrence in Brazil. In the virulence tests, high pathogenic diversity was verified among Psg isolates tested. The reference isolate and eight Psg isolates considered to be the most virulent have caused disease in hosts of Psta *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Desmodium canum*, *Aster sp*, *Celosia plumosa* and *Phaseolus vulgaris*. All the isolates reference of Psta, regardless of the host of origin caused disease in coffee seedlings.

Keywords: Bacteria. Virulence. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. ERIC-PCR. BOX PCR. *RpoD*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 O cafeeiro	16
2.2 A mancha aureolada.....	17
2.3 Mancha aureolada X outras doenças.....	18
2.4 Ferramentas moleculares modernas para a diferenciação de espécies e patovares do complexo <i>Pseudomonas syringae</i>	21
2.4.1 Multilocus sequence analysis/typing (MLSA/T)	22
2.4.2 Rep-PCR	23
2.5 Fatores relacionados à patogenicidade de patovares de <i>P. syringae</i>	24
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE CAFEEIROS DE MINAS GERAIS POR CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, REP-PCR E ANÁLISES FILOGENÉTICAS UTILIZANDO O <i>locus rpoD</i>	35
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Obtenção dos isolados e teste de patogenicidade.....	40
2.2 Caracterização bioquímica	41
2.3 Caracterização molecular	41
2.3.1 Rep-PCR	41
2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando <i>primers</i> específicos para <i>P. cichorii</i>	43
2.3.3 Identificação filogenética dos isolados utilizando o <i>locus rpoD</i>	43
3 RESULTADOS.....	45
3.1 Obtenção dos isolados e confirmação da patogenicidade	45
3.2 Caracterização bioquímica	46
3.3 Caracterização molecular	48
3.3.1 rep-PCR	48
3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando <i>primers</i> específicos para <i>P. cichorii</i>	55
3.3.3 Análise filogenética dos isolados utilizando o <i>locus rpoD</i>	55
4 DISCUSSÃO.....	59

5 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 3 ESTUDOS DE PATOGENICIDADE DE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> E <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ISOLADOS DE CAFEEIRO.....	68
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Origem dos isolados bacterianos.....	73
2.2 Virulência de isolados bacterianos de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> obtidos de diferentes cultivares de cafeeiro e locais de coleta	75
2.3 Inoculação cruzada dos isolados de Psg e Psta em mudas de café e plantas hospedeiras de Psta.....	76
3 RESULTADOS.....	77
3.1 Virulência de isolados bacterianos de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> obtidos de diferentes cultivares de cafeeiro e locais de coleta	77
3.2 Inoculação cruzada de isolados de Psg e Psta em mudas de café e plantas hospedeiras de Psta.....	79
4 DISCUSSÃO.....	87
5 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor brasileiro (CONAB, 2016). Entretanto, as doenças estão entre os principais fatores que afetam a produtividade e o rendimento da cultura e, nos últimos anos, as doenças de etiologia bacteriana tem se destacado. A mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg), embora tenha sido relatada no Brasil em 1956 (AMARAL et al., 1956), passou recentemente a causar grandes prejuízos na cultura, tanto na produção de mudas em viveiros como no campo. Além desta, outras bacterioses com sintomas semelhantes de manchas foliares ocorrem em cafeeiro: mancha bacteriana (*P. syringae* pv. *tabaci* - Psta); crestamento bacteriano (*P. cichorii* – Pc) e mancha escura bacteriana (*Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis* – Ba). A diagnose adequada dessas doenças é um dos principais desafios encontrados por fitopatologistas, pois tem sido baseada nos sintomas e em testes bioquímicos, os quais não têm sido suficientes para a identificação desses patógenos aos níveis de espécie e patovar.

A mancha aureolada inicialmente foi considerada de menor importância econômica (COSTA; SILVA, 1960), e, após seu aparecimento, apenas casos isolados da moléstia foram identificados (MOHAN, 1976). A bacteriose foi primeiramente detectada no Brasil no Estado de São Paulo (AMARAL et al., 1956) e na década de 70, a doença foi relatada nos estados de Minas Gerais (KIMURA et al., 1976) e Paraná (KIMURA et al., 1976; MOHAN et al., 1976). Atualmente, a mancha aureolada é considerada a principal bacteriose do cafeeiro, visto que, nos últimos anos tem sido fator limitante para o cultivo da cultura em regiões mais frias e expostas ao vento, em lavouras em formação ou recém-podadas, e/ou em viveiros (ZOCCOLI et al., 2011; RODRIGUES et al.; 2013).

Além do Brasil, há relatos da ocorrência da doença no Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997), Uganda e China (CHEN, 2002). A falta de informações sobre a dinâmica da doença, a ausência de produtos específicos registrados e o desenvolvimento de resistência do patógeno a antibióticos têm dificultado o controle da bacteriose, levando a perdas econômicas e ao aumento no custo de produção (ZOCCOLI et al., 2011; RODRIGUES et al.; 2013).

Teoricamente é possível diferenciar Pc de Psg, Psta e Ba, por meio de testes bioquímicos (SCHAAD et al., 2001) e da PCR utilizando *primers* específicos para Pc (COTTYN et al., 2011), pois *primers* específicos para Psg e Psta ainda não foram descritos na literatura. Porém, há variabilidade entre isolados em relação aos testes bioquímicos e alguns

reagentes utilizados no preparo desses testes podem ser cancerígenos, como no teste de oxidase. Além da semelhança nos sintomas causados em plantas de cafeeiro, a morfologia das colônias, bem como a caracterização bioquímica destas bactérias também são semelhantes (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001). Esta semelhança se aplica principalmente para Psg e Psta, o que pode levar ao diagnóstico incorreto da doença e, via de regra, subestimar a ocorrência da mancha foliar bacteriana no cafeeiro e superestimar a ocorrência da mancha aureolada, visto que os relatos recentes tem sido automaticamente atribuídos a *P. syringae* pv. *garcae* (RODRIGUES et al., 2015).

Segundo Kimura et al. (1973) o cafeeiro é o único hospedeiro natural conhecido de *P. syringae* pv. *garcae*. *Solanum lycopersicum*, *Olea europea*, *Citrus sp.*, *Ligustrum lucidum*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutilobum*, *Solanum tuberosum* (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA; WILLIS, 2005) foram hospedeiras por inoculação artificial, não havendo entretanto, relatos de infecção natural nestas espécies de plantas (RODRIGUES et al., 2015). Portanto, são necessários novos testes de patogenicidade cruzada para se confirmar a especificidade de hospedeiros de Psg e Psta, o que é importante do ponto de vista epidemiológico para a correta detecção e identificação das doenças causadas por estes patovares.

Diante do exposto, métodos mais rápidos e eficientes na identificação dos agentes causadores dessas doenças são necessários, buscando-se menor dependência de características fenotípicas e maior utilização de conceitos genômicos para a classificação e identificação destas bactérias.

A técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers*, ou reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção de algumas fitobactérias em plantas e sementes (DEUNER, 2012). A técnica de rep-PCR, que é uma variação da PCR, tem sido muito utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (OPGENORTH et al., 1996; LOUWS et al., 1999; TRINDADE et al., 2005; BARBOSA, 2007; TEGLI et al., 2002).

Mais recentemente, análises filogenéticas comparando alinhamentos de sequências de *locus* de genes constituintes do genoma bacteriano, os quais codificam proteínas essenciais para a bactéria, denominados *housekeeping* genes, demonstraram serem mais eficazes em classificar, caracterizar e identificar bactérias (incluindo a classificação abaixo do nível de espécie), do que a utilização do *loci*16S rDNA e métodos de caracterização anteriores (YAMAMOTO et al., 2000; TAYEB et al., 2005; HWANG et al., 2005).

Desse modo, objetivou-se com este trabalho identificar e diferenciar as espécies e patovares de *P. syringae* patogênicos a cafeeiros de diversos municípios de Minas Gerais, utilizando técnicas bioquímicas, moleculares e análises filogenéticas, possibilitando o levantamento da ocorrência dessas bactérias nas principais regiões produtoras do Estado, bem como estudar a patogenicidade destes isolados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea* spp.) pertence à família *Rubiacea* e está entre as culturas de maior importância econômica em todo mundo. É amplamente cultivado em regiões tropicais e essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, com uma produção estimada de 51 milhões de sacas beneficiadas, das quais aproximadamente 31 milhões foram exportadas. A área total cultivada é de aproximadamente dois milhões de hectares. O Estado de Minas Gerais contribui com aproximadamente 52% da produção nacional, destacando-se como o maior produtor brasileiro (CONAB, 2016). Existem diversas espécies de cafeeiro cultivadas no mundo. No Brasil as mais importantes economicamente são *Coffea arabica*, café Arábica, e *Coffea canephora*, café Robusta ou Conilon. Cada espécie possui um grande número de cultivares já desenvolvidas, além de materiais genéticos ainda em processo de melhoramento.

O cafeeiro, embora tenha grande potencial produtivo, pode ser afetado por diversos fatores, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças, que podem comprometer a produtividade da cultura, causando perdas significativas (OESTREICH-JANZEN, 2010). Entre esses fatores as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides têm sido limitantes à produção. Em relação às doenças de etiologia bacteriana, cinco já foram relatadas no Brasil: a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, que embora tenha sido relatada no Brasil em 1956 (AMARAL et al., 1956), recentemente tem sido muito danosa, tanto nos viveiros como no campo; o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii* (ROBBS et al., 1974), a mancha escura bacteriana, causada por *Burkholderia andropogonis* (RODRIGUES NETO et al., 1981), a atrofia dos ramos do cafeeiro, causada por *Xylella fastidiosa* (PARADELA FILHO et al., 1995) e a mancha foliar bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010).

2.2 A mancha aureolada

A mancha aureolada do cafeeiro (*Coffea arabica*) foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1956, no município de Garça, São Paulo. O agente etiológico da mancha aureolada é *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL et al., 1956; YOUNG et al., 1978), uma bactéria Gram negativa, com células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados, com 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm de diâmetro, móveis por meio de flagelos polares. Pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonadaceae* (LELLIOTT et al., 1966).

A bactéria enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (Levana + Oxidase + Podridão em batata + Arginina + Hipersensibilidade em fumo) é positiva para Levana e induz hipersensibilidade em fumo, é negativa para Oxidase, Podridão em discos de batata e Arginina di-hidrolase. Hidrolisa gelatina e não acumula Poli-β-hidroxi-butirato (PHB). Utiliza ramnose, trealose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, celobiose, sacarose, inositol, D-quinato, manitol, L-ascorbato, *meso*-inositol, D-xylose e triacetina, e não utiliza adonitol, trigonelina, lactose, L(+) tartarato, D(-) tartarato, DL-lactato, DL-homoserina, α-lectina, linolenato, L-malato, L-histidina (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001; BARTA; WILLIS, 2005). Produz pouco pigmento fluorescente em meio de cultura King B (KING et al., 1954), mas alguns isolados produzem um pigmento marrom não fluorescente difusível neste meio, causando o escurecimento do mesmo, resultante da produção de melanina (BARTA; WILLIS, 2005).

A doença foi relatada no Brasil no Estado de São Paulo na década de 50 (AMARAL et al., 1956) e, na década de 70, em Minas Gerais (KIMURA et al., 1976) e Paraná (KIMURA et al., 1976; MOHAN et al., 1976). Na África ocorre no Quênia, onde está em rápida expansão (JANSEN, 2005; ITHIRU et al., 2013), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997), Uganda e China (CHEN, 2002).

Os sintomas ocorrem nas folhas, flores, frutos novos e ramos do cafeeiro. Nas folhas mais velhas são observadas manchas de coloração pardo-escura, formato irregular, envolvidas por halo amarelo. Nas folhas novas as lesões apresentam formato circular e são circundadas por um halo amarelo, que pode não ser notado, mas ao se observar as folhas sintomáticas contra a luz é possível verificar uma transparência nessa região (ZAMBOLIM et al., 1999; 2005). Oliveira e Romeiro (1990) verificaram maior severidade em folhas e brotações novas do que em folhas adultas. Em viveiros, a doença causa necrose dos tecidos jovens e queima das folhas (ZAMBOLIM et al., 2005).

A bactéria penetra nas folhas do cafeeiro através de aberturas naturais e também por ferimentos (KIMURA et al., 1976). A colonização se dá nos espaços intracelulares e intercelulares, utilizando os exsudatos celulares como substrato. Ao propagar-se nos tecidos, a bactéria migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas deixando para trás o tecido necrosado, circundado por halo amarelado, resultado da liberação de toxinas pelo patógeno (RODRIGUES et al., 2013).

Os sintomas da mancha aureolada são semelhantes à cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) e mancha de phoma (*Phoma tarda*) e também aos causados por fatores climáticos e distúrbios nutricionais (COSTA; SILVA, 1960; PATRÍCIO et al., 2011).

A doença é observada sob condições de temperaturas amenas, alta pluviosidade, altitudes elevadas, lavouras em formação ou recém-podadas expostas a ventos frios e em viveiros (ZAMBOLIM et al., 1997; JANSEN, 2005; ZOCCOLI et al., 2011).

A disseminação da bacteriose ocorre através de respingos de água contendo células bacterianas dispersas pelo vento e, em períodos de menor precipitação, pode ocorrer também por meio de mudas infectadas assintomáticas, uma vez que a bactéria pode sobreviver de maneira epífita na planta (ROBBS, 1978; ZOCCOLI et al., 2011). Recentemente, verificou-se que sementes de cafeeiro também podem hospedar e disseminar o patógeno (BELAN et al., 2016).

A ausência de medidas adequadas de controle leva a perdas econômicas e ao aumento no custo de produção, devido ao acréscimo de aplicações de bactericidas e cúpricos na tentativa de conter o avanço da doença em regiões mais favoráveis à sua incidência (JESUS JUNIOR et al., 2002).

O manejo da mancha aureolada baseia-se, principalmente, em medidas preventivas como a utilização de sementes e mudas saudáveis, escolha de áreas livres da doença, formação de quebra-ventos ao redor da lavoura visando combater a entrada da bactéria e/ou dificultar o seu avanço nas áreas onde foi detectada. Aplicações de cloridrato de kasugamicina intercaladas com oxiclureto de cobre, bem como outros produtos com sais de cobre como princípio ativo, são utilizadas no controle químico da mancha aureolada tanto em mudas no viveiro quanto em cafeeiros no campo (PATRÍCIO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011).

2.3 Mancha aureolada X outras doenças

Conforme citado anteriormente, outras bactérias descritas em cafeeiro também ocasionam sintomas de manchas foliares em viveiro e/ou campo: *Pseudomonas cichorii*

(SWINGLE, 1925; STAPP, 1928), *P. syringae* pv. *tabaci* (WOLF; FOSTER, 1971; YONG; DYE; WILKIE, 1978) e *Burkholderia andropogonis* (SMITH, 1911; GILLIS et al., 1995) (sin. *P. andropogonis* (SMITH, 1911; STAP, 1928).

Pseudomonas cichorii, bactéria causadora do crestamento bacteriano do cafeeiro, foi observada pela primeira vez no Brasil por Robbs et al. (1974), ocorrendo em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais e, posteriormente, em viveiro, no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2012). Desde então, a bactéria tem ocorrido em campo, porém a maior incidência tem sido verificada em mudas enviveiradas, principalmente durante os meses de dezembro e janeiro, durante a estação chuvosa. *P. cichorii* é importante economicamente para ampla gama de plantas hospedeiras em todo o mundo, como alface, inhame, taioba, entre outras (COTTYN et al., 2009). Os sintomas da doença são observados geralmente nas folhas mais velhas, as quais apresentam lesões necróticas, de coloração negra e formato irregular, não sendo comum halo amarelo ao redor das lesões, mas sim um aspecto de encharcamento. Temperaturas elevadas e chuvas frequentes e abundantes favorecem a infecção pela bactéria e em condições menos favoráveis, esta pode apresentar fase epífita na superfície foliar do cafeeiro. A bactéria penetra na folha por meio de aberturas naturais ou lesões causadas por *Cercospora* sp., *Phoma* sp. e “bicho mineiro” (*Perileucoptera coffeella*) (ROBBS et al., 1974; KIMURA et al., 1976).

Pseudomonas cichorii é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato de bastonete, com um tufo de flagelos polares. As colônias são de coloração creme e produtoras de pigmento fluorescente em meio King B. Nos testes LOPAT apresentam resultados positivos para oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo e negativos para a produção de Levana, Arginina dihidrolase e podridão em discos de batata. Apresenta resultados negativos para hidrólise de gelatina, nucleação de gelo e acúmulo de poli (β -hidroxibutirato) (PHB). Utilizam manitol, 2-ketogluconato, meso-tartarato, D(-) aspartato e não utilizam eritritol, adonitol, lactose, benzoato, geraniol, celobiose, sorbitol, sacarose, D(-)-tartarato, D-arabinose, L-ramnose e trealose (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981, YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD et al., 2001).

A bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, causadora da mancha bacteriana do cafeeiro foi observada em viveiros de café no estado de São Paulo por Rodrigues Neto et al. (2006) e Destéfano et al. (2010). Além do cafeeiro, esta bactéria possui vários outros hospedeiros, dentre eles: *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Desmodium canum*, *Aster* sp. e *Celosia plumosa* (RIBEIRO et al., 1979; TANAKA et al., 1993; THEODORO; MARINGONI, 1998; MALAVOLTA JÚNIOR

et al., 2008), tendo sido detectada em mais de 17 hospedeiros naturais de diversas famílias botânicas no Brasil (MALAVOLTA JUNIOR et al., 2008).

Os sintomas causados por *P. syringae* pv. *tabaci*, são extremamente semelhantes aos causados por *P. syringae* pv. *garcae*. As folhas apresentam manchas de coloração pardo-escura circundadas por halo amarelado. Em poucos dias essas lesões coalescem, necrosam e causa morte das folhas (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010).

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* é Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato de bastonete, móvel pela presença de seis flagelos polares. Apresenta colônias semi-transparentes de cor branco-cinza, formato arredondado com margens irregulares, tamanho pequeno a médio e produzem pigmentos fluorescentes em meio King B. Por suas características bioquímicas, classifica-se no grupo LOPAT I A (LELLIOTT et al., 1966).

Burkholderia andropogonis, (sin. *Pseudomonas andropogonis*) (Ba), causadora da mancha escura bacteriana, foi relatada em 1979 em folhas de cafeeiro cv. Catuaí amarelo (RODRIGUES NETO et al., 1981). Os sintomas são observados nas folhas por meio de manchas arredondadas, de coloração marrom escura, com centro necrótico e circundadas por halo clorótico. A bactéria é Gram-negativa, as colônias apresentam coloração creme, crescimento lento e não são fluorescentes. Nos testes LOPAT apresenta resultados negativos, confirmando não pertencer ao grupo das bactérias produtoras de pigmentos fluorescentes (LELLIOTT et al., 1966).

Com relação à caracterização bioquímica, de acordo com Schaad et al. (2001) a identificação das espécies de *Pseudomonas* é baseada, principalmente, nos testes LOPAT (Levana + Oxidase + Podridão em batata + Arginina + Hipersensibilidade em fumo). Nos testes LOPAT *P. syringae* pv. *garcae* distingue-se de *P. cichorii* por caracterizar-se como Levana positiva e Oxidase negativa. Além de LOPAT, *P. cichorii* não hidrolisa gelatina, não utiliza trealose, sacarose, sorbitol e celobiose, utiliza L-tartarato enquanto *P. syringae* pv. *garcae* hidrolisa gelatina, produz ácidos a partir de trealose, D-sorbitol, celobiose e sacarose e não produz ácido a partir de L-tartarato.

A identificação de *P. cichorii* em plantas de cafeeiro pode ser feita através da PCR utilizando os *primers* específicos, desenhados a partir de genes conservados *hrcRST*, correspondentes a região de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade de *P. cichorii* isolados de alface (COTTYN et al., 2011).

A diferenciação bioquímica entre os patovares *garcae* e *tabaci*, dentro da espécie *P. syringae* é feita apenas através da utilização dos açúcares Trigonelina e L(+) tartarato pelo

patovar *tabaci*, os quais não são utilizados pelo patovar *garcae* (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001).

2.4 Ferramentas moleculares modernas para a diferenciação de espécies e patovares do complexo *Pseudomonas syringae*

O gênero *Pseudomonas sensu lato* foi subdividido em vários gêneros após estudos de hibridação DNA-DNA e comparações de sequências de 16S rDNA (PALLERONI et al., 1972; WILLEMS et al., 1992).

Dentro do complexo de *P. syringae*, a diferenciação usando reações bioquímicas, análise filogenética 16S rDNA e estudos de composição de ácidos graxos da parede celular (STEAD, 1992; MOORE et al., 2006) não tem sido suficientes para a diferenciação confiável dos taxons. A classificação dos grupos foi considerada confusa, requerindo, portanto, um estudo extensivo de hibridização DNA/DNA (GARDAN et al., 1999), o qual discriminou nove principais taxons denominados genomoespécies, e identificou duas novas espécies: *P. tremae* e *P. cannabina*. As genomoespécies propostas por Gardan et al., (1999) são definidas como grupos genômicos estabelecidos por hibridização DNA-DNA ou Análises de Sequências Multilocus (MLSA) ou por outras comparações genômicas, porém não podem ser distinguidos de outras espécies por características fenotípicas, sendo assim, a nomeação formal destes táxons somente será possível quando caracteres fenotípicos estiverem disponíveis para diferenciá-los (WAYNE et al., 1987).

Com base em estudos de hibridação DNA-DNA e MLSA, atualmente, existem nove espécies validamente publicadas pertencentes ao complexo *Pseudomonas syringae*: *P. cannabina*, *P. avellanae*, *P. amygdali*, *P. ficuserectae*, *P. savastanoi*, *P. tremae*, *P. meliae*, *P. syringae* e *P. caricapapayae* (YOUNG et al., 1978; PARKINSON et al., 2011) e 60 patovares de *P. syringae* (YOUNG, 2010).

