

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

**Desenvolvimento de metodologia de PCR multiplex para diagnose
simultânea de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas*
syringae pv. *tabaci* e influência do nitrogênio no crescimento
vegetativo do cafeeiro e severidade da mancha aureolada**

Karen Wolf Maciel

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo
2018

Karen Wolf Maciel

Desenvolvimento de metodologia de PCR multiplex para diagnose simultânea de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e influência do nitrogênio no crescimento vegetativo do cafeeiro e severidade da mancha aureolada

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

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam
Co orientador: Prof. Dr. Fernando Cesar Bachiega Zambrosi

**São Paulo
2018**

Eu **Karen Wolf Maciel**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data 09/08/18

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Maciel, Karen Wolf.

Desenvolvimento de metodologia de PCR multiplex para diagnose simultânea de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e influência do nitrogênio no crescimento vegetativo do cafeeiro e severidade da mancha aureolada. / Karen Wolf Maciel. - São Paulo, 2018.

89 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018.T.KM014

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luís Otávio Saggion Beriam.

Versão do título para o inglês: Development of multiplex PCR methodology for simultaneous diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and influence of nitrogen in vegetative growth of coffee and severity of bacterial halo blight.

1. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 2. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 3. Primer específico 4. *Coffea arabica* I. Maciel, Karen Wolf II. Beriam, Luís Otávio Saggion III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl/2018/014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Karen Wolf Maciel

Título: Desenvolvimento de metodologia de PCR multiplex para diagnose simultânea de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e influência do nitrogênio no crescimento vegetativo do cafeeiro e severidade da mancha aureolada
Tese apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Luís Otávio Saggion Beriam - Instituto Biológico

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr: Alfredo Seiiti Urashima - Universidade Federal de São Carlos

Julgamento:

Assinatura

Prof. Dr.: Lucas Mateus Rivero Rodrigues - Instituto Agronômico de Campinas

Julgamento:

Assinatura

Prof^a. Dr^a.: Flavia Rodrigues Alves Patrício - Instituto Biológico

Julgamento:

Assinatura

Prof. Dr.: Ricardo Harakava - Instituto Biológico

Julgamento:

Assinatura

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Biológico, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio e financiamento concedido.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam, orientador desta tese, por me proporcionar esta oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando Cesar Bachiega Zambrosi pela orientação desta tese, e apoio em toda parte de Nutrição Vegetal deste trabalho.

À Ms. Irene Maria Gatti de Almeida, que nos deixou, mas sempre terá um lugar especial em meu coração, serei sempre grata por sua amizade e por ter sido exemplo de competência, garra, determinação e, acima de tudo, exigência e excelência profissional, agradeço por poder ter feito parte de sua vida, e pelas lições deixadas.

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

À Prof^ª. Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício, por sua amizade, colaboração em toda parte estatística do trabalho e por estar sempre disposta a ajudar, acreditando sempre no potencial de seus alunos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Biológico – São Paulo pela realização do sequenciamento genético.

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

À toda equipe do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, Alex, Barbara, Harielly, Mari Appy, Mari Tonin, Marcel, Eros, pela amizade e companheirismo.

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

A minha mãe 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 deste trabalho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE PCR MULTIPLEX PARA DIAGNOSE SIMULTÂNEA DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* E *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* E INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO VEGETATIVO DO CAFEEIRO E SEVERIDADE DA MANCHA AUREOLADA.

Campinas, SP, 2018 Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico.

A mancha aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, é uma doença cuja importância aumentou nos últimos anos na cultura do cafeeiro no Brasil. Outras bacterioses também afetam as folhas de cafeeiro e infecções mistas de *P. syringae* pv. *garcae* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* foram encontradas em 2017 no estado do Paraná. As técnicas utilizadas rotineiramente para o diagnóstico destas bacterioses consomem recursos e tempo. No presente estudo, foram avaliadas as sequências dos genes *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG* e *fusA*, para a detecção de possíveis regiões para desenho de *primers* a serem utilizados em reação de PCR para detecção de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci*. A partir das sequências do gene *rpoD* foi possível desenvolver dois *primers*, Psg3F para detecção *P. syringae* pv. *garcae*, que amplificou um fragmento de 275 pb com sensibilidade de 0,001 ng e Pst3F para detecção *P. syringae* pv. *tabaci* que amplifica um fragmento de 585 pb com sensibilidade de 0,01 ng. Estes *primers* podem ser utilizados simultaneamente em uma reação de PCR Multiplex para detectar ambos os patógenos, tanto a partir de DNA extraído, quanto a partir de suspensões bacterianas fervidas. Esta técnica permite maior precisão e redução no tempo utilizado para o diagnóstico de ambas as bacterioses. A severidade da mancha aureolada tem sido relacionada a variações na nutrição nitrogenada da cultura do cafeeiro, em condições de campo e viveiro. Visando a avaliar o efeito do nitrogênio (N) sobre o crescimento de plantas e a severidade da mancha aureolada, foram realizados dois experimentos em condições de hidroponia com mudas de café de cultivares suscetíveis (Bourbon e Catuaí Vermelho IAC 144) e resistente (IPR 102). As mudas foram cultivadas em soluções nutritivas com 0, 5, 10 e 15 mmol L⁻¹ de (N) e inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*. As mudas que receberam N apresentaram maior teor de N nas folhas, maior crescimento da parte aérea, número de folhas e massa seca da parte aérea. As mudas das cultivares

suscetíveis apresentaram maior severidade da mancha aureolada na solução sem N, redução na severidade nas soluções com 5 e 10 mmol de N.L⁻¹ e aumento da severidade na solução com 15 mmol de N.L⁻¹. As mudas da cultivar IPR 102 mantiveram a resistência à mancha aureolada em todas as soluções estudadas.

Palavras-chave: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *primer* específico, *Coffea arabica*

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR METHODOLOGY FOR SIMULTANEOUS DIAGNOSIS OF *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* AND *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* AND INFLUENCE OF NITROGEN IN VEGETATIVE GROWTH OF COFFEE AND SEVERITY OF BACTERIAL HALO BLIGHT.

Campinas, SP, 2018 Doctoral Thesis of the Postgraduate Program in Health, Food and Environmental Security in Agribusiness, Instituto Biológico.

The relevance of bacterial halo blight of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, has increased recently in the coffee crop in Brazil. Other bacterioses also affect the coffee leaves and mixed infections of *P. syringae* pv. *garcae* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* have been found in 2017 in the state of Paraná. The techniques routinely used to diagnose these bacteria may spend resources and time. In the present study, the sequences of the genes *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG* and *fusA*. Only from the sequence of the *rpoD* gene allowed the development of two primers Psg3F for the detection of *P. syringae* pv. *garcae*, with 275 bp and a sensitivity of 0.001 ng, and Pst3F for the detection of *P. syringae* pv. *tabaci*, with 585 bp, and a sensitivity of 0.01 ng. These primers can be used simultaneously in a Multiplex PCR reaction to simultaneously to detect both pathogens, from extracted DNA and from boiled bacterial suspensions. This technique allows greater precision and reduction in the time used for diagnosis. The severity of the bacterial halo blight has been related to variations in the nitrogen nutrition of the coffee crop in field and nursery conditions. Aiming to estimate this influence, two experiments were carried out in hydroponic conditions with coffee seedlings of susceptible (Bourbon and Catuaí Vermelho IAC 144) and resistant (IPR 102) cultivars. The seedlings were grown in nutrient solutions containing 0, 5, 10 e 15 mmol L⁻¹ of nitrogen (N) and were inoculated with *P. syringae* pv. *garcae*. The seedlings presented a higher level of N and high growth of the aerial part, and dry mass of the aerial part, as well as a higher number of leaves, in response to the N supply. The seedlings of the susceptible cultivars presented more severity of bacterial halo blight in the solution without N, reduction in the severity in the solutions 5 and 10 mmol of N.L⁻¹ and increase in the severity in the solution containing 15 mmol of N.L⁻¹. The seedlings of the cultivar IPR 102 maintained resistance to bacterial halo blight in all treatments.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, specific primer, *Coffea arabica*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de fitobactérias que causam sintomas de manchas foliares	42
Tabela 2. Relação dos genes amplificados por PCR, tamanho dos fragmentos de DNA esperados e sequências dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.	44
Tabela 3. Pares de <i>primers</i> , regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR dos genes <i>dsbA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpsLG</i> e <i>fusA</i>	45
Tabela 4. Concentrações das soluções estoque para preparo das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos em condições de hidroponia.	47
Tabela 5. Composição das soluções nutritivas contendo diferentes quantidades de N e utilizadas nos experimentos em condições de hidroponia.	48
Tabela 6. Teores de macro e micronutrientes nas folhas de mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções com diferentes níveis de nitrogênio.	56
Tabela 7. Número de folhas, altura das plantas, área foliar, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST) em mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções com diferentes níveis de nitrogênio.	57
Tabela 8. Severidade de mancha aureolada, causada por <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> , estimada por uma escala de notas (1-5), pela porcentagem da área foliar afetada e pelo número de lesões formadas, em mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções nutritivas com diferentes doses de nitrogênio e inoculadas. Primeiro experimento.	58
Tabela 9. Valores de probabilidade de F da análise estatística dos teores de macro e micronutrientes detectados nas folhas das mudas de cafeeiro das cultivares IPR 102 e Catuaí Vermelho IAC 144, cultivadas em soluções nutritivas contendo diferentes teores de nitrogênio.	60

Tabela 10. Teores de macro e micronutrientes nas folhas de mudas de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144 e IPR-102, cultivadas em soluções sem e com diferentes doses de nitrogênio. Segundo experimento.	60
Tabela 11. Teores de magnésio presentes nas folhas das cultivares IPR 102 e Catuaí Vermelho IAC 144, cultivadas em soluções nutritivas contendo diferentes níveis de nitrogênio. Segundo experimento.	60
Tabela 12. Valores de probabilidade de F das variáveis número de folhas, comprimento do sistema radicular e da parte aérea, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST), em mudas de cafeeiro cultivadas em soluções contendo diferentes concentrações de nitrogênio.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de especificidade dos *primers* (A) Psg3F/*rpoDR*; (B) Pst3F/*rpoDR*. (1 e 9) *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T); (2 e 10) *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T); (3 e 11) *R. andropogonis* (IBSBF 165^T); (4 e 12) *R. andropogonis* (IBSBF 166^T); (5 e 13) *R. andropogonis* (IBSBF 169^T); (6 e 14) *P. cichorii* (IBSBF 587^T); (7 e 15) *P. cichorii* (IBSBF 1784^T); (8 e 16) Controle negativo sem DNA.52

Figura 2. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Psg3F/*rpoDR* utilizando-se diferentes concentrações do DNA genômico de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T). (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 100 ng; (2) 10 ng; (3) 1 ng; (4) 0,1 ng; (5) 0,01 ng; (6) 0,001ng; (7) Controle negativo sem DNA.53

Figura 3. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Psg3F/*rpoDR* utilizando-se diferentes concentrações do DNA genômico de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T). (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 100 ng; (2) 10 ng; (3) 1 ng; (4) 0,1 ng; (5) 0,01 ng; (6) 0,001ng; (7) Controle negativo sem DNA.53

Figura 4. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*. Sendo (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); 1- DNA genômico *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 2- DNA genômico *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 3- DNA genômico de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 4 – Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização do *primer* Psg3F/*rpoDR*; 5- Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização do *primer* Pst3F/*rpoDR*; 6- Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*.54

Figura 5 Severidade de mancha aureolada, estimada pela área foliar afetada pela doença, com auxílio do programa Leaf Doctor (Pethybridge et al., 2016) Médias comparadas por pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.64

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

µg - Micrograma

µM – Micromolar

16S - RNA ribossomal em procariotos

16S-23S - Região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S

B - Boro

BSA - Albumina sérica bovina

C.V. – Coeficiente de variação

Ca – Calcio

Ca (NO₃)₂ – Nitrato de cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cm – Centímetro

Cu – Cobre

cv. – Cultivar

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNAr - Ácido desoxirribonucléico ribossomal

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

dsbA – gene codificante da proteína DsbA

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

Fe – Ferro

fusA - Gene codificante do alongamento do fator G

g - Gramas

gyrB - Gene estrutural da subunidade B da DNA girase

h - Hora

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná

IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico

IPR – Instituto Agronômico do Paraná

K – Potássio

KCl - Cloreto de potássio

Kg – Quilogramas

KH_2PO_4 - Fosfato monopotássico
 KNO_3 – Nitrato de potássio
 LiCl - Cloreto de lítio
M - Molar
MFPA – Massa fresca da parte aérea
MFT – Massa fresca total
Mg – Magnésio
mg - Miligrama
 MgCl_2 - Cloreto de magnésio
 MgSO_4 – Sulfato de magnésio
min - Minuto
mL - Mililitro
MLSA - *Multilocus Sequence Analysis*
mM - Milimolar
Mn – Manganês
MSPA – Massa seca da parte aérea
MST – Massa seca total
N- Nitrogênio
Na – Sódio
NA - Nutriente Agar
 NaCl - Cloreto de sódio
ng - Nanograma
 NH_4^+ - Íon amônio
 NH_4NO_3 – Nitrato de amônio
 NO_2^- - Dióxido nítrico
°C - Graus Celsius
P – Fósforo
P- Linhagem patotipo
P. syringae pv. *garcae* – *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*
P. syringae pv. *tabaci* – *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*
Pb - Pares de base
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
pH - Potencial hidrogeniônico
Psg -*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Pst. – *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*
pv. – Patovar
recA - Gene codificante da recombinase A
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA - Ácido ribonucléico
RNAr - Ácido ribonucléico ribossomal
RNase - Ribonuclease
rpm - Rotações por minuto
rpoB - Gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
rpoD - gene codificante da subunidade σ da RNA polimerase
rpsLG - gene codificante da proteína ribossomal S12
s - Segundo
T^T - Linhagem Tipo
T – Transmitância
TAE - Tris - Acetato - EDTA
Taq - *Thermus aquaticus* (enzima DNA polimerase)
TE - Tris - EDTA
Tris - Tris(hidroximetil) aminometano
Tris- HCl - Tris(hidroximetil) aminometano – ácido clorídrico
U - Unidade
UFC – Unidade formadora de colônia
Zn – Zinco
 λ - Lambida
 μ L - Microlitro

