

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEEIRO

KAREN WOLF MACIEL

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal
Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Núcleo de Informação e Documentação

Instituto Biológico

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Maciel, Karen Wolf.

Caracterização de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro./ Karen Wolf Maciel. -- São Paulo, 2013.

71 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: **Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio**
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agrossistemas.

Orientador: Luis Otávio Saggion Beriam.

Versão do título para o inglês: Characterization of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, the causal agent of bacterial halo blight of coffee.

1. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 2. Mancha aureolada 3. *Coffea arabica*

I. Maciel, Karen Wolf II. Beriam, Luis Otávio Saggion III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Karen Wolf Maciel

Título: Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. Dr.: Luís Otávio Saggion Beriam

*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

*Dra.: Flávia Rodrigues Alves Patrício

*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

*Prof. Dr.: Antonio Carlos Maringoni

*Instituição: FCA/UNESP - Botucatu

“Quanto mais conhecemos sobre as leis fixas da natureza,
mais incríveis os milagres se tornam(...)”

- Charles Darwin (1809 - 1882)-

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e financiamento concedido;

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam, orientador desta dissertação, por me proporcionar esta oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal, além de todo empenho, sabedoria, compreensão e pela confiança em mim depositada.

À Ms. Irene Maria Gatti de Almeida, por sua sincera amizade, por sempre me incentivar na busca do crescimento, sendo exemplo de competência, garra, determinação e, acima de tudo, exigência, detalhismo e competência incomuns, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa;

À Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício, do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico por todo empenho, sabedoria, compreensão. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções e revisões;

À Prof. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, por sua atenção, colaboração e estímulo na realização desta pesquisa com ensinamentos, sugestões e empenho no intuito de chegar à excelência;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni da Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP - Botucatu), José Rogério Oliveira, da Universidade Federal de Viçosa e Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves, do Laboratório de Virologia do Instituto Biológico por proporcionar sugestões e correções de suma importância;

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, por ser exemplo de conhecimento e dedicação à ciência;

Ao Ms. Lucas Rodrigues, por me auxiliar com sugestões, discussões em busca de resultados, colaborando e estimulando a realização desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Marcelo Eiras, do Laboratório de Virologia do Instituto Biológico pela hospitalidade ao disponibilizar a ultracentrífuga para a extração de complexo proteico de membrana;

Ao Dr. José Alberto Caram de Souza Dias, do Laboratório de Virologia do Centro de Fitossanidade do IAC, por disponibilizar o uso da coelheira para a produção dos antissoros;

À Soninha, funcionária do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, por sua sincera amizade, apoio e incomparável alegria;

À toda equipe do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico pela amizade e companheirismo;

Aos alunos da pós-graduação pelo convívio, ensinamentos, risadas e pela amizade;

Ao Valter Alvetti obrigada por fazer parte da minha vida, pela paciência, amor e carinho, por ser um homem íntegro e um amigo sincero;

A meus pais, Antonio e Raquel, e ao meu irmão, Otto, e familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais;

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO

Campinas, SP, 2013 Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico

A mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, tem acarretado danos consideráveis à cafeicultura do Brasil, especialmente das regiões do Sul e do Cerrado, em Minas Gerais e no estado de São Paulo. Este estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar linhagens de *P. s.* pv. *garcae*. Foram estudadas técnicas para a identificação do patógeno e o diagnóstico da doença em material vegetal, sendo também avaliada caracterização genética e patológica de linhagens de *P. s.* pv. *garcae*, obtidas em diferentes anos e regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e do Quênia. As técnicas de serologia, eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS) e amplificação do DNA com os *primers* avr 1F/2R permitiram a diferenciação de *P. s.* pv. *garcae* das linhagens tipo das outras bactérias (*Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Burkholderia andropogonis*), que causam sintomas de manchas foliares em cafeeiro, indicando que o principal agente causal da doença é *P. s.* pv. *garcae*. As análises de diversidade genética por rep-PCR permitiram a separação das linhagens por ano e local de isolamento, sendo as linhagens originárias do Quênia agrupadas em um sub-grupo separado das demais linhagens estudadas e as linhagens obtidas de São Paulo se agruparam em um sub-grupo diferente do das linhagens de Minas Gerais. Observou-se a ocorrência de linhagens muito virulentas (IBSBF 65, IBSBF 3024 e IBSBF 3046) e pouco virulentas (IBSBF 248^P, IBSBF 249, IBSBF 1372, IBSBF 1373, IBSBF 2996, IBSBF 2998, IBSBF 2999, IBSBF 3005, IBSBF 3015, IBSBF 3049 e IBSBF 3065). Esta diferença ocorreu tanto entre as linhagens isoladas há muitos anos, como entre as mais recentes, indicando que o aumento da importância desta bacteriose nos últimos anos não deve ser devido a aumento da virulência do patógeno, mas às condições climáticas mais favoráveis e outros fatores, com plantio de mudas contaminadas, ausência de quebra-ventos, aumento da colheita mecanizada e redução no uso de cobre nas lavouras de café.

Palavras-chave: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, Mancha aureolada, *Coffea arabica*

ABSTRACTCHARACTERIZATION OF STRAINS OF *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, THE CAUSAL AGENT OF BACTERIAL HALO BLIGHT OF COFFEE

Campinas, SP, 2012 Dissertation Program Graduate Health, Food Safety and Ambiental Agribusiness Instituto Biológico.

Bacterial halo blight of coffee, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* is an disease of coffee plants that have become more important in the last years in Brazil, especially in the regions of South and Cerrado in the State of Minas Gerais and the state of São Paulo. This study was carried out aiming to characterize if *P. s.* pv. *garcae* and understand the increase of importance of this disease in the last years. The serology, electrophoresis of polyacrylamide gel sodium dodecyl sulfate (PAGE/SDS) techniques and DNA amplification with the pairs of *primers* avr 1F/2R allowed the differentiation of *P. s.* pv. *garcae* from the other bacteria tipe strain that are pathogenic to coffee, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Burkholderia andropogonis*, showing that probably the main etiological agent involved in the disease is *P. s.* pv. *garcae*. The genetic diversity analysis with rep-PCR showed that the strain could be classified according to year and place of isolation. The strains originated from Kenya were classified in one group and in the remaining group there were sub-groups from the States of São Paulo and Minas Gerais. There were strain highly virulent (IBSBF 65, IBSBF 3024 and IBSBF 3046) and less virulent (IBSBF 248^P, IBSBF 249, IBSBF 1372, IBSBF 1373, IBSBF 2996, IBSBF 2998, IBSBF 2999, IBSBF 3005, IBSBF 3015, IBSBF 3049 and IBSBF 3065). These strains occurred among strains obtained several years ago and from strains obtained recently, showing that the growth in the importance of the disease observed in the last years is probably not due to enhance in the virulence of the pathogen, but to climatic conditions that prevailed in the last years, more favorable to the disease and other factors such as planting infected seedlings, lack of wind-breaks, enhance in the mechanized harvest and reduction in the application of copper in the coffee crops.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, bacterial halo blight, *Coffea arabica*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> isoladas de <i>Coffea arabica</i> utilizadas neste estudo.....	11
Tabela 2 – Linhagens de fitobactérias que causam sintomas de manchas foliares em cafeeiro.....	13
Tabela 3 - Linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) selecionadas	15
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR	24
Tabela 5 – Severidade de mancha aureolada em folhas de mudas cafeeiro, cultivar Mundo Novo, inoculadas com 29 linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> . Severidade avaliada por escala de notas (1-5) calculada pela porcentagem de lesões formadas em cada folha inoculada, após inoculação com 4 perfurações por folha	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa indicativo dos municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais produtores de café onde foram isoladas as linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 10
- Figura 2 - Protocolo de produção de antissoro para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e testes serológicos para observação da reação antígeno-anticorpo..... 17
- Figura 3 - Metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS 19
- Figura 4 - Esquema do teste de patogenicidade conduzido em casa de vegetação. Inoculação em mudas de café com suspensão bacteriana de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*..... 23
- Figura 5 - Teste de dupla difusão em ágar para determinação da titulação do antissoro: (A) antissoro IBSBF 248^P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* sem diluição; antígeno de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*: (1) - 0,06 g.mL⁻¹, (2) - 0,03 g.mL⁻¹, (3) - 0,015 g.mL⁻¹, (4) - 0,0075 g.mL⁻¹ de peso fresco de crescimento bacteriano (48 h/28 °C) por mL de solução salina (NaCl 0,85 %) 26
- Figura 6 - Teste de dupla difusão em ágar utilizado meio descrito por Schaad et al. (1990) para: (A) antissoro 248^P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; antígenos: (1) IBSBF 65, (2) IBSBF 75, (3) IBSBF 152, (4) IBSBF 158, (5) IBSBF 248^P, (6) IBSBF 249, (7) IBSBF 1293, (8) IBSBF 1372, (9) IBSBF 1373, (10) IBSBF 1664, (11) IBSBF 2212, (12) IBSBF 2511, (13) IBSBF 2840, (14) IBSBF 2841, (15) IBSBF 2883, (16) IBSBF 2996, (17) IBSBF 2998, (18) IBSBF 2999, (19) IBSBF 3005, (20) IBSBF 3015, (21) IBSBF 3019, (22) IBSBF 3022, (23) IBSBF 3024, (24) IBSBF 3031, (25) IBSBF 3032, (26) IBSBF 3037, (27) IBSBF 3046, (28) IBSBF 3049, (29) IBSBF 3065 28
- Figura 7 - Perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida PAGE-SDS corado por nitrato de prata. (1) IBSBF 166, (2) IBSBF 199 - *Burkholderia andropogonis*; (3) IBSBF 248^P, IBSBF (4) 1372 - *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; (5) IBSBF 2240 (6) IBSBF 1972^P (7) IBSBF 2241 (8) IBSBF 2249 - *Pseudomonas syringae* - pv. *tabaci*..... 29
- Figura 8 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida PAGE-SDS

- mostrando a diferenciação das bactérias ao nível de patovar, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j) 30
- Figura 9 – Amplificação com o par de primers avr1F/2R (1) IBSBF 248P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (2) IBSBF 587 *Pseudomonas cichorii* (3) IBSBF 1784T. *Pseudomonas cichorii*, (4) IBSBF 2240 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (5) IBSBF 2241 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (6) IBSBF 1972P *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (7) Controle negativo sem DNA e (M) Marcador molecular 100pb 31
- Figura 10 - Amplificação de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* isoladas de diversos hospedeiros com o par de primers avr1F/2R (1) IBSBF 2249 *Coffea arabica* (2) IBSBF 2240 *Coffea arabica* (3) IBSBF 974 *Desmodium canum*, (4) IBSBF 758 *Cucumis sativus* (5) IBSBF 1437 *Celosia plumosa*, (6) IBSBF 1822 *Carica papaya* (7) 1687 *Carica papaya* (8) 1662 *Aster* sp (9) Controle negativo sem DNA e (M) Marcador molecular 100pb 32
- Figura 11 – Sintomas de necrose com halos amarelos em folhas de mudas de cafeeiro obtidos a partir de inoculação artificial por picada e aspersão de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, em condições de casa de vegetação. (A) IBSBF 65, (B) IBSBF 1293, (C) IBSBF 2840, (D) IBSBF 2511 34
- Figura 12 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* utilizando-se o primer BOX A1R. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 65, (3) IBSBF 75, (4) IBSBF 158, (5) IBSBF 1372 e (6) IBSBF 1373, (7) IBSBF 1664, (8) IBSBF 2840, (9) IBSBF 2841, (10) IBSBF 2999 36
- Figura 13 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* gerados pelos primers ERIC 1R/ ERIC2. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 2999, (3) IBSBF 3005, (4) IBSBF 3015, (5) IBSBF 3019, (6) IBSBF 3022, (7) IBSBF 3032, (8) IBSBF 3046, (9) IBSBF 249, (10) IBSBF 2883, (11) IBSBF 3037 37
- Figura 14 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* a partir dos primers ERIC 1R/ ERIC2 , baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j)..... 39
- Figura 15 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com os primers REP1R/ REP2I. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 65, (3) IBSBF 75, (4)

IBSBF 158, (5) IBSBF 1372 e (6) IBSBF 1373 (7) IBSBF 1664, (8) IBSBF 2840, (9) IBSBF 2841, (10) IBSBF 2999	40
Figura 16 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação de linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> com os primers REP1R/ REP2I, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j).....	42
Figura 17 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação de linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> com os primers ERIC-PCR e REP-PCR, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j).....	43

ANEXO

Anexo 1 – Certificado Comissão de Ética Instituto Biológico.....54

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	IV
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
ANEXO.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. O cafeeiro	4
3.2. Principais doenças do cafeeiro	6
3.2.1. A mancha aureolada	6
3.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> (sin. <i>Pseudomonas garcae</i>).....	8
3.4. Medidas de controle	9
4. MATERIAL E METODOS	10
4.1. Identificação de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>.....	10
4.1.1. Obtenção das linhagens	10
4.1.2. Seleção das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	14
4.1.3. Produção de antissoros e testes serológicos	16
4.1.4. Eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS).....	17
4.1.5. Identificação dos isolados de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> por PCR	19
4.2. Estudos da diversidade genética e da patogenicidade das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>.....	21
4.2.1. Patogenicidade das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	21
4.2.3. Avaliação da diversidade genética de linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> por rep-PCR.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Identificação das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	26
5.1.1. Testes serológicos	26

5.1.2 Relacionamento serológico.....	26
5.1.3. Eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS).....	29
5.1.4. Amplificação das linhagens bacterianas com uso de PCR.....	30
5.2. Diversidade das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>.....	32
5.2.1. Patogenicidade das linhagens de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	32
5.4.2. Diversidade genética das linhagens de P. s. pv. <i>garcae</i> por rep-PCR.....	36
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXO.....	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador e o segundo consumidor mundial de café. Os estados de Minas Gerais e São Paulo se destacam entre os maiores produtores nacionais, o que justifica sua importância para a economia nacional (CONAB, 2011).

A cadeia agroindustrial de café constitui um dos setores importantes da economia brasileira pela sua expressiva participação na pauta de exportação e na geração de emprego e de renda e representa, no médio e no longo prazo, um dos principais produtos estratégicos para o País. A importância da cafeicultura brasileira pode ser visualizada pelo volume de produção, pelo consumo interno, pela sua participação na pauta de exportação e pela capacidade de geração de emprego e de renda na economia (TEIXEIRA, 2000)

A cafeicultura de montanha do Brasil representa 42 % do total da área cultivada, sendo o Sul de Minas e o Espírito Santo os maiores produtores, que junto com os outros estados somam uma área cultivada de 900.000 ha. O maior custo de produção está na colheita, entre 35 e 55 %, que mobiliza tanto mão de obra da propriedade como também mão de obra terceirizada, sendo esta atividade de grande importância na determinação do rendimento e qualidade do produto final. Este tipo de produção é mais vulnerável às incertezas do mercado, fruto de algumas particularidades, como a maior necessidade de mão de obra, a condição geográfica e a estrutura produtiva, predominantemente de pequenos produtores familiares. Alguns pontos estratégicos para o desenvolvimento da cafeicultura nessa região passam pela consolidação da marca do café produzido na região, o fortalecimento das organizações representativas e da extensão rural, valorização a fixação da mão de obra no campo (ROMERO, 2011). Segundo Borges (2009), o produtor de montanha investe em qualidade para aumentar os preços e talvez este seja um dos caminhos a ser seguidos seja a certificação.