A maioria dos patovares de *P. syringae* foi descrita com base apenas na planta hospedeira de origem e testes limitados de patogenicidade cruzada. Por isso, embora, por definição, patovares de *P. syringae* sejam diferenciados com base na patogenicidade em gama de hospedeiros, esta caracterização não é eficaz, uma vez que alguns patovares podem ter ampla gama de hospedeiros, como verificado para *P. syringae* pv. *tabaci*. Portanto, a identificação deve ser realizada com base em características diferenciais, que sejam suficientes para provar a classificação no nível de espécie e /ou patovar (GARDAN et al., 1999).

Embora a hibridização DNA-DNA seja um método padrão para determinar as relações entre fitobactérias, é um método difícil de ser utilizado e possui grande erro experimental. Além disto, não é eficaz para identificação de fitobactérias em nível abaixo de espécie (BULL; KOIKE, 2015).

A era da classificação e identificação baseada em sequências do DNA foi iniciada pelo uso de seqüências 16S rDNA para construir um quadro filogenético para entender como os organismos estão relacionados (FOX et al., 1977; 1980; WOESE; FOX, 1977). O gene 16S rDNA é o mais utilizado para a classificação e identificação, devido à sua universalidade, facilidade de utilização (as sequências são facilmente obtidas a partir do DNA que é amplificado utilizando *primers* universais) e reprodutibilidade, bem como o grande número de sequências geradas. Porém, a análise de seqüência 16S rDNA não discrimina abaixo do nível de espécie, sendo necessários métodos adicionais para diferenciar e identificar patovares. Estudos demonstram que identificações baseadas em análise de múltiplos *locus* (que podem incluir 16S rDNA) proporcionam uma maior confiança nas conclusões filogenéticas do que a análise de genes individuais. Assim, os métodos de análise da seqüência multilocus (MLSA) ou tipagem (MLST) discriminam melhor os níveis taxonômicos quando comparados a análise da seqüência 16S rDNA (GEVERS et al., 2005; TINDALL et al., 2010; VINATZER; BULL, 2009).

Métodos baseados na amplificação de sequências repetitivas presentes no genoma bacteriano, como a rep-PCR, também são úteis para classificação e identificação de fitobactérias ao nível de espécie e abaixo do nível de espécie, sendo empregadas para investigar a etiologia e epidemiologia de doenças bacterianas (TINDALL et al., 2010). Os métodos a seguir descritos são utilizados atualmente tanto para a classificação quanto para a identificação de espécies e níveis abaixo de espécie de fitobactérias:

2.4.1 Multilocus sequence analysis/typing (MLSA/T)

O método de análise da seqüência multilocus (MLSA) ou tipagem (MLST) pode ser utilizado para a classificação e identificação de espécies e patovares (GEVERS et al., 2005).

A técnica MLST compara alinhamentos de seqüências de genes codificadores de proteínas constituintes do genoma, possibilitando determinar a relação genética entre isolados bacterianos e é especialmente útil para a identificação se fragmentos de genes sequenciados são similares aos do isolado-tipo/patótipo.

Estudos utilizando MLSA tornaram mais claro as relações entre as bactérias fitopatogênicas, por ser um método simples e rápido para a delimitação de espécies (MAIDEN et al., 1998) e útil para a caracterização de bactérias com sequências polimórficas presentes em *housekeeping* genes. Esses genes são constituintes do genoma bacteriano, os quais codificam proteínas essenciais para a bactéria (FIGUEIRA et al., 2011; MARTINO et al., 2011).

A técnica MLSA abrange o estudo de filogenia de organismos dentro de um determinado grupo - classificação em filogrupos (espécies ou genomoespécies) (GEVERS et al., 2005), dessa forma, permite que patovares sejam agrupados em suas genomoespécies (Gardan et al., 1999) corretas e ajuda a estabelecer hipóteses acerca do patovar de isolados desconhecidos (BULL et al., 2011; YOUNG et al., 2008). Na prática, os fragmentos de quatro a oito genes são amplificados e sequenciados individualmente, e cada isolado é classificado como uma análise de sequência (SA) pela combinação das sequências obtidas pela amplificação dos *housekeeping* genes (MAIDEN, 2006; MAIDEN et al., 2013). A análise desses fragmentos de genes concatenados fornece uma ferramenta filogenética poderosa útil na classificação, identificação, epidemiologia e biologia evolutiva (BULL et al., 2011; YOUNG et al., 2008).

2.4.2 Rep-PCR

Dentro do genoma de diversas bactérias existem sequências repetitivas conservadas chamadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos de 154 pb que atuam como sítios de iniciação para PCR, denominados elementos BOX. A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na observação da ocorrência dessas sequências repetitivas (VERSALOVIC et al., 1991; LOUWS et al., 1994). Três *primers* são comumente usados para análise rep-PCR *fingerprinting*, correspondendo às sequências REP, ERIC e BOX. Os protocolos são denominados REP-PCR, ERIC-PCR, e BOX-PCR, respectivamente e, quando utilizados coletivamente, rep-PCR (LOUWS et al., 1999).

A técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers*, ou reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção de algumas fitobactérias em plantas e sementes. A técnica de rep-PCR, que é uma variação da PCR, tem sido muito utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de

isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (OPGENORTH et al., 1996; LOUWS et al., 1999; TRINDADE et al., 2005; BARBOSA, 2007; TEGLI et al., 2002).

A rep-PCR identifica com precisão isolados em sua correta espécie e patovar quando isolados- tipo/patótipo são incluídos nas comparações. Este método não pode ser utilizado em descrições de espécies, mas é utilizado para apoiar hipóteses sobre a taxonomia dos organismos (TINDALL et al., 2010).

Esta técnica é particularmente eficaz porque apenas uma pequena quantidade de DNA é necessária e resulta em um método específico e sensível, rápido para gerar *fingerprintings* de fitobactérias. Tem se obtido sucesso utilizando esta técnica em bactérias obtidas diretamente de lesões em plantas. A rep-PCR é também uma ferramenta importante para se confirmar os postulados de Koch e resultados experimentais de gama de hospedeiros (LOUWS et al., 1999).

2.5 Fatores relacionados à patogenicidade de patovares de *P. syringae*

Os processos de reconhecimento do sinal do patógeno pelo sistema imune das plantas pode se dar através de dois sistemas: aqueles associados à imunidade desencadeada por PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno), chamada de resistência basal ou não-hospedeira e aqueles associados à imunidade desencadeada por efetores (JONES; DANGL, 2006).

Os PAMP's são reconhecidos por receptores PRRs (receptores de reconhecimento de PAMP's) localizados na superfície da membrana celular ou interior da célula, levando a eventos de sinalização “downstream” e, por fim, a indução de sistemas de defesa basal (HOGENHOUT et al., 2009). A detecção desses padrões serve como a primeira linha de defesa contra a presença de patógenos em potencial e permite que as plantas respondam rápida e eficientemente a uma ampla gama de patógenos (ROUX et al., 2014).

No entanto, patógenos adaptados são capazes de secretar moléculas efetoras (produtos de genes Avr) que têm como alvo, componentes regulatórios específicos do sistema basal de defesa. Dessa forma, a secreção desses efetores podem superar a resistência de não-hospedeira. Ou seja, os patógenos desenvolveram diversos fatores de virulência capazes de suplantar os PAMP's, como por exemplo aqueles empregados no sistema de secreção tipo III em bactérias, em que um repertório de proteínas efetoras de virulência são injetadas na célula vegetal para interferir na imunidade e promover a patogênese (HE et al., 2007; MISHINA; ZEIER, 2007). No entanto, plantas podem apresentar proteínas de resistência (R) que

reconhecem estes efetores resultando em defesa (HOWDEN; HUITEMA, 2012). Este é um segundo mecanismo imune conhecido como resistência de hospedeira específica de cultivar (resistência gene-a-gene) (INGLE et al., 2006; HE et al., 2007; OßWALD et al., 2014).

A maioria das bactérias fitopatogênicas produz substâncias que podem interferir direta ou indiretamente nos processos de patogênese, sendo denominados fatores de virulência. A espécie *P. syringae* apresenta um arsenal de sistemas associados à virulência durante a interação com o hospedeiro (HWANG et al., 2005).

As moléculas efetoras secretadas através do sistema de secreção tipo III, as quais restringem e promovem interações específicas de patógenos e hospedeiros, são os fatores associados à virulência mais bem estudados. Além destes fatores, destacam-se, proteínas de nucleação de gelo, resistência antimicrobiana e produção de toxinas (ABRAMOVITCH et al., 2003; GUTTMAN; GREENBERG, 2001; JACKSON et al., 1999; LEACH; WHITE, 1996).

As toxinas bacterianas, quase todas produtos secundários do metabolismo, são ativas a concentrações muito baixas, sendo substâncias nocivas para a planta. Existe uma grande diversidade de mecanismos de ação destas toxinas, podendo estas afetar a permeabilidade celular, inativar ou inibir enzimas ou atuar como antimetabólitos, que induzem deficiência em um fator de crescimento essencial para a planta. Diferentes patovares de *Pseudomonas syringae* são conhecidos produtores de toxinas como tabtoxina, coronatina, faseolotoxina, tagetitoxina e siringomicina (BENDER, 1999; HWANG et al., 2005). A tabtoxina é produzida por *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *coronafaciens*, dependendo das condições de crescimento ou cultivo. A tabtoxina intervém no metabolismo do nitrogênio, uma vez que a molécula secretada pela bactéria é convertida por peptidases da planta em um componente bioativo chamado tabtoxina- β -lactâmico, que inativa irreversivelmente a enzima glutamina sintetase, sob condições de luz. Isto provoca uma diminuição dos níveis de glutamina e acúmulo de amônio nos tecidos da planta, causando bloqueio da fotossíntese. Como consequência disso, as plantas apresentam clorose (halo clorótico nas folhas em torno da lesão), necrose e uma redução da capacidade de defesa (BALLIO et al., 1991).

A maioria dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* produz tabtoxina, porém, alguns isolados podem não produzir, ou produzir em menores quantidades, como relatado por Lydon e Patterson (2001). Embora a toxina não seja essencial para a patogenicidade, ela pode favorecer o aumento da virulência de algumas linhagens e também o movimento das bactérias nos tecidos da planta (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

A capacidade do patógeno em suplantar os mecanismos de defesa da planta hospedeira, por meio da produção de toxinas ou outros fatores de virulência, pode explicar a reação diferencial em relação à virulência dos isolados, quando inoculados ou ocorrendo naturalmente em diferentes genótipos (cultivares) de plantas (PARADELA et al., 1974; ITHIRU et al., 2013; RODRIGUES et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, B. et al. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. **The EMBO Journal**, Germany, v. 22, n. 1, p. 60-69, 2003.
- ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRICIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em mudas de café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., mês, 2012. 1 CD-ROM.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- BALLIO, A. et al. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **FEBS Letters**, Roma, v. 291, n. 1, p. 109-112, 1991.
- BARBOSA, J. F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2007. 134 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7-8, p. 492-499, 2005.
- BELAN, L. L. et al. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee seeds. **Australian Journal of Crop Science**, Lavras, v. 10, n. 7, p. 1015, 2016.
- BENDER, C. L.; ALARCÓN, C. F.; GROSS, D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Stillwater, v. 63, n. 2, p. 266-292, 1999.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: CAB International Mycological Institute, 1986.
- BULL, C. T. et al. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. **Phytopathology**, Salinas, v. 101, n. 7, p. 847-858, 2011.
- BULL, C. T.; KOIKE, S. T. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Salinas, v. 53, p. 157-180, 2015.
- CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica)- Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Café – quarto levantamento. Brasília: CONAB, 2016. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_26_51_boletim_cafe_portugues_-_4o_lev_-_dez.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2016.

COSTA, A. S.; SILVA, D. M. A Mancha aureolada do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 19, p. 63-69, 1960.

COTTYN, B. et al. *Pseudomonas cichorii* as causal the agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butter head lettuce in Flanders. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, n. 3, p. 211–225, 2009.

COTTYN, B. et al. Development of a *real time* PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grow lettuce, and its detection in irrigating water. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2011.

DESTÉFANO, S. A. L. et al. Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1162-1163, 2010.

DEUNER, C. C. et al. Sensibilidade do método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v. 38, n. 1, p. 48-53, 2012.

FIGUEIRA, V. et al. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. **Water research**, Oxford, v. 45, n. 17, p. 5599-5611, 2011.

FOX, G. E.; PECHMAN, K. R.; WOESE, C. R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 44-57, 1977.

FOX, G. E. et al. The phylogeny of prokaryotes. **Science**, Washington, v. 209, n. 4455, p. 457-463, 1980.

GARDAN, L. et al. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 49, n. 2, p. 469-478, 1999.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GILLIS, M et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 45, n. 2, p. 274-289, 1995.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**: volume 2. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184–200.

GUTTMAN, S.; GREENBERG, J. T. Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. **Molecular plant-microbe interactions**, St Paul, v. 14, n. 2, p. 145-155, 2001.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1385-1396, 2007.

HOGENHOUT, A. et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular plant-microbe interactions**, St Paul, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2009.

HWANG, M. S. H. et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5182-5191, 2005.

INGLE, A.; CARSTENS, M.; DENBY, K. J. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. **Bioessays**, Cambridge, v. 28, n. 9, p. 880-889, 2006.

ITHIRU, J. M. et al. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 8, n. 21, p. 2450-2454, 2013.

JACKSON, W. et al. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 96, n. 19, p. 10875-10880, 1999.

JANSEN, A. **Plant protection in coffee**: recommendations for the common code for the coffee community initiative. Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GmbH, 2005. Disponível em <http://www.evb.ch/cm_data/4C_Pesticide_Annex_final.pdf>. Acesso em 05 jun 2016>.

JESUS JUNIOR, W. C. J. et al. Controle químico da mancha aureolada do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 61, 2002. (Suplemento).

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006.

KIMURA, O.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. Estudos sobre o agente da "Mancha aureolada do cafeeiro" (*Pseudomonas garcae* Amaral et al.) **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Brasil)**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 15-18, 1973.

KIMURA, O.; ROBBS, C. F.; FERRARI, J. A. R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 104.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, United States of America, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: **Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens**. Springer Netherlands, p. 538-541, 1997.

LEACH, E.; WHITE, F. Bacterial avirulence genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 153-179, 1996.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.

LYDON, J.; PATTERSON, C. D. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 166-170, 2001.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAIDEN, M. C. J. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias patogênicas a plantas ornamentais ocorrendo no Brasil: uma atualização. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 1, p. 56-63, 1995.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 988, 2008.

MARTINO, A. et al. Selection of reference genes for normalization of *real-time* PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF- α mRNA expression. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 92-99, 2011.

MISHINA, E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, London, v. 50, n. 3, p. 500-513, 2007.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* em cafeeiros, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambú. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 56.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L.; PAIVA, M. A. Resistência em germoplasma de *Coffea* ao crestamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 53-64, 1978.

MOORE, E. R. B. et al. Non medical: *Pseudomonas*. In: DWORKIN, M. et al. (Ed). **The prokaryotes**: a handbook on the biology of bacteria. New York: Springer, 2006. p. 646–703.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of coffee in comprehensive natural products II: chemistry and biology**. 1. Ed. United Kingdom: Elsevier Ltd., 2010. 1 v.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355-356, 1990.

OPGENORTH, D. C. et al. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, United States, v. 80, n. 8, p. 868-873, 1996.

OBWALD, W. et al. Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. **Forest Pathology**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 169-190, 2014.

PALLERONI, N. J. et al. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 110, n. 1, p. 1-11, 1972.

PARADELA, FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A.; SUGIMORI, M. H. Comportamento diferencial em progênies de cafeeiros de 2 isolados do agente causador da Mancha aureolada do cafeeiro. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7., 1974, Brasília. **Resumos...**, 1974.

PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PARKINSON, N.; BRYANT, R.; BEW, J.; ELPHINSTONE, J. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the rpoD Locus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n.2, p. 338–344, 2011.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 119, 2010. (Suplemento).

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Aplicação mecânica de fungicida visando o controle da mancha aureolada e outras doenças do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Resumos...** Araxá: Embrapa, 2011 a. 1 CD-ROM.

RAMOS, A.H.; SHAVDIA, L.D. A dieback of coffee in Kenya. **Plant Disease Reporter**, United States, v. 60, n. 10, p. 831-835, 1976.

RIBEIRO, R. et al. Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brazil. **Phytopathology**, Salinas, v. 69, n. 3, p. 208-212, 1979.

ROBBS, C. F. et al. "Crestamento bacteriano das folhas": nova enfermidade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 1-5, 1974.

ROBBS, C. F. Epiphytic survival of *Pseudomonas garcae* on coffee. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: INRA, 1978. p. 747-748.

RODRIGUES NETO, J. et al. *Pseudomonas andropogonis* (Smith, 1911) Stapp, 1928, agente causal da “mancha escura bacteriana” em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 48, n. 1-4, p. 31-36, 1981.

RODRIGUES NETO, J. et al. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 85, 2006.

RODRIGUES, L. M. R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2013.

RODRIGUES, L. M. R. **Resistência de cafeeiros à mancha-aureolada: aspectos morfoanatômicos, fitopatológicos, genéticos e moleculares**. 2015. 120 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2015.

RODRIGUES, L. M. R. et al. Aggressiveness of strains and inoculation methods for resistance assessment to bacterial halo blight on coffee seedlings. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 165, n. 2, p. 105-114, 2017.

ROUX, F. et al. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 427-432, 2014.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogen bacterias**. 3. ed. Saint Paul: APS Press, 2001.

SWINGLE, D. B. Centre rot of “French Endive” or wilt of chicory (*Cichorium intybus* L.). **Phytopathology**, Salinas, v. 15, p. 730, 1925.

STEAD, D. E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 42, n. 2, p. 281-295, 1992.

TANAKA, M. A. S. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* on snap bean at Itababa region. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 31-34, 1993.

TAYEB, L. A. et al. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 5-6, p. 763-773, 2005.

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

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 1, p. 37-41, 1998.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR *fingerprinting*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI JÚNIOR, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VINATZER, B. A.; BULL, C. T. The impact of genomic approaches on our understanding of diversity and taxonomy of plant pathogenic bacteria. In: JACKSON, R. W. **Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology**. 2009. Norfolk: Ed. Caister Academic Press, 2009, p. 37-61.

WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WILLEMS, A. et al. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 42, n. 1, p. 107-119, 1992.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

YAMAMOTO, N. et al. Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 20, n. 24, p. 9145-9151, 2000.

YOUNG, J. M. E.; TRIGGS, C. M. Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 72, n. 2, p. 195-207, 1994.

YOUNG, J. M. et al. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

YOUNG, J. M. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, p. S5-S14, 2010.

ZAMBOLIM, L. et al. Café. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. 1997. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p. 83-180.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. **Palestras...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 134- 215, 1999.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia**: volume 2. 2005. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE CAFEEIROS DE MINAS GERAIS POR CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, REP-PCR E ANÁLISES FILOGENÉTICAS UTILIZANDO O *locus rpoD*

RESUMO

As doenças estão entre os principais fatores que afetam a produtividade da cultura do cafeeiro. Dentre elas, as de etiologia bacteriana, como a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg), a mancha bacteriana (*P. syringae* pv. *tabaci* - Psta), o crestamento bacteriano (*P. cichorii* - Pc) e a mancha escura (*Burkholderia andropogonis* - Ba). Entretanto, nos últimos anos a mancha aureolada tem se destacado, sendo que praticamente todos os relatos têm sido atribuídos a ela. A diagnose dessas doenças tem sido baseada nos sintomas e nos testes bioquímicos, os quais não têm sido suficientes para a identificação dos patógenos nos níveis de espécie e patovar. Portanto, métodos mais precisos e eficientes na diagnose dessas doenças são necessários. Assim, os objetivos com este trabalho foram os de identificar e diferenciar as espécies e patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro utilizando técnicas bioquímicas, moleculares e análises filogenéticas, possibilitando o levantamento da ocorrência dessas bactérias nas principais regiões produtoras do Estado de Minas Gerais. A caracterização bioquímica dos isolados, associada às técnicas de PCR utilizando *primers* específicos, rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR), e identificação filogenética utilizando o *locus rpoD*, possibilitaram a diferenciação e identificação de 73 isolados de mudas e plantas de cafeeiro como sendo Psg, cinco como Psta e seis como Pc, bem como analisar a diversidade genética entre eles, podendo ser utilizadas em análises de rotina na diagnose de patógenos de etiologia bacteriana em cafeeiros, pois discriminam as diferentes espécies e patovares de *Pseudomonas* sp que ocorrem na cultura. Este é o primeiro relato da ocorrência de mancha foliar bacteriana (Psta) em lavoura, no Estado de Minas Gerais e o primeiro relato do crestamento bacteriano (Pc) em viveiro e lavoura deste mesmo Estado após a descrição da doença no Brasil.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. BOX-PCR. *rpoD*

ABSTRACT

Bacterial diseases comprise the main factors that affect the yield of coffee crops in Brazil. Among them, the coffee halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), has gained significant importance in the recent years. In addition to this bacteriosis, the Brazilian coffee crops are also threatened by the coffee bacterial leaf spot, caused by *P. syringae* pv. *tabaci* - Psta, coffee bacterial blight, and coffee bacterial dark spot caused by *P. cichorii* - Pc and *Burkholderia andropogonis* - Ba, respectively. However, all the recent reports on the foliar bacterial diseases of coffee have been erroneously attributed to *P. syringae* pv. *garcae* only. The diagnosis of these diseases has been mainly based on the visual symptoms and biochemical tests which have not been able to correctly identify the pathogens in the species and pathovar levels. Therefore, more accurate and efficient methods for a reliable diagnosis of bacterial diseases of coffee are needed. Thus, the objectives of this work were to identify and differentiate the pathogenic *P. syringae* species and pathovars from coffee crops of Minas Gerais state by phylogenetic analyzes, biochemical and molecular techniques. The biochemical characterization of the isolates, associated with the rep-PCR technique (REP, ERIC and BOX-PCR) and phylogenetic analysis of *rpoD* locus, allowed the identification and differentiation of 73 Psg and 5 Psta strains recovered from naturally infected coffee plants. PCR assays using specific primers, identified 6 Pc strains. The molecular techniques and biochemical tests reported in this study could be used in routine diagnosis of bacterial pathogens in coffee plants, since they discriminate the different pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars that naturally occur in coffee crops. Moreover, we provide a new tool that enables the survey on the occurrence of the main bacterial diseases of coffee in the major producing areas. In conclusion, this is the first report of the occurrence of coffee bacterial leaf spot (Psta) under field conditions in Minas Gerais and the first report of coffee bacterial blight (Pc) outbreaks in nursery and field, since its first occurrence in Brazil.