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	IV
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
SUMÁRIO.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO	22
2.1. GERAIS	22
2.2. ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1. O CAFEIEIRO	23
3.2. ASPECTOS ECONÔMICOS	23
3.3. PRINCIPAIS DOENÇAS DO CAFEIEIRO	24
3.3.1 <i>Mancha aureolada</i>	25
3.3.2 <i>Outras doenças bacterianas:</i>	29
3.4. PCR NO DIAGNÓSTICO DE FITOBACTÉRIAS.....	31
3.4.1 <i>Técnicas de PCR específicas</i>	31
3.4.2 <i>Primers para PCR</i>	33
3.5. NUTRIÇÃO DO CAFEIEIRO	36
3.5.1 <i>Nitrogênio e o cafeeiro</i>	37
3.5.2 <i>Nitrogênio e doenças de plantas</i>	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. DIAGNOSTICO POR PCR.....	42

4.1.1. <i>Linhagens bacterianas</i>	42
4.1.2 <i>Extração de DNA</i>	42
4.1.3 <i>Amplificação, sequenciamento e alinhamento dos genes conservados</i> ...	43
4.2. EFEITO DO NITROGÊNIO NA SEVERIDADE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO	46
4.2.1. <i>Linhagem bacterianas</i>	46
4.2.2 <i>Cultivares</i>	46
4.2.4. <i>Primeiro experimento</i>	48
4.2.5. <i>Segundo experimento</i>	49
4.2.6. <i>Inoculação</i>	49
4.2.7. <i>Avaliações biométricas</i>	49
4.2.8. <i>Avaliação da severidade da mancha aureolada</i>	50
4.2.9. <i>Análises estatísticas</i>	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1 DESENHO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS	51
5.2. EXPERIMENTOS HIDROPONIA	56
5.2.1 <i>Primeiro experimento</i>	56
5.2.2. <i>Segundo experimento</i>	58
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* L. compreende 125 espécies distribuídas na África, Madagascar, Ilhas Cômoros, Ilhas Mascarene, Ásia tropical e Austrália, sendo duas espécies de importância econômica: *Coffea arabica* L. e *C. canephora* A. Froehner (KRISHNAN, 2015).

O café é a segunda *commodity* mais comercializada do mundo, atrás apenas do petróleo (SEVERINO, 2008). Na safra 2017-2018, foram produzidas em torno de 159 milhões sacas de 60 quilos de café em coco em todo mundo. Segundo dados da ICO (2018), o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, tendo produzido milhões de sacas de café em 2017-2018 51.

O Brasil é o segundo maior mercado de café do mundo tendo consumido 20,5 milhões de sacas em 2017-2018. Segundo dados da ABIC (2015), o consumo de café no país apresentou ligeiro aumento de 0,86% em 2015. A entrada de novos produtos no mercado, e a ampliação da oferta de produtos diferenciados são fatores que contribuíram para esse aumento. O consumo “per capita” brasileiro continua sendo um dos mais elevados do mundo, mesmo comparado ao de países europeus. Segundo o IBGE-POF (2012), o café é o alimento mais consumido diariamente por 78% da população acima de 10 anos, o que representa 79,7 litros/habitante/ano.

No Brasil a cultura do café enfrenta desafios constantes, incluindo as doenças de etiologia fúngica e bacteriana. Quatro doenças de etiologia bacteriana foram encontradas causando lesões em folhas de cafeeiro, como a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (*P. syringae* pv. *garcae*) (AMARAL, TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii* (ROBBS et al., 1974), a mancha escura bacteriana, ocasionada por *Robbisia 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 foliar bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P. syringae* pv. *tabaci*) (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010).

De todas as bacterioses, a que tem ocasionado os principais prejuízos para a cultura do cafeeiro é a mancha aureolada. Os sintomas da doença são caracterizados por lesões foliares de coloração parda, que podem ou não ser acompanhados por um halo amarelado, seca de ramos e lesões nas rosetas, inflorescências e frutos novos, provocando, posteriormente, a desfolha de ramos. Descrita em 1956, essa doença foi considerada secundária por muitos anos, ocasionando problemas principalmente em condições de viveiro, com o aparecimento de lesões nas folhas e

seca de hastes e ramos (AMARAL, TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; COSTA; SILVA, 1960). Entretanto, a sua incidência tem aumentado, especialmente em lavouras em formação, em regiões de elevada altitude, localizadas nas faces sul e sudeste e sujeitas a ventos frios constantes, causando, inclusive a morte de plantas com até um ano de idade (PATRÍCIO et al., 2011). Recentemente isolados de *P. syringae* pv. *garcae* obtidos nos estados de São Paulo e de Minas Gerais, em diferentes épocas e regiões, apresentaram diversos níveis de agressividade e foram agrupados por local de origem e data de isolamento, indicando uma possível disseminação da bactéria por material vegetativo doente (MACIEL et al., 2018)

A partir da detecção de *P. syringae* pv. *tabaci* como patógeno do cafeeiro no Brasil (RODRIGUES NETO et al., 2006), tem sido observada a presença dessa bacteriose em várias regiões cafeeicultoras, como, por exemplo, em vários municípios do Estado do Paraná. Também no estado do Paraná, Rodrigues e colaboradores (2017) relataram a ocorrência simultânea das duas bactérias *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* pv. *garcae*.

Atualmente a diferenciação das bactérias que ocorrem no cafeeiro é realizada primeiramente com observação da sintomatologia, além de testes posteriores ao isolamento da cultura, como análise da morfologia e a presença ou não de fluorescência em determinados meios de cultura. Técnicas serológicas foram desenvolvidas, na tentativa de otimizar o tempo de diagnose (BERIAM et al., 2017). Contudo há dificuldades para realização destas técnicas, principalmente pelas restrições ao uso de animais para a produção de antissoro. Uma das metodologias para a diferenciação das espécies bacterianas são os testes bioquímicos, que demandam longo tempo para obtenção de resultados

Para mancha aureolada, não há na literatura, metodologia molecular desenvolvida para sua diagnose, bem como a sua diferenciação das outras bactérias que causam sintomas semelhantes de manchas foliares em cafeeiro. Como diferenciação dos patovares é difícil por conta de sua semelhança, o desenvolvimento de técnicas moleculares para a identificação de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* pv. *garcae* possibilita diminuição do tempo de análise e pode aumentar a precisão da identificação de ambos os patógenos.

O manejo da mancha aureolada pode ser obtido pelo plantio de quebra-ventos, aplicação de fungicidas cúpricos, além de uma nutrição equilibrada das plantas. Cultivares resistentes também podem ser utilizadas em regiões muito favoráveis a doença. No estado do Paraná a resistência a mancha aureolada vem sendo estudada a partir da geada de 1970, tendo sido

desenvolvida a cultivar resistente IPR 102, e as cultivares com resistência parcial IPR 103, IPR 104, IPR 108 e IPR 59 (MOHAN, 1976; PETEK et al., 2001; PETEK et al., 2006; ITO et al., 2008; SERA; SERA; FAZUOLI, 2017).

Dentre os nutrientes necessários para o crescimento das plantas, o nitrogênio é o mais relevante, pois participa de inúmeras reações necessárias ao desenvolvimento das plantas como da produção de aminoácidos, enzimas, hormônios, fitoalexinas e compostos fenólicos. Há na literatura relatos de muitas doenças bacterianas ou fúngicas sendo estimuladas pela quantidade de nitrogênio fornecida ao hospedeiro, pois o N estimula o crescimento das plantas e os tecidos jovens tendem a ser os mais suscetíveis ao ataque por inúmeros patógenos. No entanto a deficiência de nitrogênio pode afetar a capacidade de defesa das plantas, pois plantas deficientes em nitrogênio têm crescimento lento e processo acelerado de senescência, e o N participa de diversos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos. (HUBER; THOMPSON, 2007). Na cultura do cafeeiro, observações de produtores e viveiristas, indicaram que o excesso de nitrogênio poderia aumentar a incidência da mancha aureolada, no entanto este fenômeno foi pouco estudado para este patossistema.

2. OBJETIVO

2.1. Gerais

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia rápida e precisa para a detecção simultânea de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci*, diferenciando-as das outras bactérias que afetam o cafeeiro, facilitando assim a diagnose correta da mancha aureolada e da mancha foliar bacteriana. Outro objetivo do estudo foi caracterizar o efeito do suprimento de nitrogênio sobre a severidade da mancha aureolada, em materiais genéticos suscetíveis e resistente ao patógeno.

2.2. Específicos

- a. Desenvolver *primer* específico para a diferenciação de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* das outras bactérias que afetam a cultura do café;
- b. Avaliar o efeito da nutrição nitrogenada sobre o teor de nutrientes e o crescimento de mudas de cafeeiro de cultivares suscetíveis e resistente a mancha aureolada;
- c. Avaliar se nitrogênio interfere na ocorrência e severidade da mancha aureolada em mudas de cafeeiro de cultivares suscetíveis e resistente a mancha aureolada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O cafeeiro

O gênero *Coffea L* pertencente à família Rubiaceae, compreende 125 espécies já identificadas (KRISHNAN, 2015). Dentre as espécies, duas são de grande importância econômica: *Coffea arabica L.* e *Coffea canephora A* Froehner, devido principalmente a qualidade da bebida produzida por estas espécies (CHARRIER; BERTHAUD, 1985), contribuindo respectivamente, com aproximadamente 64 % e 36 % do total produzido em 2016 (ICO, 2018)

A espécie *arabica* é originária da Etiópia, supostamente uma das primeiras espécies de café a ser cultivada. A sua dispersão se deu através do Iêmen, um país árabe, onde seus frutos eram consumidos *in natura*. Apenas no século XVI os grãos de café começaram a ser torrados, dando origem à atual bebida (FAO, 2011).

A cafeicultura brasileira teve origem em 1727 em Belém do Pará a com semente de *C. arabica* cultivar típica. (MENDES et al, 2008). *C. arabica* e a espécie é a de maior importância econômica para as Américas, por produzir o café com a bebida de melhor qualidade. O seu cultivo se implantou, abrindo cidades e criando riquezas, principalmente para o estado de São Paulo, se estabelecendo posteriormente no estado de Minas Gerais (CARVALHO, 1997. CONAB, 2018).

A espécie é originária da África Ocidental e cultivada principalmente em regiões da África, do Brasil e do Vietnã. As plantas de *C. canephora* são robustas e altamente produtivas, porém sua bebida é considerada de qualidade inferior, sendo apenas utilizada misturada ao *C. arabica*, fornecendo corpo, possibilitando redução de valor de venda. (FAO, 2011).

O Brasil é atualmente o maior produtor e exportador de café do mundo. Em 2017-2018 o país produziu 51 milhões de sacas e exportou cerca de 21 milhões de sacas de 60 quilos (ICO, 2018). A produção brasileira de *C. arabica* em 2017 representou 76% da produção total de café do país, estimando-se 34,25 milhões de sacas de *C. arabica* e 10, 72 milhões de *C. conilon*. (CONAB, 2018)

3.2. Aspectos econômicos

O café é considerado uma das mais importantes *commodities* do mundo. A produção é

feita principalmente por pequenos agricultores de regiões tropicais menos desenvolvidas, e os maiores mercados consumidores são o europeu e norte-americano.

Segundo dados da ICO (2015) quatro países são responsáveis por 64,8% da produção mundial sendo: o Brasil representando 33,2%, seguido por Vietnã (16,4%), Indonésia (7,8%) e Colômbia (7,3%).

A cafeicultura brasileira é uma das atividades que mais contribuiu para o crescimento econômico do país permitindo ao país se destacar como maior produtor de café do mundo (LOPES; FERNANDES, 2012). Segundo Molin et al. (2010), aproximadamente dez milhões de pessoas estão envolvidas direta ou indiretamente na atividade cafeeira, incluindo produção, industrialização e comercialização.

Segundo ABIC, 2015, o consumo de café no Brasil mostrou um leve acréscimo em 2015, mesmo diante da crise. A recuperação de +1,24% em 2014, atingindo 20,333 milhões de sacas. O consumo 'per capita' do brasileiro também aumentou ligeiramente, passando a 4,90 kg/habitante.ano de café torrado e moído (6,12 kg de café verde em grão), o equivalente a 81 litros/habitante.ano.

O agronegócio do café no Brasil vem crescendo e inovando técnicas de produção, promovendo impactos positivos sobre a produtividade e qualidade do produto (BLISKA et al., 2007).