Uma série de desafios precisa ser vencida, como o custo de mão de obra, a migração dos trabalhadores rurais para as cidades, a sucessão familiar cada vez menor, o preço recebido pelo cafeicultor e talvez o principal desafio, o pequeno produtor e a agricultura familiar terem que produzir café com qualidade para o mercado (ROMERO, 2011).

Além de todos estes fatores, a cafeicultura de montanha se depara com um desafio constante que são as várias doenças de etiologia fúngica e bacteriana que podem ser

agravadas nesta condição. Já foram relacionadas em nosso país várias doenças de etiologia bacteriana afetando a cultura do cafeeiro, incluindo a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (BITANCOURT, 1958), o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii* (ROBBS et al., 1974), a mancha escura bacteriana, ocasionada por *Burkholderia andropogonis* (RODRIGUES NETO et al., 1981), a atrofia dos ramos do cafeeiro, causada por *Xylella fastidiosa* (PARADELA et al., 1995) e, mais recentemente, a mancha bacteriana, que tem como agente causal a bactéria *P. syringae* pv. *tabaci* (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010).

De todas essas bacterioses, seguramente a que tem ocasionado maiores danos à cultura do cafeeiro é a mancha aureolada. Essa bactéria, descrita na década 1950, foi considerada patógeno secundário por muitos anos, ocasionando problemas principalmente em condições de viveiro. Essa doença tem aumentado de importância especialmente em lavouras em formação introduzidas em regiões de elevada altitude, localizadas na face sul e sudeste e sujeitas a ventos frios constantes. Os sintomas da doença são caracterizados por lesões foliares de coloração parda, que podem ou não ser acompanhados por halo amarelado, seca de ramos e lesões nas rosetas, inflorescências e frutos novos, provocando, posteriormente, a desfolha de ramos. No final do período das águas, a doença se restringe aos ramos, sendo esta uma estratégia de sobrevivência da bactéria. A mancha aureolada também incide sobre mudas e viveiros, causando lesões nas folhas e seca de hastes e ramos (COSTA; SILVA, 1960). A doença é mais importante em lavouras novas, com até 3 ou 4 anos de idade e nos últimos anos tem ocorrido com gravidade, causando, inclusive a morte de plantas com até um ano de idade (PATRÍCIO et al., 2011).

Confirmando o aumento da importância da mancha aureolada nos anos de 2007 a 2009, 52 novos isolados de *P. s.* pv. *garcae* foram obtidos de materiais de café de várias cultivares, com sintomas de seca de ramos, lesões foliares, lesões nas rosetas e inflorescências, provenientes de vários municípios de São Paulo e Minas Gerais, foram identificados como *P. s.* pv. *garcae* nos anos de 2007 a 2009 (ALMEIDA et al., 2010).

Devido ao crescente aumento da incidência da mancha aureolada nas áreas produtoras de café, esta doença tem se tornado um grande problema à cultura, causando perdas econômicas significativas. Visando o desenvolvimento de um manejo adequado para o controle desta moléstia, estudos estão sendo desenvolvidos pelo Instituto Biológico para a caracterização do patógeno, bem como o estudo da sua variabilidade por meio de serologia, eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS) e técnicas moleculares como o uso de primers, rep-PCR e análise dos padrões de *fingerprinting*.

2. OBJETIVO

Considerando o aumento da importância da mancha aureolada os objetivos deste estudo foram:

Testar e validar a identificação de *P. s. pv. garcae*, diferenciando-a das outras bactérias que causam manchas foliares em cafeeiro como *P. cichorii*, *P. s. pv. tabaci* e *Burkholderia andropogonis* por meio de serologia, eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS) de proteínas totais e amplificação com os *primers* avr 1F/2R

Estudar a diversidade das linhagens de *P. s. pv. garcae* com base em sua diversidade genética, por técnicas moleculares como rep-PCR e análise dos padrões de *fingerprinting* e patogenicidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O cafeeiro

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, gênero *Coffea*, que agrupa aproximadamente 103 espécies, sendo as mais cultivadas para o consumo como bebida *C. arabica* e *C. canephora* (DAVIS et al., 2006; MAURIN et al., 2007). A espécie *C. arabica* é originária de regiões restritas do sudoeste da Etiópia e Sudão e também do norte do Quênia. A faixa de altitude recomendada para o cultivo encontra-se entre 1.000 e 2.000 metros. A sua dispersão se deu através do lêmen e toda a cafeicultura brasileira tem origem na introdução de apenas três plantas no País, em 1727 (CARVALHO, 2008). Esta espécie é a de maior importância econômica para as Américas, por produzir o melhor café e ser mais apreciado por todos os países consumidores. O seu cultivo se implantou, abrindo cidades e criando riquezas, principalmente para o Estado de São Paulo (CARVALHO, 1967).

A área cultivada de café no país (arábica e robusta) totaliza 2.341,73 mil hectares sendo Minas Gerais o maior Estado produtor com uma área plantada de 1.221,04 mil hectares como 98,8 % da espécie arábica, essa área representa 52,66 % da área cultivada de café no país sendo o primeiro no ranking nacional. O Espírito Santo tem a segunda maior área plantada com a cultura do café totalizando 498.952 hectares sendo 311.067 hectares da espécie robusta e 187.885 hectares da espécie arábica (CONAB, 2013).

Segundo dados da ICO (2012), o Brasil é o maior exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã, Indonésia, Honduras e Colômbia.

O consumo de café pelos brasileiros continua crescendo a cada ano e segundo dados da ABIC (2012), no Brasil, o seu consumo aumentou em 3,05 % em 2012, com um crescimento anual de 5,34 % em relação a 2011. A entrada de novos produtos no mercado e a ampliação da oferta produtos diferenciados são fatores que contribuíram para esse aumento.

O consumo brasileiro “per capita” continua sendo um dos mais elevados do mundo, mesmo quando comparado com o de países europeus. Segundo IBGE-POF (2012), o café é o alimento mais consumido por 78 % da população acima de 10 anos, o que representa 79,7

litros por habitante por ano, muito semelhante ao apurado pela ABIC (2012), e é maior na região Nordeste, seguido pela região Sudeste (255 mL/dia ou 93 L/habitante/ano).

3.2. Principais doenças do cafeeiro

São fatores limitantes à produção de café as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. A principal doença fúngica é a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*. Nematoides do gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus* também podem afetar a produção da cultura (RODRIGUES et al., 2013). Com relação aos patógenos causadores de doenças de etiologia bacteriana, além de *P. s. pv. garcae*, agente causal da mancha aureolada, também são relatadas *P. cichorii*, causadora do crestamento bacteriano do cafeeiro em viveiros e campo no Estado de Minas Gerais (ROBBS et al., 1974) e em viveiro, no Estado de São Paulo (ALMEIDA; RODRIGUES; PATRÍCIO, 2012); *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*), que causa a mancha escura bacteriana (RODRIGUES NETO et al., 1981), constatada em viveiro de mudas no estado de Santa Catarina; *P.s. pv. tabaci*, causadora da mancha bacteriana (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010), detectada em viveiro no estado de São Paulo e *Xylella fastidiosa*, agente causal da atrofia dos ramos do cafeeiro (PARADELA et al., 1995).

3.2.1. A mancha aureolada

A mancha aureolada do cafeeiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral Teixeira & Pinheiro), foi descrita final do ano de 1955, detectada em um cafezal localizado no município de Garça, Estado de São Paulo (AMARAL, TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Após sua constatação, a doença foi considerada de importância secundária (COSTA; SILVA, 1960) e, por aproximadamente 17 anos após seu aparecimento, apenas casos isolados da moléstia foram identificados (MOHAN, 1976). De 1973 e 1975, foi observada alta incidência da doença em viveiro de mudas e em lavouras de cafezais que se recuperavam da ocorrência de geada no Estado do Paraná (KIMURA; ROBBS; RIBEIRO, 1973; MOHAN, 1976). Nos últimos anos, o aumento da incidência da mancha aureolada tornou-se um fator limitante para o cultivo do café em regiões mais frias e expostas ao vento, em lavouras em formação ou recém-podadas e em viveiros, principalmente nas regiões produtoras do Estado do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, mais frequentemente no Sul e Triângulo Mineiro, Alto do Parnaíba e Cerrado (MOHAN, 1976; SERA; ALTÉIA; PETEK, 2002; SERA et al., 2004; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

No Brasil, a bactéria já foi relatada nos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, principalmente em regiões com temperaturas mais frias ou amenas (MALAVOLTA JR. et al., 2008). Mundialmente, há relatos de sua ocorrência no Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976), Uganda e na China (CHEN, 2002).

Os sintomas característicos da mancha aureolada são lesões foliares pardas com halo amarelado, seca de ramos e desfolha. A doença também ocorre nas rosetas e frutos, sendo os frutos novos mais suscetíveis. Nos ramos do cafeeiro, causam queda prematura de folhas e seca das hastes e dos ramos. Na tentativa de se recuperarem, as plantas emitem novos ramos, originando sintomas de superbrotamento. A bactéria, ao colonizar as hastes do cafeeiro, interfere no pegamento das flores, o que prejudica a produção das plantas no ano seguinte. O período chuvoso está associado com o período de formação dos frutos do café e a infecção nesta fase provoca a queda dos frutos devido à seca dos ramos, ocasionando prejuízos na produção. Os sintomas da mancha aureolada podem ser confundidos com aqueles causados pelos fungos *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda*, responsáveis respectivamente pela cercosporiose e mancha de phoma, e também por distúrbios nutricionais e fatores climáticos (COSTA; SILVA, 1960; PATRÍCIO et al., 2011).

Estudos ainda revelaram que folhas jovens de café são mais suscetíveis à *P. s. pv. garcae*, enquanto folhas velhas apresentam maior resistência à infecção (OLIVEIRA, 1988; OLIVEIRA; ROMEIRO, 1991).

A infecção inicia no interior do tecido vegetal, e a colonização ocorre nos espaços intra e intercelulares, pois exsudatos celulares são utilizados como substrato pela bactéria. Ao colonizar os tecidos, a bactéria migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas, deixando como consequência tecidos mortos (necrosados), que ficam circundados por halo amarelado, resultado da liberação de toxinas pela bactéria. As células bacterianas presentes nas lesões são transportadas para as folhas ou outras plantas através de gotas de água dispersadas pelo vento. Ao atingir as folhas, os respingos de água levam consigo células bacterianas, dando sequência ao ciclo do patógeno (RODRIGUES et al., 2013). Em períodos de menor precipitação ocorre diminuição da incidência da bactéria, pela ausência da água para sua disseminação. Neste período o patógeno sobrevive principalmente na face inferior das folhas do cafeeiro como epífita, ou seja, na superfície das folhas sem causar doença ou em restos de cultura presentes no solo, até que o próximo período chuvoso proporcione condições ideais para que as células bacterianas sobreviventes atuem como inóculo primário para novas infecções (ROBBS 1977; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

De acordo com observações feitas por Costa et al. (1957), adubações potássicas resultaram em maior suscetibilidade dos cafeeiros à doença, enquanto que o fósforo conferiu tolerância às plantas. Adubações nitrogenadas não alteraram a manifestação da doença, entretanto estes resultados não foram confirmados com diferentes concentrações de cada um dos nutrientes.

Dados sobre perdas de produção devido à ocorrência da mancha aureolada foram estimados na região Sul do Estado de Minas Gerais em torno de R\$ 5 milhões, devido à associação da doença às fortes chuvas de granizo incidentes na região, o que causou perdas que acarretaram uma produção de aproximadamente 10 sacas por hectare, aproximadamente 20 - 40 % do total da produção estimada para o ano de 2012 (INTER KAVA AGRONEGÓCIOS, 2012). Produtores de São Sebastião da Gramma e Caconde, no Estado de São Paulo, estimaram quebra na produção em até 50 % em 2012, devido à falta de chuvas no período de setembro a novembro de 2011, o que propiciou o ataque da bactéria e dificultou o controle do patógeno em lavouras situadas em regiões montanhosas, que não permitem a entrada de maquinário para aplicação de produtos fitossanitários (GLOBO, 2012).

3.3. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (sin. *Pseudomonas garcae*)

P. s. pv. *garcae* é uma bactéria Gram-negativa, com células em forma de bastonete reto ou levemente curvado, com medidas que variam de 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm, móveis, devido a presença de um a sete flagelo(s) polar(es). Esta espécie é pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gamma Proteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas*, espécie *Pseudomonas syringae* e patovar *P. s.* pv. *garcae* (MOORE et al., 2006). Produzem pequena quantidade de pigmento fluorescente em meio de cultura King B (KB) (KING; WARD; RANEY, 1954) e, em meio de cultura como Batata Dextrose Agar (BDA) e Nutriente Agar (NA), produzem pigmento marrom, denominado melanina, como citado por Barta e Willis (2005). A bactéria enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes LOPAT + - - - + (L= produção de Levan, O= atividade de oxidase, P= proctopectinase em discos de batata, A= utilização de arginina di-hidrolase, T= hipersensibilidade em folhas de fumo) (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966). Utiliza L-ascorbato, meso-inositol, manitol, D-sorbitol, triacetina e D-xylose, porém não utiliza L-histidina, DL-homoserina, DL-lactato, α-lectina, linolenato, L-malato, D(-) tartarato ou L(+)

tatarato (BRADBURY, 1986). De acordo com Bradbury (1986), as plantas hospedeiras naturais pertencem à diversas espécies do gênero *Coffea*. Em inoculação artificial, sintomas foram obtidos em: *Citrus* sp., *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicon* (sin. *Lycopersicon esculentum*), *Olea europea*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutilobum* e *Solanum tuberosum*.

3.4. Medidas de controle

Com relação ao controle da mancha aureolada do cafeeiro, há vários relatos na literatura nacional sobre a utilização de defensivos agrícolas (PATRÍCIO et al., 2011a; PATRÍCIO et al., 2010; MENEGUIM et al., 2004), porém o manejo da doença é o procedimento mais recomendado para o controle dessa bacteriose. Esse manejo inicia-se pela escolha da área a ser plantada, evitando áreas já contaminadas com a bactéria, além da utilização de mudas saudáveis. Seguramente, a melhor medida de controle é a obtenção de variedades/progênes que apresentem algum grau de resistência à *P. s. pv. garcae*.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Identificação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

4.1.1. Obtenção das linhagens

As linhagens utilizadas neste estudo são procedentes de isolamentos datados a partir de 1958 que foram obtidos na Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF (Tabela 1). As linhagens recentemente isoladas foram obtidas de levantamentos realizados no período de 2007 a 2012, por técnicos dos Laboratórios de Bacteriologia Vegetal e Fitopatologia do Instituto Biológico, nas principais regiões cafeeicultoras do Estado de São Paulo (Águas de Prata, Albertina, Altinópolis, Bragança Paulista, Caconde, Cássia dos Coqueiros, Cristais Paulista, Divinolândia, Franca, Garça, Piraju, São Sebastião da Gramma e Serra Negra) e de Minas Gerais (Andradas, Carmo de Minas, Guaxupé, Monte Santo de Minas, Patrocínio, Serra do Salitre, Unaí e Varginha) (Figura 1).