Keywords: *Coffea arabica*. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. BOX-PCR. *rpoD*

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea* spp.) está entre as culturas de maior importância econômica em todo mundo. O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café e Minas Gerais o maior Estado produtor brasileiro (CONAB, 2016).

As doenças de etiologia bacteriana, nos últimos anos, tem se destacado entre os fatores que afetam a produtividade da cultura, causando perdas significativas. No Brasil, quatro bacterioses causadoras de manchas foliares foram descritas na cultura do cafeeiro: mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL et al., 1956; YOUNG et al., 1978 (Psg), mancha foliar bacteriana, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (WOLF; FOSTER, 1971; YONG et al., 1978; RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010) (Psta)), crestamento bacteriano, *Pseudomonas cichorii* (SWINGLE, 1925; STAPP, 1928; ROBBS et al., 1974 (Pc)) e mancha escura bacteriana, *Burkholderia andropogonis* (SMITH, 1911; GILLIS et al., 1995) (*sin. P. andropogonis* (SMITH, 1911; STAP, 1928)) (Ba) (RODRIGUES NETO et al., 1981).

A mancha aureolada já foi detectada nas regiões produtoras dos Estados do Paraná (KIMURA et al., 1976; MOHAN et al., 1976), São Paulo (AMARAL et al., 1956) e Minas Gerais (KIMURA et al., 1976; PATRÍCIO et al., 2010; ZOCCOLI et al., 2011) e, atualmente, é considerada uma das principais bacterioses do cafeeiro e tem sido fator limitante para o cultivo da cultura em regiões frias e expostas ao vento, com alta pluviosidade e altitudes elevadas, em lavouras em formação ou recém-podadas e/ou em viveiros (ZOCCOLI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013). A doença pode ser facilmente confundida com as demais bacterioses causadoras de manchas foliares no cafeeiro, visto que os sintomas causados por elas são muito semelhantes, caracterizando-se por manchas de coloração marrom escura, de formato irregular e envoltas por halo amarelo (ROBBS et al., 1974, RODRIGUES NETO et al., 1981; ZAMBOLIM et al., 1999; 2005; RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010). A morfologia das colônias e as características bioquímicas destas bactérias também são semelhantes (RODRIGUES NETO et al., 1981; YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD et al., 2001). Tais semelhanças se aplicam principalmente para Psg e Psta, o que pode levar ao diagnóstico incorreto da doença, podendo superestimar a ocorrência da mancha aureolada na cultura e subestimar a ocorrência da mancha foliar bacteriana. Ademais, é notório que a correta identificação do agente etiológico é premissa fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficientes de manejo.

Sendo assim, a diagnose adequada dessas doenças é um dos principais desafios encontrados por fitopatologistas, uma vez que essa tem sido baseada nos sintomas e testes bioquímicos os quais, embora fundamentais, não têm sido suficientes para a identificação dos isolados aos níveis de espécie e patovar. Portanto, métodos mais precisos e eficientes na diagnose dessas doenças são necessários.

A técnica rep-PCR, a qual engloba os protocolos REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, tem sido utilizada na diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (OPGENORTH et al., 1996; LOUWS et al., 1999; TRINDADE et al., 2005), bem como para identificar com precisão isolados aos níveis de espécie e patovar quando isolados - tipo são incluídas nas comparações (TINDALL et al., 2010).

Recentemente, análises filogenéticas comparando alinhamentos de sequências de *loci* de genes constituintes do genoma bacteriano codificadores de proteínas essenciais para a bactéria, denominados *housekeeping* genes, como o locus *rpoD*, que codifica para a síntese da RNA polimerase (PARKINSON et al., 2011; LONETTO et al., 1992), têm sido mais eficazes em classificar, caracterizar e identificar bactérias, quando comparados a métodos de caracterização anteriores como utilização do locus 16S rDNA e hibridização DNA-DNA (YAMAMOTO et al., 2000; TAYEB et al., 2005; HWANG et al., 2005).

A utilização dessas técnicas moleculares e filogenéticas, bem como a caracterização bioquímica permitirá a rápida identificação dos agentes etiológicos causadores de manchas foliares em cafeeiros aos níveis de espécie e patovar de *Pseudomonas* sp. A frequência de ocorrência do patovar *garcae* em relação aos outros isolados patogênicos a cafeeiro, em Minas Gerais, poderá contribuir para o entendimento da recente explosão da mancha aureolada no campo, mais de 50 anos após a sua detecção no Brasil.

Desse modo, objetivou-se com este trabalho identificar e diferenciar as espécies e patovares de *Pseudomonas* sp. patogênicos a cafeeiros, provenientes de diversos municípios das principais regiões produtoras do Estado Minas Gerais, utilizando técnicas bioquímicas, moleculares e análises filogenéticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados e teste de patogenicidade

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Minas Gerais, no período de setembro de 2012 a dezembro de 2016.

Amostras de folhas coletadas de mudas e/ou plantas de cafeeiros doentes, ou enviadas por produtores rurais de diversos municípios do Estado de Minas Gerais foram submetidas ao teste de exsudação em gotas e, posteriormente, ao isolamento em meio King B (KING et al., 1954), totalizando 161 isolados. Estes isolados foram, então, submetidos ao teste de patogenicidade. Para isso foram preparadas as suspensões bacterianas em solução salina (NaCl 0,85%), sendo a concentração ajustada para $A_{600} = 0,2$ (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990). Os testes de patogenicidade foram realizados por inoculação das suspensões bacterianas de cada isolado em mudas de cafeeiro sadias da cultivar Catuaí/99, utilizando uma seringa hipodérmica fina (KLEMENT, 1964). Após o surgimento dos sintomas foram feitos novos isolamentos e a comparação das colônias obtidas com as colônias originais, a fim de se completar os postulados de Koch. Os isolados tipo/referência e isolados de outras espécies (TABELA 1) foram também utilizados nas análises.

Tabela 1 - Identificação, espécie/patovar e planta hospedeira dos isolados bacterianos utilizados neste estudo. (Continua).

Isolados	Espécie/patovar	Hospedeiro
CFBP 1634	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>
CFBP 2101	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>
IBSPF 166	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Coffea arabica</i>
IBSBF 2249	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>
IBSBF 1972	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
IBSBF 1822	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Carica papaya</i>
IBSBF 1662	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Aster</i> sp.
IBSBF 1437	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Celosia plumosa</i>

IBSBF 758	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Cucumis sativus</i>
IBSBF 974	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Desmodium canum</i>
IBSBF 703	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
UFLA 160	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Lactuca sativa</i>
UFLA Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
UFLA Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>

* CFBP = Coleção Francesa de bactérias fitopatogênicas, IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP. UFLA= Universidade Federal de Lavras. Fonte: Do autor (2017).

2.2 Caracterização bioquímica

Oitenta e quatro isolados bacterianos, que tiveram a patogenicidade confirmada em plantas de cafeeiro, foram caracterizados bioquimicamente de acordo com Lelliott et al. (1966), Wilkie e Dye (1973), Rodrigues Neto et al. (1981), Young e Triggs (1994), Schaad et al. (2001) e Barta e Willis (2005). Foram utilizados os seguintes testes: reação de Gram (RYU, 1940), oxidase, arginina dihidrolase, reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, hidrólise de gelatina, hidrólise de esculina, produção de pigmento fluorescente em meio de cultura King B e utilização de: sorbitol, celobiose, trealose, sacarose, adonitol e lactose.

2.3 Caracterização molecular

2.3.1 Rep-PCR

Nas análises de rep-PCR foram utilizados os DNAs genômicos dos 84 isolados bacterianos que foram patogênicos às plantas de cafeeiro, dos isolados referência Psg CFBP 1634, Pc CFBP 2101, Psta IBSP 2249 e Ba IBSP 166, do isolado UFLA 160, UFLA Cmm e UFLA Psta. Os DNAs genômicos dos isolados foram extraídos utilizando-se o Kit de extração Archive Pure DNA Cell/Tissue (5 PRIME), posteriormente foram quantificados utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e ajustados para a concentração de 50 ng/μL, através da diluição em água ultrapura. Todos os DNAs foram armazenados a -20 °C no Laboratório de Bacteriologia de Plantas (Departamento de Fitopatologia – UFLA). Os protocolos de amplificação utilizados foram de acordo com Lows et al. (1994).

Para a técnica de REP-PCR foram utilizados os pares de *primers* correspondentes à região REP, REPIR-I (5' IIICGICGICATCIGGC 3') e REP-2I (5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3') (LOWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996) sintetizados pela Invitrogen Brasil LTDA. A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 2 µL de cada *primer* (10 µM); 0,5 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 2 µL de DNA (50 ng/µL) e 13,0 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 6 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 1 min, anelamento por 1 min a 44°C e extensão a 65°C, por 1 min, com um ciclo final de extensão a 65°C por 16 min.

Para a técnica de ERIC-PCR foram utilizados os pares de *primers* correspondentes à região ERIC, ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') e ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (LOWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996), sintetizados pela Invitrogen Brasil LTDA. A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 2 µL de cada *primer* (10 µM); 0,5 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 2 µL de DNA (50ng/µL) e 13,8 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 7 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 1min, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 65°C, por 8 min, com um ciclo final de extensão a 65°C, por 16 min.

Na técnica de BOX-PCR foi utilizado o *primer* correspondente à região BOX, BOXAIR (5' CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG 3') (LOWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996). A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 0,5 µL do *primer* (10 µM); 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 2 µL de DNA (50ng/µL) e 18 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 2 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C, por 5 min, com um ciclo final de extensão a 72°C, por 5 min.

Os produtos amplificados da rep-PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X corados com Gel RedNucleicAcid Gel Stain (Biotium®). Os marcadores utilizados foram de 1 Kb e 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os perfis eletroforéticos obtidos por rep-PCR foram analisados por sistema binário (bandas presentes 1 ou ausentes 0, para cada isolado). A matriz de similaridade foi construída

utilizando-se o coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) através do software PAST vers. 2.17 (HAMMER et al., 2001).

2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para *P. cichorii*

Foram analisados os isolados referência Psg CFBP 1634, Pc CFBP 2101, Psta IBSP 2249 e Ba IBSP 166, o isolado UFLA 160 e os 84 isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro.

Foram utilizados os pares de *primers* PscHrc662F (5' AGGCTTTATGGAAACCCT GACG 3') e PscHrc751R (5' ACAATCACCGCCACGATCAG 3'), descritos originalmente para a detecção de *P. cichorii* por PCR em tempo real. O fragmento amplificado foi de 90pb (COTTYN et al., 2011).

A reação foi realizada para o volume total de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão 5X, 1,5 µL de MgCl₂ (25mM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 µM) 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 2,0 µL do DNA (10 ng/µL) e 15,75 µL de água livre de nuclease. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100TM (*Programmable Thermal Controller*, MJ Research, Inc.), utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95° C, por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95° C por 1 min, 63° C por 1 min e 72° C por 30 segundos e extensão final a 72° C por 10 min (COTTYN et al., 2011).

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X e corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium[®]). O marcador utilizado foi 100pb DNA ladder (Bioscience).

2.3.3 Identificação filogenética dos isolados utilizando o locus *rpoD*

Os estudos de filogenia realizados no presente trabalho foram baseadas nos estudos de Parkinson et al. (2011), os quais analisaram o locus *rpoD* de todos os isolados-tipo de 67 patovares pertencentes ao complexo de espécies de *Pseudomonas syringae* para se confirmar o parentesco genético entre eles.

Para a análise por filogenia, utilizando o locus *rpoD*, da proximidade genética entre alguns isolados bacterianos de cafeeiro utilizados no presente estudo com os isolados referência utilizados por Parkinson et al. (2011), foram acrescentados aos isolados já

empregados por estes autores: oito isolados referência de Psta (provenientes dos oito hospedeiros), o isolado referência de Psg e o isolado referência de Pc, e também quatro isolados que, de acordo com as análises de rep-PCR, apresentaram perfil genético semelhante ao isolado referência de Psg, cinco isolados que apresentaram perfil genético semelhante ao isolado referência de Psta e cinco isolados que foram identificados como Pc através da utilização de *primers* específicos para a espécie. Estes isolados foram analisados juntamente com os isolados de todas as espécies-tipo e todos os patovares-tipo obtidos a partir do NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria), ICMP (*International Collection of Microorganisms from Plants*) e CFBP (*French Collection of Plant associated bacteria*), os quais estão descritos no trabalho de Parkinson et al. (2011). Estes autores utilizaram a espécie *P.cichorii* como “*outgroup*” nas análises filogenéticas, e no presente trabalho, esta espécie foi incluída nas análises com as demais espécies e patovares do complexo *P.syringae*, sendo utilizadas as espécies *P. viridiflava* e *P. syringae* pv. *ribicola* como “*outgroup*”. As sequências de todos os isolados foram obtidas através dos números de acesso no GenBank (FN433209-FN565199).

Para amplificação do gene *rpoD* presente no genoma destes isolados, foram utilizados os *primers* PsrpoD FNP1 (5' TGAAGGCGARATCGAAAT CGCCAA 3') e PsrpoDnprpcr1 (5' YGCMGWCAGC TTYTGCTGGCA 3') (PARKINSON et al., 2011) sintetizados pela Invitrogen Brasil LTDA. O protocolo de amplificação foi utilizado de acordo com Parkinson et al. (2011). A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,5µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTPs mix (10 mM); 1µL de cada *primer* (10 µM); 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 1 µL de DNA (50 ng/µL) e 16,75 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 94°C, por 2 min; 34 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 30 seg, anelamento por 30 seg a 55°C e extensão a 72°C por 30 seg, com um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados (700 pb) foram analisados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os produtos da PCR foram purificadas utilizando-se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). As etapas de purificação foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante, consistindo na dissolução do gel, filtragem, duas lavagens do filtro com etanol e eluição do DNA em água livre de nucleasse.

Os produtos purificados foram sequenciados pela MacroGen (Rockville, Maryland, Estados Unidos). Alinhamentos múltiplos de sequências de nucleotídios foram construídos, utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) e implementados usando MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2008). As árvores filogenéticas foram construídas usando o software PAUP 4.0 (Swofford, 2002) utilizando máxima parcimônia (MP). Os dados foram submetidos a análise bootstrap, utilizando 1000 repetições.

3 RESULTADOS

3.1 Obtenção dos isolados e confirmação da patogenicidade

A partir das plantas e mudas de cafeeiro provenientes de diversos municípios do Estado de Minas Gerais, que apresentaram resultado positivo para o teste de exsudação em gotas foram obtidos 161 isolados.

Dos 161 isolados bacterianos obtidos de cafeeiro, 84 tiveram a patogenicidade confirmada pela produção de sintomas típicos nas mudas de café cinco dias após a inoculação, como lesões necróticas, envoltas ou não por um halo amarelado (TABELA 2). Posteriormente, foi feito novamente o isolamento a partir das folhas sintomáticas e observou-se o crescimento de colônias semelhantes às aquelas inicialmente inoculadas, apresentando formato arredondado com margens irregulares, tamanho pequeno a médio, com algumas apresentando florescência no meio King B e outras não. Dessa forma, completaram-se os postulados de Koch. Os isolados referência utilizados neste estudo também tiveram a patogenicidade confirmada.

Tabela 2 - Municípios de origem dos isolados obtidos de cafeeiros (MG) no período de 2012 a 2015. (Continua).

Isolados	Local de coleta
UFLA 06; UFLA 20; UFLA 21; UFLA 97; UFLA 98; UFLA 99; UFLA 106; UFLA 107; UFLA 109; UFLA 77; UFLA 78; UFLA 79; UFLA 80; UFLA 85; UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89 A; UFLA 89C; UFLA 90; UFLA 91A; UFLA 101; UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 105	Nepomuceno
UFLA 43, UFLA 44, UFLA 46, UFLA 48; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54; UFLA 58; UFLA 59; UFLA 60; UFLA 61; UFLA 114; UFLA 115; UFLA 116; UFLA 121; UFLA 117; UFLA 118; UFLA 119; UFLA 120;	Três Pontas

UFLA 127; UFLA 130; UFLA 157; UFLA 158

UFLA 69	Candeias
UFLA 81; UFLA 82; UFLA 83	Patos de Minas
UFLA 84; UFLA 136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159	Lavras
UFLA 112	Varginha
UFLA 113	Vargem Grande
UFLA 122; UFLA 123	Nova Rezende
UFLA 125; UFLA 128; UFLA 129; UFLA 142; UFLA 143	São Sebastião do Paraíso
UFLA 126; UFLA 154	Sto Antônio do Amparo
UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133; UFLA 134; UFLA 135	Patrocínio
UFLA 138; UFLA 139	Elói Mendes
UFLA 148; UFLA 149	Ijací
UFLA 150; UFLA 151	Muzambinho
UFLA 152; UFLA 153; UFLA 156	Santana da Vargem

Fonte: Do autor (2017).

3.2 Caracterização bioquímica

Os 84 isolados patogênicos ao cafeeiro foram Gram negativos, arginina dihidrolase negativo, incitaram a hipersensibilidade em folhas de fumo e hidrolisaram a esculina. A maior parte dos isolados foi negativa para oxidase, exceto Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147 e UFLA 159, e também hidrólise da gelatina positivo, exceto Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147, UFLA 159, UFLA 21, UFLA 48, UFLA 60, UFLA 61, UFLA 79, UFLA 85, UFLA 87, UFLA 98 e UFLA 102 (TABELA 3). A maioria dos isolados produziu ácido a partir de sorbitol, exceto UFLA 44, e sacarose, exceto Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147, UFLA 159 os quais não utilizaram nenhum dos dois açúcares. Dos 84 isolados, 30 utilizaram trealose e 24 utilizaram celobiose. Adonitol não foi utilizado por nenhum isolado e lactose foi utilizado apenas pelos isolados Psta IBSP 2249, UFLA 142 e UFLA 143 (TABELA 3).

Os isolados UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147 e UFLA 159 apresentaram o mesmo padrão bioquímico do isolado Pc CFBP 2101, referência de *P. cichorii*. Os isolados UFLA 69, UFLA 128, UFLA 129, UFLA 142 e UFLA 143

apresentaram o mesmo padrão bioquímico do isolado Psta IBSP 2249, referência de *P. syringae* pv. *tabaci* e também apresentaram fluorescência em meio King B (TABELA 3).

Tabela 3 - Características bioquímicas de isolados bacterianos patogênicos a cafeeiros (MG). (Continua).

Testes*	Positivo (+)	Negativo (-)
Oxidase	Pc CFBP 210; UFLA 135; UFLA 136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159; UFLA160	Psg CFBP 1634; Psta IBSP 2249; IBSPF 166 e RI ¹
King B	Pc CFBP 210; Psta IBSP 2249; UFLA 69; UFLA 128; UFLA 129; UFLA 135; UFLA 136; UFLA 142; UFLA 143; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159; UFLA160	Psg CFBP 1634; IBSPF 166 e RI ¹
Hidrólise de gelatina	Psg CFBP 1634; Psta IBSP 2249 e RI ¹	Pc CFBP 2101; IBSPF 166; UFLA 135; UFLA136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159; UFLA 21; UFLA 48; UFLA 60; UFLA 61; UFLA 79; UFLA 85; UFLA 87; UFLA 98 e UFLA 102
Sorbitol	Psg CFBP 1634; Psta IBSP 2249 e RI ¹	Pc CFBP 2101; IBSPF 166; UFLA 44; UFLA 135; UFLA 136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159; UFLA160
Sacarose	Psg CFBP 1634; Psta IBSP 2249 e RI ¹	Pc CFBP 2101; IBSPF 166; UFLA 44; UFLA 135; UFLA 136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159; UFLA160
Trealose	Psg CFBP 1634; Psta IBSP 2249; UFLA 06; UFLA 21; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 69; UFLA 79; UFLA 80; UFLA 91; UFLA 102; UFLA 104; UFLA 112; UFLA 113; UFLA 116; UFLA 117; UFLA 120; UFLA 121; UFLA 128; UFLA 130; UFLA 131; UFLA 132; UFLA 134; UFLA 142; UFLA 143; UFLA 148; UFLA 150; UFLA 151; UFLA 152; UFLA 153; UFLA 156	Pc CFBP 2101; IBSPF 166 e RI ¹

Lactose	Psta IBSP 2249; UFLA 142; UFLA 143	Psg CFBP 1634; Pc CFBP 2101; IBSPF 166 e RI ¹
Celobiose	Psta IBSP 2249; UFLA 06; UFLA 53; UFLA 60; UFLA 69; UFLA 77; UFLA 81; UFLA 91; UFLA 98; UFLA 102; UFLA 116; UFLA 118; UFLA 121; UFLA 128; UFLA 129; UFLA 130; UFLA 134; UFLA 142; UFLA 143; UFLA 152; UFLA 153; UFLA 156; UFLA 157; UFLA 158	Psg CFBP 1634; Pc CFBP 2101; IBSPF 166 e RI ¹

Adonitol - Todos os isolados

*Adaptado de Lelliot et al. 1966; Rodrigues Neto et al. 1981; Bradbury, 1986; Schaad et al. 2001. Positivo (+) = 80% ou mais linhagens são positivas; Negativo (-) = 80% ou mais linhagens são negativas. RI¹: restante dos isolados, isolados utilizados no presente estudo (UFLA 06 a UFLA 159), exceto os que apresentaram resultado contrários a estes.