O ambiente determina a produtividade e a qualidade do café, além das práticas de manejo, em razão do efeito de pragas, como insetos e doenças (ZULLO Jr. et al., 2011). Pela importância da cultura, muitos estudos são realizados com a intenção de minimizar as perdas nas lavouras (SOUZA et al., 2007). As deficiências nutricionais, o manejo inadequado e a incidência de pragas e doenças, são os principais responsáveis pela redução da produtividade e da eficiência no processo produtivo do cafeeiro (GARCIA Jr et al., 2003).

3.3. Principais doenças do cafeeiro

Durante o ciclo da cultura do café, muitas doenças podem ocorrer, podendo reduzir em até 20% a produção e serem, em alguns casos, limitantes para o cultivo. Essas doenças podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, além dos distúrbios nutricionais

(EMBRAPA, 2004).

Dentre as doenças fúngicas encontra-se a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*. As faces inferiores das folhas apresentam pústulas de cor amarelo alaranjada, causando também desfolha e redução da produção. Essa doença ocorre principalmente em condições de campo, sendo disseminada pelo vento. Outras doenças fúngicas relevantes são a cercosporiose causada pela *Cercospora cafeicola* e mancha de phoma causada pela *Phoma tarda* (ZAMBOLIM et al., 2005)

Nematoides do gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus* também podem afetar a produtividade da cultura e no desenvolvimento da planta, deixando-a menor, sem folhas e clorótica e nas raízes aparecem galhas de cor marrom. Mesmo em ambientes de viveiro é possível observar a ocorrência de nematoides (MESQUITA et al, 2016).

No Brasil as doenças de etiologia bacteriana na cultura do cafeeiro são: a mancha aureolada, causada *P. syringae* pv. *garcae* (AMARAL, TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii* (ROBBS et al., 1974) e em viveiro, no Estado de São Paulo (ALMEIDA; RODRIGUES; PATRÍCIO, 2012), a mancha escura bacteriana, ocasionada por *Robbsia andropogonis* (RODRIGUES NETO et al., 1981; LOPES-SANTOS L. et al, 2017), 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).

3.3.1 Mancha aureolada

A mancha aureolada, causada por *P. syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956) foi observada pela primeira vez no Brasil em 1955, em cafeeiros no município de Garça, estado de São Paulo. A partir de então, a doença tem sido observada sob condições de temperaturas amenas, alta pluviosidade, altitudes elevadas, lavouras em formação ou recém podadas expostas a ventos frios e em viveiros (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM et al, 1997; JANSEN, 2005). Os sintomas ocorrem nas folhas, flores, frutos novos e ramos do cafeeiro. Manchas de coloração pardo-escura, formato irregular, envolvidas por halo amarelo são observadas nas folhas mais velhas. Nas folhas novas, as lesões apresentam formato circular e são circundadas por um halo amarelo, que pode não ser notado, mas ao se observarem as folhas sintomáticas contra a luz é possível verificar uma transparência nessa

região (ZAMBOLIM et al., 1999; ZAMBOLIM et al., 2005). Oliveira e Romeiro (1991) verificaram maior severidade em folhas e brotações novas do que em folhas adultas. Em viveiros, a doença causa necrose dos tecidos jovens e queima das folhas (ZAMBOLIM et al., 2005). A bactéria penetra nas folhas do cafeeiro através de aberturas naturais e por ferimentos (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976). A colonização é iniciada nos espaços intra e intercelulares, utilizando como substrato os exsudatos celulares. A bactéria migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas necrosando o tecido e em razão da liberação de toxinas pelo patógeno, há formação de halo amarelado (RODRIGUES et al., 2013).

3.3.1.1. História

A mancha aureolada do cafeeiro, causada pela bactéria *P. syringae* pv. *garcae*, foi descrita no final do ano de 1955, detectada em um cafezal localizado no município de Garça, estado de São Paulo, incidindo em folhas, ramos e frutos (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). O aumento da incidência da mancha aureolada, nos últimos anos tornou-se um fator limitante para o cultivo do café em regiões com clima mais ameno 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 Paranaíba e Cerrado (MOHAN, 1976; SERA; ALTÉIA; PETEK, 2002; SERA et al., 2004; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Mundialmente, há relatos de sua ocorrência no Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976), Uganda e na China (CHEN, 2002).

3.3.1.2. Etiologia

A mancha aureolada possui como agente etiológico a bactéria *P. syringae* pv. *garcae*, uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, 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 *P. syringae* patovar *garcae* (MOORE et al., 2006). Crescem adequadamente a 28-30°C

em meio de cultura King B (KING; WARD; RANEY, 1954), onde apresentam colônias de coloração branco/creme, com bordos irregulares e produzem pequena quantidade de pigmento fluorescente em meio de cultura como Batata Dextrose Agar (BDA), enquanto em Nutriente Agar (NA), produzem pigmento marrom, denominado melanina (BARTA; 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 -lecitina, 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*. São hospedeiras experimentais: *Citrus* sp., *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicon*, *Olea europea*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum paniculatum* var. *acutilobum* e *Solanum tuberosum*.

Diferentes espécies do gênero *Coffea* podem servir de hospedeiras naturais dessa bactéria (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966). Além de existir em outras espécies hospedeiras por meio da inoculação artificial: *Phaseolus vulgaris*, *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicum*, *Olea europea*, *Citrus* sp., *Solanum paniculatum* var. *acutilobum*, (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA; WILLIS, 2005).

3.3.1.3. Ciclo da doença

As células bacterianas penetram por aberturas naturais e/ou por ferimentos ocasionados no manejo da cultura, fricção natural entre folhas ocasionado pelo vento ou mecanicamente, pela abrasão de grãos de areia levados pelo vento ou, pela própria ação do vento, que pode provocar microfissuras (COSTA et al., 1957; KIMURA; ROBBS; RIBEIRO, 1973; KIMATI et al., 2005).

A bactéria, ao colonizar as hastes do cafeeiro, interfere no desenvolvimento 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 (COSTA; SILVA, 1960; PATRÍCIO et al., 2011).

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).

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

3.3.1.4. Sintomatologia

Oliveira e Romeiro (1991) constataram que a severidade da doença é influenciada pela idade fisiológica das plantas, onde a estrutura mais tenra das folhas jovens favorece a penetração do patógeno, além da presença de compostos de defesa em folhas velhas, o que provoca maior resistência à infecção. Concluindo que a mancha aureolada incide com maior severidade em folhas e brotações novas do cafeeiro do que em folhas adultas.

Os sintomas característicos da mancha aureolada são pequenas lesões irregulares foliares, de coloração marrom escura que, com o desenvolvimento da doença, aumentam de tamanho, surgindo halos amarelados ao redor das lesões. Esses halos estão diretamente relacionados às toxinas produzidas pelas bactérias durante o processo de infecção e colonização do tecido vegetal (GNANAMAICKAM; STARRATT, WARD, 1982; DURBIN, 1991).

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 super brotamento (ALMEIDA; RODRIGUES; PATRÍCIO, 2012).

3.3.1.5. Medidas de controle

Com relação ao controle da mancha aureolada do cafeeiro, há vários relatos na literatura nacional sobre a utilização de defensivos agrícolas, principalmente com ativos cúpricos (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 sadias. Seguramente, a melhor medida de controle é a obtenção de materiais genéticos que apresentem algum grau de resistência a *P. syringae* pv. *garcae*.

Pesquisas realizadas por Petek et al. (2001), Sera et al. (2002), Petek et al. (2006) e Ito et al. (2008), em cafeeiros expostos à ocorrência natural da doença, resultaram na seleção da cultivar IPR 102, tem se mostrado resistente a *P. syringae* pv. *garcae* (SERA; SERA; FAZUOLI, 2017)

3.3.2. Outras doenças bacterianas:

3.3.2.1. *Crestamento bacteriano*

O crestamento bacteriano causado por *Pseudomonas cichorii*, foi observado primeiramente em viveiros e campo no Estado de Minas Gerais (ROBBS et al., 1974) e em viveiro no Estado de São Paulo, com maior evidência em períodos mais chuvosos e temperaturas mais altas (ALMEIDA; RODRIGUES; PATRÍCIO, et al., 2012). Apresenta importância econômica pela ampla gama de plantas hospedeiras todo o mundo (COTTYN et al., 2009). Segundo Kimura; Robbs; Ferrari, 1976, a bactéria apresenta em um estágio epífita, mantendo-se na superfície foliar do cafeeiro, e quando as condições ambientais são favoráveis, a bactéria penetra na folha por meio de aberturas naturais e em áreas lesionadas por outras enfermidades, ou até mesmo injúrias naturais provocadas por chuva, vento e areia.

A doença causa sintomas nas folhas mais velhas, apresentando lesões necróticas, de formato irregular e coloração escura, normalmente apresentando encharcamento do tecido no entorno da lesão (GUIMARÃES; MENDES; BALIZA, 2010). As lesões apresentam rápida evolução, podendo causar desfolha (ROBBS et al., 1974).

Pseudomonas cichorii é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato de bastonete, com um tufo de flagelos polares. As colônias são de coloração creme e produtoras de pigmento fluorescente em meio King B. Nos testes LOPAT apresentam resultados positivos para oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo e negativos para a produção de Levan, arginina dihidrolase e podridão em discos de batata. (WILKIE; DYE, 1973; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

3.3.2.2. *Mancha escura bacteriana*

A mancha escura bacteriana causada por *Robbsia andropogonis* foi relatada em 1979 em folhas de cafeeiro cv. Catuaí amarelo (RODRIGUES NETO et al., 1981). Os sintomas observados nas folhas por meio de manchas arredondadas, de coloração marrom escura, com centro necrótico e circundadas por halo clorótico.

A bactéria causadora da doença foi classificada inicialmente como *Pseudomonas andropogonis* (RODRIGUES NETO et al., 1981), posteriormente em renomeada como *Burkholderia andropogonis* (YABUUCHI et al, 1992) e foi recentemente reclassificada como *Robbsia andropogonis* (LOPES-SANTOS L. et al, 2017)

A bactéria é Gram-negativa, as colônias apresentam coloração creme, crescimento lento e não são fluorescentes (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001, ALMEIDA, et al., 2009).

3.3.2.3. *Mancha foliar bacteriana*

A mancha foliar bacteriana, causada por *P. syringae* pv. *tabaci*, foi observada em viveiros de café no estado de São Paulo por Rodrigues Neto et al. (2006) e Destéfano et al. (2010), afeta também o fumo e outras culturas economicamente importantes, como feijão e soja (RODRIGUES; MARQUES, 2004).

Os sintomas são observados nas folhas como pequenas lesões castanhas, tornando-se negras e angulares, podendo também ocorrer lesões irregulares circundadas por um grande halo clorótico.

P. syringae pv. *tabaci* é uma bactéria Gram-negativa e, em meio King B, as colônias apresentam coloração branca cremosa, formato arredondado com margens irregulares, tamanho pequeno a médio e produção de pigmentos fluorescentes (DESTÉFANO et al., 2010). A identificação da bactéria pode ser confirmada com o teste LOPAT, apresenta resultados negativos para a produção de oxidase, podridão em batata e arginina dihidrolase, e resultados positivos para levan, hipersensibilidade em folhas de tomate (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

3.4. PCR no diagnóstico de fitobactérias

Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas para a detecção de fitobacterioses, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) suas variações (SAETTLER, 1995). O método que consiste na amplificação “in vitro” de uma sequência específica de DNA. O procedimento é composto por uma etapa inicial de desnaturação inicial, seguida por vários ciclos repetitivos de três etapas básicas (desnaturação das fitas do DNA, hibridização dos iniciadores e extensão do novo fragmento), que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo microtubo de reação e com reagentes termoestáveis. Em uma etapa final em que é feita uma extensão final dos produtos de amplificação (GOMES, 2008).

A detecção de sequências de DNA via PCR é um método rápido, específico e sensível. Esta técnica possui vantagens para diagnosticar patógenos de plantas quando são comparadas aos procedimentos tradicionais, podendo inclusive eliminar a necessidade do cultivo das bactérias em meio de cultura. A PCR apresenta variações na seletividade, dependendo dos *primers* empregados, podendo se detectar apenas um patógeno ou diversos membros de um grupo de patógenos relacionados (HARTUNG; DANIEL; PRUVOST, 1993). Devido a versatilidade, rapidez e acuidade desta técnica, passou a ser muito utilizada na identificação de bactérias fitopatogênicas (OH et al., 1999) e possibilita inclusive, em alguns casos, a detecção de bactérias sem a obtenção de cultura pura (SCHAAD et al., 1995; REEVES, 1997; MADDOX, 1998). A técnica de PCR é utilizada atualmente para diagnose de muitas doenças de plantas como rotina em laboratórios (SCHAAD et al., 2001), possibilitando a identificação de espécies com reduzida concentração populacional em materiais propagativos assintomáticos, tais como *Pectobacterium atrosepticum* (sinônimo *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) agente causal da podridão mole em tubérculos de batata (VAN DER WOLF et al., 1996) e *Xylella fastidiosa*, responsável pela clorose variegada dos citros (CVC) em borbulhas de laranjeiras contaminadas (COLETTA FILHO; BORGES; MACHADO, 2000).