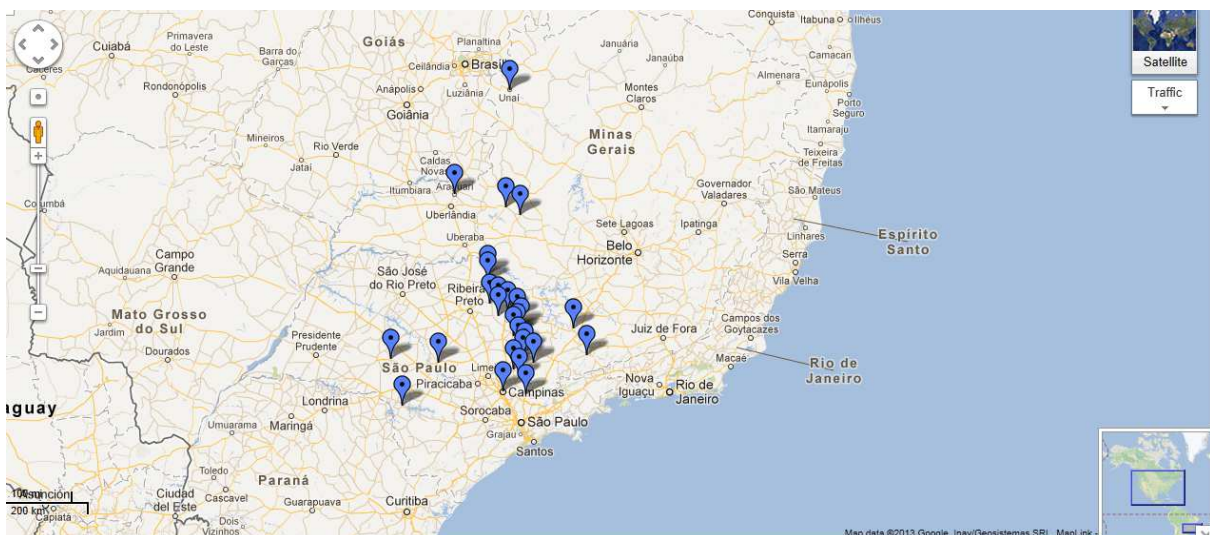


Figura 1 - Mapa indicativo dos municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais produtores de café onde foram isoladas as linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Tabela 1 - Linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* isoladas de *Coffea arabica* utilizadas neste estudo

Nº Linhagens IBSBF	Origem			Ano de isolamento
	Cidade	Estado	País	
64	Pirajú	SP	Brasil	1976
65	Jaú	SP	Brasil	1976
75	Pirajú	SP	Brasil	1978
151	Araguari	MG	Brasil	1978
152	Ouro Fino	MG	Brasil	1978
158	Campinas	SP	Brasil	1978
225	-	-	Brasil	1956
248 ^P	Garça	SP	Brasil	1958
249	-	-	Quênia	1962
1197	Campinas	SP	Brasil	1995
1202	Itapira	SP	Brasil	1995
1293	Guaxupé	MG	Brasil	1997
1372	Cristais Paulista	SP	Brasil	1998
1373	São João da Boa Vista	SP	Brasil	1998
1664	Serra Negra	SP	Brasil	2001
1665	Pirajú	SP	Brasil	2001
1743	Itapira	SP	Brasil	2002
1744	Jaú	SP	Brasil	2002
2212	Franca	SP	Brasil	2005
2213	Franca	SP	Brasil	2005
2511	Patrocínio	MG	Brasil	2007
2512	Patrocínio	MG	Brasil	2007
2840	Caconde	SP	Brasil	2009
2841	Águas da Prata	SP	Brasil	2009
2842	Caconde	SP	Brasil	2009
2883	-	-	Quênia	1973
2996	Monte Santo de Minas	MG	Brasil	2008
2997	Serra Negra	SP	Brasil	2008
2998	Carmo de Minas	MG	Brasil	2008
2999	Serra Negra	SP	Brasil	2008
3004	Serra Negra	SP	Brasil	2008
3005	Altinópolis	SP	Brasil	2008
3011	Carmo de Minas	MG	Brasil	2008
3015	Garça	SP	Brasil	2008
3017	São Sebastião da Gramma	SP	Brasil	2009
3019	São Sebastião da Gramma	SP	Brasil	2009
3020	Bragança Paulista	SP	Brasil	2009
3021	São Sebastião da Gramma	SP	Brasil	2009
3022	Bragança Paulista	SP	Brasil	2009

Tabela 1 - Continuação

3023	São Sebastião da Grama	SP	Brasil	2009
3024	Serra do Salitre	MG	Brasil	2011
3029	São Sebastião da Grama	SP	Brasil	2009
3030	Patrocínio	MG	Brasil	2009
3031	Varginha	MG	Brasil	2009
3032	Albertina	SP	Brasil	2009
3037	-	-	Quênia	1972
3045	Divinolândia	SP	Brasil	2009
3046	Divinolândia	SP	Brasil	2009
3049	Andradas	MG	Brasil	2009
3050	Andradas	MG	Brasil	2009
3051	Andradas	MG	Brasil	2009
3052	Albertina	SP	Brasil	2009
3053	Caconde	SP	Brasil	2009
3058	Caconde	SP	Brasil	2009
3060	Caconde	SP	Brasil	2009
3062	Albertina	SP	Brasil	2009
3063	Albertina	SP	Brasil	2009
3064	Unaí	MG	Brasil	2010
3065	Unaí	MG	Brasil	2010
3069	Guaxupé	MG	Brasil	2010
3070	Guaxupé	MG	Brasil	2010
3107	Monte Santo de Minas	MG	Brasil	2009
3109	Garça	SP	Brasil	2012
3110	Garça	SP	Brasil	2012
3111	Cássia dos Coqueiros	SP	Brasil	2012

^P Linhagem Patotipo

Para fins comparativos, além das linhagens de *P. s. pv. garcae*, também foram incluídas nos testes linhagens de *P. cichorii*, *P. s. pv. tabaci* e *Burkholderia andropogonis*, também patogênicas ao cafeeiro, que causam sintomas de manchas foliares (Tabela 2).

Tabela 2 – Linhagens de fitobactérias que causam sintomas de manchas foliares em cafeeiro e em outras culturas

Nº Linhagens IBSBF	Espécie	Hospedeiro	Origem	Ano isolamento
166	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1979
199 ^T	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	EUA	1959
587	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1973
1784 ^T	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Cichorium endívia</i>	Alemanha	1929
1972 ^P	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungria	1959
2240	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2241	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2249	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005

^T Linhagem Tipo; ^P Linhagem Patotipo

4.1.2. Seleção das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Das 65 linhagens de *P. s.* pv. *garcae* utilizadas neste estudo, 29 foram selecionadas (Tabela 3), para serem utilizadas nos experimentos de patogenicidade, diversidade genética e serologia, representativas tanto das diferentes regiões geográficas, bem como dos diferentes anos de isolamento.

Tabela 3 - Linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) selecionadas

Nº Linhagens	Origem			Ano de isolamento
	IBSBF	Cidade	Estado País	
65	Jaú	SP	Brasil	1976
75	Pirajú	SP	Brasil	1978
152	Ouro Fino	MG	Brasil	1978
158	Campinas	SP	Brasil	1978
248 ^P	Garça	SP	Brasil	1958
249	-	-	Quênia	1962
1293	Guaxupé	MG	Brasil	1997
1372	Cristais Paulista	SP	Brasil	1998
1373	São João da Boa Vista	SP	Brasil	1998
1664	Serra Negra	SP	Brasil	2001
2212	Franca	SP	Brasil	2005
2511	Patrocínio	MG	Brasil	2007
2840	Caconde	SP	Brasil	2009
2841	Águas da Prata	SP	Brasil	2009
2883	-	-	Quênia	1973
2996	Monte Santo de Minas	MG	Brasil	2008
2998	Carmo de Minas	MG	Brasil	2008
2999	Serra Negra	SP	Brasil	2008
3005	Altinópolis	SP	Brasil	2008
3015	Garça	SP	Brasil	2008
3019	São Sebastião da Gramma	SP	Brasil	2009
3022	Bragança Paulista	SP	Brasil	2009
3024	Serra do Salitre	MG	Brasil	2011
3031	Varginha	MG	Brasil	2009
3032	Albertina	SP	Brasil	2009
3037	-	-	Quênia	1972
3046	Divinolândia	SP	Brasil	2009
3049	Andradas	MG	Brasil	2009
3065	Unaí	MG	Brasil	2010

^P Linhagem Patotipo

4.1.3. Produção de antissoros e testes serológicos

Para obtenção dos antissoros, a linhagem patotipo de *P. s. pv. garcae* (IBSBF 248^P) foi cultivada em meio Nutriente Ágar (NA), durante 48 h a 28 °C. Em seguida, as colônias obtidas foram suspensas em tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7 (PBS) e lavadas três vezes nesse tampão, por centrifugação (16.000 *g* por 3 min). Em cada etapa de lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de PSB com adição de 200 µL de adjuvante completo de Freund. Essas suspensões foram utilizadas para imunização de coelhos da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 2,5 kg. Antes das imunizações, os animais foram submetidos ao processo de sangria para obtenção dos soros normais, que foram utilizados como controle negativo das reações serológicas. Os animais foram imunizados via linfonódulo (OLIVEIRA, 1975) e as sangrias efetuadas semanalmente (Figura 2). Os procedimentos para produção de antissoro estão de acordo com a Comissão de Ética do Instituto Biológico (Anexo 1).

Foi realizado previamente teste de dupla difusão em ágar para a determinação da melhor concentração do antígeno e antissoro para os demais testes serológicos, utilizando-se os antígenos nas concentrações de 0,06 g.mL⁻¹, 0,03 g.mL⁻¹, 0,015 g.mL⁻¹ e 0,0075g.mL⁻¹ de peso fresco do crescimento bacteriano em NA (48 h/28 °C).

O relacionamento serológico entre as diversas linhagens bacterianas previamente selecionadas (Tabela 3) foi efetuado com teste de dupla difusão em agarose a 1 %, contendo 0,02 % de azida de sódio, 0,85 % de cloreto de sódio, 2 % de cloreto de magnésio e 0,5 mL de uma solução de azul tripano a 1 %, seguindo protocolos previamente determinados, de acordo com metodologia descrita por Schaad et al. (1990). E em meio de agarose a 1 % contendo 0,85 % de cloreto de sódio

O antissoro produzido contra *P. s. pv. garcae* também foi testado por dupla difusão em ágar para outras fitobactérias patogênicas ao cafeeiro, relacionadas na Tabela 2.

Também foi realizado teste de dupla difusão em ágar utilizando extrato em solução salina (NaCl 0,85 %) de porções de lesões foliares de amostras de plantas provenientes de cafeeiros com suspeita de infecção por *P. s. pv. garcae*.

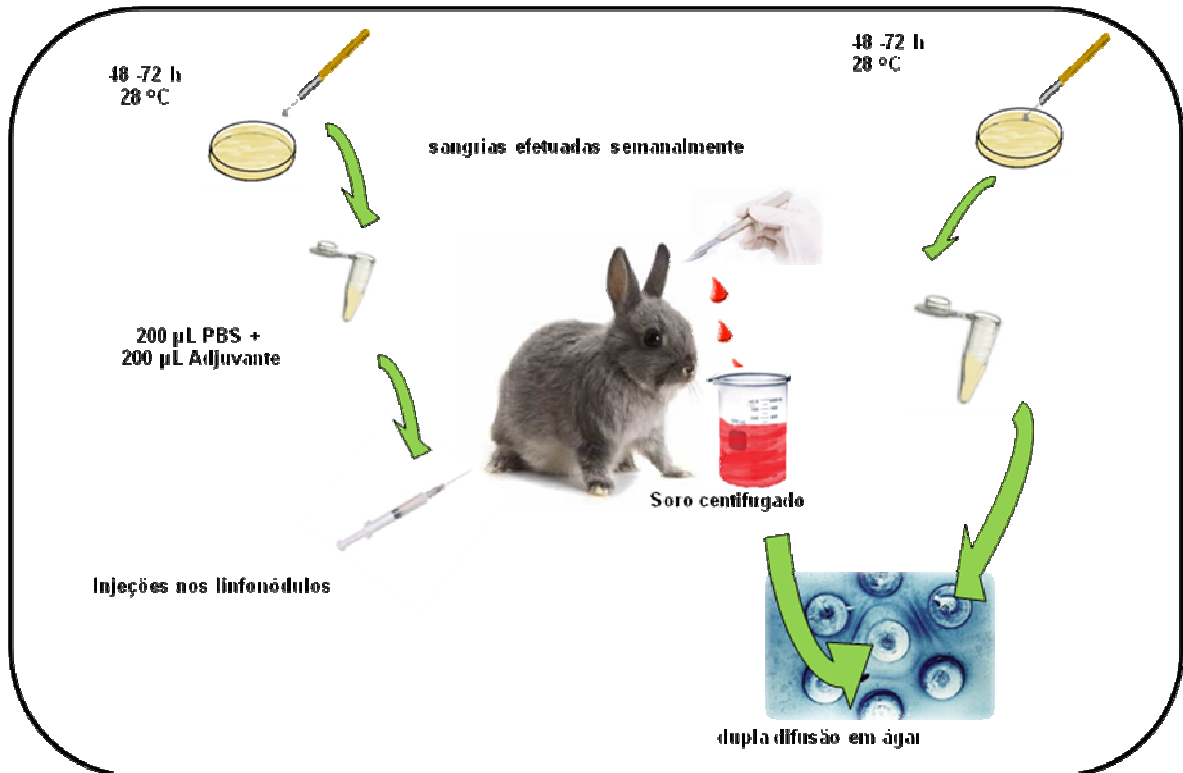


Figura 2 - Protocolo de produção de antissoro para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e testes serológicos para observação da reação antígeno-anticorpo

4.1.4. Eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)

O padrão eletroforético das proteínas totais das linhagens relacionadas na Tabela 2 foi comparado com a linhagem IBSBF 248^P por PAGE/SDS, pelo sistema descontínuo e desnaturante, descrito por Hames; Rickwood (1972), com gel de resolução na concentração de 10 % e de empacotamento à 3,73 %. Os géis foram submetidos a uma voltagem constante de 140 V em cubas Protean II xi Cell - Bio-Rad (Figura 3).

Alíquotas de crescimento bacteriano, cultivado em NA por 48 h a 28 °C, foram coletadas, pesadas e tratadas em tampão de amostra (Tris HCl 63 mM-pH 6,8; sacarose 10 %; 2-β-mercaptoetanol 5 %; SDS 2 % e azul de bromofenol 0,0002 %), na relação de 80 mg

de peso fresco/1000 μ L de tampão de amostra e fervidas a 100 °C/5 min. Esta suspensão foi centrifugada a 16000 *g* por 4 min em temperatura ambiente, desprezando-se os precipitados, sendo os sobrenadantes armazenados em freezer a -20 °C.

Os géis foram corados com prata segundo metodologia de Blum; Bier; Gross (1987) descrita a seguir: fixação em etanol 50 %, ácido acético 12 %, 75 μ L de formaldeído, lavagem com etanol a 50% em água destilada por três vezes de 20 min cada, sob agitação constante, seguido de tratamento com tiosulfato de sódio (20 mg/100 mL de água destilada), mantendo o gel nesta solução por 1 min sob agitação constante. Posteriormente o gel foi lavado em água destilada por três vezes de 20 s cada. A seguir, o gel foi tratado com nitrato de prata a 0,2 % em água destilada com adição de 0,075 % de formaldeído, por 20 min sob agitação constante, seguido de outras três lavagens em água destilada por 20 s cada. Para a revelação foi utilizado carbonato de sódio a 6 % contendo 2 mL da solução de tiosulfato de sódio, descrita acima e 0,05 % de formaldeído. Para interrupção da revelação, o gel foi lavado duas vezes em água destilada por 20 s e mantido no fixador com etanol 50 %; ácido acético 12 %; 0,075 % de formaldeído.