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 rep-PCR

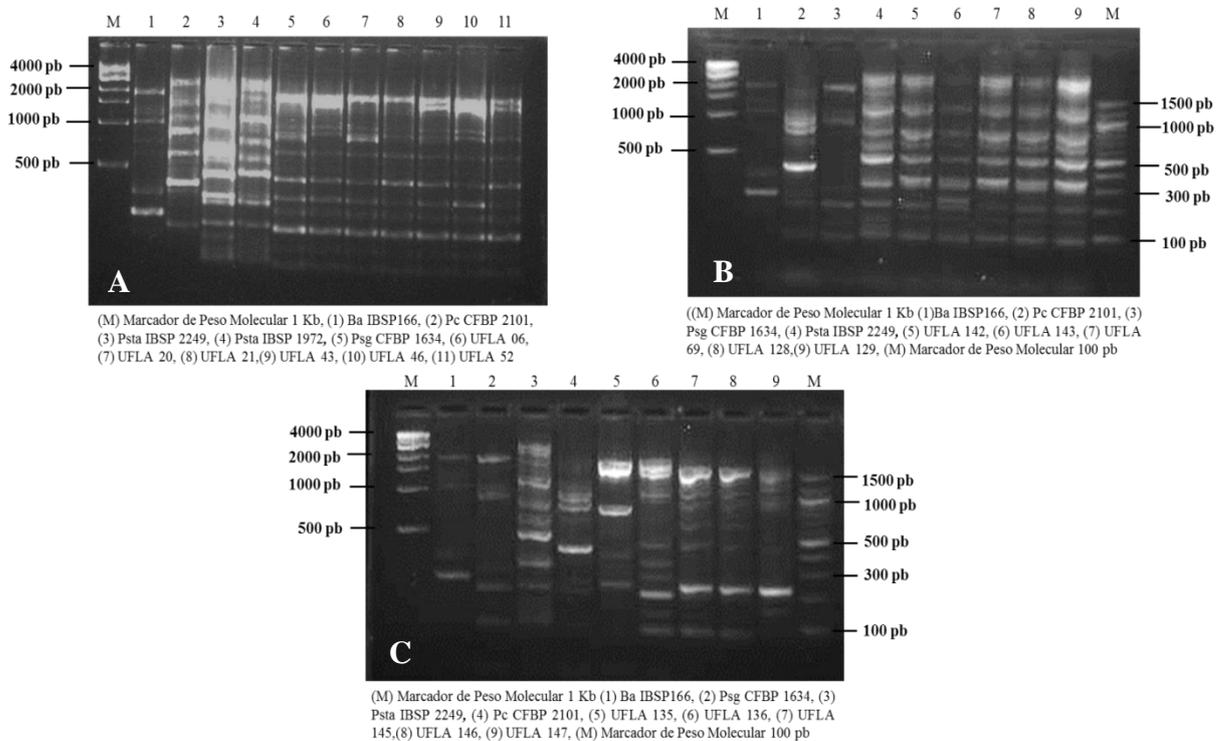
As análises dos padrões de *fingerprinting*, utilizando cada uma das três técnicas (REP, ERIC e BOX-PCR) demonstraram que a maioria dos isolados, independente do município de origem, apresentaram perfil genético semelhante ao isolado referência Psg CFBP 1634, sendo, portanto, identificados como *P. syringae* pv. *garcae* (FIGURAS 1 a 6; TABELA 4). Na REP-PCR, observou-se que 45 isolados apresentaram 100% de similaridade com Psg CFBP 1634, 17 isolados apresentaram 95% de similaridade com Psg CFBP 1634 e 10 isolados apresentaram 92% de similaridade com Psg CFBP 1634 (FIGURAS 1 e 2). Nas técnicas ERIC e BOX-PCR, observou-se que a maioria dos isolados (73 isolados) apresentou 100% de similaridade com Psg CFBP 1634 (FIGURAS 2 a 6). Destes 73 isolados, 26 são provenientes do município de Nepomuceno, 23 isolados provenientes de Três Pontas, três isolados de cada um dos municípios: Patos de Minas e Santana da Vargem; quatro isolados de Patrocínio, um isolado de cada um dos municípios: Lavras, Varginha, Vargem Grande, São Sebastião do Paraíso e dois isolados de cada um dos municípios: Nova Rezende, Santo Antônio do Amparo, Elói Mendes, Ijací e Muzambinho (TABELA 4).

A utilização de cada uma das três técnicas também demonstrou que os isolados UFLA 69, proveniente do município de Candeias e os isolados UFLA 128, UFLA 129, UFLA 142 e UFLA 143, provenientes do Município de São Sebastião do Paraíso, apresentaram perfis

genéticos semelhantes ao isolado referência Psta IBSP 2249, sendo, portanto, identificados como *P. syringae* pv. *tabaci* (FIGURAS 1 a 6; TABELA 4).

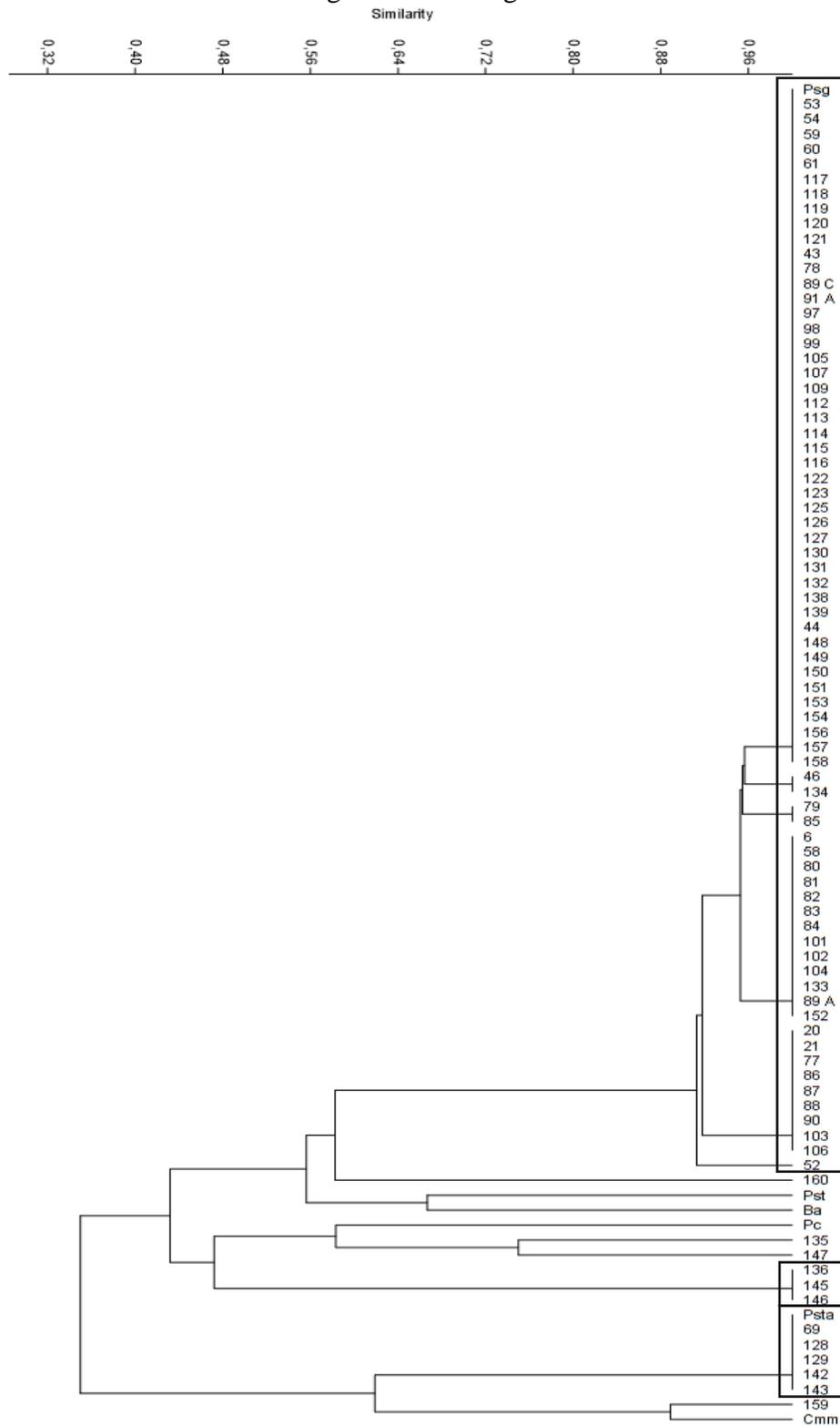
Os isolados UFLA 135, proveniente do município de Patrocínio, e os isolados UFLA136, UFLA 145, UFLA 146 e UFLA 147 e UFLA 159, provenientes do município de Lavras, apresentaram padrão de bandas diferente de todos os isolados referência utilizados, quando se utilizou cada uma das três técnicas. No entanto, na REP e ERIC-PCR, observou-se que os isolados UFLA 136, UFLA 145 e UFLA 146 apresentaram 100% de similaridade entre eles e na BOX-PCR, apenas os isolados UFLA 145 e UFLA 146 apresentaram 100% de similaridade entre eles (FIGURAS 1 a 6).

Figura 1 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose.



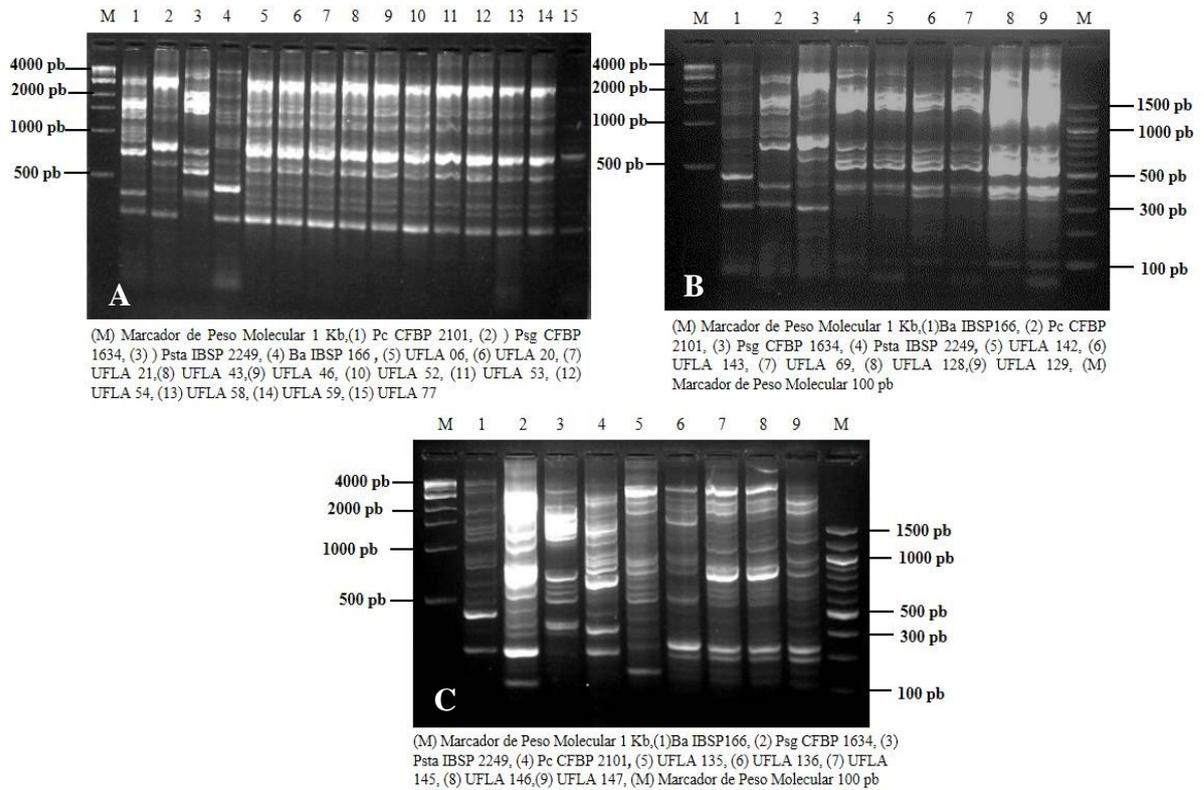
Legenda: Análise dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* REPIR e REP2I, comparando perfis genéticos de isolados provenientes de café com os isolados referência de Psg (A), Psta (B) e Pc (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 2 - Dendograma de similaridade.



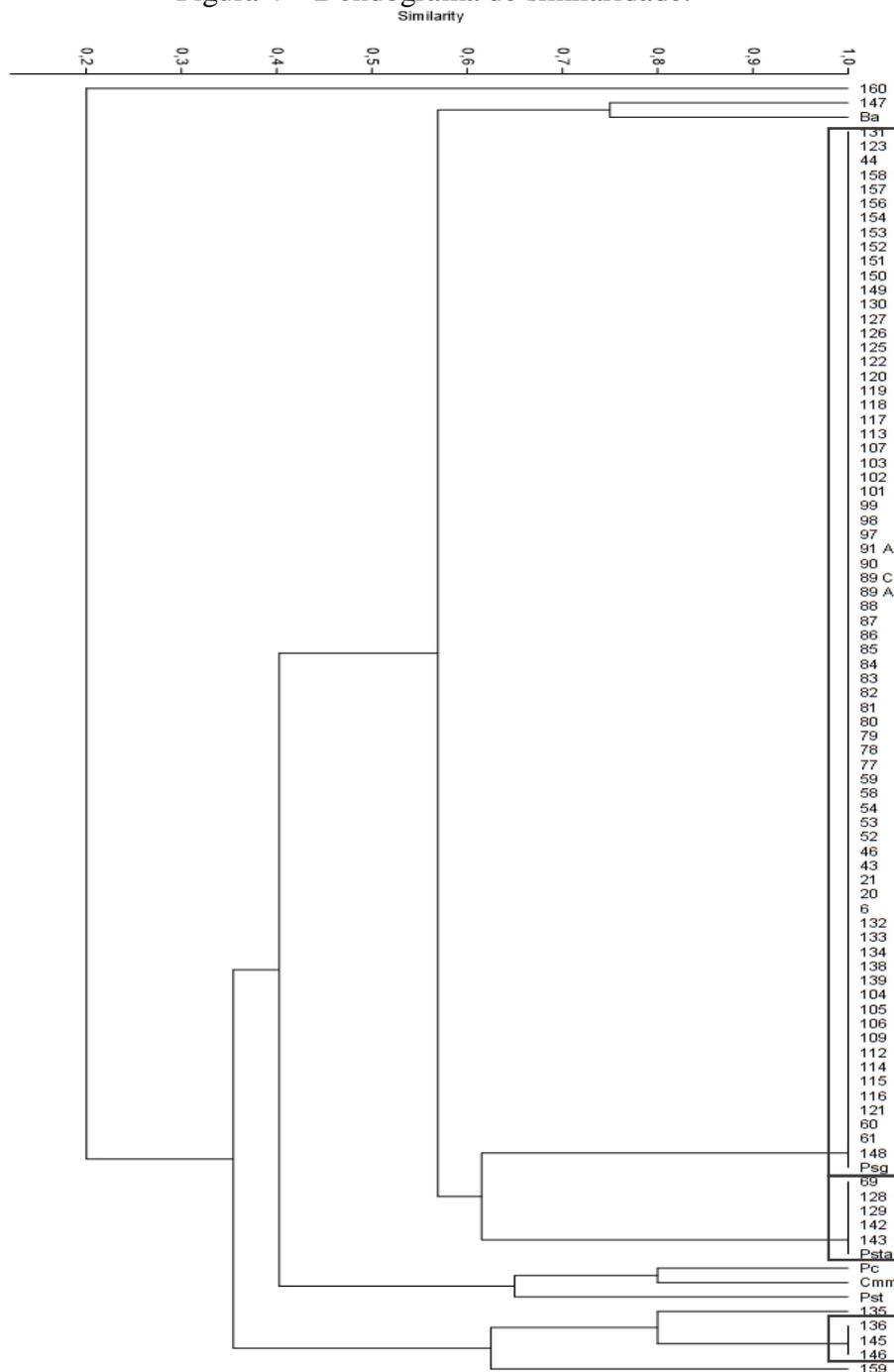
Legenda: Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação dos 84 isolados bacterianos obtidos de cafeeiro, isolados referência (Psg, Psta, Pc e Ba), e isolados UFLA160, UFLA Psta e UFLA Cmm, a partir do *primers* REP IR e REP 2I, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice, por meio do Programa Past. Fonte: Do autor (2017).

Figura 3 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose.



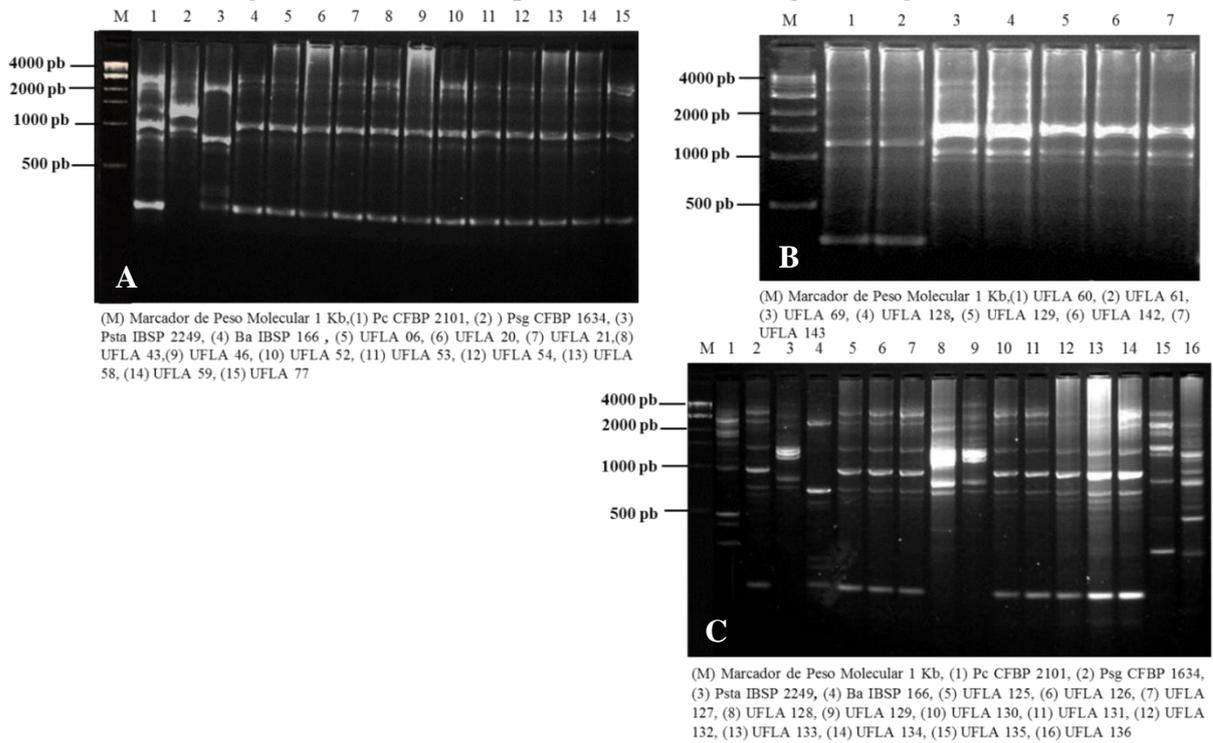
Legenda: Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o par de *primers* ERIC1R e ERIC2, comparando perfis genéticos de isolados provenientes de café com os isolados referência de Psg (A), Psta (B) e Pc (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 4 – Dendograma de similaridade.