3.4.1. Técnicas de PCR específicas

Além disso, é possível, combinar técnicas para a detecção de bactérias, como no caso da BIO-PCR, uma técnica relatada por Schaad et al. (1995) que combina amplificação biológica e enzimática, pelo uso do meio seletivo e técnica da PCR, respectivamente. A mesma metodologia foi também utilizada para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em extrato de sementes de feijão, baseada no crescimento da bactéria em meio de cultivo seletivo antes da amplificação,

seguidas de processo de crescimento e aumento do número de células, para amplificação do segmento da região do gene *tox*. Após este estudo, outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se esta mesma técnica para a detecção de do fungo *Corynespora cassiicola* em sementes de soja (SOUSA; SIQUEIRA; MACHADO, 2016), e das bactérias, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (KOBAYASTI, 2002), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (SCHAAD et al., 2001; SONG et al., 2004), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (SAKTHIEVEL; MORTENSEN; MATHUR, 2001).

Uma outra variação da técnica de PCR é a nested-PCR geralmente usada para aumentar a sensibilidade na detecção de um fitopatógeno. Consiste em uma segunda etapa de amplificação utilizando-se *primers* internos ao produto da primeira reação visando aumentar a concentração de produto a ser amplificado num nível que torne possível uma amplificação bem sucedida (KHAINAR et al., 2007). Esta técnica foi utilizada por Ojeda e Verdier (2000) para identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em sementes de mandioca infectadas naturalmente, e os iniciadores internos possibilitaram a amplificação de um fragmento de 509 pares de bases em todas as 12 estirpes testadas, enquanto que nenhum produto de amplificação foi obtido para outros patovares de 17 estirpes de *Xanthomonas* testadas.

A técnica de PCR Multiplex (mPCR) é uma variação da PCR convencional empregada de maneira crescente nos últimos anos. Utilizando mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA. Esta pode ser utilizada para identificação de mais de uma espécie bacteriana na mesma PCR, possibilitando, redução da quantidade de reagentes utilizados e tempo requerido para a identificação do patógeno em uma amostra (PHUERKTES et al., 2001; GANDRA, 2006). Desde sua introdução, a mPCR tem sido aplicada com sucesso em muitas áreas de diagnóstico de DNA, incluindo análise de deleção, mutação e polimorfismo, análise quantitativa e detecção de RNA. Esta técnica foi empregada por Berg; Tesoriero; Hailstones (2005), para a detecção de patovares *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de brássicas. *Primers* foram desenhados para amplificar especificamente um fragmento do gene *hrpF* (hypersensitivity response gene) de *X. campestris*, estes foram específicos, não amplificando para outras espécies de *Xanthomonas*, ou de outras bactérias patogênicas ou epifíticas que ocorrem nessas plantas. Contudo, para evitar resultados falso-negativos decorrentes da presença de inibidores de amplificação em extratos vegetais, os autores desenvolveram outros *primers* da região do espaçador interno transcrito (ITS) da *Brassica* spp. Por esse método foi possível a detecção de apenas uma semente contaminada

dentro de um lote de 10.000 sementes sadias.

3.4.2. *Primers* para PCR

Os *primers* específicos podem ser desenhados a partir de sequências de DNA diversas, entretanto, deve-se levar em conta o nível de especificidade do mesmo para garantir a confiabilidade na detecção e identificação de um determinado patógeno. Neste sentido, os genes conservados são os mais utilizados para este objetivo (BERG; TESORIERO; HAILSTONES, 2005).

3.4.2.1 *Genes conservados*

Os genes conservados são constitutivos estruturais ou de regulação celular, conhecidos como genes *housekeeping* e estão amplamente distribuídos dentre os genomas bacterianos, geralmente se apresentam em cópia única e têm sido propostos como marcadores filogenéticos eficientes para identificação e classificação de bactérias (PALYS et al., 1997; ZEIGLER, 2003). O uso de vários destes genes na taxonomia bacteriana tem se mostrado o método mais adequado para identificação em nível de gênero e espécie (LERAT et al., 2003; PALYS et al., 1997; STACKEBRANDT et al., 2002; VENTURA et al., 2004; ZEIGLER, 2003).

Sequências do operon ribossomal DNAr 16S, 23S, 5S e regiões espaçadoras 16S-23S figuram entre as mais utilizadas em estudos de taxonomia e filogenia de bactérias. Milhares de sequências de DNAr 16S encontram-se disponíveis na base de dados RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA) (MAIDAK, 1999) (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências das regiões espaçadoras entre os genes DNAr 16S-23S têm se acumulado em anos recentes, demonstrando a ocorrência de variação considerável entre espécies, tanto no tamanho como na sequência de bases (GÜRTLER; STANISICH, 1996).

O alinhamento de sequências da região espaçadora 16S-23S disponíveis em bancos de dados evidenciou que não existem regiões altamente conservadas nessa molécula e que podem ocorrer variações de tamanho e composição das bases (GÜRTLER; STANISICH, 1996). Análises da região espaçadora para diferenciação de espécies bacterianas têm sido empregadas no estudo de diversos grupos taxonômicos. Variações nessas sequências podem ser suficientes para discriminar diferentes espécies, enquanto que análises de fragmentos amplificados por PCR através de RFLP ou análise de sequências podem fornecer informações adicionais para

diferenciação de organismos com região espaçadora de mesmo tamanho.

O sequenciamento de outros genes conservados também pode ser bastante eficiente em estudos de identificação de diversos organismos fitopatogênicos (KIM et al., 2003). Dentre eles podemos citar o gene *rpoB*, descrito como um útil marcador molecular para a identificação das espécies do gênero *Pseudomonas* (PASSOS, 2009). Segundo Invitti, 2004, cada uma das subunidades da RNA polimerase possui uma função específica e modifica o processo de transcrição. As funções características de cada subunidade e dos fatores associados a RNA polimerase, o gene *rpoB*, responsável pela codificação da síntese da subunidade β , possui a função de catálise da síntese de RNA, reconhecimento de terminador, ligação do substrato ribonucleosídeo trifosfato, ligação do RNA produzido, controle da estringência, regulação autógena da síntese de 3 e 3' ligação a rifamicina e estreptovaricina. Há relatos da utilização do gene *rpoB* na diferenciação de espécies de *Streptomyces* spp. e de linhagens isoladas da sarna da batata provenientes da Coreia foi obtida utilizando-se sequências do gene *rpoB* (MUN et al., 2007). Estudos filogenéticos de linhagens dos gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas* e *Brevundimonas* empregando-se os genes *rpoB*, *gyrB* e *rrs* revelaram que todas as linhagens estreitamente relacionadas puderam ser claramente separadas nas análises efetuadas com as sequências do gene *rpoB*, indicando que este gene representa uma ferramenta eficaz para a identificação de espécies dos gêneros estudados (TAYEB et al., 2005)

Um outro gene utilizado neste estudo é o gene *gyrB*, que responsável pela codificação de uma proteína da subunidade β da DNA girase, uma topoisomerase tipo II de DNA, que desempenha um papel essencial na replicação do DNA e é distribuída universalmente entre espécies bacterianas (WATT; HICKSON, 1994; HUANG, 1996; PAITAN et al; 1998). Sequências de genes *gyrB* têm sido utilizadas em estudos taxonômicos e filogenéticos de *Pseudomonas* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1998), *Acinetobacter* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1996; YAMAMOTO et al. 1999), *Mycobacterium* (KASAI et al., 2000a; NIEMANN et al., 2000), *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (FUKUSHIMA et al., 2002), *Aeromonas* (Yáñez et al., 2003); *Streptomyces* (HATANO; NISHII; KASAI, 2003) e grupo de *Bacillus anthracis-thuringiensis-cereus* (LA DUC et al., 2004). De acordo com Kasai e colaboradores. (2000b), as estruturas filogenéticas obtidas a partir de sequências do gene *gyrB* de *Micromonospora* foram consistentes com resultados de hibridização DNA-DNA, indicando que esse gene se mostrou uma ferramenta útil nas análises filogenéticas em nível de espécie. Ainda, Niemann e colaboradores (2000) utilizaram a técnica de PCR-RFLP do gene *gyrB* para a diferenciação de espécies dentro do gênero *Mycobacterium* e concluíram que esta técnica foi

rápida, de fácil realização e precisa.

O gene *recA* codifica a recombinase A, uma proteína onipresente nas eubactérias e se classifica entre as mais conservadas nos organismos bacterianos. Esta proteína é multifuncional e está relacionada com mecanismo de reparo do DNA e recombinação homóloga. Atua na ligação dos trechos de fita simples, proporcionando o desenrolamento da dupla hélice e encontrando regiões de homologia entre cromossomos na recombinação homóloga (KREUTZER et al., 1994). A recombinase, por ser um gene *housekeeping*, tem sido relatado como um marcador molecular potencial para desvendar relações filogenéticas entre níveis taxonômicos como famílias, classes e filos (EISEN, 1995; ZEIGLER, 2003). Em estudos do gênero *Burkholderia* com este gene realizados por Payne e colaboradores (2005) a partir de análises filogenéticas, que englobam espécies de importância ecológica, biotecnológica e patogênica, tornou possível a identificação de espécies do gênero, como *B. cepacia*. Outro estudo realizados por Thompson e colaboradores (2004) utilizando esta sequência deste mesmo gene efetuaram um estudo da família *Vibrionaceae* e entre os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium*, e foram observados valores de similaridade entre 83 % e 99 %, nas análises com linhagens da família *Vibrionaceae*, indicando que este gene apresentou poder discriminatório muito maior do que o observado com o gene 16S RNAr (similaridades superiores a 98 %).

O gene *dsbA* codifica a síntese de pontes de dissulfeto. É um componente chave da família das enzimas Dsb (ligação dissulfureto). *DsbA* catalisa a formação da ligação dissulfeto intracadeia, os peptídeos emergem no periplasma da célula (KADOKURA; BECKWITH, 2009). Este gene, juntamente com o gene codificador da EEPP foi utilizado por Aragon e colaboradores (2015), para determinar se o gene *dgcP* é co-transcrito. Para isso foi utilizada PCR tempo real (RT-PCR) com amostras de RNA isoladas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e *P. aeruginosa*. A amplificação das regiões intergênicas revelou que os três genes são transcritos e sugeriu a presença de um terminador a jusante de *dgcP* em ambas estirpes. Em outro estudo, realizado por Iweriebor e colaboradores (2017), dos 760 carrapatos analisados para a presença de materiais genéticos de *Anaplasma* e *Ehrlichia*, utilizando pares de *primers* específicos para o gene da proteína tio-oxidoreductase (*dsbA*) os autores obtiveram o total de 16 amostras positivas do gênero *Ehrlichia* e *primers* específicos do gene 16S RNA de *Anaplasma*, as amostras positivas identificadas foram todas de *Ehrlichia*; nenhum foi positivo para o *Anaplasma*.

O gene *rpoD* é codificante da subunidade sigma, que promove a ligação da RNA polimerase a locais específicos de iniciação e são liberados. Este fator sigma é o principal fator

durante o crescimento exponencial. Transcreve preferencialmente genes associados ao crescimento rápido, como operons ribossômicos, outros genes relacionados à síntese de proteínas, genes codificadores de rRNA e tRNA e *prfB* (MACIAG et al., 2011). Em estudo de Vojtková e colaboradores (2015) foi possível reclassificar a estirpe, originalmente classificada como *Pseudomonas putida* em *Pseudomonas monteilii* através de análise sequencial do gene *rpoD*.

O gene *rpsL* está ligado a resistência à estreptomicina. Esse gene sintetiza a proteína S12 que é um componente da subunidade 30S do ribossomo e desempenha um papel na precisão da tradução (PELCHOVICH et al., 2014). A estreptomicina é um dos tratamentos mais eficientes da tuberculose com problema crescente de resistência a medicamentos. As mutações mais comuns associadas à resistência à estreptomicina de *Mycobacterium tuberculosis*, ocorrem nos códons 43 e 88 do gene *rpsL*. De acordo com estudo realizado por Arjomandzadegan e colaboradores (2016), em estudo com 71 isolados clínicos de *M. Tuberculosis*, observaram que a análise de mutação no códon 43 de *rpsL* pode ser usado, como um ensaio rápido e simples, e possui alta sensibilidade para diferenciação de cepas que são resistentes à estreptomicina.

O gene *fusA*, proveniente de uma sequência nucleotídica do gene *Escherichia coli fus*, codifica o fator de alongamento G. Este mostra o padrão não aleatório de uso de codons típico de proteínas ribossômicas e outras proteínas sintetizadas em alto nível (ZENDEL et al., 1984). A sequência deste gene foi utilizada por Akineden e colaboradores (2017) na reavaliação de 80 isolados de *Cronobacter* que foram isolados como *E. sakazakii* de diferentes alimentos nos anos 2003-2006. Foram reavaliados usando métodos de identificação atuais, incluindo sequenciamento *fusA*, tipificação de sequência multilocus e foram realocados em duas espécies, *C. sakazakii* e *C. malonaticus*. Este gene também foi utilizado por Reis e colaboradores (2018) na detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte resfriadas e congeladas pelos métodos imunoenzimático. PCR e PCR em tempo real, contudo o método de PCR em tempo real com utilização das sequências de do gene *fusA* apresentou os melhores resultados, com alta sensibilidade

3.5. Nutrição do cafeeiro

O cafeeiro, assim como outras culturas, necessita de dezesseis nutrientes essenciais para completar o seu ciclo de vida, sendo três, carbono, hidrogênio e oxigênio, vindos do ar e da água, que compõem aproximadamente 95% do total do peso de uma planta. Os treze restantes são

divididos em macro e micronutrientes e geralmente obtidos no solo (HUBER; THOMPSON, 2007). Os solos tropicais são caracterizados pela baixa fertilidade e a nutrição de plantas com esses nutrientes deve ser realizada por meio da adubação. Esses nutrientes são de grande importância, devido ao fato de exercerem funções específicas na planta e podem ser divididos em função estrutural, constituintes de enzimas e ativadores enzimáticos, que garantem um adequado crescimento, desenvolvimento e produção e favorecem o aumento de resistência ao ataque de pragas e doenças. Nas plantas deficientes ou com toxidez de algum nutriente, tem-se um comprometimento no desenvolvimento de todas as estruturas de crescimento da parte aérea (vegetativas e reprodutivas) e das raízes (PRADO, 2003).