Os perfis eletroforéticos das proteínas totais para detectar possíveis diferenças entre as distintas bactérias estudadas foram analisados por sistema binário (bandas presentes, 1 ou ausentes, 0 para cada linhagem). Os fragmentos abaixo de 100 pares de base (pb) não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se programa para dados qualitativos (SIMQUAL), com o coeficiente de Jaccard (S_j). Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do programa NTSYS-PC (ROHLF, 1992).

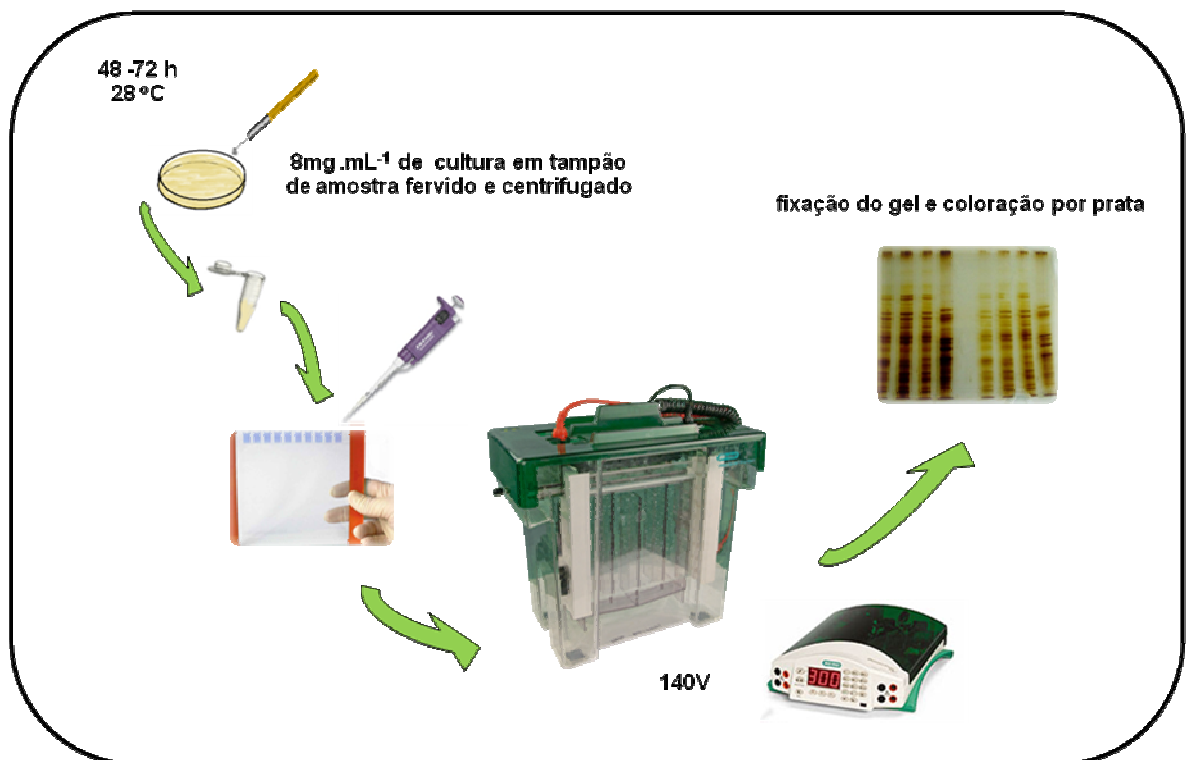


Figura 3 - Metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS

4.1.5. Identificação dos isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* por PCR

Para a validação da identidade das 65 linhagens em estudo como *P. s. pv. garcae* (Tabela 1), o DNA extraído foi amplificado com o par de *primers* avr 1F/2R .

4.1.5.a. Extração de DNA

As extrações do DNA cromossômico das linhagens de *P. s. pv. garcae* foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Pitcher; Saunders; Owen (1989) com pequenas modificações.

As linhagens cultivadas em meio NA por 48 h/28 °C, foram transferidas para 5 mL de meio nutriente líquido (NB) e incubadas a 28 °C por 16 a 18 h, sob agitação constante de 150 rpm (New Brunswick Classic C25KC Refrigerated incubator shaker). A cultura líquida foi submetida à centrifugação, as células foram suspensas em 100 µL de solução de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA) pH 8,0 contendo, 2 mg/ mL de lisozima, homogenizadas com a utilização de agitador de tubos e incubadas a 37 °C /1h. Após esse período foram adicionados 500 µL de solução de tiocianato de guanidina 5 M e a mistura foi agitada brevemente. Em seguida, adicionou-se 250 µL de acetato de amônio 7,5 M misturando-se por inversão e incubando-se as amostras no gelo por dez min. Adicionou-se, posteriormente, 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e após agitação manual vigorosa, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm (12.000 g) em centrífuga Minispin - Eppendorf por 10 min sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 0,54 volume de isopropanol (cerca de 450 µL) a solução foi centrifugada a 12.000 rpm /2 min e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 200 µL de tampão TE pH 8,0. Adicionou-se 2 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C /1h. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de LiCl 4M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), cerca de 400 µL. Após centrifugação de 10 min a 12.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (400 µL) e centrifugado. O sedimento foi lavado duas vezes em etanol 70 %. Após secagem o DNA foi suspenso em 20 a 50 µL de água ultra pura e estocado.

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,6 % em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio 10 mg/mL (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982), visualizados em transluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação Alpha Innotech 2200.

4.1.5.b. Amplificação das linhagens *com primers avr 1F/2R*

A amplificação do DNA das linhagens foi realizada por PCR utilizando-se os *primers avr 1F/2R*. As reações de amplificação foram efetuadas em um volume de 25 µL contendo 1X tampão de reação da enzima *Taq* polimerase; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 mM dos *primers avr 1F/2R*; 0,2 mM de dNTPs e 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e

200 ng do DNA genômico de cada linhagem. As amplificações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad MyCycler) programado para execução de um ciclo de desnaturação inicial 95 °C/2 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C/1 min, 55°C/30 s, 72 °C/1 min e um ciclo de extensão final a 72 °C/3 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5 % em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio 10 mg/mL (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982), visualizados em fonte de luz U.V. e registrados pelo sistema de fotodocumentação.

4.2. Estudos da diversidade genética e da patogenicidade das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

A análise da diversidade genética foi realizada submetendo as linhagens à amplificação com rep-PCR e análise dos padrões de *fingerprinting*.

4.2.1. Patogenicidade das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Os testes de patogenicidade foram realizados por inoculações artificiais em condições de casa de vegetação, com 29 linhagens de *P.s.* pv. *garcae* selecionadas (Tabela 3). Plantas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo, com quatro pares de folhas verdadeiras, foram inoculadas com suspensões aquosas bacterianas obtidas de cultivo em meio NA, durante 48 h a 28 °C, na concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL ($\lambda = 550$ nm; T = 55 %). As inoculações foram efetuadas por aspersão da suspensão, até o escoamento, em folhas que receberam quatro picadas com alfinete entomológico esterilizado. Plantas controle foram também picadas e aspergidas com água destilada e esterilizada. As plantas foram mantidas sob câmara úmida por 72 h após as inoculações (Figura 4). A partir do décimo terceiro dia após as inoculações, foram feitas observações diárias para acompanhamento do desenvolvimento dos sintomas da doença. As avaliações foram realizadas aos 13, 19, 26 e 33 dias após a inoculação (DAI), através de uma escala de notas

adaptada de Moraes e colaboradores (1975), sendo adotados os valores de 1 a 5, onde a nota 1 foi atribuída às folhas sem lesões aparentes, nota 2 para as lesões leves com até 25 % da área foliar afetada por clorose e necrose, nota 3 para folhas com até 50 % de área lesionada necrosada, nota 4 para folhas com até 75 % da área lesionada necrosada e nota 5 para as folhas com até 100 % da área lesionada necrosada.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma muda contendo quatro pares de folhas verdadeiras, considerando-se nas avaliações o segundo e terceiro pares de folhas. Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância, e os dados, quando necessário, foram submetidos à transformação, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, com o uso do programa SASM-Agri (ALTHAUS; CANTERI; GIGLIOTI, 2001).

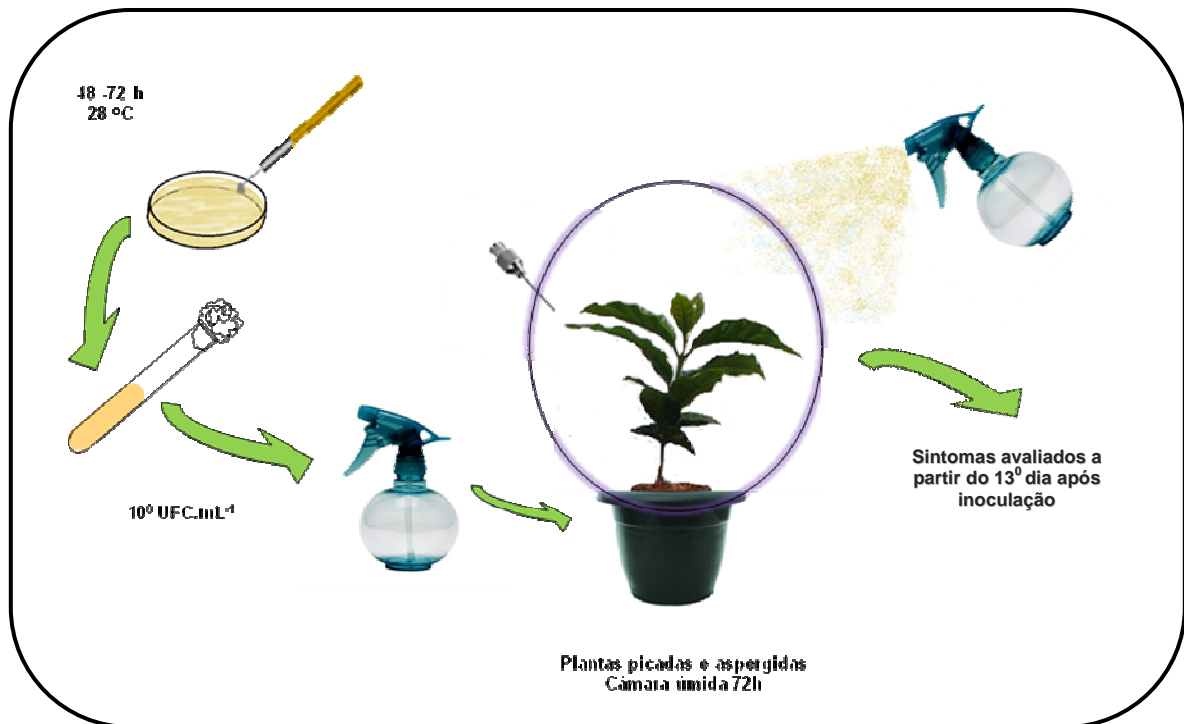


Figura 4 - Esquema do teste de patogenicidade conduzido em casa de vegetação. Inoculação em mudas de café com suspensão bacteriana de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

4.2.3. Avaliação da diversidade genética de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* por rep-PCR

A Avaliação da diversidade genética foi realizada com 28 das 29 linhagens de *P.s.* pv. *garcae* selecionadas (Tabela 3). Foram utilizados cerca de 100 ng de DNA genômico de cada amostra em reações de 25 µL. Com os *primers* listados na tabela a seguir:

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR

Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')*	Código	Nt	Especificidade
III ICG ICG ICA TCI GGC	REP1R-I	18	Repetitive Extragenic Palindromic sequence
ICG ICT TAT CIG GCC TAC	REP2-I	18	Repetitive Extragenic Palindromic sequence
ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	ERIC1R	22	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence
AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	ERIC2	22	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence
CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	BOX A1R	22	elementos Box

* I = A, T, C, G; Nt = nucleotídeos

Os protocolos de amplificação segundo Lows et al (1995), com algumas modificações, utilizados para os diferentes *primers* foram:

- **REP-PCR:** 2,5 U de enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 µM de cada *primer*; 2,5 mM MgCl₂ por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/6 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/ 1 min; 40 °C/ e 65 °C/1 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/16 min.

- **ERIC-PCR:** 2,5 U de enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima; 0,4 mM de dNTPs; 0,8 µM de cada *primer*; 2,5 mM MgCl₂ por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/7 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 52 °C/1 min e 65 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/16 min.

- **BOX-PCR:** 2,5 U de enzima *Taq* polimerase (Fermentas), 1X tampão de reação da enzima; 0,4 mM de dNTPs; 1 µM do *primer*; 1,5 mM MgCl₂ por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/7 min; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min; 53 °C/1 min e 56 °C/8 min; e um ciclo de extensão final a 65 °C/16 min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5 % em tampão TAE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídio 10 mg/mL, visualizados em fonte de luz U.V. e registrados pelo sistema de fotodocumentação digital.

4.2.3.a Análise dos padrões de *fingerprinting*

Os perfis eletroforéticos obtidos por rep-PCR foram analisados por sistema binário (bandas presentes, 1 ou ausentes, 0 para cada linhagem). Os fragmentos abaixo de 100 pares de base (pb) não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se programa para dados qualitativos (SIMQUAL), com o coeficiente de Jaccard (S_j). Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do programa NTSYS-PC (ROHLF, 1992).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

5.1.1. Testes serológicos

No teste para a determinação da concentração ótima do antígeno e do antissoro, o antissoro sem diluição apresentou os melhores resultados e para os antígenos, a suspensão bacteriana na concentração de 0,03 g correspondente ao peso fresco de crescimento bacteriano (48 h/ 28 °C) por mL de solução salina (NaCl 0,85 %) se mostrou mais eficiente (Figura 5).

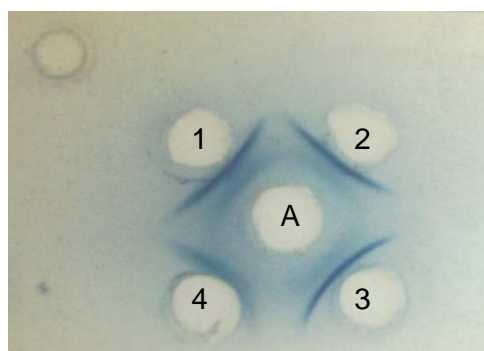


Figura 5 - Teste de dupla difusão em ágar para determinação da titulação do antissoro: (A) antissoro IBSBF 248^P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* sem diluição; antígeno de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*: (1) - 0,06 g.mL⁻¹, (2) - 0,03 g.mL⁻¹, (3) - 0,015 g.mL⁻¹, (4) - 0,0075 g.mL⁻¹ de peso fresco de crescimento bacteriano (48 h/28 °C) por mL de solução salina (NaCl 0,85 %)

5.1.2 Relacionamento serológico

Os resultados obtidos nos testes de dupla difusão em ágar com antissoro produzido contra a linhagem IBSBF-248^P (AS-248^P) mostraram que, quando foi utilizado o meio de

dupla difusão em ágar descrito por Schaad et al. (1990), houve reação de precipitação contra os antígenos obtidos de suspensões das linhagens de *P. s. pv. garcae*, sem que tenham ocorrido reações com outras linhagens bacterianas patogênicas ao cafeeiro. Nas reações serológicas com o meio de agarose contendo cloreto de sódio, foram observadas reações cruzadas entre AS-248^P e linhagens de *P. s. pv. tabaci* e *P. cichorii*. Como os antissoros foram obtidos a partir de células totais, as reações cruzadas entre *P.s. pv. garcae* e *P. s. pv. tabaci* eram esperadas, visto tratar-se das mesmas espécies, com inúmeros determinantes antigênicos comuns. Como as únicas diferenças entre dos dois meios são a presença de cloreto de magnésio e o corante no meio de Schaad, é provável que um ou ambos os componentes estejam de alguma forma, alterando a estrutura dos determinantes antigênicos das diversas linhagens testadas.