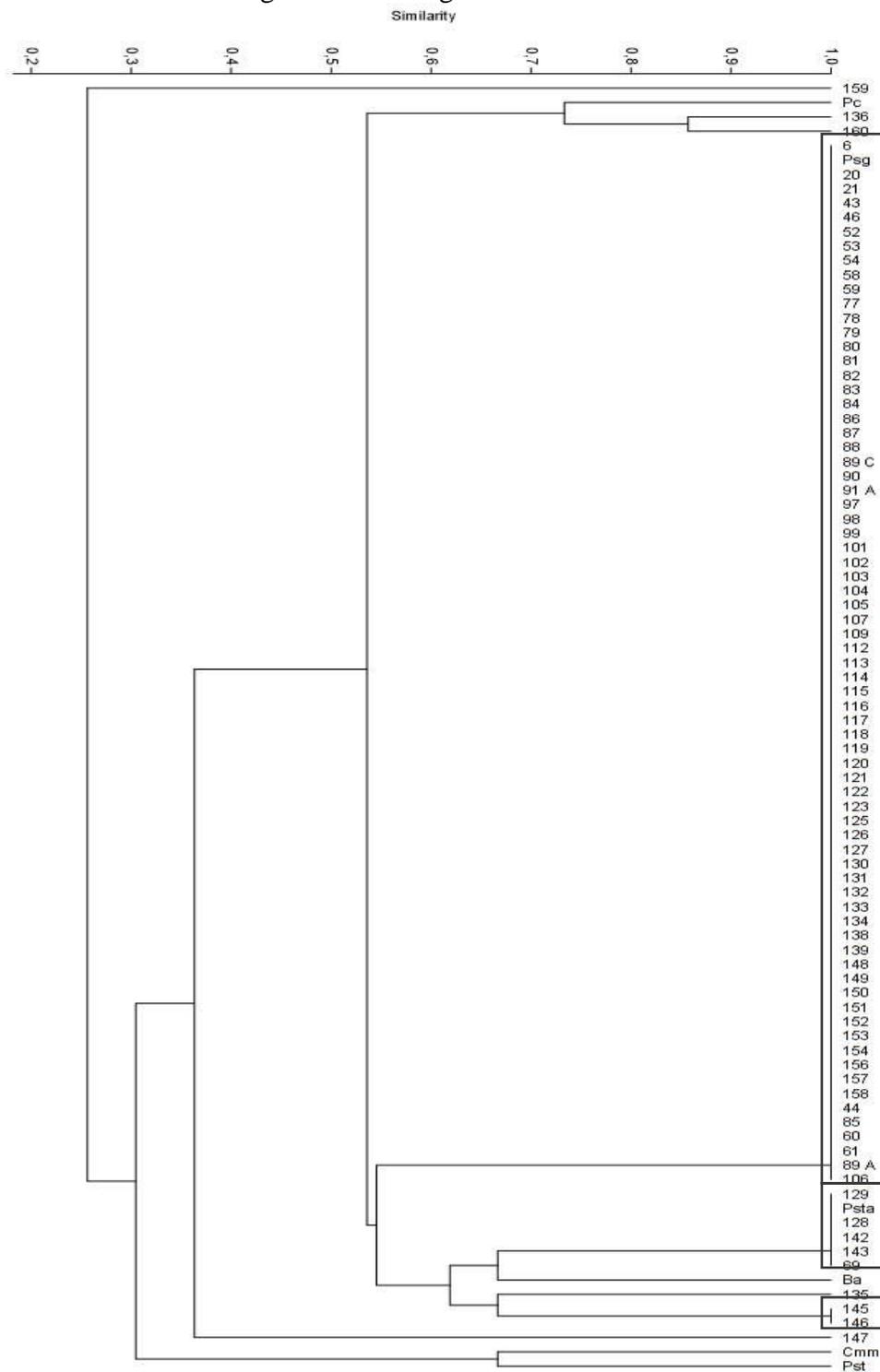
Legenda: Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação dos 84 isolados bacterianos obtidos de cafeeiro, isolados referência (Psg, Psta, Pc e Ba), e isolados UFLA160, UFLA Psta e UFLA Cmm, a partir do *primers* ERIC1R e ERIC2, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice, por meio do Programa Past. Fonte: Do autor (2017).

Figura 5 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose.



Legenda: Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o *primer* BOX1AR, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos obtidos de cafeeiro com os isolados referência de Psg (A) e Psta (B) e comparando isolados de Psg e Psta (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 6 - Dendograma de similaridade.

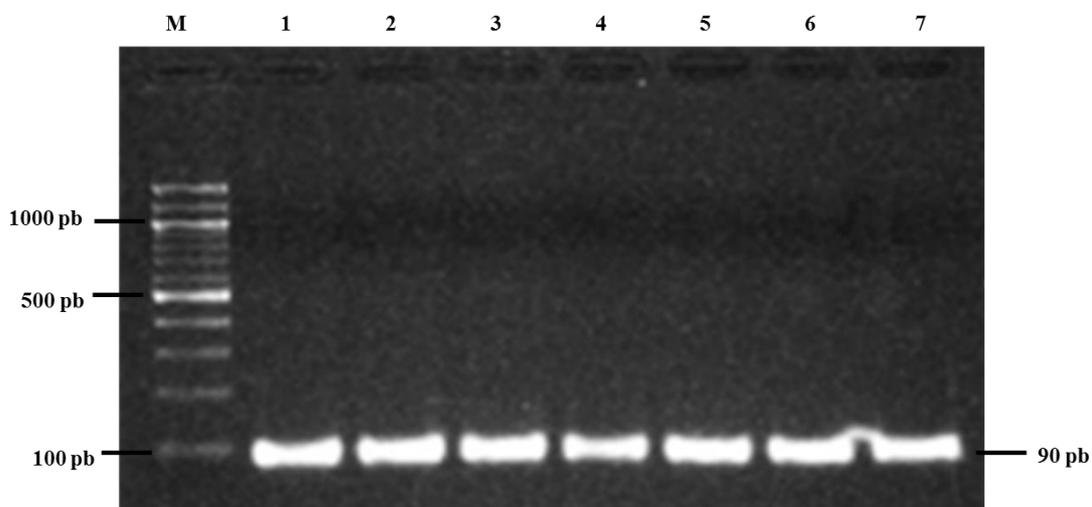


Legenda: Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação dos 84 isolados bacterianos obtidos de cafeeiro, isolados referência (Psg, Psta, Pc e Ba), e isolados UFLA160, UFLA Psta e UFLA Cmm, a partir do *primer* BOX1AR, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice, por meio do Programa Past. Fonte: Do autor (2017).

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para *P. cichorii*

Os isolados Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA 136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147, UFLA 159 e UFLA 160 apresentaram o produto de amplificação de 90 pb, quando se utilizou o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R (FIGURA 7), específicos para *P. cichorii*, o que permitiu afirmar que esses isolados pertencem à esta espécie. O restante dos isolados estudados não apresentaram o produto de amplificação de 90 pb.

Figura 7 - Análise dos produtos da PCR em gel de agarose.



Legenda: Análise dos produtos da PCR em gel de agarose, utilizando o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R para detecção de *Pseudomonas cichorii* (Pc). (M) Marcador de Peso Molecular 100 pb, (1) Pc CFBP 2101, (2) UFLA 135, (3) UFLA 136, (4) UFLA 145, (5) UFLA 146, (6) UFLA 147, (7) UFLA 159. Fonte: Do autor (2017).

3.3.3 Análise filogenética dos isolados utilizando o *locus rpoD*

A identificação filogenética utilizando o *locus rpoD* possibilitou diferenciar os isolados de Psg, Psta e Pc testados, conforme no trabalho de Parkinson et al. (2011), visto que estes foram agrupados em clados distintos, de acordo com o filogrupo (SARKAR et al., 2006) e a genomoespécie a que pertencem, sendo que, apenas Pc não é atribuída a nenhuma das nove genomoespécies propostas por Gardan et al. (1999).

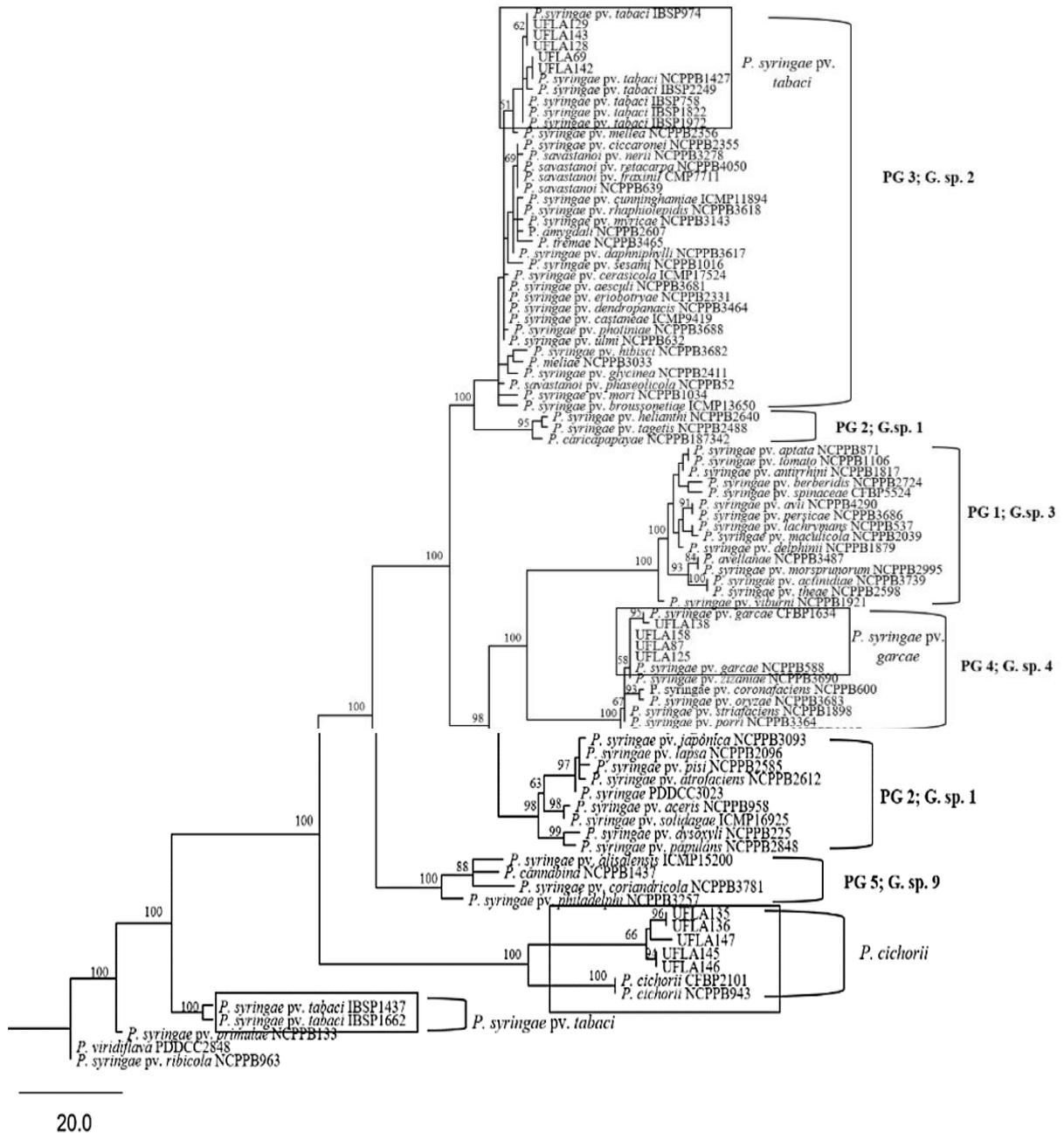
Todos os isolados foram agrupados em clados apoiados em altos valores de *bootstrap* (mínimo de 95%), indicando atribuição confiável dos isolados aos filogrupos e genomoespécies, através das análises do *locus rpoD*. Também houve boa correlação entre as

genomoespécies, propostas por Gardan et al. (1999), e as classificações de filogrupos, propostas por Sarkar et al. (2006).

O isolado referência de Psg (CFBP 1634), bem como quatro isolados que apresentaram padrão de bandas semelhante a este referência nas reações de rep-PCR (UFLA 87, UFLA 125, UFLA 138, UFLA 158) se agruparam juntamente ao isolado referência de *P. syringae* pv. *garcae* (NCPBP588) utilizado nos estudos de Parkinson et al. (2011) no Filogrupo 4 e genomoespécie 4. Este filogrupo abrangeu também *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *striaefaciens* e outros quatro patovares, todos patógenos de monocotiledôneas, exceto *P. syringae* pv. *garcae*, que causa doença em cafeeiro.

Os isolados referências de *P. syringae* pv. *tabaci* dos hospedeiros *Coffea arabica* (IBSP 2249), *Nicotiana tabacum* (IBSP 1972), *Phaseolus vulgaris* (IBSP 703), *Cucumis sativus* (IBSP 758), *Carica papaya* (IBSP 1822) e *Desmodium canum* (IBSP 974) e os cinco isolados que apresentaram padrão de bandas semelhante a estes referências nas reações de rep-PCR (UFLA 69, UFLA 128, UFLA 129, UFLA 142 e UFLA 143) se agruparam juntamente ao isolado referência de *P. syringae* pv. *tabaci* (NCPBP1427) (PARKINSON et al., 2011) no Filogrupo 3, genomoespécie 2. Porém, os isolados referência de *P. syringae* pv. *tabaci* dos hospedeiros *Aster* sp (IBSP 1662) e *Celosia plumosa* (IBSP 1437) foram agrupados em outro clado distante filogeneticamente dos demais citados.

O isolado referência de *P. cichorii* agrupou-se juntamente com os cinco isolados identificados como *P.cichorii* (UFLA 135, UFLA 136, UFLA 145, UFLA 146 e UFLA 147) e com o isolado referência de *P.cichorii* (NCPBP943) utilizado nos estudos de Parkinson et al. (2011). Porém, no estudo destes autores a espécie *P.cichorii* foi utilizada como “outgroup” (FIGURA 8).

Figura 8 - Filogenia gerada a partir do *locus rpoD*.

Legenda: Filogenia gerada a partir do *locus rpoD* de espécies e patovares tipo pertencentes ao complexo *Pseudomonas spp* utilizados por Parkinson et al. (2011) e isolados de *Pseudomonas spp* patogênicos a cafeeiros de Minas Gerais utilizados no presente estudo, utilizando-se o programa PAUP (Swofford, 2002). Fonte: Do autor (2017).

Tabela 4 - Isolados obtidos de cafeeiro, local de coleta e espécie/patovar à qual foram identificados.

Isolados	Local de coleta	Espécie/patovar
UFLA 06; UFLA 20; UFLA 21; UFLA 77; UFLA 78; UFLA 79; UFLA 80; UFLA 85; UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89 A; UFLA 89C; UFLA 90; UFLA 91A; UFLA 97; UFLA 98; UFLA 99; UFLA 101; UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 105; UFLA 106; UFLA 107; UFLA 109	Nepomuceno	
UFLA 43, UFLA 44, UFLA 46, UFLA 48; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54; UFLA 58; UFLA 59; UFLA 60; UFLA 61; UFLA 114; UFLA 115; UFLA 116; UFLA 121; UFLA 117; UFLA 118; UFLA 119; UFLA 120; UFLA 127; UFLA 130; UFLA 157; UFLA 158	Três Pontas	
UFLA 81; UFLA 82; UFLA 83	Patos de Minas	
UFLA 84	Lavras	
UFLA 112	Varginha	
UFLA 113	Vargem Grande	
UFLA 122; UFLA 123	Nova Rezende	Psg ¹
UFLA 125	São Sebastião do Paraíso	
UFLA 126; UFLA 154	Sto Antônio do Amparo	
UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133; UFLA 134	Patrocínio	
UFLA 138; UFLA 139	Elói Mendes	
UFLA 148; UFLA 149	Ijací	
UFLA 150; UFLA 151	Muzambinho	
UFLA 152; UFLA 153; UFLA 156	Santana da Vargem	
UFLA 69	Candeias	
UFLA 128; UFLA 129; UFLA 142; UFLA 143	São Sebastião do Paraíso	Psta ²
UFLA 135	Patrocínio	
UFLA 136; UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147; UFLA 159	Lavras	Pc ³

Psg¹ e Psta²: isolados identificados como *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci*, respectivamente, através dos testes bioquímicos e rep-PCR por apresentar padrões de bandas semelhantes aos respectivos isolados referência. Pc³: isolados identificados como *P. cichorii* de acordo com os testes bioquímicos e a PCR utilizando *primers* específicos para a espécie. Fonte: Do autor (2017).

4 DISCUSSÃO

Nos testes bioquímicos, a maioria dos isolados bacterianos patogênicos a cafeeiros utilizou os açúcares sorbitol e sacarose. Alguns apresentaram resultados positivos para celobiose e trealose, não utilizaram lactose e adonitol e apresentaram pouca fluorescência em meio king B, características da espécie *P. syringae*. Porém, alguns isolados utilizaram lactose, não utilizaram sorbitol e/ou sacarose ou não hidrolisaram a gelatina, conforme esperado para esta espécie (TABELA 3). Tal fato pode ocorrer, pois nos testes bioquímicos os resultados são considerados como positivos ou negativos para uma determinada espécie ou patovar quando 80% dos isolados testados apresentam essa característica (YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD, et al., 2001), porém este fato pode gerar dúvidas ou um diagnóstico inconclusivo nas análises de rotina nos laboratórios de diagnose.

Uma importante característica para o diagnóstico dos dois patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro é a produção de forte fluorescência produzida por isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* em meio KB ao se observar sob a luz UV. A maioria dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* exibe fraca fluorescência neste meio, mas produz pigmento de melanina, causando escurecimento do meio, o que não é observado para isolados do patovar *tabaci* (BARTA; WILLIS, 2005).

O fato dos isolados UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147 e UFLA 159 terem apresentado o mesmo padrão bioquímico do isolado Pc CFBP 2101, referência de *P. cichorii* e terem agrupado com o isolado-tipo desta espécie utilizado por Parkinson et al. (2011) na filogenia *rpoD* permitiu concluir que eles pertencem a essa espécie (LELLIOTT et al., 1966; WILKI; DYE, 1973; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD, et al., 2001). Tal fato foi comprovado através da utilização de *primers* específicos para *P. cichorii* (COTTYN et al., 2011). Na rep-PCR foi possível verificar que isolados de *P. cichorii* obtidos de diferentes hospedeiros apresentaram padrão de bandas diferente do isolado referência Pc CFBP 2101, indicando haver variabilidade intraespecífica (FIGURAS 1 a 7). Após a descrição do crestamento bacteriano (*P. cichorii*) no Brasil, por Robbs et al. (1974), este é o primeiro relato da doença em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais.

Teoricamente é possível diferenciar *P. cichorii* de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* por meio de testes bioquímicos (LEVANA, oxidase, hidrólise da gelatina e utilização de trealose, sacarose, sorbitol, celobiose, trigonelina e L (+) tartarato) (SCHAAD et al., 2001). Entretanto, há variabilidade entre isolados em relação a estes testes, além do que a maior dificuldade está em diferenciar *P. syringae* pv. *garcae* de *P. syringae* pv. *tabaci*,

devido a semelhança dos sintomas causadas por estas bactérias em plantas de cafeeiro, das características bioquímicas apresentadas por elas e da morfologia semelhante das colônias (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001). A PCR pode ser utilizada para Pc, pois há *primers* específicos descritos para esta espécie (COTTYN et al., 2011), entretanto não há *primers* específicos descritos na literatura para identificação dos patovares Psg e Pst. Nos testes LOPAT (Levana + Oxidase + Podridão em batata + Arginina + Hipersensibilidade em Tabaco), *Burkholderia andropogonis* apresenta resultados negativos, confirmando não pertencer ao grupo das bactérias produtoras de pigmentos fluorescentes, sendo possível diferenciá-la das outras bactérias patogênicas ao cafeeiro (SCHAAD et al., 2001). No presente estudo nenhum dos isolados obtidos de cafeeiros de Minas Gerais apresentou características bioquímicas ou moleculares semelhantes a *B. andropogonis*, portanto podemos afirmar que a bactéria não foi constatada no campo.

A rep-PCR e a filogenia utilizando o *locus rpoD* permitiram identificar os isolados pertencentes à espécie *P. syringae* e também diferenciá-los e identificá-los como patovar *garcae* ou *tabaci* de acordo com o perfil genético semelhante entre eles e os respectivos isolados referência Psg CFBP 1634 e Psta IBSP 2249 (FIGURAS 1 a 6; TABELA 4) na rep-PCR e, nas análises filogenéticas utilizando o *locus rpoD* se agruparam com os respectivos isolados-tipo utilizados por Parkinson et al. (2011).

Através das análises de rep-PCR foi possível observar que houve diversidade genética entre os isolados de espécies diferentes obtidos do cafeeiro, mas não entre isolados dentro de um mesmo patovar, como no caso dos isolados de Psg e Psta, que apresentaram padrão de bandas semelhantes entre eles e seus respectivos isolados referência de cada patovar. Assim, foi possível identificar e diferenciar, com precisão, os dois patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro, *garcae* e pv. *tabaci*, e diferenciá-los da espécie *P. cichorii*, devido a boa correlação entre os testes bioquímicos e moleculares utilizados.

Parkinson et al. (2011) analisaram o *locus rpoD* de todos os isolados-tipo dos 67 patovares pertencentes ao complexo de espécies de *Pseudomonas syringae* para confirmar o parentesco de todas as espécies validamente publicadas. O *locus rpoD* já foi estudado por Sarkar et al. (2006), quando foram definidos cinco principais filogrupos aos quais todas as espécies do complexo *P. syringae* foram atribuídas. Os resultados das análises filogenéticas utilizando o *locus rpoD* realizadas por Parkinson et al. (2011) apresentaram boa correlação entre as genomoespécies propostas por Gardan et al. (1999) e as classificações de filogrupos propostas por Sarkar et al. (2006). Verificou-se concordância entre os resultados obtidos no presente estudo com os resultados obtidos por Parkinson et al. (2011), sendo que através da

utilização da sequência do gene *rpoD*, os isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii* puderam ser classificados em clados (filogrupos) distintos. Dessa forma, o locus *rpoD* pode ser usado para classificar isolados em filogrupos ou genomoespécies, o que irá facilitar a identificação e monitoramento dessas bactérias (PARKINSON et al., 2011).

O clado em que foi incluído *P. syringae* pv. *garcae*, patogênico ao cafeeiro, compreende cinco agentes patogênicos a plantas da família *Poaceae*. Um fato que liga esta família de plantas hospedeiras a este grupo é a patogenicidade de *P. syringae* pv. *garcae* quando inoculada em aveia, conforme visto em experimentos feitos por Barta e Willis (2005). Os autores também relatam a semelhança genética entre os patovares *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* e *P. syringae* pv. *striaefaciens*, propondo que estes formam o mesmo patovar. Estes patovares foram agrupados juntos, no filogrupo 4, genomoespécie 4.

Os resultados obtidos nos testes bioquímicos, morfológicos e moleculares acima mencionados, permitem constatar a predominância de *P. syringae* pv. *garcae* causando doença em cafeeiro em lavouras e viveiros de diferentes municípios de Minas Gerais. Verificou-se também a ocorrência de *P. syringae* pv. *tabaci* em cafeeiro em lavouras de dois municípios de Minas Gerais, Candeias e São Sebastião do Paraíso, e de *P. cichorii* em Lavras e Patrocínio.

O único relato obtido até o momento da ocorrência de *P. syringae* pv. *tabaci* em cafeeiro foi em viveiros do município de Arandu, no Estado de São Paulo em 2006 (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010). Assim, o presente estudo é o primeiro relato de ocorrência de mancha-bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tabaci* em condições de campo no Estado de Minas Gerais.