3.5.1. Nitrogênio e o cafeeiro

Entre os macronutrientes essenciais, o nitrogênio é o mais importante e o quarto elemento mais abundante em plantas cultivadas. O nitrogênio é essencial para a produção de amino ácidos, enzimas, hormônios, fitoalexinas e compostos fenólicos, entre outros (HUBER; THOMPSON, 2007). Quantidades elevadas de N também aumentam os teores de aminoácidos e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O nitrogênio é essencial para o crescimento e o desenvolvimento da planta e é obtido a partir do solo, como nitrato ou amônio e para as leguminosas, também fixado por via de simbiótica. O nitrato produzido pela planta é primeiramente convertido em amônia através da ação da nitrato redutase e convertido a nitrito pela nitrito redutase antes que a biossíntese de aminoácidos ocorra. Em plantas superiores, a principal via para a biossíntese de aminoácidos é a glutamina feita pela sintetase glutamato sintase, que converte amônia em glutamina. Eventualmente, uma série de aminoácidos e amidas é formada, incluindo a glutamina, glutamato, asparagina e aspartato, que representam a maioria dos transportadores de nitrogênio. Dependendo da espécie da planta, a redução de nitrato pode ocorrer na raiz, caule ou ambos (HUBER; THOMPSON, 2007).

A maioria das espécies herbáceas, incluindo importantes culturas econômicas, reduz nitrato tanto nas raízes como nas folhas. Em culturas como o algodão, cevada, soja e milho, os níveis de redutase de nitrato são mais altos na parte aérea do que nas raízes. Em outras espécies, como girassol, tremoço e rabanete, as raízes apresentam atividade bem maior do que a das folhas. No cafeeiro, tanto as raízes como as folhas assimilam nitrato; nas raízes, os níveis de atividade da nitrato redutase são, em alguns casos, bem maiores do que os das folhas, variando, entretanto,

com a idade da planta e do tecido analisado e, provavelmente, com as condições de crescimento. A assimilação de nitrato requer energia e esqueletos de carbono que, em órgãos heterotróficos como as raízes, são fornecidos pela oxidação dos carboidratos translocados da parte aérea. O nitrato é um poderoso competidor pela energia disponível nas raízes, de tal forma que, em plantas cultivadas em alto nível de nitrato, o teor de açúcares e o crescimento do sistema radicular são bem inferiores aos daqueles crescidos em baixo teor de nitrato, ou outras formas de nitrogênio. Tal situação pode ser ainda mais acentuada em plantas como o café, que reduzem grande parte do nitrato absorvido em seu sistema radicular, desde que o custo energético para a assimilação de nitrato nas raízes é quase o dobro daquele observado em tecidos verdes. Isso ocorre porque nas raízes toda a energia necessária para converter nitrato em aminoácidos deriva da oxidação dos carboidratos ou ácidos orgânicos, enquanto, nas folhas, parte desse processo está acoplado diretamente com as reações da luz que ocorrem nos cloroplastos (CARELLI; FAHL, 1991).

Apesar do N_2 ser muito abundante na atmosfera, ele é relativamente escasso na crosta terrestre: nesta, seu teor é da ordem de 19 ppm (isto é, 19 g em cada tonelada), teor igual ao do gálio, 33º em ordem de abundância, e semelhante ao do nióbio (20 ppm) e do lítio (18 ppm). Grandes quantidades de nitrogênio são consumidas nos diversos processos de fixação do nitrogênio atmosférico, como por exemplo o realizado por microrganismos, tornando o nitrogênio disponível às plantas (PEIXOTO, 2008).

A quantidade de nitrogênio disponível no solo é pequena. Muito pouco é encontrado nas rochas e nos minerais que formam o solo. Quase todo nitrogênio do solo é proveniente da atmosfera da terra, a qual contém um suprimento quase ilimitado. O elemento precisa ser combinado com outros elementos, antes que as plantas possam usá-lo. O nitrogênio ocorre no solo em três partes principais: N orgânico, que não está disponível para a planta; N amoniacal, que é disponível para as plantas de forma lenta e íons de amônio, nitrato ou compostos solúveis, que representam somente 2 a 3% do total e é o nitrogênio que as plantas usam (LOPES, 1989).

Segundo Malavolta (1986), a maior parte do nitrogênio orgânico no solo parece estar ligado à lignina (um derivado de carboidrato) como um complexo ligno protéico. Este mesmo autor relata que um hectare de solo brasileiro possui na profundidade de 30 cm, entre 1000 a 1500 kg de nitrogênio total. Quase todo esse nitrogênio encontra-se na forma orgânica e a fração mineral corresponde a somente 25 kg.

As plantas superiores são capazes de absorver o nitrogênio de diferentes formas: N_2 ,

aminoácidos, uréia, NH_4^+ e, predominantemente nas condições naturais, como NO_3^- . O nitrogênio é transportado no xilema e redistribuído no floema; tanto o transporte como a redistribuição são relativamente rápidos (MALAVOLTA, 1980).

Segundo Lopes (1989), dentro da planta, o nitrogênio é convertido a aminoácidos, que são as unidades de formação das proteínas. Esses aminoácidos são usados para a formação do protoplasma. O N é um componente necessário para a estrutura e as funções da célula, uma vez que o protoplasma é o local de divisão celular e, portanto, de crescimento das plantas. Assim sendo, o nitrogênio é necessário para todas as reações enzimáticas nos vegetais. Segundo Moraes et al. (1976), na maioria das regiões produtoras de café no Brasil, com frequência, o nitrogênio é o fertilizante que mais influencia a produtividade. Carvalho (1975), estudando a atividade da nitrato redutase em mudas de cafeeiro sob a forma nítrica (salitre do Chile) e amoniacal (sulfato de amônio) de adubação nitrogenada, concluiu que, mesmo não havendo diferenças significativas, a forma nítrica apresentou melhor resultado, estando a atividade da nitrato redutase relacionada com a utilização do nitrogênio e desenvolvimento das mudas. Malavolta (1986) verificou que quando a adubação nitrogenada é fornecida adequadamente, e não havendo outros fatores limitantes, ocorre um crescimento rápido das plantas e a formação de folhas verdes e brilhantes. O mesmo autor comenta sobre o efeito positivo da interação N e K, quando esses nutrientes são aplicados juntos e que o auto sombreamento limita a capacidade fotossintética, diminuindo, assim, a necessidade de adubos, particularmente o nitrogênio.

As perdas de nitrogênio no solo ocorrem por erosão, lixiviação ou volatilização. A lixiviação de N se dá, na maioria dos casos (99%), na forma de nitratos, sendo que menos de 1% na forma amoniacal (NH_4^+) e somente traços na de nitrito (NO_2^-). Os solos de textura arenosa facilitam a perda de nitratos devido à maior percolação da água (COELHO, 1973).

O N é um nutriente difícil de ser armazenado no solo na quantidade total necessária a uma boa produção de café e praticamente impossível dessa estocagem ser regulada, para que libere a quantidade correta na época de alta taxa de exigência do cafeeiro em produção (MALAVOLTA, 1983). O nitrogênio, comparado aos demais nutrientes, é muito mais difícil de ser mantido no solo ao alcance das raízes, devido ao seu acentuado dinamismo no sistema solo. Devido à sua grande exigência pela cultura e seu baixo efeito residual, a adubação nitrogenada precisa ser feita em maior quantidade e constantemente, em relação aos demais nutrientes

(FURTINI NETO et al., 2001).

Em lavouras em produção, teores de N nas folhas abaixo de 23 g kg⁻¹ geralmente estão associados à presença de sintomas visuais de deficiência desse nutriente e, acima de 35 g kg⁻¹, podem ser observados sintomas de toxidez, especialmente em folhas de ramos produtivos, em lavouras (MALAVOLTA, 1993). De acordo com Malavolta e Moreira (1997), para plantas de café em produção, a faixa crítica dos teores de nitrogênio situa-se entre 2,90 e 3,20 g kg⁻¹ no terceiro ou quarto par de folhas. Já Matiello (1997) recomenda teores entre 3,00 e 3,50 g kg⁻¹ como sendo a faixa crítica; para Malavolta (1993), entre 2,70 e 3,20 g kg⁻¹; para Mills e Jones (1996), entre 2,30 e 3,00 g kg⁻¹; para Wilson (1985) 2,60 e 3,40 g kg⁻¹ e, para Reuter e Robson (1988), entre 2,50 e 3,00 g kg⁻¹.

Em trabalho sobre efeito da omissão de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) em solução nutritiva, na composição química das folhas e no crescimento do cafeeiro, Haag; Malavolta (1960) verificaram que a ausência de N foi a que mais afetou o peso seco das folhas e do caule e o número de folhas. Haag; Malavolta (1960), trabalhando com solução nutritiva, verificaram que as massas secas das folhas e do caule e pares de folhas de mudas de cafeeiros foram mais afetadas pela ausência do nitrogênio do que dos demais macronutrientes.

Viana (1967) estudou diferentes doses de adubação nitrogenada e fosfatada no substrato, com posterior irrigação com sulfato de amônio no desenvolvimento de mudas de cafeeiro. O autor concluiu que a adição de nitrogênio via irrigação, bem como as adições de superfosfato simples ao substrato, foi positiva para o crescimento das mudas. Apesar de o nitrogênio ter uma ação positiva, quando aplicado em cobertura no desenvolvimento de mudas de cafeeiro pode, por outro lado, afetar a relação raiz/parte aérea, que é uma característica de extrema importância para um bom estabelecimento das mudas no campo (FALCO, 1999). Guimarães (1994) encontrou teores de N de 16,1 g kg⁻¹ no caule e 31,4 g kg⁻¹ nas folhas, trabalhando com mudas formadas em substrato padrão, que se encontravam com 6 pares de folhas verdadeiras.

3.5.2. Nitrogênio e doenças de plantas

Quanto as funções dos nutrientes no metabolismo vegetal, a nutrição mineral apresenta envolvimento um importante, afetando a incidência de doenças nas plantas (MARSCHNER, 1995). Muitos compostos oriundos de rotas metabólicas secundárias são formados após a ocorrência da infecção, que podem conferir uma maior resistência às doenças (GRAHAM;

WEBB, 1991).

Um agente patogênico ao invadir a planta encontra uma gama de diferentes formas de nitrogênio no apoplasto e simplasto dos tecidos do hospedeiro, que vão desde nitrogênio inorgânico, como nitrato, até nitrogênio orgânico, como glutamina. Embora pouco se saiba sobre a absorção e o metabolismo de nitrogênio inorgânico e orgânico, a infecção por patógenos e a colonização podem levar a alterações nos tecidos do hospedeiro, alterações do metabolismo e nas concentrações de nitrogênio inorgânico e orgânico. Assim, dependendo das espécies de plantas, em particular o órgão da planta (por exemplo, folha ou raiz) e o tipo de patógeno, diversos tipos e concentrações de nitrogênio serão disponibilizadas para o agente patogênico (HEIL; BUENO, 2007).

O fornecimento de nitrogênio pode afetar o desenvolvimento de doenças, inclusive causadas por bactérias fitopatogênicas. Algumas dessas bactérias são estimuladas pela quantidade de N fornecida pelo hospedeiro como: *Corynebacterium*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia stewartii*, *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces scabies* e *Xanthomonas campestris*. Em geral, o N é necessário para proporcionar às plantas a estrutura de crescimento e para resistir ou recuperar de lesões causadas por doenças. As plantas que sofrem de deficiência de N têm crescimento lento e o processo acelerado de senescência. Essas plantas se tornaram mais suscetíveis a patógenos que são especializados em infectar plantas debilitadas e de crescimento mais lento. Resultados contraditórios foram relatados na interação entre repolho e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que mostraram que, independente da fonte de N utilizado, altos níveis de N reduziram significativamente o nível de colonização sistêmica do xilema pela bactéria, bem como o desenvolvimento lesões de podridão negra (SNOEIJERS et.al., 2000). Pérez - García e colaboradores (1995) verificaram que durante a infecção de tomate por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* uma isoforma de glutamina sintase (GS) é acumulada em folhas infectadas. Esta isoforma pode estar envolvida em transporte de reassimilação de nitrogênio liberado durante a degradação da proteína em tecidos infectados para tecidos saudáveis da planta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Diagnóstico por PCR

4.1.1. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF. Além das linhagens de *P. syringae* pv. *garcae*, também foram incluídas nos testes, para fim de comparação e validação, as linhagens de *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *Robbsia andropogonis*, também patogênicas ao cafeeiro que causam sintomas de manchas foliares e que são facilmente confundidas na diagnose (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de fitobactérias que causam sintomas de manchas foliares

Nº Linhagens IBSBF	Espécie	Hospedeiro	Origem	Ano isolamento
166	<i>Robbsia andropogonis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1979
199 ^T	<i>Robbsia andropogonis</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	EUA	1959
248 ^T	<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1955
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>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungria	1959
2240	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2241	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2249	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005

^T - Linhagem Tipo; ^P - Linhagem Patotipo

4.1.2 Extração de DNA

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

As linhagens cultivadas 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, homogeneizadas 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 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 g /2 min e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 200 µL de tampão TE pH 8,0. Adicionaram-se 2 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C /1h. Posteriormente, adicionaram-se 40 µL de LiCl 4M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e cerca de 400 µL. Após centrifugação de 10 min a 12.000 g, 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 ultrapura e estocado (PITCHER; SAUNDERS; OWEN,1989).