As reações de dupla difusão com AS-248^P utilizando como antígeno extratos em salina (NaCl 0,85%) de porções de plantas suspeitas de infecção de amostras originárias do campo mostraram resultado equivalente ao obtido com antígenos em forma de suspensão bacteriana. Esse teste foi um indicativo de que o diagnóstico da mancha aureolada do cafeeiro possa ser efetuado diretamente, a partir de material vegetal, porém é preciso testar um maior número de amostras, inclusive a partir de plantas de cafeeiro infectadas por *P. cichorii* e *P. s. pv. tabaci*, com o objetivo de se verificar se há especificidade ou se os antissoros reagem cruzadamente. É ainda possível que ocorram infecções cruzadas, o que dificulta ainda mais a diagnose.

Os resultados obtidos indicam que esse antissoro foi eficiente no reconhecimento das 29 linhagens estudadas (Tabela 3, Figura 6) de *P. s. pv. garcae*. Sugimori e colaboradores (1978) já haviam obtido antissoro para *P. s. pv. garcae* com o uso da mesma técnica, porém este estudo foi mais amplo, porque incluiu um grande número de isolados. Para estudos com outros patossistemas também foram desenvolvidos antissoros para fins de diagnose de fitobactérias (SILVEIRA et al., 2002). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a técnica de dupla difusão em ágar pode ser empregada como rotina fitossanitária, devendo ser usada paralelamente a outras técnicas de diagnose (FISCHER; KIMATI; MARTINS, 2003; ALMEIDA et al., 2009)

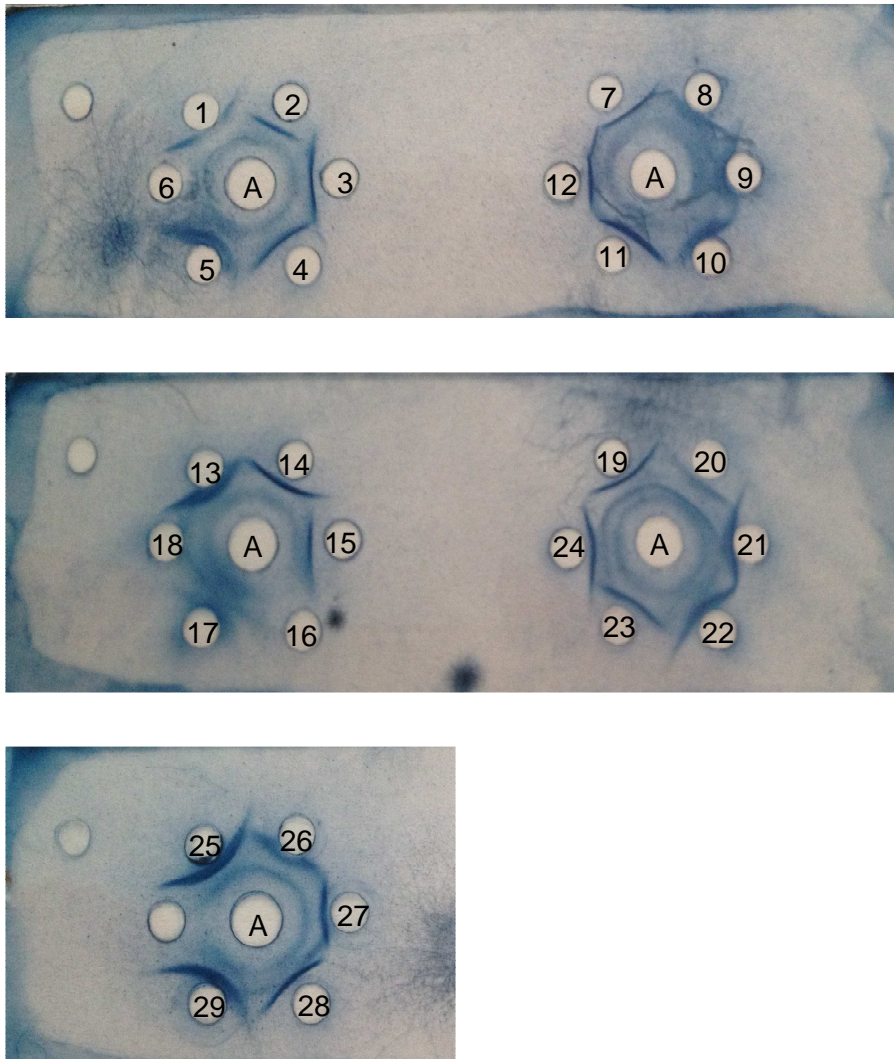


Figura 6 - Teste de dupla difusão em ágar utilizado meio descrito por Schaad et al. (1990) para: (A) antissoro 248^P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; antígenos: (1) IBSBF 65, (2) IBSBF 75, (3) IBSBF 152, (4) IBSBF 158, (5) IBSBF 248^P, (6) IBSBF 249, (7) IBSBF 1293, (8) IBSBF 1372, (9) IBSBF 1373, (10) IBSBF 1664, (11) IBSBF 2212, (12) IBSBF 2511, (13) IBSBF 2840, (14) IBSBF 2841, (15) IBSBF 2883, (16) IBSBF 2996, (17) IBSBF 2998, (18) IBSBF 2999, (19) IBSBF 3005, (20) IBSBF 3015, (21) IBSBF 3019, (22) IBSBF 3022, (23) IBSBF 3024, (24) IBSBF 3031, (25) IBSBF 3032, (26) IBSBF 3037, (27) IBSBF 3046, (28) IBSBF 3049, (29) IBSBF 3065

5.1.3. Eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)

As análises das bandas protéicas obtidas nos perfis eletroforéticos mostrou diferença nos padrões obtidos para *P. s. pv. garcae* das demais espécies de bactérias fitopatogênicas que causam manchas foliares no cafeeiro (Figura 7), o que possibilitou a montagem de um dendrograma de similaridade que permitiu diferenciar as linhagens e confirmar as respectivas identidades (Figura 8).

Estes resultados mostraram que o PAGE/SDS também pode ser utilizado para a diferenciação das bactérias patogênicas ao cafeeiro em nível de patovar.

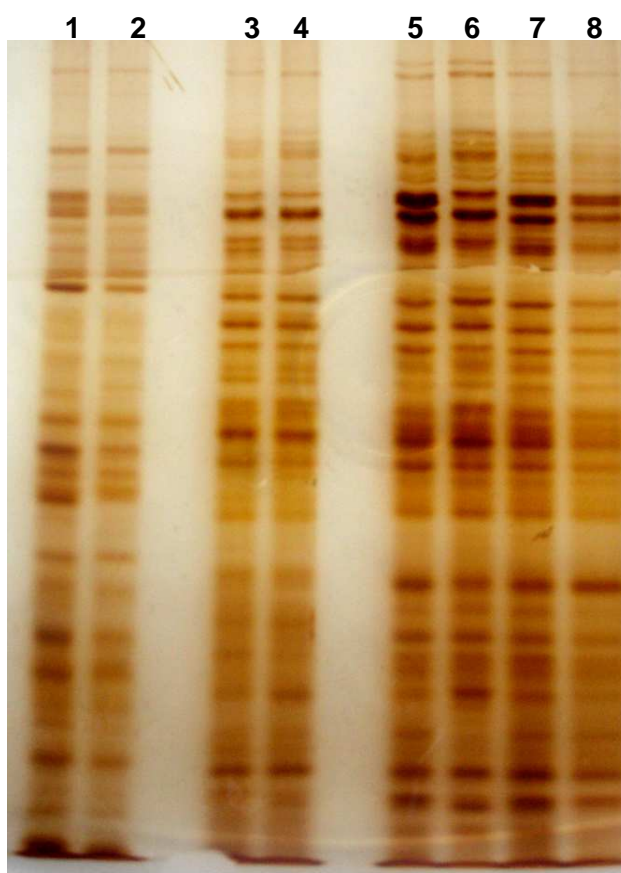


Figura 7 - Perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida PAGE-SDS corado por nitrato de prata. (1) IBSBF 166, (2) IBSBF 199 - *Burkholderia andropogonis*; (3) IBSBF 248^P, IBSBF (4) 1372 - *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; (5) IBSBF 2240 (6) IBSBF 1972^P (7) IBSBF 2241 (8) IBSBF 2249 - *Pseudomonas syringae* - pv. *tabaci*

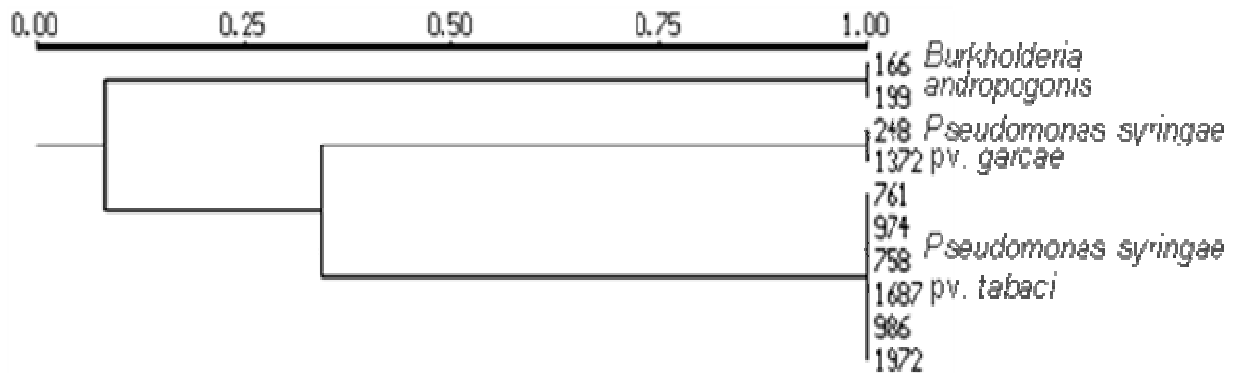


Figura 8 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis eletroforéticos de proteínas totais em gel de poliacrilamida PAGE-SDS mostrando a diferenciação das bactérias ao nível de patovar, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j)

5.1.4. Amplificação das linhagens bacterianas com uso de PCR

Com a amplificação por PCR utilizando-se os *primers* avr 1F/2R foi obtido fragmento de aproximadamente 800 pb para as linhagens de *P. s. pv. garcae*, distinguindo-a das bactérias *P. cichorii*, *Burkholderia andropogonis* e linhagem tipo de *P. s. pv. tabaci*. Contudo, também se observou um fragmento nesta altura para as linhagens de *P. s. pv. tabaci* isoladas de cafeeiro (Figura 9).

Amplificações de linhagens de *P. s. pv. tabaci* de diversos hospedeiros foi realizada, e observou-se que apenas naquelas isoladas de cafeeiro ocorreu sinal positivo de amplificação do fragmento de 800 pb (Figura 10). Esse fato levantou a suspeita de que o par de *primers* utilizado pode estar amplificando uma região envolvida na relação patógeno hospedeiro, uma vez que o mesmo foi desenhado a partir de seqüências do gene *avr* (*avirulence gene*). Entretanto, somente estudos posteriores poderão confirmar tal hipótese.

Neste estudo a utilização dos *primers* avr 1F/2R foi eficiente para a diferenciação de *P. s. pv. garcae* das linhagens de algumas das principais bactérias que causam sintomas de manchas foliares na cultura do café. Segundo Loreti e colaboradores (2001) a detecção de fitobactérias por *primers* específicos tem se mostrado uma ferramenta molecular de

grande importância por sua alta eficiência. Embora haja dificuldade no desenvolvimento de *primers* específicos, principalmente para a diferenciação de fitobactérias em nível de patovar, como observado por Cachatori (2011) para *P. s. pv. aptata* e *P. s. pv. syringae*; por Berg; Tesoriero; Hailstones (2005) para a detecção de *Xanthomonas campestris* em sementes, pois estas assemelham-se em suas características genéticas; e por Tonin (2012) que obteve um *primer* reverso, que associado a outro *primer*, conseguiu diferenciar a espécie *X. campestris* em nível infraespecífico.

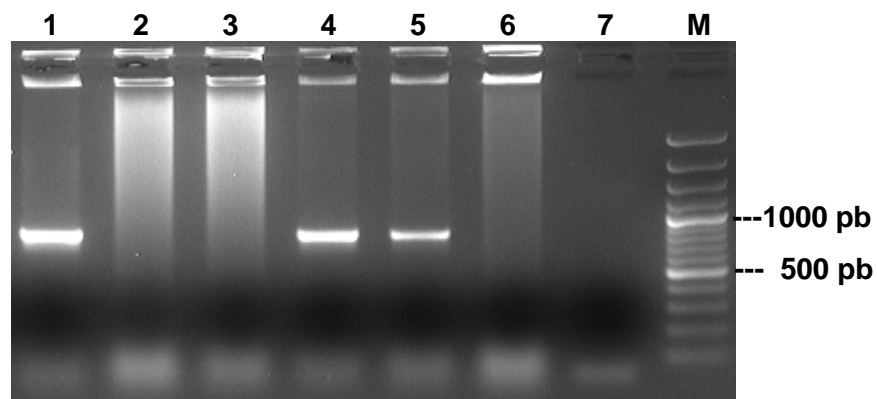


Figura 9 – Amplificação com o par de primers avr1F/2R (1) IBSBF 248P *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (2) IBSBF 199^T *Burkholderia andropogonis* (3) IBSBF 1784T. *Pseudomonas cichorii*, (4) IBSBF 2240 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (5) IBSBF 2241 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (6) IBSBF 1972P *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (7) Controle negativo sem DNA e (M) Marcador molecular 100pb

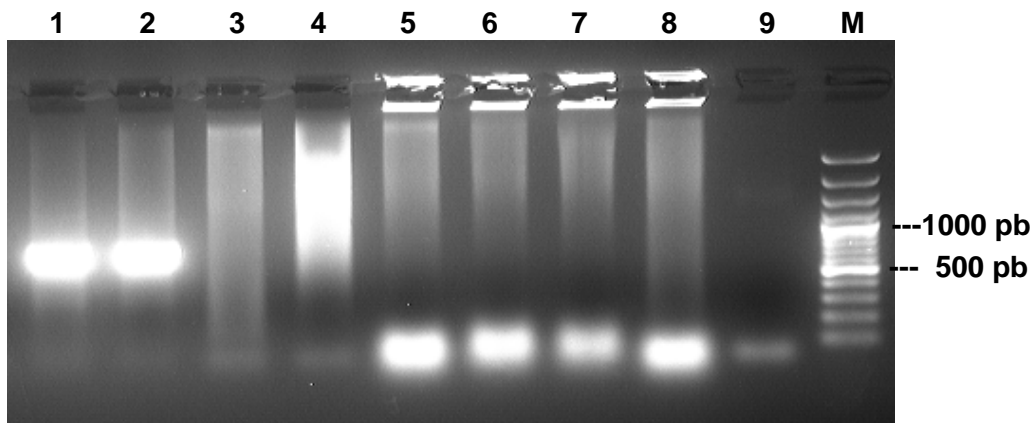


Figura 10 - Amplificação de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* isoladas de diversos hospedeiros com o par de *primers* avr1F/2R (1) IBSBF 2249 *Coffea arabica* (2) IBSBF 2240 *Coffea arabica* (3) IBSBF 974 *Desmodium canum*, (4) IBSBF 758 *Cucumis sativus* (5) IBSBF 1437 *Celosia plumosa*, (6) IBSBF 1822 *Carica papaya* (7) 1687 *Carica papaya* (8) 1662 *Aster* sp (9) Controle negativo sem DNA e (M) Marcador molecular 100pb

5.2. Diversidade das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

5.2.1. Patogenicidade das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

No experimento para avaliar a patogenicidade as linhagens (Figura 11) IBSBF 2996, IBSBF 2998 e IBSBF 3005 foram as menos virulentas comparadas com as demais. As linhagens IBSBF 65, IBSBF 75, IBSBF 1293, IBSBF 2212, IBSBF 3024 e IBSBF 3046 foram as mais virulentas, sendo as demais linhagens moderadamente virulentas (Tabela 5). Não foram observados sintomas de mancha aureolada no tratamento controle.