Devido à semelhança dos sintomas causados principalmente por Psg e Psta, a mancha bacteriana do cafeeiro pode estar sendo incorretamente diagnosticada como mancha aureolada, visto que Psta é associada com um grande número de plantas hospedeiras e é possível que algumas destas plantas possam atuar como fonte de inóculo primário para o café. Tal fato pode estar ligado aos estudos feitos por Petek et al. (2006), os quais sugeriram a ocorrência de patótipo similar a *P. syringae* pv. *garcae* em condições de campo no Estado do Paraná, permitindo supor que as lesões observadas por estes autores em plantas de café resistentes a *P. syringae* pv. *garcae* presente em campo experimental localizado em Londrina - PR, foram causadas por *P. syringae* pv. *tabaci*, entretanto, mais estudos precisam ser feitos para comprovar estas informações (RODRIGUES et al., 2015).

Dentro do complexo de *P. syringae*, as reações bioquímicas, gene da região 16S rDNA e análises filogenéticas da composição de ácidos graxos da parede celular (STEAD, 1992) não

tem sido suficientes para a diferenciação confiável dos patovares. A hibridização DNA-DNA sempre foi um método padrão para determinar as relações entre as bactérias, no entanto é um método difícil de ser utilizado e apresenta erro experimental (HWANG et al., 2005). Portanto, a rep-PCR tem sido proposta como uma ferramenta de diagnóstico rápida e sensível, possibilitando a identificação e diferenciação de fitobactérias (Trindade et al., 2005; Marques et al., 2008). Segundo Tindall et al. (2010), através da rep-PCR é possível identificar com precisão isolados em sua correta espécie e patovar quando isolados-tipo/patótipos são incluídas nas comparações.

Em estudos feitos por Belan et al. (2016), através da técnica de BOX-PCR associada a testes bioquímicos e de patogenicidade, foi possível identificar *P. syringae* pv. *garcae* em sementes de cafeeiro, constituindo o primeiro relato da ocorrência deste patógeno em sementes desta cultura. Através deste estudo, foi possível comprovar que sementes de café coletadas a partir de plantas sintomáticas podem abrigar *P. syringae* pv. *garcae*, consistindo em um eficiente meio de disseminação desta bactéria a longas distâncias e também servindo como fonte de inóculo inicial para epidemias em viveiros e campos.

Segundo Louws et al. (1994), a rep-PCR, é adequada para uma rápida caracterização molecular de bactérias patogênicas de plantas, especialmente ao nível de patovar. Esses autores utilizaram a técnica e verificaram que cada conjunto de primers (REP, BOX e ERIC) foi eficaz para distinguir os diferentes patovares de *Xanthomonas campestris* e de *Pseudomonas syringae*. Na diferenciação dos patovares de *P. syringae*, os *fingerprints* gerados foram altamente característicos para a maioria dos patovares testados e houveram poucas variações intrapatovares. Marques et al. (2008) obtiveram a diferenciação de espécies e patovares de *P. syringae*, utilizando a técnica BOX-PCR e observaram perfis genéticos semelhantes entre 40 isolados de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Utilizando as técnicas de rep-PCR e estudo filogenético do *locus rpoD* realizados no presente trabalho foi possível diferenciar e identificar as espécies e patovares de *P. syringae* que causam doença no cafeeiro. Portanto, estas técnicas consistem em métodos eficazes e sensíveis para a diagnose destas bacterioses em plantas de cafeeiro e a utilização destas permitiu constatar que a mancha aureolada causada por *P. syringae* pv. *garcae* é predominante em lavouras e viveiros de café em diversos municípios de Minas Gerais, porém, a mancha bacteriana e o crestamento bacteriano também ocorrem. Essa correta identificação do agente causal poderá ajudar nos estudos epidemiológicos das doenças do cafeeiro, pois a ampla gama de plantas hospedeiras naturais existente para *P. cichorri* e *P. syringae* pv. *tabaci*, em contraste com a estrita gama de hospedeiras de *P. syringae* pv. *garcae*, poderá esclarecer a

origem do inóculo, bem como explicar o recente surto no campo da mancha aureolada tanto tempo após a sua primeira detecção.

Os resultados obtidos neste trabalho permitirão, em estudos posteriores, o desenho de *primers* específicos para identificação por PCR de Psg e Psta, a partir das sequências de regiões específicas do gene *rpoD* de cada uma destes patovares.

5 CONCLUSÃO

A rep-PCR e a caracterização bioquímica permitiram a identificação precisa dos isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro ao nível de espécie e patovar quando comparados aos isolados - tipo/referência.

Nas análises filogenéticas utilizando o *housekeeping* gene *rpoD*, os isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii* foram classificados em clados (filogrupos) distintos.

Foi possível identificar e diferenciar os patovares *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* patogênicos ao cafeeiro em Minas Gerais.

Este é o primeiro relato da ocorrência de mancha foliar bacteriana (*P. syringae* pv. *tabaci*) em lavoura, no Estado de Minas Gerais e o primeiro relato do crestamento bacteriano (*P. cichorii*) em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais após a descrição da doença no Brasil (ROBBS et al. em 1974).

Não foi constatada a presença da mancha escura (*Burkholderia andropogonis*) em lavouras e viveiros de café amostrados em Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRICIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em mudas de café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., mês, 2012. 1 CD-ROM.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 153, n. 7-8, p. 492-499, 2005.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986.
- BELAN, L. L. et al. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee seeds. **Australian Journal of Crop Science**, Lavras, v. 10, n. 7, p. 1015, 2016.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Café – quarto levantamento. Brasília: CONAB, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_26_51_boletim_cafe_portugues_-_4o_lev_-_dez.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2016.
- COTTYN, B. et al. Development of a *real time* PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2011.
- DESTÉFANO, S. A. L. et al. Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1162-1163, 2010.
- GARDAN, L. et al. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 49, n. 2, p. 469-478, 1999.
- GILLIS, M et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 45, n. 2, p. 274-289, 1995.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, United States, v. 9, n. 4, 2001.
- HWANG, M. S. H. et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9. p. 5182-5191, 2005.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, United States of America, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KIMURA, O.; ROBBS, C. F.; FERRARI, J. A. R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 104.

KLEMENT, Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, Londres, v. 199, n. 4890, p. 299-300, 1963.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.

LONETTO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C. A. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 12, p. 3843, 1992.

LOUWS, F. J. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

MARQUES, A. S. A. et al. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 106-112, 2008.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* em cafeeiros, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambú. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 56

KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, London, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355-356, 1990.

OPGENORTH, D. C. et al. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, United States, v. 80, n. 8, p. 868-873, 1996.

PARKINSON, N.; BRYANT, R.; BEW, J.; ELPHINSTONE, J. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the rpoD Locus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n.2, p. 338-344, 2011.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 119, 2010. (Suplemento).

- PETEK, M. R. et al. Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. **Bragantia**, Campinas, v.65 n. 1, p.65-73, 2006.
- ROBBS, C. F. et al. "Crestamento bacteriano das folhas": nova enfermidade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 1-5, 1974.
- RODRIGUES NETO, J. et al. *Pseudomonas andropogonis* (Smith, 1911) Stapp, 1928, agente causal da "mancha escura bacteriana" em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 48, n. 1-4, p. 31-36, 1981.
- RODRIGUES NETO, J. et al. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 85, 2006.
- RODRIGUES, L. M. R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2013.
- RODRIGUES, L. M. R. **Resistência de cafeeiros à mancha-aureolada: aspectos morfoanatômicos, fitopatológicos, genéticos e moleculares**. 2015. 120 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2015.
- RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram negative organisms without staining. **The Kitasato Archives of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.
- SARKAR, S. F. et al. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. **Genetics**, Austin, v. 174, n. 2, p. 1041-1056, 2006.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogen bacterias**. 3. ed. Saint Paul: APS Press, 2001.
- STEAD, D. E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 42, n. 2, p. 281-295, 1992.
- SWINGLE, D. B. Centre rot of "French Endive" or wilt of chicory (*Cichorium intybus* L.). **Phytopathology**, Salinas, v. 15, p. 730, 1925.
- SWOFFORD, D. L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods) version 4.0. B5. Sunderland, MA. 2002.
- TAYEB, L. A. et al. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 5-6, p. 763-773, 2005.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Harpenden, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR *fingerprinting*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005.

WILKIE, J. P.; DYE, D. W. *Pseudomonas cichorii* causing to mato and celery diseases in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 17, n. 2, p. 123-130, 1973.

YOUNG, J. M. E.; TRIGGS, C. M. Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 72, n. 2, p. 195-207, 1994.

YAMAMOTO, N. et al. Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 20, n. 24, p. 9145-9151, 2000.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. **Palestras...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 134- 215, 1999.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia**: volume 2. 2005. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.

CAPÍTULO 3

ESTUDOS DE PATOGENICIDADE DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* E *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* ISOLADOS DE CAFEIRO

RESUMO

O correto diagnóstico da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg) e da mancha bacteriana do cafeeiro (*P. syringae* pv. *tabaci* - Psta) é um grande desafio para os fitopatologistas, visto que além de causarem sintomas semelhantes em plantas de cafeeiro, apresentam morfologia das colônias e caracterização bioquímica muito semelhantes. Até a presente data, sabe-se que *Coffea arabica* é o único hospedeiro natural de Psg, enquanto Psta afeta ampla gama de hospedeiros. No entanto, ainda não foram realizados estudos visando testar a patogenicidade de isolados de Psg em hospedeiros de Psta e de isolados de Psta provenientes dos diferentes hospedeiros em plantas de cafeeiro, o que poderia contribuir para um diagnóstico mais seguro e para o controle destes patógenos em mudas e cafeeiros no campo. Assim, os objetivos com este trabalho foram verificar a virulência de isolados de Psg, e também realizar testes de inoculação cruzada para se confirmar a especificidade de hospedeiros de Psg e Psta. Nos testes de virulência, foi verificada alta diversidade entre os isolados de Psg obtidos de diferentes cultivares de cafeeiro e de diferentes municípios de Minas Gerais. O isolado referência (CFBP 1634) e oito isolados de Psg considerados mais virulentos causaram doença nos hospedeiros de Psta testados: *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Aster* sp, *Coffea arabica*, *Celosia plumosa* e *Desmodium canum*. Todos os isolados de Psta, independentemente do hospedeiro de origem causaram doença em mudas de cafeeiro. Com estes resultados verifica-se que não há especificidade de hospedeiros para Psg e Psta.

Palavras-chave: Mancha aureolada. Mancha bacteriana. Inoculação. *Pseudomonas syringae*. Patovar

ABSTRACT

The correct diagnosis of coffee halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) and coffee bacterial leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*- Psta) is a great challenge for phytopathologists, since in addition to causing similar symptoms in coffee plants, causing similar symptoms in coffee plants, and exhibit very similar colony morphology and biochemical characterization. Nowadays, *Coffea arabica* is known to be the only natural host of Psg, while Psta affects a wide range of hosts. However, no studies have yet been carried out to test the pathogenicity of Psg isolates in Psta hosts and Psta isolates from different hosts in coffee plants, which could contribute to a accurate diagnosis and to the control of these pathogens in seedlings and coffee trees in the field. Thus, the objectives of this work were to verify the virulence of Psg isolates, and also to perform cross inoculation tests to confirm the specificity of Psg and Psta hosts. In the virulence tests, high diversity was observed among the Psg isolates obtained from different coffee cultivars and from different cities of Minas Gerais. The reference isolate (CFBP 1634) and eight Psg isolates considered more virulent induced disease in the tested Psta hosts: *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Aster sp*, *Coffea arabica*, *Celosia plumosa* and *Desmodium canum*. All isolates of Psta, independently of the origin host, caused disease in coffee seedlings. These results showed that there is no host specificity for Psg and Psta.

Keywords: Bacterial halo blight. Bacterial leaf spot. Inoculation. *Pseudomonas syringae*. Pathovar

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção e exportação de café e o segundo maior consumidor do produto, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor brasileiro (CONAB, 2016). Entre as doenças de etiologia bacteriana que afetam a cultura do cafeeiro, a mancha aureolada causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL et al., 1956) (Psg) é considerada atualmente uma das principais. Além desta, a mancha foliar bacteriana, causada por *P. syringae* pv. *tabaci* (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010) (Psta), ocorre em cafeeiro produzindo sintomas muito semelhantes aos da mancha aureolada, que se caracterizam principalmente por manchas nas folhas de coloração pardo-escura circundadas por halo amarelado tanto em mudas em viveiro como em plantas no campo (ROBBS et al., 1974, RODRIGUES NETO et al., 1981; ZAMBOLIM et al., 1999; 2005; RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010). Além da semelhança dos sintomas causados por estas bactérias em plantas de cafeeiro, a morfologia das colônias, bem como a caracterização bioquímica destas bactérias também são muito semelhantes (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001), fazendo com que a correta diagnose destas bacterioses seja um grande desafio para os fitopatologistas. A maioria dos relatos recentes de doenças em cafeeiro apresentando os sintomas descritos tem sido automaticamente atribuídos a *P. syringae* pv. *garcae* e é possível que a ocorrência da mancha bacteriana no cafeeiro seja subestimada devido a superestimação da ocorrência da mancha aureolada na cultura.

No que diz respeito ao complexo sistema de interação planta-patógeno, embora fitopatógenos apresentem a habilidade de reconhecer sinais das plantas para iniciar a infecção (DALIO et al., 2014), as plantas também desenvolveram um sistema imune eficiente, que é ativado após o reconhecimento de sinais da presença do patógeno (DALIO, 2013; GASSMANN; BHATTACHARJEE, 2012). Esta “batalha” resulta em uma constante pressão de seleção entre os organismos envolvidos. Diante disso, os fitopatógenos mais adaptados desenvolveram diversos fatores de virulência capazes de suplantar o sistema basal de defesa das plantas (resistência de não-hospedeira) (HE et al., 2007; MISHINA; ZEIER, 2007). Dentre estes fatores, destacam-se moléculas efetoras (produtos de genes Avr), secretadas através do sistema de secreção tipo III; proteínas de nucleação de gelo; resistência antimicrobiana e produção de toxinas (HWANG et al., 2005). Diferentes patovares de

Pseudomonas syringae são conhecidos produtores de toxinas como tabtoxina, coronatina, faseolotoxina, tagetitoxina e siringomicina (BENDER, 1999; HWANG et al., 2005).

A tabtoxina é produzida por *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *coronafaciens*. A tabtoxina produzida por estes patógenos é responsável pela formação do halo clorótico em torno da lesão nas folhas de plantas hospedeiras, devido à intervenção no metabolismo do nitrogênio (BALLIO et al., 1991) e embora essa toxina não seja essencial para a patogenicidade, ela pode favorecer o aumento da virulência de alguns isolados (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

Até a presente data, estudos relatam que o café é o único hospedeiro natural de *P. syringae* pv. *garcae* (KIMURA et al., 1973; BRADBURY, 1986) e sintomas foram obtidos por inoculação artificial em: *Citrus* sp., *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicon* (sin. *Lycopersicon esculentum*), *Olea europea*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutibulum* e *Solanum tuberosum* (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA; WILLIS, 2005).

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* possui uma ampla gama de hospedeiros (BRADBURY, 1986) e foi detectada em mais de 17 hospedeiros naturais de muitas famílias botânicas no Brasil, incluindo café (*Coffea arábica*), fumo (*Nicotiana tabacum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), pepino (*Cucumis sativus*), mamão (*Carica papaya*), *Desmodium canum*, *Aster* sp, *Celosia plumosa*, entre outras (BRADBURY, 1986; TANAKA et al., 1993; BERIAM et al., 2006; MALAVOLTA JUNIOR et al., 2008). No entanto estudos visando testar a patogenicidade de isolados de Psg em hospedeiros de Psta e de isolados de Psta provenientes dos diferentes hospedeiros em plantas de cafeeiro ainda não foram realizados. Tais estudos seriam interessantes do ponto de vista epidemiológico, pois poderiam esclarecer a origem do inóculo bacteriano e impedir que a doença se propague de um cultivo a outro. Se não houver especificidade de hospedeiros para Psg e Psta, tanto o café como as plantas hospedeiras naturais de Psta podem servir como reservatório de inóculo para estes patógenos, permitindo sua sobrevivência por longo tempo e dificultando sua eliminação das áreas de cultivo. Desse modo, o estudo de patogenicidade destes dois patovares patogênicos ao cafeeiro pode contribuir para o controle da população destes patógenos, em um programa de manejo integrado de doenças bacterianas no cafeeiro.

Assim, os objetivos com este trabalho foram verificar a diversidade patogênica de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e também realizar testes de inoculação cruzada para se confirmar a especificidade de hospedeiros de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos isolados bacterianos

Para o teste de virulência foram utilizados o isolado referência de *P. syringae* pv. *garcae* (Psg CFBP 1634), obtido da “*Collection Français e de Bactéries Phytopathogènes*” (CFBP) e 73 isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* obtidos de folhas e hastes coletadas de mudas e/ou plantas de cafeeiros doentes, ou enviadas por produtores rurais de diversos municípios do Estado de Minas Gerais (TABELA 1).

Para o teste de inoculação cruzada foram utilizados o isolado referência de Psg (CFBP 1634) e oito isolados de Psg (UFLA 59, UFLA 60, UFLA 126, UFLA 131, UFLA 134, UFLA 149 e UFLA 158) considerados mais agressivos de acordo com o teste de virulência realizado neste trabalho. Também foram utilizados oito isolados referência de *P. syringae* pv. *tabaci*, obtidos do Instituto Biológico de São Paulo, provenientes dos seguintes hospedeiros: *Coffea arabica* (IBSP 2249), *Nicotiana tabacum* (IBSP 1972), *Phaseolus vulgaris* (IBSP 703), *Cucumis sativus* (IBSP 758), *Carica papaya* (IBSP 1822), *Desmodium canum* (IBSP 974), *Aster sp* (IBSP 1662) e *Celosia plumosa* (IBSP 1437).

Tabela 1- Isolados obtidos, cultivar do cafeeiro doente e local onde foram coletados.
(Continua).

Isolados	Cultivar	Local de coleta
UFLA 06; UFLA 20; UFLA 21; UFLA 97; UFLA 98; UFLA 99; UFLA 106; UFLA 107; UFLA 109	Mundo Novo 376/4	Nepomuceno
UFLA 77; UFLA 78; UFLA 79; UFLA 80; UFLA 85; UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89 A; UFLA 89C; UFLA 90; UFLA 91A; UFLA 101; UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 105	Catuaí Vermelho/99	
UFLA 43, UFLA 44, UFLA 46, UFLA 48; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54; UFLA 58; UFLA 59; UFLA 60; UFLA 61	Mundo Novo 376/4	Três Pontas
UFLA 114; UFLA 115; UFLA 116; UFLA 121; UFLA 117; UFLA 118; UFLA 119; UFLA 120; UFLA 127; UFLA 130; UFLA 157; UFLA 158	Catuaí Vermelho/99	
UFLA 81; UFLA 82; UFLA 83	Catuaí Vermelho/99	Patos de Minas
UFLA 84	Catuaí Vermelho/99	Lavras
UFLA 112	Catuaí Vermelho/99	Varginha
UFLA 113	Catuaí Vermelho/99	Vargem Grande
UFLA 122; UFLA 123	Catuaí Vermelho/99	Nova Rezende
UFLA 125	Acaiá	São Sebastião do Paraíso
UFLA 126	Mundo Novo 376/4	
UFLA 154	Catuaí 2SL	Sto Antônio do Amparo
UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133; UFLA 134	Mundo Novo 376/4	Patrocínio
UFLA 138; UFLA 139	Catuaí Vermelho IAC 144	Elói Mendes
UFLA 148; UFLA 149	Catuaí Amarelo IAC 62	Ijací

UFLA 150; UFLA 151	Catuaí Vermelho IAC 144	Muzambinho
UFLA 152; UFLA 153; UFLA 156	Mundo Novo 376/4	Santana da Vargem

Fonte: Do autor (2017).

2.2 Virulência de isolados bacterianos de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* obtidos de diferentes cultivares de cafeeiro e locais de coleta

Para os estudos de virulência os 73 isolados de Psg foram semeados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio King B (KING et al., 1954) e incubados a 28°C. Após 48 horas foram preparadas as suspensões bacterianas em solução salina (NaCl a 0,85%) estéril, na concentração $OD_{600nm} = 0,4$. As inoculações foram feitas em mudas de cafeeiro sadias da cultivar Catuaí vermelho IAC-99, contendo quatro pares de folhas verdadeiras, utilizando-se um conjunto de multiagulhas, as quais foram imersas na suspensão bacteriana. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, sendo cada repetição representada por uma muda, sendo inoculados o primeiro e o segundo pares de folhas. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas testemunhas inoculadas apenas com solução salina (NaCl 0,85%). Após a inoculação, as mudas foram mantidas por 72 horas em câmara úmida à temperatura de 23 °C, umidade relativa superior a 70% e fotoperíodo de 12 h de luz. A severidade da doença foi avaliada com base na área ocupada pelas lesões, utilizando-se a escala diagramática proposta por Belan et al. (2014). A primeira avaliação foi feita cinco dias após a inoculação, sendo realizadas sete avaliações no total. A média da severidade dos dois pares de folhas inoculados foi empregada para calcular a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) (SHANER; FINNEY, 1977) para cada isolado. Os dados de AACPS foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial utilizando-se o software "R" (versão 3.1.3). As folhas sintomáticas foram coletadas e fragmentos das lesões foram submetidos ao teste de exsudação em gota para confirmação da etiologia bacteriana e realizado o isolamento da bactéria presente nas amostras que tiveram a etiologia bacteriana confirmada. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento vegetal e foi repetido duas vezes.