A pureza e a 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).

4.1.3 Amplificação, sequenciamento e alinhamento dos genes conservados

Os genes conservados utilizados foram: *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG*, *fusA* testados. Os genes, *dsbA* (pontes de dissulfeto), *gyrB* (subunidade beta da DNA girase), *rpoD* (subunidade delta da RNA polimerase), *recA* (recombinase), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *rpsLG* (proteína ribossomal), e *fusA* (fator de alongamento de tradução).

A seleção destes genes foi efetuada com base nos dados publicados por Frapolli e colaboradores (2007), que utilizaram esses marcadores para análise multilocus de diferentes espécies de *Pseudomonas* fluorescentes. As sequências dos respectivos *primers* estão descritas na Tabela 2 e as condições de amplificação na Tabela 3.

Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

Tabela 2. Relação dos genes amplificados por PCR, tamanho dos fragmentos de DNA esperados e sequências dos *primers* utilizados neste estudo.

Gene	Fragmento (pb)	<i>primers</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3') *
<i>dsbA</i>	399	<i>dsbAf</i>	AGC TGT TCT GGT ACG GCT GCC C
		<i>dsbAr</i>	AAG CGG TAC TTG CCG TTG ACG A
<i>gyrB</i>	586	<i>gyrBf</i>	TTC AGC TGG GAC ATC CTG GCC AA
		<i>gyrBf</i>	TCG ATC ATC TTG CCG ACR ACC A
<i>rpoD</i>	695	<i>rpoDf</i>	ACT TCC CTG GCA CGG TTG ACC A
		<i>rpoDf</i>	TCG ACA TGC CAG GGT TGA TGT C
<i>recA</i>	537	<i>recAf1</i>	TGG CTG CGG CCC TGG GTC AGA TC
		<i>recAr1</i>	ACC AGG CAG TTG GCG TTC TTG AT
<i>rpoB</i>	508	<i>rpoBf1</i>	CAG TTC ATG GAC CAG AAC AAC CCG CT
		<i>rpoBr1</i>	CCC ATC AAC GCA CGG TTG GCG TC
<i>rpsLG</i>	965	<i>rpsLGf1</i>	ATG GCA ACT ATC AAC CAG CTG GT
		<i>rpsLGr1</i>	ATT AGA AGC GGT TAG TGC GAG AA
<i>fusA</i>	774	<i>fusAf1</i>	CGA AGA GCT GAT GAA CAA GTA CCT
		<i>fusAr1</i>	AAC CTG CGG CTT GCC GAT GTT GGC

Onde R (A/G)

*Sequências dos *primers* utilizados por Frapolli; Defago; Moenne-Loccoz (2007).

Tabela 3. Pares de *primers*, regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR dos genes, *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG* e *fusA*.

Pares de <i>primers</i>	Região amplificada	pb	<i>primers</i> (μ M)	dNTPs (mM)	Taq DNA pol (U/reacção)	Programas de Amplificação
dsbAf/dsbAr	Parte do gene <i>dsbA</i>	399	0,4	0,4	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 59,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
gyrBf/gyrBr2	Parte do gene <i>gyrB</i>	586	0,4	0,4	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 59,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
rpoDf/rpoDr	Parte do gene <i>rpoD</i>	695	0,4	0,2	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 68,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
recAf1/recAr1	Parte do gene <i>recA</i>	537	0,4	0,2	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 58,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
rpoBf1/rpoBr1	Parte do gene <i>rpoB</i>	508	0,4	0,4	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 58,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
rpsLGf1/rpsLGr1	Parte do gene <i>rpsLG</i>	965	0,4	0,4	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 59,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.
fusAf1/fusAr1	Parte do gene <i>fusA</i>	774	0,4	0,4	2	94°C/2,3min; 30X (94°C/30s, 59,5°C/30s, 72°C/1min); 72°C/10min.

Os produtos correspondentes a parte dos genes *rrs*, *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG*, *fusA* das linhagens de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* foram enviados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Biológico –São Paulo para sequenciamento, utilizando o sistema ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems – HITACHI. As sequências foram editadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas com uso do programa Clustal X (THOMPSON, et al., 1997)

4.2. Efeito do nitrogênio na severidade da mancha aureolada do cafeeiro

Foram realizados dois experimentos, para avaliar o efeito de diferentes doses de sobre a severidade da mancha aureolada, causada por *P. syringae* pv. *garcae*. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, localizada no Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas-SP.

Para ambos os experimentos as mudas foram obtidas a partir da germinação das sementes em bandejas plásticas contendo substrato, com prévia desinfecção das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos e posterior lavagem com água corrente. As mudas com 3-4 pares de folhas verdadeiras foram transplantadas para solução nutritiva diluída a ¼ daquela usada para o cultivo. Após cinco dias de crescimento em solução nutritiva diluída, a solução foi substituída pelas soluções contendo as diferentes concentrações de N.

As soluções foram renovadas a cada 14 dias e o volume inicial foi mantido constante com a adição diária de água filtrada. O pH foi ajustado para próximo de 5,5 a cada 48 horas e o meio de crescimento radicular aerado constantemente com auxílio de compressores de ar.

Após a manifestação visual de deficiência de N, foi realizada análise química das folhas para determinar a concentração de N.

4.2.1. Linhagem bacterianas

Foi utilizada a linhagem bacteriana IBSBF 3024, pertencente a Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico IBSBF. Esta linhagem foi escolhida por apresentar maior virulência em estudo realizado Maciel e colaboradores (2018).

4.2.2 Cultivares

No primeiro experimento foi utilizada a cultivar suscetível Bourbon amarelo. No segundo experimento foram utilizadas as cultivares suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 e resistente: IPR 102.

4.2.3. Soluções nutritivas

Foram preparadas soluções estoque para os nutrientes utilizados na composição das diferentes soluções nutritivas (Tabela 4). As soluções nutritivas foram preparadas de acordo com a Tabela 5.

Tabela 4. Concentrações das soluções estoque para preparo das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos em condições de hidroponia.

Sais	Concentração na solução estoque, g/L
CaCl ₂	110,98
KCl	74,55
KH ₂ PO ₄	136,08
MgSO ₄	120,36
NH ₄ NO ₃	80,04
Ca(NO ₃) ₂	164,08
KNO ₃	101,10

Tabela 5. Composição das soluções nutritivas contendo diferentes quantidades de N e utilizadas nos experimentos em condições de hidroponia.

Concentração N mmol N.L ⁻¹ solução	Soluções estoque	Quantidade (mL)
0	CaCl ₂	4
	KCl	3
	KH ₂ PO ₄	0.5
	MgSO ₄	1.2
	Solução estoque Micronutrientes	20
5	NH ₄ NO ₃	0.5
	Ca(NO ₃) ₂	2
	CaCl ₂	2
	KCl	3
	KH ₂ PO ₄	0.5
	MgSO ₄	1.2
10	NH ₄ NO ₃	1
	Ca(NO ₃) ₂	4
	KCl	3
	KH ₂ PO ₄	0.5
	MgSO ₄	1.2
15	NH ₄ NO ₃	1.5
	Ca(NO ₃) ₂	4
	KNO ₃	3
	KH ₂ PO ₄	0.5
	MgSO ₄	1.2
Extra para fornecer cloro	CaCl ₂	0.5
Extra para fornecer cloro	KCl	1

4.2.4. Primeiro experimento

O primeiro experimento foi realizado apenas com a cultivar suscetível Bourbon Amarelo e submetidas a quatro concentrações de N na solução nutritiva: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, além do tratamento controle, sem adição de N na solução nutritiva.

O Experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro

repetições, sendo cada repetição representada por quatro vasos contendo quatro mudas cada.

4.2.5. Segundo experimento

O segundo experimento foi realizado em esquema fatorial 2 (cultivares) x 4 (doses de N), em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição representada por quatro mudas. As mudas foram preparadas da mesma maneira que no experimento anterior. Foram utilizadas as cultivares suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 e resistente IPR102. As mudas foram submetidas a quatro concentrações de N na solução nutritiva: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, além do tratamento controle, sem adição de N na solução nutritiva.

4.2.6. Inoculação

Em ambos os experimentos, após a manifestação visual de deficiência de N, as mudas foram inoculadas com as suspensões bacterianas preparadas em água destilada estéril, obtidas do cultivo da bactéria em meio nutriente ágar (NA), durante 48 h a 28 °C, na concentração de 10⁸ UFC/mL ($\lambda = 550$ nm; T = 55 %). As inoculações foram efetuadas por aspersão da suspensão, até o escorrimento, em folhas que haviam recebido previamente quatro picadas com alfinete entomológico esterilizado. Plantas controle também foram picadas e aspergidas com água destilada esterilizada. As plantas foram mantidas sob câmara úmida por 72 h após as inoculações. Outras 20 mudas foram arranjadas de modo semelhante, mas não foram inoculadas com a bactéria.

4.2.7. Avaliações biométricas

Ao final do experimento, foram realizadas avaliações de biometria com medições do comprimento do caule, além de quantificadas a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST). Essas variáveis foram determinadas após a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingirem massa constante, sendo pesadas em balança com de 0,01g (Horaus TS2KS).

Para avaliação do estado nutricional, as plantas foram coletadas, lavadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C para estimativa da umidade. A determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn e B nas amostras das folhas foi realizada no laboratório de Nutrição Vegetal do Instituto Agrônomo de Campinas de acordo com a metodologia

sugerida por BATAGLIA et al. (1983).

4.2.8. Avaliação da severidade da mancha aureolada

No primeiro experimento a severidade da mancha aureolada nas plantas inoculadas foi avaliada 15 dias após inoculação. A severidade foi estimada por uma escala de notas (1 a 5), por meio da porcentagem da área foliar afetada pela mancha aureolada, e pelo número médio de lesões por folha. A escala de notas foi adaptada de Moraes e colaboradores (1975), na qual 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.

No segundo experimento para avaliar a área afetada pela doença nas folhas foram fotografadas para ser avaliadas no aplicativo interativo Leaf Doctor. As fotos foram editadas usando o Adobe Photoshop para criar um fundo preto que envolvia todas as folhas individuais. O aplicativo interativo Leaf Doctor foi usado para distinguir doentes a partir de tecidos de plantas saudáveis e calcular a porcentagem da gravidade da doença (PETHYBRIDGE; NELSON, 2015).

4.2.9. Análises estatísticas

Os resultados do primeiro experimento, em delineamento inteiramente casualizado e do segundo experimento, em esquema fatorial e delineamento inteiramente casualizado foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para o segundo experimento as interações foram desdobradas, quando houve interação significativa entre os fatores. As médias de todas as variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o uso do programa SASM-Agri (ALTHAUS; CANTERI; GIGLIOTI, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenho de *primers* específicos

Após as ampliações e análises das sequências dos genes *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *rpoB*, *rpsLG*, *fusA*, verificou-se que apenas nos alinhamentos dos genes *recA*, *dsbA* e *rpoB*, haviam regiões que poderiam ser selecionadas para o desenho de *primers* específicos. Para os outros genes, não foi possível selecionar regiões específicas.

Foram desenhados cinco pares de *primers*, sendo três para *P. syringae* pv. *garcae*, a partir do gene *recA*, o *primer* Psg1F (5' CGT CGA TGC CGA ACA CGC TCT G 3'), composto por 22 nucleotídeos e, a partir do gene *dsbA*; o *primer* Psg2F (5' ACA CTT CGT CCG TAT CCC G 3'), composto por 19 nucleotídeos; e a partir do gene *rpoD*, o *primer* Psg3F (5' TGG TGC CCT AGA GCG CCT TCG TGC C 3'), composto por 25 nucleotídeos.

Paralelamente, utilizaram-se as mesmas sequências para se desenhar dois *primers* específicos para *P. syringae* pv. *tabaci*, a partir do gene *recA*, o *primer* Pst1F (5' TCG CCA GGC TAT TCC TGC CA 3'), composto por 20 nucleotídeos e a partir do gene *rpoD*, o *primer* Pst3F (5' TCA AGG CCG AAG GCA CCG AT 3'), composto por 20 nucleotídeos. Estes *primers* então foram sintetizados e testados quanto a sua especificidade e sensibilidade.

Dentre os cinco *primers* desenhados, os *primers* Psg1F, Psg2F e Pst1F não foram capazes de diferenciar as bactérias a nível de patovar.

Os outros dois foram selecionados devido a maior especificidade, ambos provenientes do alinhamento do gene *rpoD*: Psg3F (produto com aproximadamente 275 pb), específico para *P. syringae* pv. *garcae*; e Pst3F (produto com aproximadamente 585 pb), específico para *P. syringae* pv. *tabaci*. Não foi possível o desenho de *primers* específicos no sentido reverso, por isso os experimentos foram conduzidos com o *primer* *rpoD* (FRAPOLLI; DEFAGO; MOENNE-LOCCOZ, 2007).