Com relação à severidade, avaliada pela área ocupada pelas lesões (escala de notas 1-5), observou-se que as linhagens IBSBF 65, IBSBF 3024 e IBSBF 3046 foram mais virulentas. As linhagens IBSFB 248^P, IBSBF 249, IBSBF 1372, IBSBF 1373, IBSBF 2996, IBSBF 2998, IBSBF 2999, IBSBF 3005, IBSBF 3015, IBSBF 3049 e IBSBF 3065 foram menos virulentas apresentando menor agressividade às mudas de cafeeiro, embora também tenham causado a mancha aureolada nas mudas (Tabela 5).

Embora *P. s. pv. garcae* seja um patógeno pouco estudado até o momento, variações da virulência de linhagens bacterianas às mudas de cafeeiro são esperadas. Este fenômeno foi detectado em outros patossistemas semelhantes, como observado por Natalini e colaboradores (2006) para *P. s. pv. syringae* em um pomar de pera e também por Mirik; Ayson; Sahin (2011) para *P. cichorii* em alface, tomate e a planta ornamental *Schefflera arboricola*.

A variação tanto na virulência das linhagens de *P. s. pv. garcae* quanto na agressividade às mudas de cafeeiro observada neste estudo pode ter sido causada, em parte, pela produção de toxinas. Toxinas podem estar envolvidas no grau de virulência, promovendo aumento na severidade de algumas linhagens, pois como observado no trabalho de Lydon; Patterson (2001), linhagens de *P. s. pv. garcae* podem produzir tabtoxina em diferentes quantidades. As toxinas não são essenciais para a patogenicidade dos isolados, porém podem aumentar a sua virulência, ao favorecer o aumento da severidade das lesões, além de promover o crescimento e movimento das bactérias nos tecidos da planta (HWANG et al., 2005). Bactérias da espécie *P. syringae* são conhecidas produtoras de toxinas como tabtoxina, coronatina, faseolotoxina e siringomicina (BENDER; ALARCON-CHAIDEZ; GROSS, 1999; HWANG et al., 2005). Hwang e colaboradores (2005) observaram, ao estudar 95 isolados de *P. syringae*, dos patovares *aceris*, *actinidiae*, *aesculi*, *apii*, *aptata*, *atrofaciens*, *broussonetiae*, *cilantro*, *coronafaciens*, *glycinea*, *japonica*, *lachrymans*, *maculicola*, *mella*, *mori*, *morsprunorum*, *myricae*, *oryzae*, *phaseolicola*, *pisi*, *savastanoi*, *sesami*, *syringae*, *tabaci*, *thea* e *tomato*, que 54 isolados não produziram nenhuma das quatro toxinas testadas, phaseolina, siringomicina, tabtoxina e coronatina, embora fossem patogênicos. Também verificaram que alguns isolados perdiam a capacidade de produzir as toxinas quando armazenados por longos períodos. No presente estudo linhagens obtidas há muitos anos (IBSBF 65, IBSBF 75 e IBSBF 1293) foram patogênicas, indicando que não perderam a patogenicidade durante o armazenamento sob liofilização e ultracongelamento a -80 °C. Mas é possível que as linhagens produzam outras toxinas (coronatina, corceptina, fuscopeptina, persicomicina, phaseolotoxina, rhizobitoxina, siringomicina, syringopeptina, tagetinotoxina, tolaasina e viscosina) como observado para outras espécies de *Pseudomonas*. (BENDER; ALARCON-CHAIDEZ; GROSS, 1999).



Figura 11 – Sintomas de necrose com halos amarelos em folhas de mudas de cafeeiro obtidos a partir de inoculação artificial por picada e aspersão de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, em condições de casa de vegetação. (A) IBSBF 65, (B) IBSBF 1293, (C) IBSBF 2840, (D) IBSBF 2511

Tabela 5 – Severidade de mancha aureolada em folhas de mudas cafeeiro, cultivar Mundo Novo, inoculadas com 29 linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Severidade avaliada por escala de notas (1-5) calculada pela porcentagem de lesões formadas em cada folha inoculada, após inoculação com 4 perfurações por folha

Nº Linhagens	Avaliações				AACPD nota	
	IBSBF	13 DAI	19 DAI	26 DAÍ		33 DAI
65		1,6 a	2,3 a	2,7 b	4 a	64,2 a
75		1,5 a	1,9 b	2,3 c	3,2 b	55,3 b
152		1,4 a	1,5 c	2 d	2,7 c	47,5 c
158		1,3 b	1,7 b	1,7 d	2,8 c	46,6 c
248 ^P		1,1 c	1,2 c	1,3 e	1,3 e	33,4 e
249		1,0 c	1,3 c	1,3 e	1,6 d	34,9 e
1293		1,4 a	1,9 b	2,6 b	3,2 b	56,5 b
1372		1,0 c	1,2 c	1,3 e	1,7 d	33,1 e
1373		1,0 c	1,2 c	1,4 e	1,7 d	33,9 e
1664		1,2 b	1,5 c	2,0 c	2,7 c	46,7 c
2212		1,2 b	2,2 a	2,6 b	3,1 b	56,6 b
2511		1,1 c	1,6 c	1,8 d	2,6 c	43,5 d
2840		1,2 c	1,7 b	1,9 d	2,2 d	44,7 d
2841		1,3 b	1,8 b	2,2 c	3,4 b	52,2 b
2883		1,1 c	1,3 c	1,5 e	2,6 c	39,5 d
2996		1,0 c	1,1 c	1,2 e	1,2 e	29,8 e
2998		1,1 c	1,0 c	1,1 e	1,2 e	30,1 e
2999		1,0 c	1,3 c	1,4 e	1,6 d	34,3 e
3005		1,0 c	1,1 c	1,2 e	1,3 e	31,1 e
3015		1,0 c	1,1 c	1,2 e	1,4 e	31,8 e
3019		1,0 c	1,5 c	1,5 e	1,6 d	36,7 d
3022		1,3 b	1,3 c	1,5 e	1,7 d	38,0 d
3024		1,5 a	2,4 a	3,1 a	4,5 a	68,6 a
3031		1,0 c	1,3 c	1,5 e	1,7 d	35,4 e
3032		1,0 c	1,3 c	1,6 e	1,7 d	36,0 e
3037		1,1 c	1,3 c	1,5 e	1,9 d	37,5 d
3046		1,5 a	2,4 a	3,3 a	4,1 a	68,1 a
3049		1,0 c	1,1 c	1,3 e	1,7 d	32,2 e
3065		1,0 c	1,3 c	1,4 e	1,9 d	35,3 e
Controle		1,0 c	1,0 c	1,0 e	1,0 e	26,5 e
CV(%)		12,1	18,8	19,5	17,6	13,1

¹ Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade

5.4.2. Diversidade genética das linhagens de *P. s. pv. garcae* por rep-PCR

5.4.2.1. BOX-PCR

A análise de *fingerprinting* dos padrões de *P. s. pv. garcae* (Tabela 3) com amplificação de sequências repetitivas do DNA bacteriano com o *primer* BOX A1R gerou perfis genéticos muito similares em todas as 29 linhagens analisadas e, portanto, optou-se por descartar esse marcador molecular nas análises de diversidade genética (Figura 12).

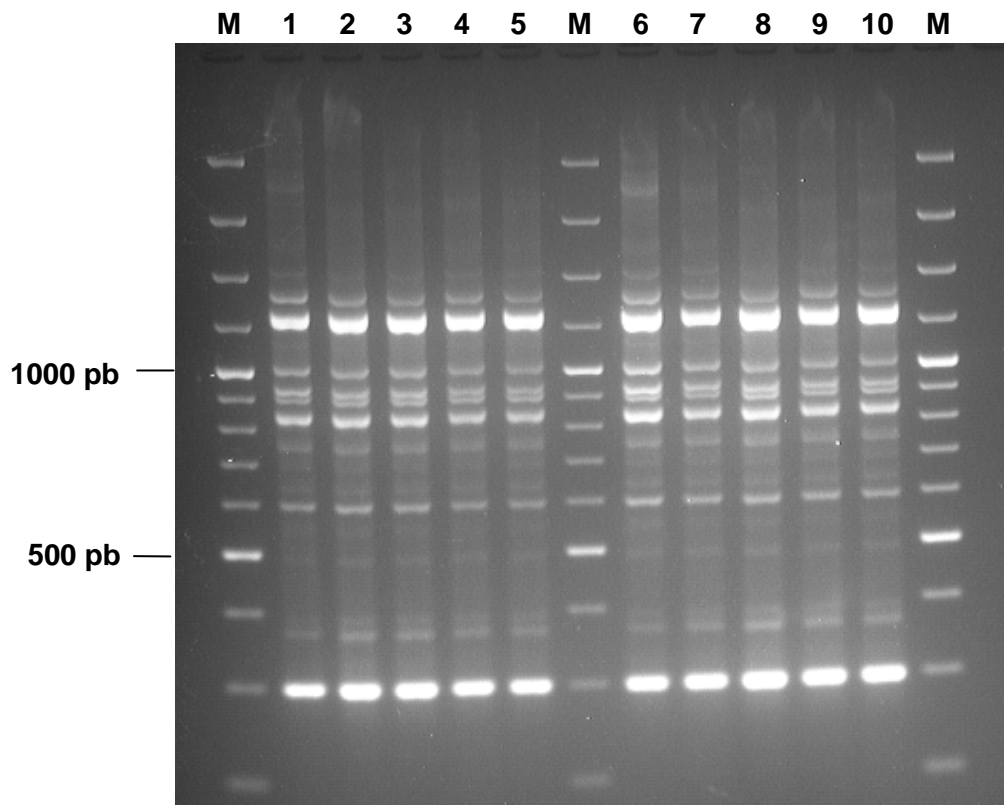


Figura 12 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* utilizando-se o *primer* BOX A1R. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 65, (3) IBSBF 75, (4) IBSBF 158, (5) IBSBF 1372 e (6) IBSBF 1373, (7) IBSBF 1664, (8) IBSBF 2840, (9) IBSBF 2841, (10) IBSBF 2999

5.4.2.2. ERIC-PCR

Diferente das ampliações com o *primer* BOX, os padrões gerados pela amplificação de sequências repetitivas do DNA genômico com os *primers* ERIC 1R/ ERIC2 revelaram diversidade genética entre os isolados testados. Nessa análise foram considerados fragmentos de DNA que variaram de 200 a 1.400 pb (Figura 13).

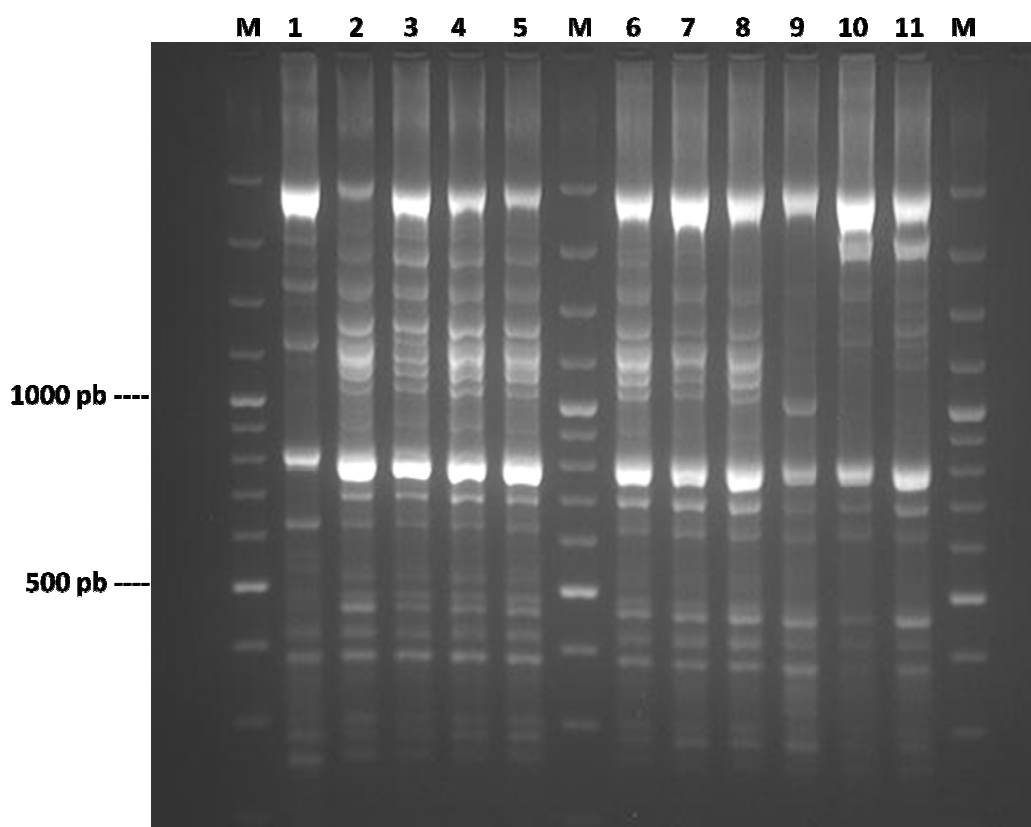


Figura 13 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* gerados pelos *primers* ERIC 1R/ ERIC2. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 2999, (3) IBSBF 3005, (4) IBSBF 3015, (5) IBSBF 3019, (6) IBSBF 3022, (7) IBSBF 3032, (8) IBSBF 3046, (9) IBSBF 249, (10) IBSBF 2883, (11) IBSBF 3037

A análise do polimorfismo das linhagens foi efetuada por meio da construção de dendrograma de similaridade. O dendrograma gerado permitiu a separação das linhagens em dois grandes grupos denominados I e II, com aproximadamente 36 % de similaridade entre si. O grupo I ficou representado por quatro linhagens oriundas do estado de São

Paulo, isoladas no período de 1958 a 1978. O grupo II alocou as 24 linhagens restantes, ficando dividido em dois subgrupos “a” e “b”, com aproximadamente 44 % de similaridade entre eles. O grupo “a” ficou representado pelas três linhagens provenientes do Quênia, com isolamentos que dataram entre 1962 a 1973; e o grupo “b” ficou ainda subdividido em outros dois subgrupos, “i” e “ii”, com similaridade de aproximadamente 67 %. O subgrupo “i” alocou apenas linhagens provenientes do estado de Minas Gerais (76 % de similaridade), enquanto que o subgrupo “ii” apenas linhagens do estado de São Paulo (75 % de similaridade), sendo estes últimos isolados no período de 1998 a 2010 (Figura 14).

Nessas análises foi possível verificar a separação das linhagens provenientes de São Paulo por período de isolamento, ou seja, as linhagens isoladas de 1958 a 1978 ficaram no grupo I enquanto que as demais isoladas de 1998 a 2010 no grupo II subgrupo “b”, “ii”.