2.3 Inoculação cruzada dos isolados de Psg e Psta em mudas de café e plantas hospedeiras de Psta

Os isolados referência de Psta obtidos dos oito diferentes hospedeiros (IBSP 1972, IBSP 703, IBSP 758, IBSP 1822, IBSP 974, IBSP 1662, IBSP 1437 e IBSP 2249) foram inoculados em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) sadias da cultivar Catuaí vermelho IAC-99, contendo quatro pares de folhas verdadeiras. O isolado referência de Psg (CFBP 1634) e os sete isolados de Psg considerados os mais virulentos (UFLA 59, UFLA 60, UFLA 126, UFLA 131, UFLA 134, UFLA 149 e UFLA 158) dentre os 73 testados no item anterior, foram inoculados em hospedeiros de Psta. Os métodos de inoculação utilizados foram: injeção, multiagulhas e pulverização da suspensão bacteriana. Cada isolado foi inoculado em três plantas de cada espécie testada para cada método de inoculação utilizado, totalizando nove plantas inoculadas para cada isolado. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas testemunhas inoculadas apenas com solução salina (NaCl a 0,85%).

Os isolados bacterianos foram semeados em placas de 90 mm de diâmetro contendo meio King B, incubados a 28°C e após 48 horas foi preparada a suspensão bacteriana com solução salina (NaCl a 0,85%) estéril, na concentração $OD_{600nm} = 0,4$.

As mudas foram mantidas por 24 horas antes da inoculação e por 72 horas após inoculação em câmara úmida à temperatura de 23 ° C e umidade relativa superior a 70%. O experimento foi monitorado diariamente quanto ao aparecimento de sintomas. Foram realizadas as avaliações da incidência da doença, ou seja, utilizando-se o método qualitativo, presença ou ausência de sintomas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e repetido duas vezes.

Ao final das avaliações as folhas sintomáticas foram coletadas e fragmentos das lesões foram submetidos ao teste de exsudação em gota para confirmação da etiologia bacteriana. Em seguida foi realizado o isolamento da bactéria presente nas amostras que tiverem a etiologia bacteriana confirmada. Também foi realizada a REP-PCR para a comparação do perfil genético das colônias reisoladas com os dos respectivos isolados-referência.

Na técnica de REP-PCR foram utilizados os pares de *primers* correspondentes à região REP, REPIR-I (5' IICGICGICATCIGGC 3') e REP-2I (5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3') (LWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996) sintetizados por Invitrogen Brasil LTDA. Foi utilizado o protocolo de amplificação de Lows et al. (1994). A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 2,0µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 2 µL de cada *primer* (10 µM); 0,5 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL)

(Invitrogen), 2µL de DNA (50 ng/µL) e 13,0µL de água livre de nuclease. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 6 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 1 min, anelamento por 1 min a 44°C e extensão a 65°C por 1 min, com um ciclo final de extensão a 65°C por 16 min. Os produtos amplificados da rep-PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X corados com Gel RedNucleicAcid Gel Stain (Biotium®).

3 RESULTADOS

3.1 Virulência de isolados bacterianos de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* obtidos de diferentes cultivares de cafeeiro e locais de coleta

Todos os 73 isolados de *P. syringae* pv. *garcae* foram capazes de infectar as plantas de café, porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste de Scott Knott entre os isolados para a variável severidade da doença (AACPS) (TABELA 2). Os primeiros sintomas da doença foram observados a partir de sete dias após a inoculação, caracterizando-se como manchas necróticas envoltas por halo amarelado (FIGURA 1).

Verificou-se ampla diversidade patogênica entre os isolados de *P. syringae* pv. *garcae* testados. Os 35 isolados compreendidos entre o isolado UFLA 59 e o isolado UFLA 103 (TABELA 2) foram os mais virulentos, visto que apresentaram os maiores valores de AACPS, ou seja, apresentaram maior severidade da doença. Os 17 isolados compreendidos entre o isolado UFLA 150 e UFLA 106 (TABELA 2) foram os menos virulentos, visto que apresentaram os menores valores de AACPS, ou seja, apresentaram menor severidade da doença, sendo os demais isolados moderadamente virulentos (TABELA 2). Não foram observados sintomas de mancha aureolada no tratamento controle.

As colônias obtidas no reisolamento das bactérias presentes nas folhas sintomáticas e que tiverem a etiologia bacteriana confirmada através do teste de exsudação em gota, foram semelhantes às colônias de *P. syringae* pv. *garcae* inoculadas, completando-se os postulados de Koch.

Tabela 2 - Média da área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) da mancha aureolada (*P. syringae* pv. *garcae*) inoculada em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) ‘Catuai vermelho IAC-99’.

ISOLADOS	Média AACPS		ISOLADOS	Média AACPS	
UFLA 59	2.2020316	a	UFLA 58	1.2088279	b
UFLA 126	2.1022107	a	UFLA 104	1.1344239	b
UFLA 60	2.0928572	a	UFLA 119	1.0883929	b
UFLA 131	2.0475275	a	UFLA 48	1.0816356	b
UFLA 149	2.0283636	a	UFLA 80	1.0806965	b
UFLA 134	1.9864651	a	UFLA 148	1.0001082	b
UFLA 158	1.9807440	a	UFLA 152	0.9370410	b
UFLA 115	1.9575131	a	UFLA 79	0.9355078	b
UFLA 78	1.9530543	a	UFLA 84	0.9176730	b
UFLA 97	1.9199431	a	UFLA 151	0.8980594	b
UFLA 112	1.9036173	a	UFLA 46	0.8244071	b
UFLA 77	1.8963521	a	UFLA 132	0.7900642	b
UFLA 89C	1.8636177	a	UFLA 122	0.7271757	b
UFLA 118	1.8550144	a	UFLA 86	0.7000330	b
UFLA 87	1.8260795	a	UFLA 53	0.6961199	b
UFLA 154	1.8120794	a	UFLA 43	0.6843379	b
UFLA 125	1.8097911	a	UFLA 133	0.6538456	b
UFLA 117	1.8068687	a	UFLA 116	0.5463252	b
UFLA 82	1.7308040	a	UFLA 61	0.4927691	b
UFLA 44	1.7263789	a	UFLA 52	0.3858693	b
UFLA 153	1.7118671	a	UFLA 156	0.3560620	b
UFLA 90	1.7110022	a	UFLA 150	0.1326000	c
UFLA 83	1.7064084	a	UFLA 139	0.3332110	c
UFLA 157	1.6676457	a	UFLA 114	0.3270410	c
UFLA 130	1.6440153	a	UFLA 89A	0.3042132	c
UFLA 123	1.6375788	a	UFLA 88	0.2876730	c
UFLA 127	1.6340086	a	UFLA 101	0.2780594	c
UFLA 120	1.5789440	a	UFLA 98	0.2652762	c
UFLA 113	1.5788995	a	UFLA 99	0.2500321	c
Psg CFBP 1634	1.5705025	a	UFLA 91A	0.2475972	c
UFLA 20	1.5619438	a	UFLA 105	0.2300220	c
UFLA 85	1.4923047	a	UFLA 06	0.2165198	c
UFLA 102	1.4639540	a	UFLA 138	0.2053342	c
UFLA 109	1.4338646	a	UFLA 54	0.1858453	c
UFLA 103	1.3664212	a	UFLA 121	0.1641253	c
			UFLA 107	0.1535697	c
			UFLA 21	0.1456582	c
			UFLA 106	0.1251511	c

* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2017).

Figura 1 - Sintomas causados pelos isolados em mudas de cafeeiro.



Legenda: Sintomas causados pelos isolados UFLA 105 (A), UFLA 58 (B) e UFLA 120 (C), 14 dias após inoculação em mudas de cafeeiro. Fonte: Do autor (2017).

3.2 Inoculação cruzada de isolados de Psg e Psta em mudas de café e plantas hospedeiras de Psta.

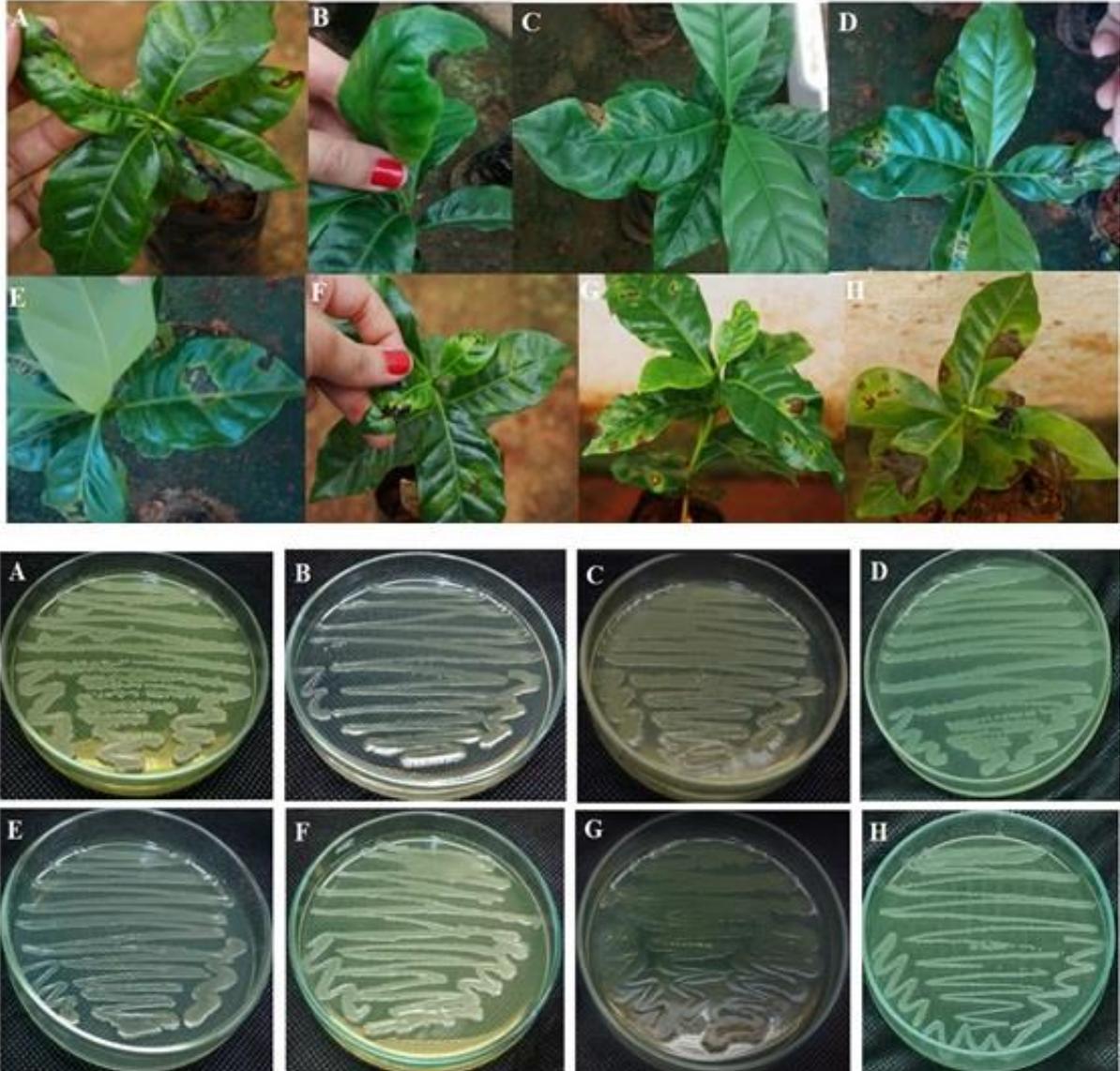
Observou-se que todos os isolados referência de Psta, independentemente do hospedeiro de origem (*Nicotiana tabacum* (IBSP 1972), *Phaseolus vulgaris* (IBSP 703), *Cucumis sativus* (IBSP 758), *Carica papaya* (IBSP 1822), *Desmodium canum* (IBSP 974), *Aster sp* (IBSP 1662), *Celosia plumosa* (IBSP 1437) e *Coffea arábica* (IBSP 2249) e do método de inoculação utilizado (injeção, multiagulhas e pulverização) causaram doença em mudas de cafeeiro, as quais apresentaram sintomas de manchas nas folhas de cor marrom circundadas por halo amarelado (FIGURA 2).

Os oito isolados de Psg obtidos de cafeeiro (CFBP 1634, UFLA 59, UFLA 60, UFLA 126, UFLA 131, UFLA 134, UFLA 149 e UFLA 158), independentemente do método de inoculação utilizado (injeção, multiagulhas e pulverização) causaram doença nos seguintes hospedeiros de Psta: *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Aster sp* e *Coffea arábica*. Utilizando-se o método de injeção, foi possível observar sintomas da doença em *Celosia plumosa* e utilizando-se o método de pulverização observou-se sintomas da doença em *Desmodium canum*. Os sintomas iniciais foram observados a partir de sete dias após a inoculação e apresentaram-se como lesões de aparência oleosa, de cor amarelo-cinza, que posteriormente se tornaram necróticas circundadas por halo amarelado (FIGURAS 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Apenas *Nicotiana tabacum* não desenvolveu a doença, visto que apresentou reação hipersensível quando inoculada com os referidos isolados de Psg (FIGURA 11).

A etiologia bacteriana foi confirmada através do teste de exsudação em gota a partir de folhas sintomáticas que foram coletadas. As colônias obtidas no reisolamento das bactérias

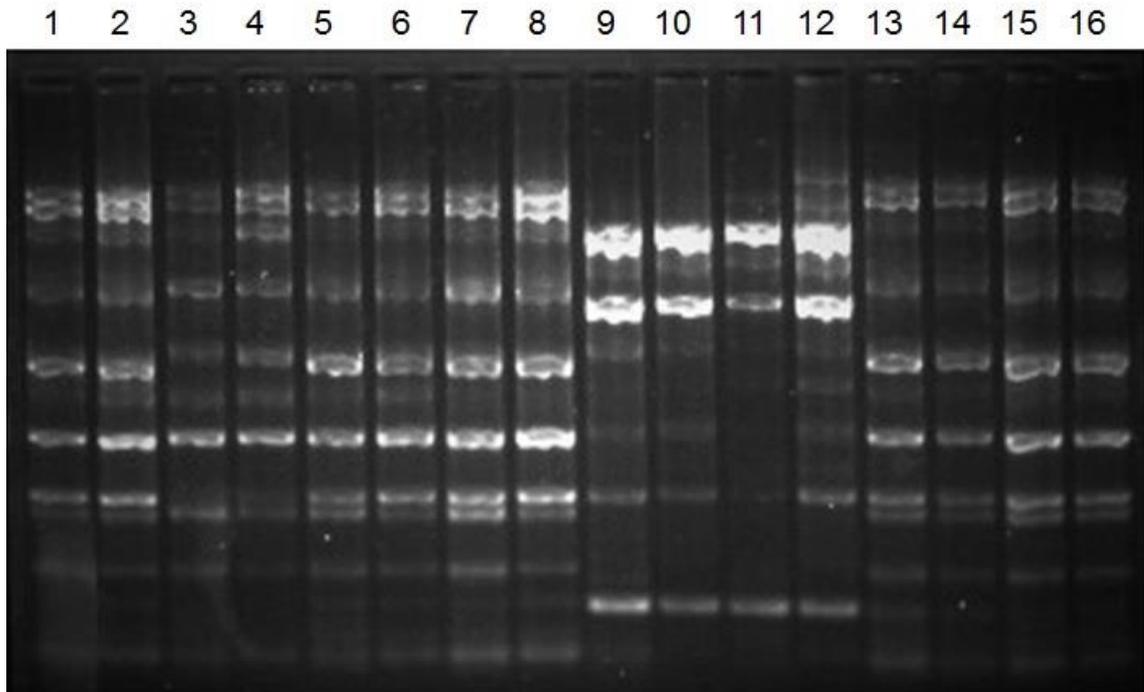
presentes nas lesões causadas em folhas das diferentes hospedeiras de Psta, mostraram-se semelhantes às colônias originais de Psg inoculadas nestas plantas (FIGURA 12). Esta identificação foi confirmada através da REP-PCR, que apresentou padrão de bandas semelhante entre as colônias obtidas do reisolamento e o isolado referência de Psg (CFBP 1634) (FIGURA 13). Da mesma forma, as colônias obtidas no reisolamento das bactérias presentes nas lesões causadas em folhas de cafeeiro mostraram-se semelhantes às colônias originais de Psta provenientes dos diferentes hospedeiros que foram inoculadas. Foi possível observar que as colônias bacterianas de Psta provenientes dos diferentes hospedeiros apresentam coloração diferenciada em meio de cultura (FIGURA 2). A etiologia da doença foi confirmada através da REP-PCR, o resultado demonstrou padrão de bandas semelhante entre as colônias obtidas do reisolamento e os respectivos isolados referência de Psta (IBSP 1972, IBSP 703, IBSP 758, IBSP 1822), IBSP 974, IBSP 1662, IBSP 1437 e IBSP 2249) (FIGURA 3). Dessa forma, os postulados de Koch foram completados.

Figura 2 - Sintomas causados em mudas de cafeeiro por *P. syringae* pv *tabaci* e colônias obtidas dos respectivos hospedeiros/ métodos de inoculação utilizados/ colônias obtidas dos reisolamentos.



Legenda: Sintomas causados em mudas de cafeeiro por *P. syringae* pv *tabaci* provenientes dos seguintes hospedeiros/ método de inoculação utilizado/ colônias obtidas dos reisolamento das respectivas bactérias: *C. arábica*/pulverização/(IBSP 2249) (A), *Aster sp* /pulverização/(IBSP 1662) (B), *C. plumosa*/ pulverização/(IBSP 1437) (C) *P. vulgaris*/ multiagulhas/(IBSP 703) (D), *C. papaya*/ multiagulhas/(IBSP 1822) (E), *C. sativus*/ multiagulhas/ (IBSP 758) (F), *N. tabacum*/ Injeção/(IBSP 1972) (G) e *D. canum*/ Injeção/ (IBSP 974) (H). Fonte: Do autor (2017).

Figura 3 - Análise dos produtos da PCR em gel de agarose.



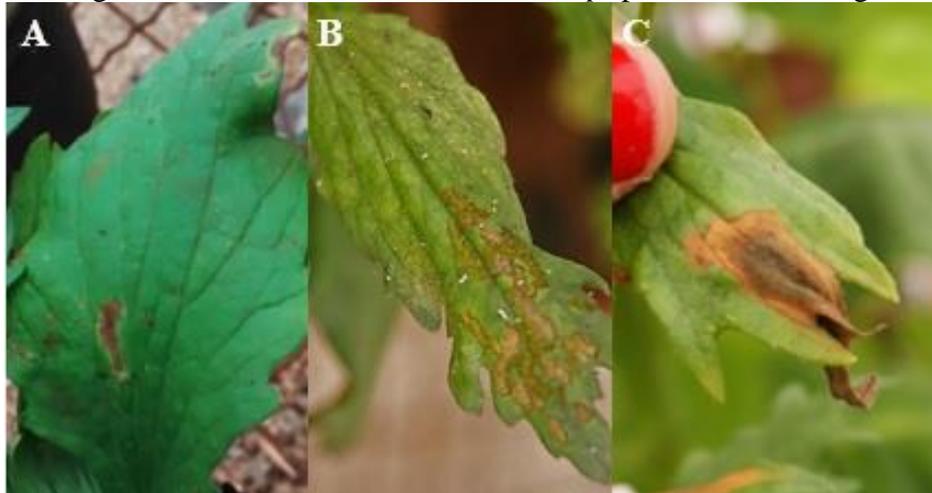
Legenda: Análise dos produtos da PCR em gel de agarose utilizando os *primers* REPIR e REP2I, comparando perfis genéticos das colônias de *Psta* reisoladas do cafeeiro e seus respectivos isolados referência: IBSP 2249 (1 e 2), IBSP 703 (3 e 4), IBSP 1822 (5 e 6), IBSP 758 (7 e 8), IBSP 1662 (9 e 10), IBSP 1437 (11 e 12), IBSP 1972 (13 e 14), IBSP 974 (15 e 16). Fonte: Do autor (2017).

Figura 4 - Sintomas causados em cafeeiro por isolados de *Psg*.



Legenda: Sintomas causados em cafeeiro por isolados de *Psg*, utilizando-se cada um dos métodos: UFLA 59 (pulverização) (A), UFLA 60 (multiagulhas) (B) e UFLA126 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 5 - Sintomas causados em *Aster sp.* por isolados de Psg.



Legenda: Sintomas causados em *Aster sp.* por isolados de Psg utilizando-se cada um dos métodos: UFLA 131 (pulverização) (A), UFLA 134 (multiagulhas) (B) e UFLA149 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 6 - Sintomas causados em *C. plumosa* por isolados de Psg.



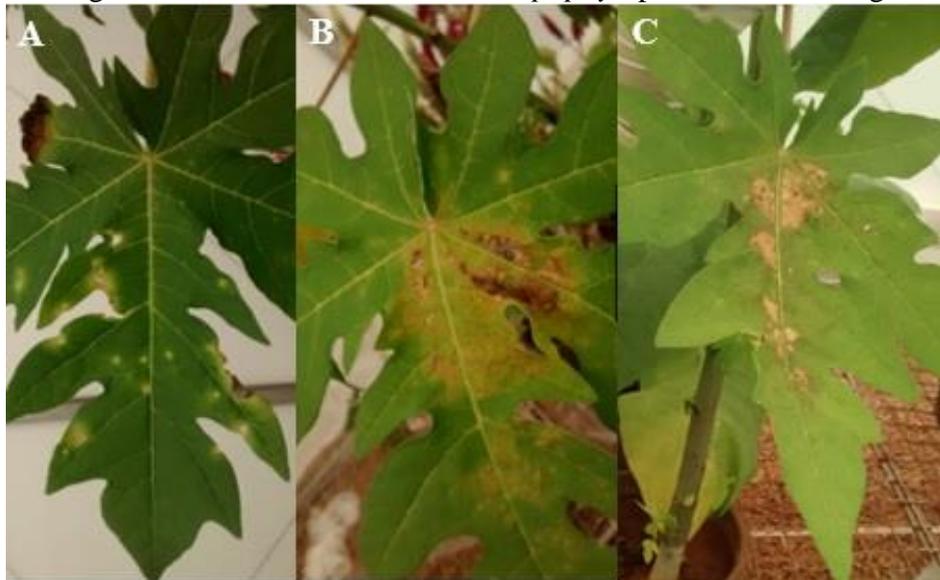
Legenda: Sintomas causados em *C. plumosa* por isolados de Psg utilizando-se o método de injeção: UFLA 134 (A), Psg (CFBP 1634) (B) e UFLA 126 (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 7 - Sintomas causados em *P. vulgaris* por isolados de Psg.