A especificidade dos *primers* provenientes do gene *rpoB* foi avaliada por meio de experimentos de amplificação com DNAs das diferentes linhagens de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. cichorii* e *R. andropogonis*, que são bactérias associadas a sintomas de manchas foliares em cafeeiro (Figura 1). Quando utilizado o *primer* Psg3F, houve amplificação apenas para a bactéria *P. syringae* pv. *garcae* referenciada na Figura 1 como A1, com fragmento de 275pb, enquanto que para todas as outras bactérias causadoras de manchas foliares testadas,

não houve amplificação. Para o *primer* Pst3F, houve amplificação para *P. syringae* pv *tabaci*, referenciado na Figura 1, como B2, contudo sinal positivo de amplificação não específica foi observado para as duas linhagens de *P. cichorii* IBSBF 587T e 1784 (B-14 e B-15). Uma vez que os fragmentos desta amplificação apresentaram tamanhos diferentes do esperado de 585 pb, este fato foi desconsiderado no que se refere a especificidade para *P. syringae* pv *tabaci* (Figura 1).

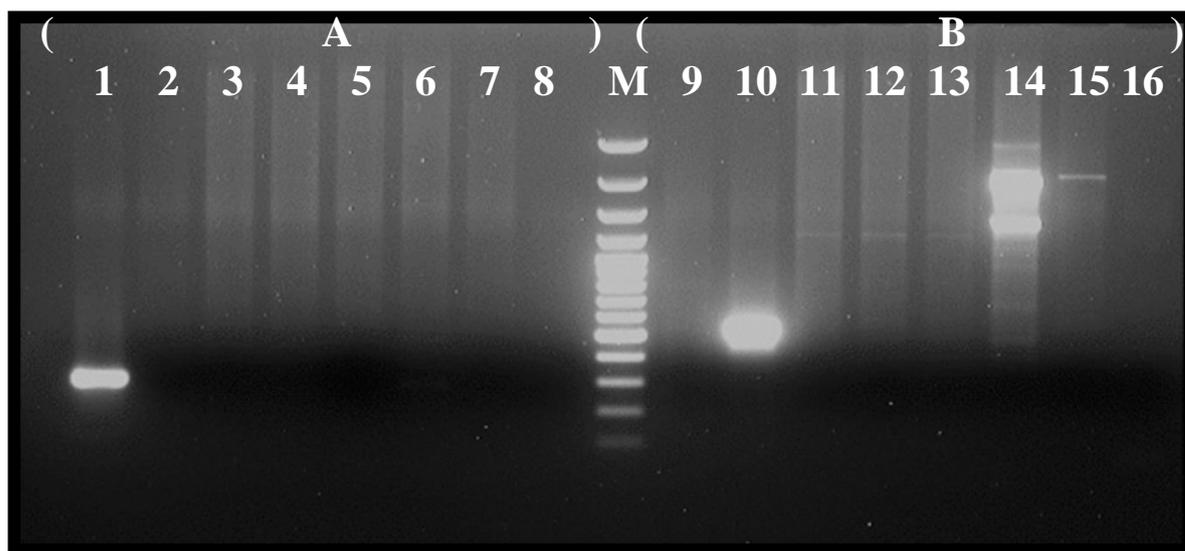


Figura 1. Teste de especificidade dos *primers* (A) Psg3F/*rpoDR*; (B) Pst3F/*rpoDR*. (1 e 9) *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T); (2 e 10) *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T); (3 e 11) *R. andropogonis* (IBSBF 165^T); (4 e 12) *R. andropogonis* (IBSBF 166^T); (5 e 13) *R. andropogonis* (IBSBF 169^T); (6 e 14) *P. cichorii* (IBSBF 587^T); (7 e 15) *P. cichorii* (IBSBF 1784^T); (8 e 16) Controle negativo sem DNA.

O nível de sensibilidade da técnica de PCR empregando-se os *primers* Psg3F e Pst3F foi avaliado em gel de agarose, e o sinal positivo de amplificação foi visualizado até a concentração equivalente a 0,001 ng para o par de *primers* Psg3F (Figura 2) e 0,01 ng para o *primer* Pst3F (Figura 3).

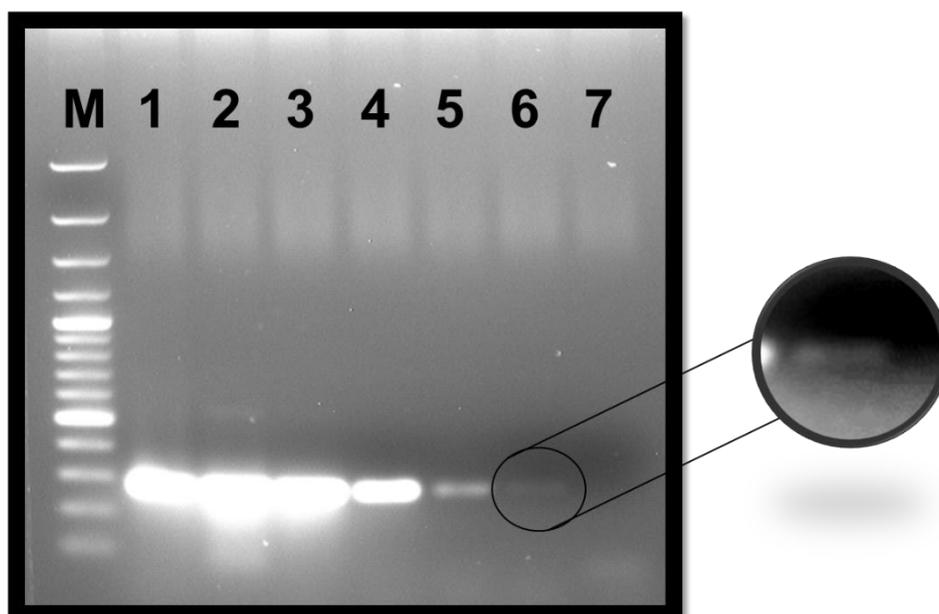


Figura 2. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Psg3F/*rpoDR* utilizando-se diferentes concentrações do DNA genômico de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T). (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 100 ng; (2) 10 ng; (3) 1 ng; (4) 0,1 ng; (5) 0,01 ng; (6) 0,001ng; (7) Controle negativo sem DNA.

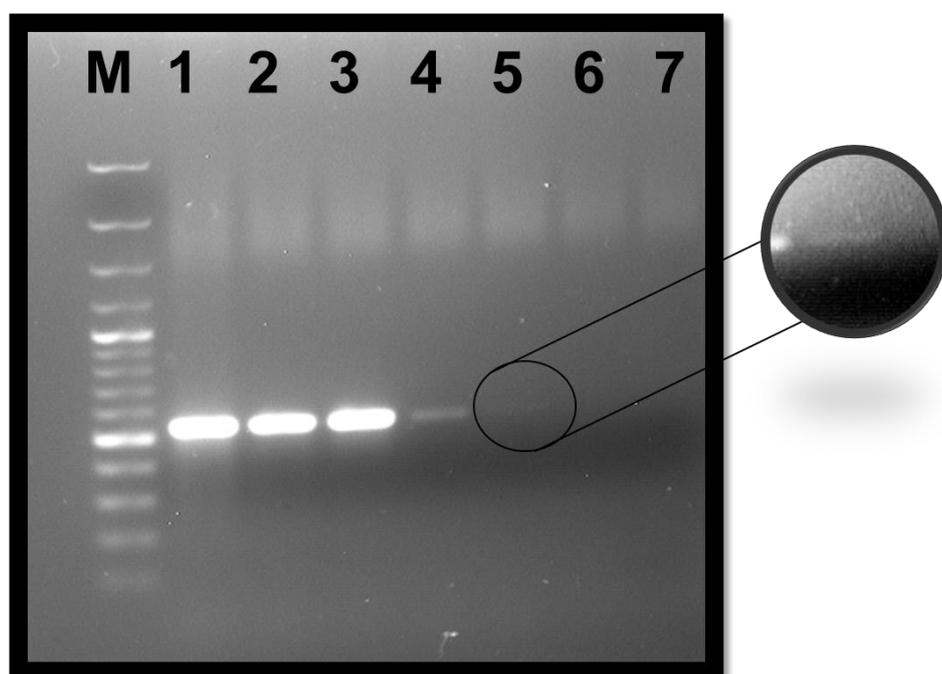


Figura 3. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Pst3F/*rpoDR* utilizando-se diferentes concentrações do DNA genômico de *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 248^T). (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 100 ng; (2) 10 ng; (3) 1 ng; (4) 0,1 ng; (5) 0,01 ng; (6) 0,001ng; (7) Controle negativo sem DNA.

Baseado nos resultados de que *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* apresentaram fragmentos específicos de tamanhos diferentes, decidiu-se testar uma nova

metodologia de PCR multiplex, podendo assim ser avaliado em apenas uma reação, a presença das duas bactérias (Figura 4). Visando acelerar ainda mais o processo de identificação, decidiu-se testar também a utilização de suspensões bacterianas dos referidos fitopatógenos obtidas a partir das placas de isolamento diretamente no tubo de PCR, ou seja, sem a etapa de extração de DNA. Nesse processo verificou-se que havia necessidade de lise das células das suspensões por meio de aquecimento a 100 °C. Após fervura alíquotas foram retiradas e utilizadas diretamente para reação de PCR.

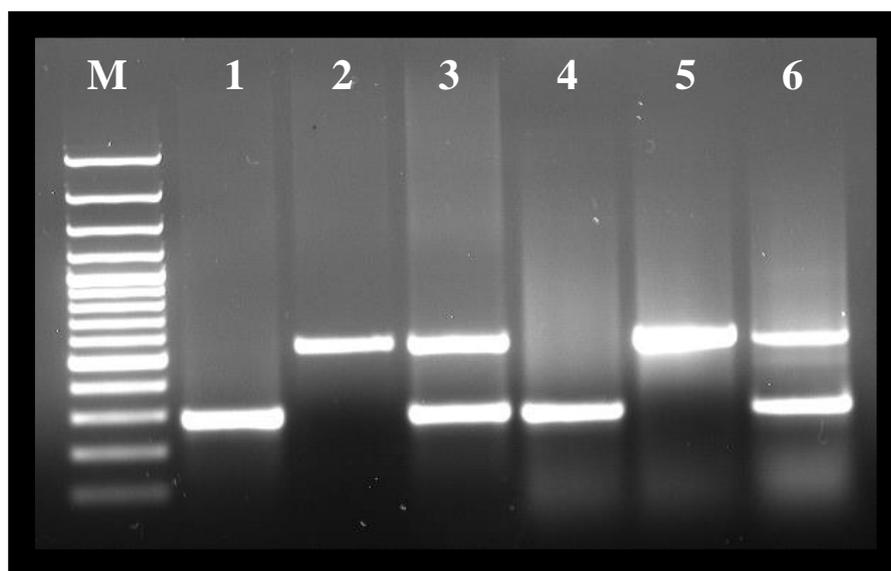


Figura 4. Produtos de amplificação obtidos com os *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*. Sendo (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); 1- DNA genômico *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 2- DNA genômico *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 3- DNA genômico de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*; 4 – Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização do *primer* Psg3F/*rpoDR*; 5- Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização do *primer* Pst3F/*rpoDR*; 6- Suspensão bacteriana fervida de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 248^T) e *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1972^T) com utilização dos dois *primers* Psg3F e Pst3F/*rpoDR*.

As tentativas de diagnose via sintomatologia na grande maioria dos casos levam a diagnose errada. O diagnóstico de doenças bacterianas causadoras de manchas foliares é realizado pela diferenciação por morfologia de colônias, fluorescência sob luz ultravioleta, aliadas aos resultados dos testes serológicos e LOPAT (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, et al., 1966; BERIAM et al., 2017). Tais técnicas demandam mais tempo quando comparadas a detecção por biologia molecular. Além disso, embora as técnicas serológicas apresentem resultados confiáveis, há atualmente dificuldades na produção de antissoros, principalmente no que diz respeito a utilização de animais para experimentação. Raramente se encontra na literatura

atual trabalhos relacionados a diagnose de fitopatógenos fazendo uso exclusivo de serologia.

O gene *rpoD* utilizado no presente estudo foi o mais indicado para a identificação de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* pv. *garcae*, possibilitando a diferenciação destas das demais bactérias que causam manchas foliares em cafeeiro. Em estudo realizado por Yamamoto e Harayama (1998), apenas as combinações deste gene com *gyrB* e a região 16S possibilitaram a classificação e a análise filogenética de isolados de *Pseudomonas putida*. Resultado semelhante foi encontrado por Mulet e colaboradores (2009) ao diferenciar espécies de *Pseudomonas* em amostras ambientais, sem necessidade de cultivo das bactérias. Adicionalmente Vojtková e colaboradores (2015) apenas conseguiram reclassificar uma estirpe descrita como *Pseudomonas putida* em *Pseudomonas monteilii* através de análise sequencial do gene *rpoD*.