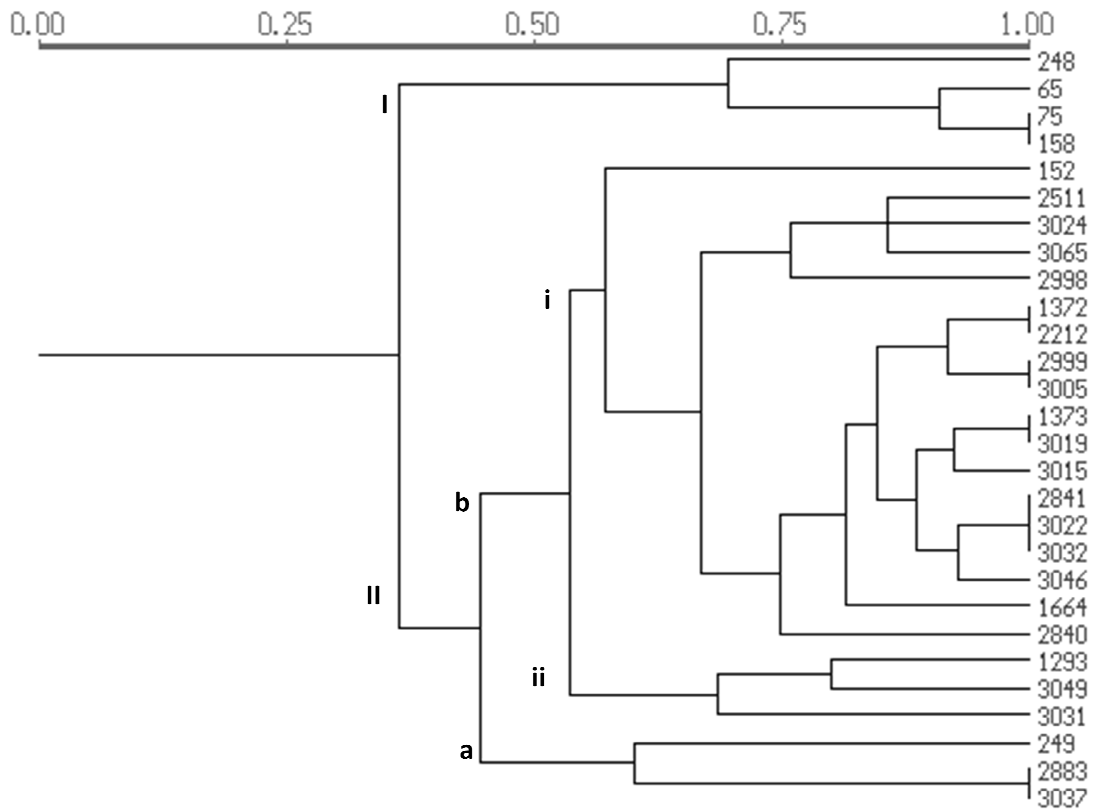


Figura 14 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação das linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* a partir dos *primers* ERIC 1R/ ERIC2, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_J)

5.4.2.3. REP-PCR

A análise dos padrões de perfis gerados pela amplificação dos DNAs das 29 linhagens de *P. s. pv. garcae* (Tabela 3) por REP-PCR com os *primers* REP1R/ REP2I também revelou alta diversidade genética entre os isolados (Figura 15). Nessa análise foram considerados fragmentos de DNA que variaram de 200 a 1.400 pb.

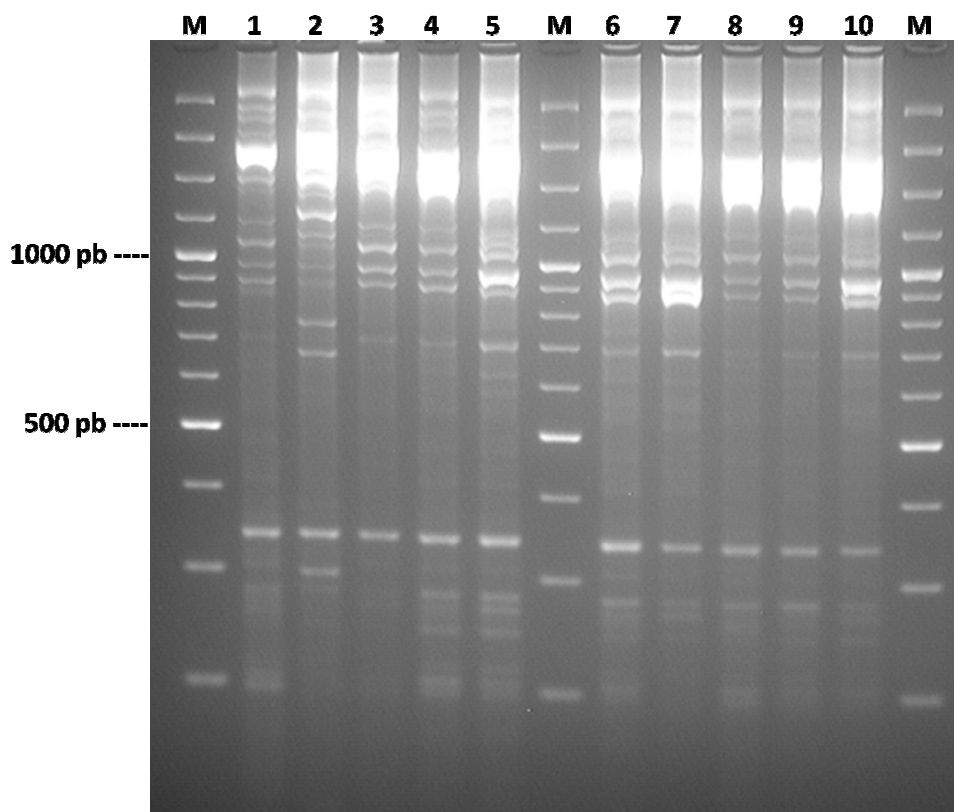


Figura 15 - Produtos de amplificação dos DNAs de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com os *primers* REP1R/ REP2I. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) IBSBF 248^P, (2) IBSBF 65, (3) IBSBF 75, (4) IBSBF 158, (5) IBSBF 1372 e (6) IBSBF 1373 (7) IBSBF 1664, (8) IBSBF 2840, (9) IBSBF 2841, (10) IBSBF 2999

As linhagens foram analisadas quanto ao polimorfismo pela construção de dendrograma de similaridade (Figura 16). Nesta análise as linhagens ficaram separadas em dois grupos, sendo que o grupo I ficou representado apenas pela linhagem IBSBF 2883, proveniente do Quênia, com similaridade de aproximadamente 20 % com o grupo II. O grupo II alocou as linhagens restantes e ficou subdividido em “a” e “b”, com similaridade de aproximadamente 50 % entre si. O subgrupo “a” incluiu apenas cinco linhagens, sendo duas delas provenientes do Quênia (IBSBF 249 e IBSBF 3037), a linhagem Patotipo (IBSBF 248^P) e ainda duas linhagens provenientes do estado de Minas Gerais. O subgrupo “b” com as 22 linhagens restantes, ainda pode ser dividido em dois outros subgrupos, “i” e “ii”, sendo pertencentes ao grupo “i”, apenas linhagens isoladas do estado de Minas Gerais e no grupo “ii” apenas linhagens provenientes do estado de São Paulo.

Nessas análises as linhagens provenientes do estado de São Paulo (grupo II subgrupo “b”, “ii”) ficaram claramente separadas das oriundas do estado de Minas Gerais (grupo II, subgrupo “a” e subgrupo “b”, “i”).

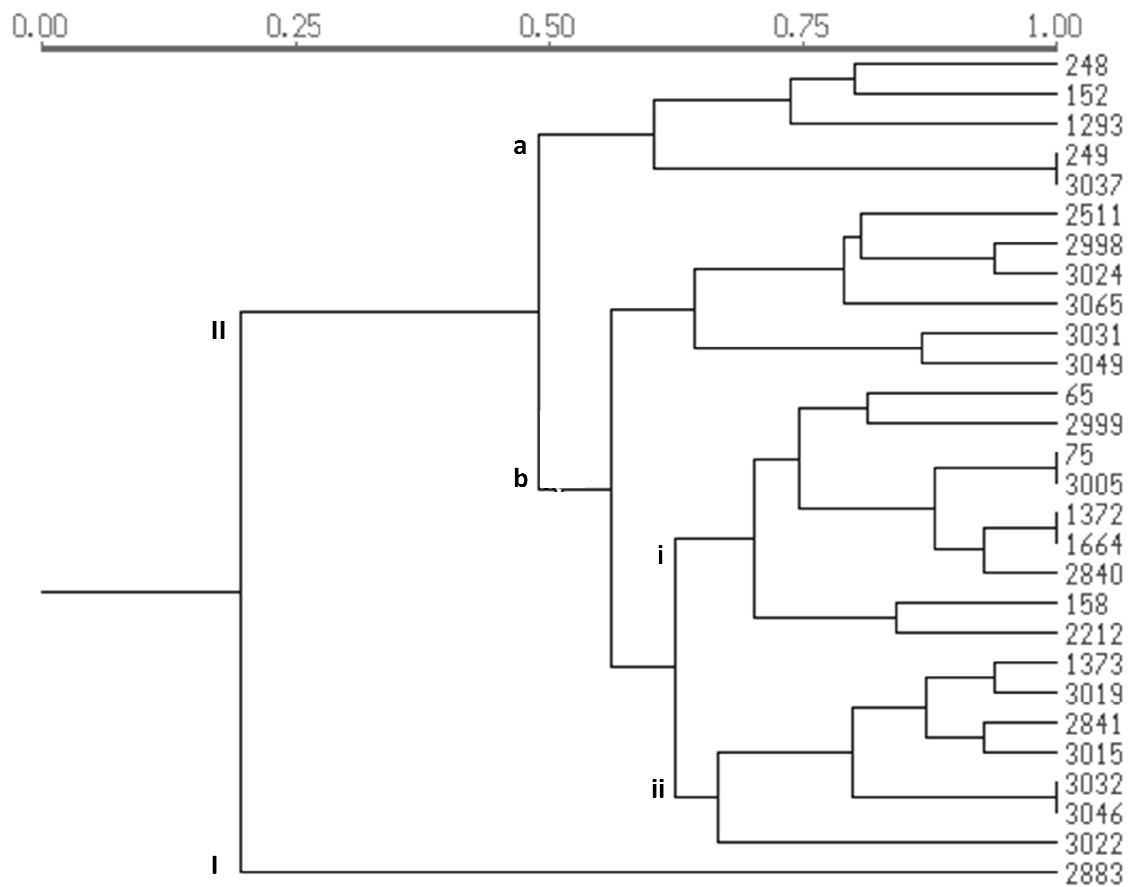


Figura 16 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com os *primers* REP1R/ REP2I, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_J)

5.4.2.4. Análise combinada de ERIC-/REP-PCR

Foi também construído um dendrograma de similaridade da análise combinada das matrizes com os *primers* de ERIC 1R/ ERIC2 e REP1R/ REP2I. A análise do polimorfismo entre as linhagens testadas permitiu separar as linhagens em dois grupos. O grupo I ficou composto apenas por três linhagens de provenientes do Quênia, com similaridade de aproximadamente de 37 % com as demais linhagens deste estudo. O grupo II compreendeu as linhagens restantes, divididas em dois subgrupos, “a” e “b”, com similaridade de aproximadamente de 50 % entre si. O subgrupo “a” ficou composto por quatro linhagens

isoladas estado de São Paulo no período de 1958 a 1978. O subgrupo “b”, alocou 21 linhagens oriundas do estado de São Paulo e Minas Gerais e ficou subdividido em dois subgrupos “i” e “ii”, com similaridade de aproximadamente de 61 %, sendo os pertencentes ao grupo “i”, apenas linhagens oriundas do estado de Minas Gerais, e o “ii”, alocando apenas linhagens de do Estado de São Paulo. Nessa análise, foi possível a observação de correlação entre a formação dos grupos e o local de origem das linhagens (Figura 17).

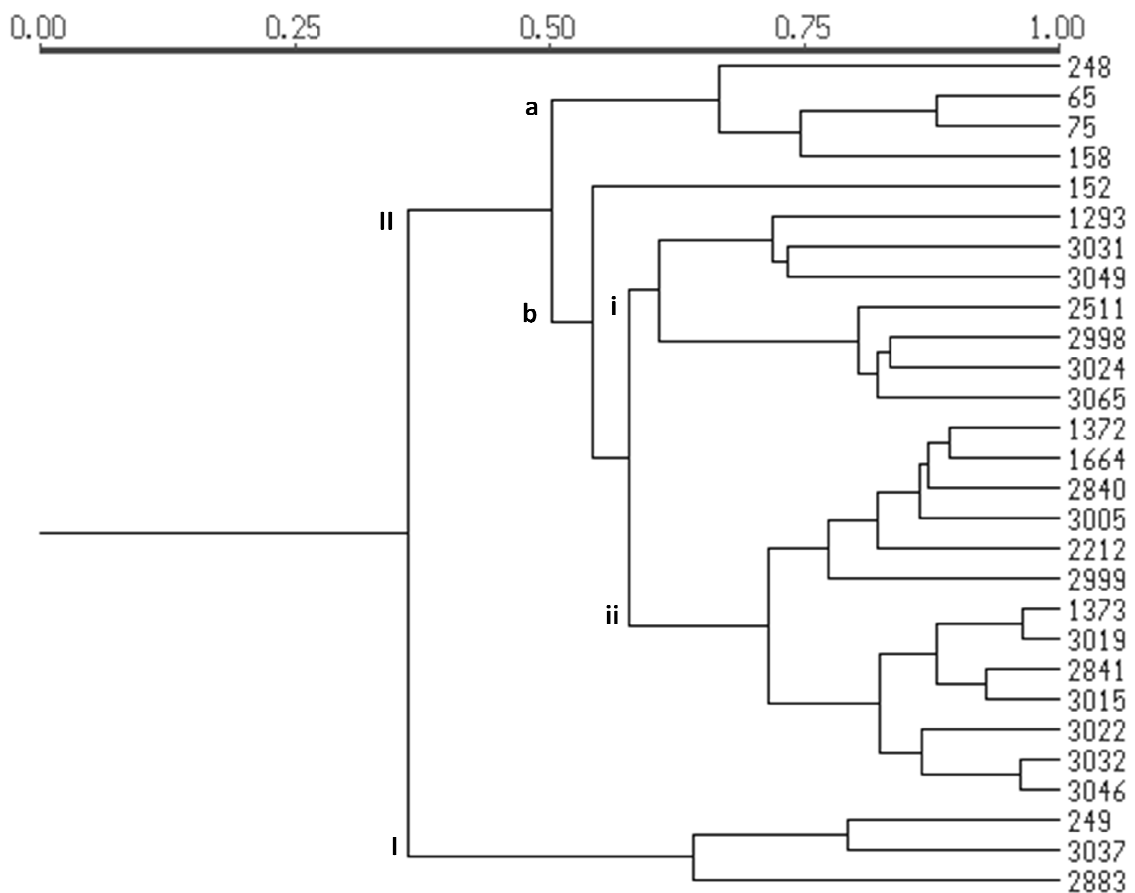


Figura 17 - Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com os *primers* ERIC-PCR e REP-PCR, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (S_j)

A técnica de rep-PCR (REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR) tem sido considerada robusta para estudos filogenéticos de populações de bactérias, tendo apresentado elevada correlação com outras técnicas mais trabalhosas como AFLP e hibridização de DNA

(RADEMAKER et al., 2000). Louws e colaboradores (1994), já haviam descrito a possibilidade de análise de diversidade genética através dos *primers* rep-PCR, contudo apenas recentemente Çepni; Gürel, (2012) observaram possibilidade desta diferenciação para a espécie *P. syringae* em nível infraespecífico e subsequente análise genética da diversidade de linhagens do mesmo patovar. Lows et al (1995) observaram que a técnica permitiu a diferenciação dos isolados de acordo com a localidade e hospedeiro de origem. Também para *Xanthomonas axonopodis* pv. *juglandis* foi observado que a técnica de rep-PCR diferenciava duas regiões de origem dos isolados (SCORTICHINI; MARCHESI; DI PROSPERO, 2001). Ainda, Lows e colaboradores (1995) puderam diferenciar linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de diferentes hospedeiros de acordo com o hospedeiro de origem.