Legenda: Sintomas causados em *P. vulgaris* por isolados de Psg utilizando-se cada um dos métodos: UFLA 60 (pulverização) (A), UFLA 126 (multiagulhas) (B) e UFLA149 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 8 - Sintomas causados em *C. papaya* por isolados de Psg.



Legenda: Sintomas causados em *C. papaya* por isolados de Psg utilizando-se cada um dos métodos: Psg (CFBP 1634) (pulverização) (A), UFLA 134 (multiagulhas) (B) e UFLA 60 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 9 - Sintomas causados em *C. sativus* por isolados de Psg.



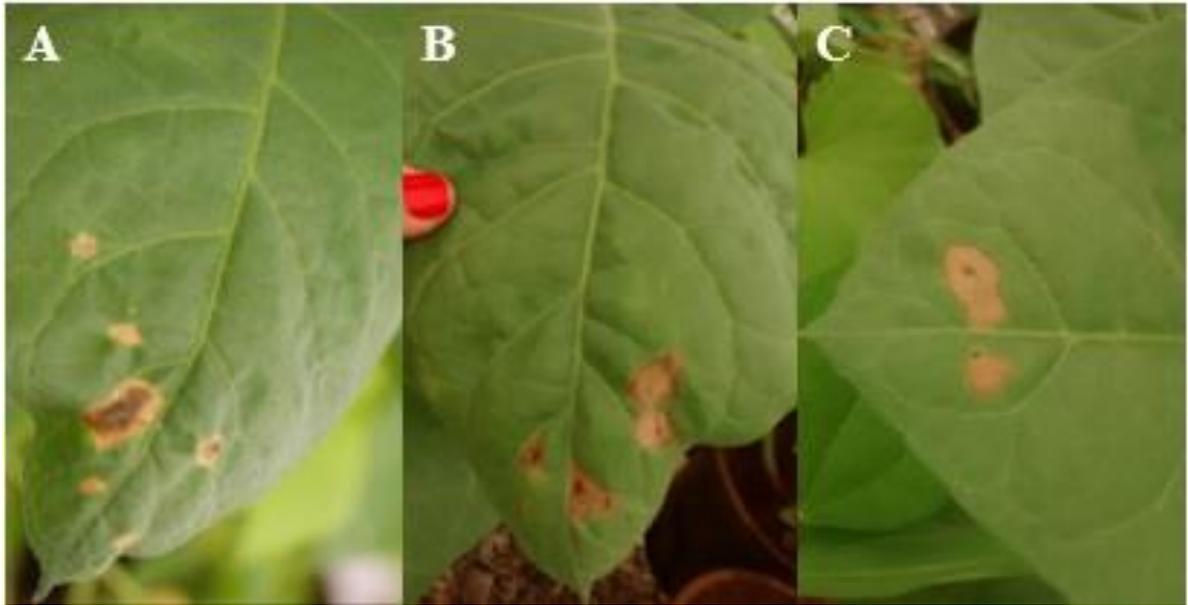
Legenda: Sintomas causados em *C. sativus* por isolados de Psg utilizando-se cada um dos métodos: UFLA 158 (pulverização) (A), Psg (CFBP 1634) (multiagulhas) (B) e UFLA 59 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 10 - Sintomas causados em *D. canum* por isolados de Psg.



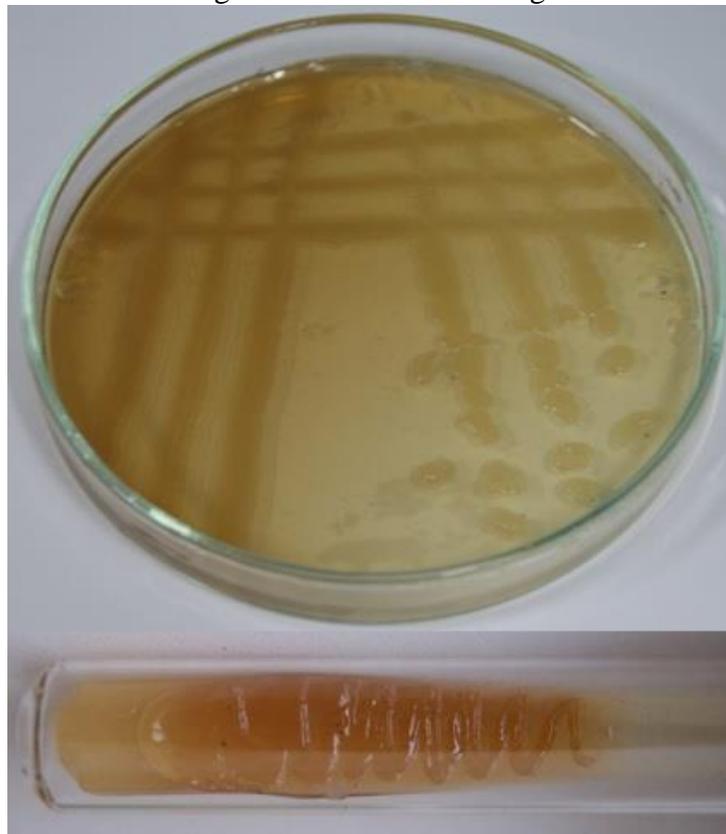
Legenda: Sintomas causados em *D. canum* por isolados de Psg utilizando-se o método de pulverização: UFLA 149 (A), UFLA 59 (B) e Psg (CFBP 1634) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 11 - Sintomas de HR (reação de hipersensibilidade) causados por isolados de Psg em folhas de *N. tabacum*.



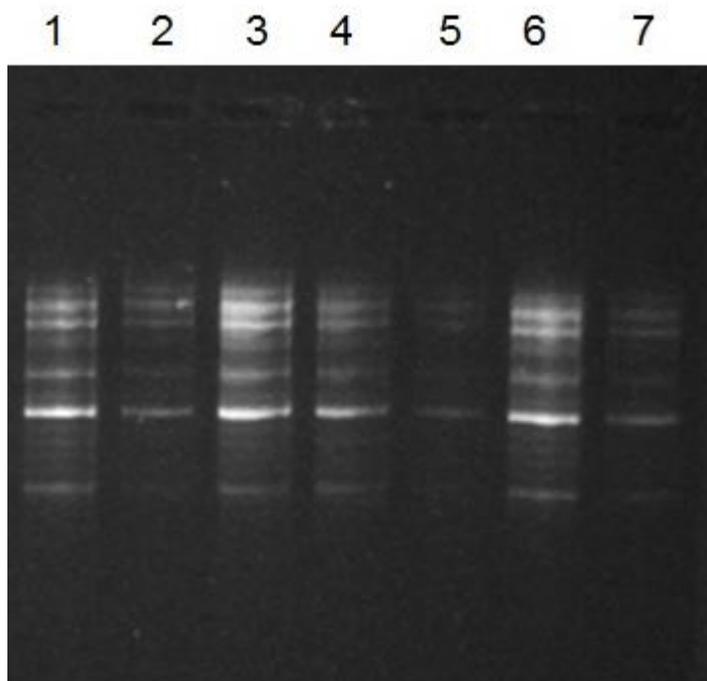
Legenda: Sintomas de HR (reação de hipersensibilidade) causados por isolados de Psg em folhas de *N. tabacum* utilizando-se cada um dos métodos: UFLA 126 (pulverização) (A), UFLA 149 (multiagulhas) (B) e UFLA 158 (injeção) (C). Fonte: Do autor (2017).

Figura 12 - Colônias de Psg.



Legenda: Colônias de Psg (UFLA 59) obtidas do reisolamento em folhas de *Desmodium canum*. Fonte: Do autor (2017).

Figura 13 - Análise dos produtos da PCR em gel de agarose.



Legenda: Análise dos produtos da PCR em gel de agarose utilizando os *primers* REPIR e REP2I, comparando perfis genéticos das colônias de Psg reisoladas das plantas hospedeiras de Psta: *Aster sp* (2), *C. plumosa* (3), *P. vulgaris* (4), *C. papaya* (5), *C. sativus* (6) e *D. canum* (7) com o isolado referência de Psg (CFBP 1634) (1). Fonte: Do autor (2017).

4 DISCUSSÃO

Foi observado que todos os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* obtidos de cafeeiro foram capazes de infectar as mudas de cafeeiro, porém houve diferença significativa entre os isolados com relação a AACPS. O grupo de isolados mais virulentos apresentou valores de AACPS 10 a 20 vezes maiores que o grupo de isolados menos virulentos.

Apenas os dois primeiros pares de folhas das mudas de cafeeiro foram inoculados, evitando-se a inoculação em folhas mais velhas, pois segundo Oliveira e Romeiro (1990) folhas mais velhas são menos suscetíveis a mancha aureolada.

A diversidade patogênica de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* também foi observadas por Maciel (2012) e Rodrigues et al. (2017), ao utilizarem isolados provenientes de municípios dos estados de Minas Gerais e São Paulo.

As variações na virulência de isolados bacterianos de *P. syringae* pv. *garcae* às mudas de cafeeiro observadas neste estudo são esperadas e podem ter sido causadas por diferentes fatores de patogenicidade como: produção de fito hormônios e polissacarídeos, expressão de genes de virulência e produção de toxinas (PRASANNATH, 2013). A maioria dos isolados de

Psg produz tabtoxina e, segundo Lydon e Patterson (2001), a tabtoxina pode ser produzida em diferentes quantidades por estes isolados. Embora a tabtoxina não seja essencial para a patogenicidade, ela pode influenciar no nível de virulência das fitobactérias, propiciando o aumento na severidade da doença (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

No presente estudo não houve correlação entre a virulência e o município de origem dos isolados, mas sim entre a virulência dos isolados com a cultivar/variedade de cafeeiro da qual eles foram obtidos. Esta reação diferencial em relação à virulência dos isolados, quando em diferentes genótipos (cultivares), pode ser explicada pela capacidade do patógeno em suplantar os mecanismos de defesa da planta hospedeira, como foi observado por Paradela et al. (1974), Ithiru et al. (2013) e Rodrigues et al. (2015).

Observou-se que dentre os 35 isolados considerados os mais virulentos, 63% são provenientes da cultivar Catuaí vermelho/99, 28% são da cultivar Mundo Novo 376/4, e 3% destes isolados para cada uma das cultivares Catuaí amarelo IAC 62, Catuaí 2SL e Acaiaí. Dentre os 21 isolados moderadamente virulentos, 52% são da cultivar Mundo Novo 376/4, 38% são da cultivar Catuaí vermelho/99 e cada uma das cultivares: Catuaí amarelo IAC 62 e Catuaí vermelho IAC 144 estão representadas por 5% destes isolados. Dos 17 isolados considerados os menos virulentos 41% são da cultivar Catuaí vermelho/99, 35% são da cultivar Mundo Novo 376/4 e 24% são da cultivar Catuaí vermelho IAC 144. Considerando-se que do total de isolados testados, a maioria (36 isolados) são da cultivar Catuaí vermelho/99, 28 isolados são da cultivar Mundo Novo 376/4, quatro isolados são da cultivar Catuaí vermelho IAC 144, dois isolados da cultivar Catuaí amarelo IAC 62, um isolado da cultivar Catuaí 2SL e um isolado da cultivar Acaiaí, nota-se que todos os isolados da cultivar Catuaí vermelho IAC 144 pertencem ao grupo dos isolados menos virulentos, enquanto que um isolado da cultivar Catuaí amarelo IAC 62, o único isolado da cultivar Catuaí 2SL e o único isolado da cultivar Acaiaí estão no grupo dos isolados considerados mais virulentos. Segundo Moraes et al. (1974), Mohan et al. (1978) e Cardoso e Sera (1983), as cultivares Mundo Novo, Catuaí e Bourbom são consideradas suscetíveis a mancha aureolada.

Os relatos obtidos na literatura até o momento indicam que diversas espécies do gênero *Coffea* são hospedeiras naturais de *P. syringae* pv. *garcae* (LELLIOTT et al., 1966) e são hospedeiras por inoculação *Citrus* sp., *C. eugenoides*, *C. excelsa*, *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicum*, *Olea europea*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutibulum*, *Solanum tuberosum* (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA; WILLIS, 2005). No entanto, no presente trabalho verificou-se que *Cucumis sativus*, *Carica papaya*,

Desmodium canum, *Aster sp* e *Celosia plumosa*, hospedeiras naturais de *P. syringae* pv. *tabaci*, são também hospedeiras por inoculação artificial de *P. syringae* pv. *garcae*. Kimura et al. (1973) contestaram a patogenicidade de *P. syringae* pv. *garcae* em diversas hospedeiras, alegando que os sintomas por eles observados após inoculações foram devidos à reação de hipersensibilidade. Entretanto, com base nos postulados de Kock e nas técnicas moleculares, como a REP-PCR, utilizadas neste estudo, foi possível confirmar a presença de *P. syringae* pv. *garcae* nos sintomas observados e, com isso, afirmar a patogenicidade da bactéria a diferentes hospedeiras.

Foi observado também que os patovares de *P. syringae* pv. *tabaci* provenientes não apenas do cafeeiro, mas também de diversos outros hospedeiros causaram doença em cafeeiro. Através da REP-PCR verificou-se diferença no padrão de bandas dos isolados de Psta provenientes de *Aster sp* e *Celosia plumosa* em relação aos isolados provenientes dos outros hospedeiros, demonstrando diversidade genética intrapatovar.

Com base nestes resultados foi verificado que não há especificidade de hospedeiros para Psg e Psta. Sendo assim, algumas dessas plantas hospedeiras naturais de Psta, podem atuar como fonte de inóculo primário para o café e também este último pode atuar como fonte de inóculo para as plantas hospedeiras de Psta.

Uma importante característica para o diagnóstico destes dois patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro é a produção de grande quantidade de pigmento fluorescente por isolados de *P. syringae* pv. *tabaci*, quando cultivados em meio KB e observados sob a luz UV. A maioria dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* exibe fraca fluorescência neste meio, mas produz pigmento de melanina, o qual causa escurecimento do meio, o que não é observado para isolados de *tabaci* (KAIRU, 1997; BARTA; WILLIS, 2005). Entretanto, vale ressaltar que as colônias bacterianas de Psta provenientes de alguns hospedeiros, como: *Aster sp*, *C. plumosa*, *C. papaya* e *N. tabacum* também produzem pouca fluorescência em meio KB e portanto se assemelham mais às colônias de Psg, podendo ser confundidas com este patovar. As colônias provenientes de *C. arabica*, *P. vulgaris*, *C. sativus* e *D. canum* exibem maior fluorescência em meio KB.

Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo são de suma importância do ponto de vista epidemiológico, visto que, a ocorrência da mancha foliar bacteriana pode estar sendo subestimada no campo e em viveiros, por estar sendo incorretamente diagnosticada, devido à similaridade de sintomas causada principalmente por Psg. Diante destas observações é questionável a existência de um novo patótipo de *P. syringae* pv. *garcae* ocorrendo em condições de campo no Estado do Paraná como relatado por Petek et al. (2006).

Segundo Costa et al. (1957), *P. syringae* pv. *garcae* apresenta similaridade patogênica com *P. syringae* pv. *tabaci*, com *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (sin *P. syringae* pv. *phaseolicola*) e também com *P. syringae* pv. *striaefaciens* e *P. syringae* pv. *coronafaciens*, que possuem características morfológicas e genéticas semelhantes e são patogênicas à aveia. Atualmente essas bactérias foram classificadas no grupo de genomospécie 4, assim como *P. syringae* pv. *garcae* (BULL; KOIKE, 2015). Diante disso, Rodrigues et al. (2015) sugerem a possibilidade de mutantes bacterianos de *P. syringae* pv. *garcae* terem se adaptado à cultura do café e também indicam a possibilidade da ocorrência de variabilidade intraespecífica do patógeno, com a ocorrência de raças e biótipos, como conhecida para os patovares *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *pisi*, entre outras espécies bacterianas (JANSE, 2005).

Os resultados obtidos com o presente trabalho fazem parte de um primeiro estudo de patogenicidade cruzada para os patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro visando confirmar a especificidade de hospedeiros de Psg e Psta. Este é o primeiro relato de Psg causando doença em pepino (*C. sativus*), mamão (*C. papaya*), *D. canum*, *Aster sp* e *C. plumosa*, os quais são hospedeiros naturais de Psta e também o primeiro relato de Psta provenientes destes hospedeiros causando doença em cafeeiro, através de inoculação artificial.

5 CONCLUSÃO

Isolados de *P. syringae* pv. *garcae* obtidos de mudas e cafeeiros provenientes de vários municípios do Estado de Minas Gerais apresentaram alta diversidade patogênica, com diferentes níveis de virulência.

Isolados de *P. syringae* pv. *garcae* causaram doença em *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Desmodium canum*, *Aster sp.*, *Celosia plumosa*, após inoculação artificial.

Isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* provenientes dos hospedeiros naturais *Coffea arabica*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Carica papaya*, *Desmodium canum*, *Aster sp.*, *Celosia plumosa* e *Nicotiana tabacum* causaram sintomas em cafeeiro, após inoculação artificial.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- BALLIO, A. et al. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **FEBS Letters**, Roma, v. 291, n. 1, p. 109-112, 1991.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7-8, p. 492-499, 2005.
- BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, M. L. D. O.; SOUZA, R. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; OLIVEIRA, J. M. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 11-12, p. 801-810, 2014.
- BERIAM, L.O.S. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in papaya seedlings. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2006.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: CAB International Mycological Institute, 1986.
- BULL, C. T.; KOIKE, S. T. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Salinas, v. 53, p. 157-180, 2015.
- CARDOSO, R. M. L.; SERA, T. Obtenção de cultivares de *Coffea arabica* L. com Garcae no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983, Oeiras. **Resumos...** Lisboa: CIFIC, 1983. p. 417-419.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Café – quarto levantamento. Brasília: CONAB, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_26_51_boletim_cafe_portugues_-_4o_lev_-_dez.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2016.
- COSTA, A. S. et al. Bacterial halo blight of coffee in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 28, p. 427-444, 1957.
- DALIO, R. et al. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e87860, 2014.
- DALIO, R. J. D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.)**. 2013. 188p. Tese (Doutorado em Nutrição, Uso da Terra e Meio Ambiente) – Universidade Técnica de Munique, Munique, 2013.

DESTÉFANO, S. A. L. et al. Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1162-1163, 2010.

GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. **Molecular plant-microbe interactions**, St. Paul, v. 25, n. 7, p. 862-868, 2012.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1385-1396, 2007.

HWANG, M. S. H. et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5182-5191, 2005.

ITHIRU, J. M. et al. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 8, n. 21, p. 2450-2454, 2013.

JANSEN, A. **Plant protection in coffee**: recommendations for the common code for the coffee community initiative. Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GmbH, 2005. Disponível em <http://www.evb.ch/cm_data/4C_Pesticide_Annex_final.pdf>. Acesso em 05 jun 2016>.

KAIRU, G. M. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 239-246, 1997.

KIMURA, O.; ROBBS, C. F.; FERRARI, J. A. R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 104.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, United States of America, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.

LYDON, J.; PATTERSON, C. D. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 166-170, 2001.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 988, 2008.

MACIEL, K. W. **Caracterização de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro**. 2013. 55 p. Dissertação (Mestrado em

Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2012.

MISHINA, E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, London, v. 50, n. 3, p. 500-513, 2007.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L.; PAIVA, M. A. Resistência em germoplasma de Coffea ao crestamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 53-64, 1978.

MORAES, S.A. et al. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 1.; 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1974. p. 183.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355-356, 1990.

OPGENORTH, D. C. et al. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, United States, v. 80, n. 8, p. 868-873, 1996.

PARADELA, FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A.; SUGIMORI, M. H. Comportamento diferencial em progênies de cafeeiros de 2 isolados do agente causador da Mancha aureolada do cafeeiro. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7., 1974, Brasília. **Resumos...**, 1974.

PETEK, M. R. et al. Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. **Bragantia**, Campinas, v.65 n. 1, p.65-73, 2006.

PRASANNATH, K. Pathogenicity and virulence factors of phyto bacteria. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, India, v.1, n. 1, p. 24-33, 2013.

ROBBS, C. F. et al. "Crestamento bacteriano das folhas": nova enfermidade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 1-5, 1974.

RODRIGUES NETO, J. et al. *Pseudomonas andropogonis* (Smith, 1911) Stapp, 1928, agente causal da "mancha escura bacteriana" em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 48, n. 1-4, p. 31-36, 1981.

RODRIGUES NETO, J. et al. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 85, 2006.

RODRIGUES, L. M. R. **Resistência de cafeeiros à mancha-aureolada: aspectos morfoanatômicos, fitopatológicos, genéticos e moleculares**. 2015. 120 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2015.

RODRIGUES, L. M. R. et al. Aggressiveness of strains and inoculation methods for resistance assessment to bacterial halo blight on coffee seedlings. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 165, n. 2, p. 105-114, 2017.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogen bacterias**. 3. ed. Saint Paul: APS Press, 2001.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Berlin, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

TANAKA, M. A. S. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* on snap bean at Itababa region. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 31-34, 1993.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. **Palestras...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 134- 215, 1999.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia**: volume 2. 2005. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.