Neste estudo não foi possível diferenciar geneticamente as linhagens de *P. s.* pv. *garcae* com a utilização do *primer* BOX, embora Marques e colaboradores (2008) tenham observado a diferenciação de espécies e patovares de *P. s.* como *aceris*, *aptata*, *atrofaciens*, *dysoxylis*, *japonica*, *lapsa*, *panici*, *papulans*, *pisi*, *syringae*, *aesculi*, *ciccaronei*, *dendropanacis*, *eriobotryae*, *hibisci*, *lachrymans*, *mella*, *mori*, *morsprunorum*, *myricae*, *photiniae*, *sesami*, *tabaci*, *ulmi*, *antirrhini*, *apii*, *berberidis*, *delphinii*, *maculicola*, *passiflorae*, *persicae*, *philadelphii*, *primulae*, *rubicola*, *tomato*, *viburni*, *atroporpurea*, *coronafaciens*, *garcae*, *oryzae*, *porri*, *striafaciens*, *zizaniae*, *helianthi*, *tagetis*, *theae* e *actinidiae* com a amplificação desta região repetitiva do genoma. Natalini e colaboradores (2006) utilizando essa mesma técnica também conseguiram separar e analisar a diversidade de linhagens de *P. s.* pv. *syringae* que produziam diferentes sintomas em pera.

Com a utilização do marcador molecular ERIC-PCR foi possível a separação das linhagens de *P. s.* pv. *garcae* por período de isolamento, enquanto que experimentos com o marcador REP-PCR permitiram a separação das linhagens por local do isolamento. A diferenciação de linhagens de *P. syringae* de rosáceas de caroço foi possível utilizando a técnica de REP-PCR (GAŠIĆ et al., 2012), enquanto que Vicente; Roberts (2007) conseguiram diferenciar linhagens de *P. s.* pv. *morsprunorum* obtidos de cereja (nível infraespecífico).

Na análise combinada dos marcadores moleculares ERIC-PCR e REP-PCR foi possível observar que as linhagens provenientes do estado de São Paulo se diferenciavam das linhagens originárias de Minas Gerais. Também foi possível verificar baixa similaridade entre as linhagens brasileiras das originárias do Quênia, o que possibilitou a separação desses dois grupos de linhagens bacterianas. Esses resultados corroboram estudo anterior desenvolvido por Kairu (1997), que mostrou a clara diferenciação entre as linhagens

nacionais das linhagens quenianas, baseado em formação de pigmentos fluorescentes, produção de bacteriocina e virulência.

O presente trabalho representa o primeiro estudo desta natureza para *P. s. pv. garcae*.

Os dados obtidos com os resultados de patogenicidade, diversidade genética, local de origem e ano de isolamento das linhagens estudadas, foram cruzados, mas não apresentaram correlação evidente. As linhagens IBSBF 65, IBSBF 75, IBSBF 1293, IBSBF 2212, IBSBF 3024 e IBSBF 3046, que foram mais virulentas não se alocam em um grupo definido em nenhum dos três dendrogramas gerados de acordo com os perfis de amplificação com os primer ERIC 1R/ ERIC2, REP1R/ REP2I e a análise combinada de ERIC e REP-PCR, a mesma divergência ocorreu com as linhagens pouco virulentas IBSBF 2996, IBSBF 2998 e IBSBF 3005.

Linhagens isoladas há muitos anos bem como as mais recentes apresentaram divergência no grau de virulência, indicando que o aumento da importância da bacteriose nos últimos anos não deve ser devido ao aumento da virulência do patógeno, mas as condições climáticas mais favoráveis e outros fatores, como plantio de mudas contaminadas, ausência de quebra-ventos, aumento da colheita mecanizada e redução no uso de cobre nas lavouras de café.

6. CONCLUSÕES

- Linhagens de *P. s. pv. garcae* apresentaram reações sorológicas específicas, quando usado com o meio descrito por Schaad et al. (1990) e perfis eletroforéticos de proteínas totais que diferenciaram das outras bactérias que atacam o cafeeiro. Amplificações com os *primers* avr 1F/2R permitiram diferenciá-la também de *P. cichorii*, *Burkholderia andropogonis* e linhagem tipo de *P. s. pv. tabaci*;
- Houve variação na virulência das linhagens de *P. s. pv. garcae* em folhas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, independente do local de origem e ano de obtenção; e
- Linhagens de *P. s. pv. garcae* do Quênia foram diferenciadas das linhagens brasileiras e estas apresentaram diversidade quanto à data de obtenção e local de origem pelas análises obtidas por rep-PCR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). Indicadores da indústria de café no Brasil. 2012. Disponível em : <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1389>>. Acesso em: 25 set. 2012.

ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S.; PATRICIO, F.R.A.; MENDONÇA, P.L.P. Detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro, nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, supl. (CD), 2010.

-----; 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. (CD), 2012.

-----; BERIAM, L.O.S.; SANNAZZARO, A.M.; RODRIGUES NETO, J. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35 n. 5, p.339-342, 2009.

ALTHAUS, R.A., CANTERI, M.G., GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2001, Ponta Grossa. **Anais...**Ponta Grossa: UEPG, 2001. Parte 1. p.280-281.

AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.G.; PINHEIRO, E.D. O bactério causador da mancha aureolada do cafeeiro. **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* *patovars coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.153, p.492- 499, 2005.

BENDER, C.L., ALARCON-CHAIDEZ, F.; GROSS, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.63, n.2, p.266–292, 1999.

BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D.L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, p. 426-427, 2005.

BITANCOURT, A.A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.24, p.191-203, 1958.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v.8 p.93-99, 1987.

- BORGES, C.J.F. A montanha e o café. 2009. Disponível em: <<http://www.cafepoint.com.br/cadeia-produtiva/a-montanha-e-o-cafe-3888n.aspx>>. Acesso em: 17 out. 2011.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986. 332p.
- CACHATORI, J.R. **Desenvolvimento de metodologia para diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, agente causal da mancha bacteriana das folhas de beterraba**. 2011. 72f Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico. São Paulo, 2011.
- CARVALHO, A. Espécies e variedades. In: GRANER, E.A.; GODOY JÚNIOR, C. (Coord.). **Manual do Cafeicultor**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1967. Cap 2, p.18-39.
- CARVALHO, C.H.S. Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.
- ÇEPNI, E.; GÜREL, F. Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP *primers* in the identification of closely related isolates. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.35, n.3, p.650-656, 2012.
- CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. PhD Thesis - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2002.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Acompanhamento da safra brasileira – safra 2013 – Segunda Estimativa – Maio/2013. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_35_12_boletim_cafe_mai_2013.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2013.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Avaliação da Safra Agrícola Cafeeira 2011 - Terceira Estimativa – Setembro/2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_10_10_21_boletim_cafe_-_setembro_2012.pdf>. Acesso em: 25 set. 2012.
- COSTA, A.S.; AMARAL, J.F.; VIEGAS, A.P.; SILVA, D.M.; TEIXEIRA, C.G.; PINHEIRO, E.D. Bacterial halo blight of coffee in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.28, p.427-444, 1957.
- ; SILVA, D.M. A Mancha aureolada do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v.19, p.LXII-LXVIII, 1960.
- DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.152, p.465 - 512, 2006.

DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES, L.M.R.; BERIAM, L.O.S.; PATRÍCIO, F.R.A.; THOMAZIELLO, R.A.; RODRIGUES NETO, J. Bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. **New Disease Reports**, London, v.22, n.5, 2010.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; MARTINS, M.C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. **Fitopatologia Brasileira** v.28, n.6, p.650-655, 2003.

GAŠIĆ, K.; PROKIĆ, A.; IVANOVIĆ, M.; KUZMANOVIĆ, N.; OBRADOVIĆ, A. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. **Pesticide and Phytomedicine**, Belgrado, v.27, n.3, p. 219-229, 2012.

GLOBO, G1. Bactéria ameaça safra de café em São Sebastião da Grama, SP. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/2012/02/bacteria-ameaca-safra-de-cafe-em-sao-sebastiao-da-grama-sp.html>>. Acesso em 13 jan. 2012.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRI Press Ltda., 1972. 290p.

HWANG, M.S.H.; MORGAN, R.L.; SARKAR, S.F.; WANG, P.W.; GUTTMAN, D.S. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.9. p.5182-5191, 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/default.shtm>>. Acesso em: 25 set. 2012.

INTER KAVA AGRONEGOCIOS Clipping café - Chuvas trazem prejuízo de R\$ 5 milhões à cafeicultura, devido aparecimento da mancha aureolada. Disponível em: <<http://interkava.com/lmercado.php?cod=726>>. Acesso em: 06 jan. 2012.

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

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

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

LELLIOT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.29, n.3, p.470-589, 1966.

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

LORETI, S.; GALLELLI, A.; BELISARIO, A.; WAJNBERG, E.; CORAZZA, L. Investigations of genomic variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by AFLP analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.583-591, 2001.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DE BRUIJN, F.J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.528-536, 1995.

LOUWS, F. J., FULBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T. & DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.60, p.2286-2295, 1994.

MALAVOLTA JR., V.A.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, supl.esp., p.9-88, 2008.

MANIATS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

MARQUES, A.S.A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. 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.

MAURIN, O.; DAVIS, A.P.; CHESTER, M; MVUNGI, E.F.; FAKIN, Y.J.; FAY, M. Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, London, v.100, p.1565-1583, 2007.

MENEGUIM, L.; KAJIHARA, L.H.; OCCHIENA, E.M.; LEITE JR., R.P. Avaliação da eficiência de Kasugamicina no controle da mancha aureolada em mudas de cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, p.113, 2004.

MIRIK, M.; AYSAN, Y.; SAHIN, F. Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different hosts in Turkey. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 13, n.2, p.203-209, 2011.

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

MORAES, S.A.; SUGIMORI, M.H.; TOMAZELLO FILHO, M.; CARVALHO, P.C.T. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 1, n.1, p.105-110, 1975.

MOORE, E.R.B.; TINDALL, B.J.; MARTINS DOS SANTOS, V.A.P.; PIEPER, D.H.; RAMOS, J.L.; PALLERONI, N.J. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRAND, T.E. (Ed). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. New York: Springer, 2006. p.646–703.

NATALINI, E.; ROSSI, M.P.; BARIONOVI, D.; SCORTICHINI, M. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. **Journal of Plant Pathology**, Padova, v.88, n.2, p.219-223, 2006.

OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção via linfonódulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.1, p.61-64, 1975.

OLIVEIRA, J.R. **Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. 1988. 79f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

-----; ROMEIRO, R.S. Compostos fenólicos, idade da folha e resistência do cafeeiro à *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.38, n.220, p.445-452, 1991.

Organização Internacional do Café (ICO), Estatísticas do comércio. Disponível em: <<http://dev.ico.org/prices/m1.htm>>. Acesso em: 18 set. 2012.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J..A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JR., A.; BERETTA, M.J.G.; HAKAWA, R.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeiropolis, v.16, p.135-136, 1995.

PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S.; BRAGHINI, M.T.; FAZUOLI, L.C. Mancha aureolada volta a preocupar cafeeicultor. Comunicados Técnicos, n.148, 2011. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=148>. Acesso em: 03 ago. 2012.

-----; BERIAM, L.O.S.; ROSSI, A.; MORAES, A.; ALMEIDA, I.M.G. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35 supl. p.s119, 2010.

-----; BERIAM, L.O.S.; SANTOS, J.M.F.; REIS, J.C.S.; JORGE, J.M.; DUARTE, R.P.; MENDONÇA, P.L.P. 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, 2011a (CD).

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, J.R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, p.151-156, 1989.

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

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.50, p.665-677, 2000.

ROBBS, C.F. Sobrevivência de *Pseudomonas garcae* como epífita de folhas de cafeeiros. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5. Guarapari, 1977.
Resumos. Rio de Janeiro: IBC/GERCA/DAC - UFRRJ, 1977. p.152-153.

-----; KIMURA, O.; RIBEIRO, R.L.D.; OYADOMARI, L.C. "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**, Itaguaí v.4, n.2, p.1-5, 1974.

RODRIGUES, L.M.R.; ALMEIDA, I.M.G.; PATRÍCIO, F.R.A.; BERIAM, L.O.S.; MACIEL, K.W.; BRAGHINI, M.T.; GUERREIRO FILHO, O. Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Boletim Técnico IAC 212**, Campinas, 24p, 2013.

RODRIGUES NETO, J.; FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P.R.; ROBBS, C.F. *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, p.31-36, 1981.

-----; SILVA, C.H.D.; BERIAM, L.O.S.; PATRICIO, F.R.A.; RODRIGUES, L.M.R.; THOMAZIELO, R.A. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, supl., p.85, 2006.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Applied Biostatistics**, Inc., Setauket, NY, 1992.

ROMERO, J.C.D. 2011. Cafeicultura de Montanha. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DE CAFÉS DO BRASIL, 7, 2011, Araxá. **Resumos...** Araxá: Embrapa, 2011 (CD).

-----; SULE, S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VRUGGINK, H.; ALVAREZ, A.M.; BENEDICT, A.A.; DE WAEL, L.; VAN LAERE, O. Serology. In: KLEMENT et al., ed. **Methods in Phyto bacteriology**. Budapest. Akadémiai Kiadó, 1990. p.153-190.

SCORTICHINI, M.; MARCHESI, U.; DI PROSPERO, P. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, p.325-332, 2001.

SERA, G.H.; SERA, T.; ALTÉIA, M.Z.; ANDROCIOLI FILHO, A.; AZEVEDO, J.A.; PETEK, M.R.; ITO, D.S. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agrônômicas em cafeeiros F₂ segregantes para o gene *erecta*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.974-977, 2004.

SERA, T.; ALTEIA, M.Z.; PETEK, M.R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002. p.217-251.

SILVEIRA, J.R.P.; CASTRO, L.A.S.; COUTO, M.E.O.; MARTINS, O.M.; BERNI, V. Produção de anti-soros para diagnose de pectobactérias causadoras de podridão mole em batata. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.8, n.1 - 2, p.7-14, 2002.

SUGIMORI, M.H.; OLIVEIRA, A.R.; NAKAMURA, T.; RODRIGUES NETO, J. Anti-soro para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* preparados pela técnica de injeção no linfonóculo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.4, p.7, 1978.

TEIXEIRA, T.D. 2000. Política estratégica para a cafeicultura brasileira. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, Poços de Calda. **Palestras...Poços de Calda: Embrapa**, 2000 v. 1 e 2 p.169 - 193

TONIN, M.F. **Caracterização taxonomica de espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 137f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

VICENTE J.G.; ROBERTS S.J. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.117, p.383-392, 2007.

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.

8. ANEXO



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 116/11** sobre o Projeto: “Caracterização de linhagens de *Pseudomonas syringae* PV. *Garcae*, agente causal da “mancha aureolada do cafeeiro” por técnicas serológicas, eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS e biologia molecular”, sob a responsabilidade de **Luis Otávio Saggion Beriam**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 27 de julho de 2011.

São Paulo, 02 de agosto de 2011.


Ricardo Spaccagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