Enquanto a região 16S rRNA é o marcador molecular mais utilizado para classificação de microrganismo, esta região pode apresentar problemas pelo fato de haver várias cópias no DNA bacteriano. Por outro lado, os genes codificantes de proteínas como o gene *rpoD* podem gerar uma melhor resolução, pelo fato de apresentam apenas uma cópia. Estes genes evoluem rapidamente, podendo ser mais discriminatórios para organismos muito semelhantes. (MULET et al., 2009) No presente estudo, o gene *rpoD* foi o único capaz de discriminar os patovares de *P. syringae* detectados no cafeeiro

Os *primers* desenvolvidos neste estudo mostraram-se eficazes para a identificação simultânea de *P. syringae* pv. *garcae*, e *P. syringae* pv. *tabaci*. A metodologia de PCR multiplex se mostrou muito adequada devido a precisão e rapidez no diagnóstico. Esta foi a primeira vez em que foi utilizada esta técnica para doenças bacterianas do cafeeiro, contudo a técnica de PCR multiplex já foi utilizada em outros patossistemas. Potrykus e colaboradores (2014) utilizaram PCR multiplex para diferenciação de *Dickeya* and *Pectobacterium* em tubérculos de batata. Com a técnica de PCR multiplex Özdemir (2009), conseguiu diferenciar simultaneamente três de patógenos transmitidas por sementes *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*; *P. syringae* pv. *tomato*; *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.

A utilização da técnica de PCR multiplex desenvolvida neste estudo poderá promover a identificação simultânea em amostras de cafeeiro, inclusive a partir de suspensões bacterianas eliminando a etapa de extração de DNA. Essa identificação tornou-se mais importante no Brasil a partir da detecção de *P. syringae* pv. *tabaci* como patógeno do cafeeiro (RODRIGUES NETO et al., 2006). A presença desta bacteriose em diversas regiões produtoras do país tem sido

observada, como, por exemplo, em vários municípios do Estado do Paraná. Neste mesmo estado Rodrigues e colaboradores (2017), relataram recentemente a ocorrência simultânea de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* pv. *garcae* na mesma amostra de material vegetal.

5.2. Experimentos hidroponia

5.2.1 Primeiro experimento

5.2.1.1. Avaliação nutricional das folhas

Os tratamentos com nitrogênio apresentaram maior teor desse nutriente, que variou de 34,1 a 31,6, enquanto o tratamento sem N apresentou o teor de 20,6 g.kg⁻¹ desse nutriente nas folhas, nível considerado abaixo do ideal, entre 26 e 32 g.kg⁻¹ (VAN RAIJ et al., 1997). Não houve variação quanto aos teores de P, que estavam um pouco acima do recomendado (entre 1,2 e 2,0 g.kg⁻¹) e os teores de K encontravam-se nos níveis adequados (entre 18 e 25 g.kg⁻¹) (VAN RAIJ et al., 1997). Os níveis de Ca encontravam-se dentro ou um pouco acima do recomendado, entre 10 e 15 g.kg⁻¹ e os teores de Mg dentro ou abaixo do sugerido para o cafeeiro, entre 3,0 e 5,0 g.kg⁻¹ (VAN RAIJ et al., 1997). Os teores de S encontravam-se acima ou dentro do recomendado, entre 1,5 e 2,0 g.kg⁻¹ (VAN RAIJ et al., 1997). Com relação aos micronutrientes, os níveis de Fe, entre 463 e 516,4 mg.kg⁻¹ se encontravam acima do recomendado, entre 50 e 200 mg.kg⁻¹ (VAN RAIJ et al., 1997). O mesmo ocorreu para o Cu, Zn e Mn, provavelmente por causa dos elementos utilizados na solução nutritiva (Tabela 6). No entanto não foi observado nenhum sintoma de fitotoxicidade. Pelo contrário, as plantas apresentaram crescimento adequado e acima do esperado nos tratamentos com N.

Tabela 6. Teores de macro e micronutrientes nas folhas de mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções com diferentes níveis de nitrogênio.

Concentração N (mmol L ⁻¹ solução)	N g kg ⁻¹	P g kg ⁻¹	K g kg ⁻¹	Ca g kg ⁻¹	Mg g kg ⁻¹	S g kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	B mg kg ⁻¹
0	20,6	4,0	26,4	17,0	3,1	3,1	463	397	254	58	86
5	34,1	3,0	25,7	15,8	2,6	2,6	492	356	278	49	67
10	31,1	3,0	25,4	14,1	2,1	2,1	483	388	302	49	57
15	31,6	2,7	25,0	16,3	2,3	2,3	516	4654	200	46	61

5.2.1.2. Análises Biométricas

No primeiro experimento observou-se que o número de folhas das mudas de cafeeiro aumentou com a adição de nitrogênio na solução nutritiva. Os tratamentos com 5 mmol N.L⁻¹ e 10 mmol N.L⁻¹ não diferiram entre si e o tratamento 15 mmol N.L⁻¹ solução apresentou quase três vezes mais folhas que o tratamento sem nitrogênio (Tabela 7). Também houve uma resposta positiva com relação à altura das mudas de cafeeiro, que, na maior dose de N empregada, apresentou altura de 58,12 cm, e, na menor dose, apenas 43,4 cm (Tabela 7). O mesmo ocorreu para a área foliar. As mudas cultivadas na solução com 15 mmol N.L⁻¹ de solução tiveram mais que o dobro de crescimento. Com relação à massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca total (MST) também se observou que as plantas cultivadas nas soluções com nitrogênio diferiram significativamente do tratamento sem N, mas não diferiram entre si (Tabela 7).

Tabela 7. Número de folhas, altura das plantas, área foliar, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST) em mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções com diferentes níveis de nitrogênio.

Concentração N (mmol L ⁻¹ solução)	Número de folhas	Altura	Área foliar	MFT ¹	MSPA ²	MST ³
0	22,87 c ⁴	43,50 c ⁴	482,96 b ⁴	60,46 b ⁴	6,96 b ⁴	12,67 b ⁴
5	51,75 b	51,87 b	1458,72 a	86,43 ab	15,19 a	21,16 a
10	47,17 b	52,87 b	1925,10 a	101,81 a	18,76 a	24,95 a
15	60,62 a	58,12 a	1726,87 a	98,90 a	18,19 a	24,36 a

¹MFT - Massa Fresca Total

²MSPA – Massa seca da parte aérea

³MST – Massa seca total

⁴ Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.2.1.3. Severidade da mancha aureolada

Com relação à severidade da mancha aureolada nas mudas inoculadas, observou-se que para o parâmetro notas não houve diferença entre os tratamentos. Com relação à área foliar afetada pela doença, observou-se maior severidade no tratamento sem nitrogênio. Observou-se maior número de lesões por folha no tratamento sem nitrogênio, seguido pelo tratamento com 15 mmol N.L⁻¹ de solução, que não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 8)

Tabela 8. Severidade de mancha aureolada, causada por *P. syringae* pv. *garcae*, estimada por uma escala de notas (1-5), pela porcentagem da área foliar afetada e pelo número de lesões formadas, em mudas de cafeeiro da cultivar Bourbon, cultivadas em soluções nutritivas com diferentes doses de nitrogênio e inoculadas. Primeiro experimento.

Concentração N (mmol L ⁻¹ solução)	Notas (1-5) ¹	Área foliar com mancha aureolada (%)	Número médio de lesões por folha
0	3,33 a ²	29,75 a ^{2,3}	29,50 a ²
5	2,18 a	13,12 b	5,83 c
10	1,18 a	4,75 b	3,12 c
15	2,43 a	15,16 b	14,33 b

¹ Notas estimadas com auxílio da escala de notas (Moraes et. al., 1975)

² Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

³ Dados transformados em para $\sqrt{x+k}$ com $k = 0$

5.2.2. Segundo experimento

5.2.2.1. Avaliação nutricional das folhas

Não se observou interação entre os fatores para todos os macro e micronutrientes, com exceção do Mg, para o qual houve interação entre os fatores cultivar e nitrogênio (Tabela 9). Houve efeito significativo dos tratamentos sobre os níveis de N, K, Ca, S, Fe, Mn, Zn e B (Tabela 9). Não se observou diferença entre as cultivares para nenhum nutriente (Tabela 9).

Os tratamentos com nitrogênio apresentaram aumento neste elemento de 17,25 no tratamento sem o nutriente para 35,40 g.kg⁻¹ no tratamento com 15 mmol de N.L⁻¹ solução. O nível do tratamento sem N está abaixo do adequado para a cultura, mas os demais encontram-se próximos à faixa adequada para plantas de cafeeiro em condições de campo, entre 26 e 32 g.kg⁻¹. Não foi observada diferença entre os tratamentos com relação ao P, mas os níveis encontravam-se um pouco mais altos que a faixa adequada, entre 1,2 e 2,0 g.kg⁻¹. O tratamento N0 apresentou menor teor de K que os demais tratamentos, que não diferiram entre si. Os teores de 30,13 até 33,53 dos tratamentos 5 mmol N.L⁻¹ de solução a 15 mmol N.L⁻¹ encontravam-se acima dos sugeridos como adequados, entre 18,0 e 25,0 g.kg⁻¹. O teor de Ca do tratamento 5 mmol N.L⁻¹ de solução foi superior aos demais, porém todos os tratamentos encontravam-se com teores próximos aos considerados adequados para a cultura do cafeeiro, entre 10 e 15,0 g.kg⁻¹. Os tratamentos com N também apresentaram maiores teores de S, que estavam próximos aos sugeridos como adequados para a cultura do cafeeiro, 1,5 a 2,0 g.kg⁻¹. Os tratamentos com N apresentaram menores teores de Fe, entretanto os níveis deste nutriente encontravam-se elevados

nas folhas das mudas de cafeeiro de todos os tratamentos. Observou-se aumento nos teores de Mn e redução nos teores de Zn e B nos tratamentos com N (Tabela 10). Esses micronutrientes encontravam-se em níveis acima do sugerido na recomendação para a cultura, porém não se observou toxicidade nas plantas e o crescimento das mudas de cafeeiro foi bastante significativo nas soluções com nitrogênio. Não se observou diferença significativa entre as cultivares para a maior parte dos nutrientes, com exceção do Mn, que foi detectado em maior quantidade na cultivar IPR 102 (Tabela 10) (VAN RAIJ et al., 1997). No presente estado houve aumento nos teores foliares de Mn nos tratamentos com N (Tabela 10). Este aumento dos teores de Mn também pode estar relacionado à redução na severidade da doença nos tratamentos com N. Especialmente porque o Mn atua como ativador de diversas enzimas, sem ser componente da sua estrutura (HUBER; THOMPSON, 2007). Dessa forma pode ser ativado enzimas envolvidas nos mecanismos de resistência dos cafeeiros ao ataque por *P. syringae* pv. *garcae*. De maneira geral, ocorre redução na severidade das doenças causadas por bactérias em resposta ao aumento na disponibilidade no Mn nos tecidos foliares (HUBER; THOMPSON, 2007). Neste estudo as mudas da cultivar resistente apresentaram maior teor de Mn, que também pode estar relacionado à sua resistência a doença.

Com relação ao Mg, observou-se interação entre os tratamentos e este nutriente foi detectado em maior quantidade na cultivar IPR 102, nos tratamentos sem N e com 5 mmol N.L⁻¹ de solução (Tabela 11). O Mg é um componente das estruturas dos tecidos das plantas e participa de funções fisiológicas e processos bioquímicos. O excesso de Mg foi associado a aumento da severidade de algumas bacterioses em pimenta e tomate. Entretanto em estudo em condições de campo o aumento de N resultou em redução nos níveis de Mg, assim como observado neste experimento, e houve aumento na severidade de mancha causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e a redução na disponibilidade de Mg no solo resultou em aumento da predisposição de plântulas de cereja ao ataque por *P. syringae* pv. *syringae* (JONES; HUBER, 2007)

Tabela 9. Valores de probabilidade de F da análise estatística dos teores de macro e micronutrientes detectados nas folhas das mudas de cafeeiro das cultivares IPR 102 e Catuaí Vermelho IAC 144, cultivadas em soluções nutritivas contendo diferentes teores de nitrogênio.

	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
Cultivar	0,263	0,691	0,157	0,206	0,002	0,913	0,709	0,000	0,132	0,522	0,520
Dose de N	0,000	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,546	0,000	0,000
Cultivar x Dose de N	0,593	0,197	0,086	0,190	0,020	0,265	0,799	0,307	0,113	0,541	0,059

Tabela 10. Teores de macro e micronutrientes nas folhas de mudas de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144 e IPR-102, cultivadas em soluções sem e com diferentes doses de nitrogênio. Segundo experimento.

N (mmol.L ⁻¹ solução)	N g kg ⁻¹	P g kg ⁻¹	K g kg ⁻¹	Ca g kg ⁻¹	S g kg ⁻¹	Fe g kg ⁻¹	Mn g kg ⁻¹	Cu g kg ⁻¹	Zn g kg ⁻¹	B g kg ⁻¹
N0	17,25 b	3,88 a	22,58 b	15,16 b	1,31 b	700,20 a	179,78 c	5,07 a	21,29 a	92,95 a
5	32,33 a	4,41 a	33,53 a	18,43 a	2,10 a	592,81ab	328,14 a	5,28 a	17,18 b	73,88 b
10	34,04 a	4,18 a	31,55 a	13,36 b	2,16 a	601,19 ab	228,26 bc	3,78 a	15,23 b	60,85 c
15	35,40 a	3,93 a	30,13 a	14,50 b	2,36 a	549,53 b	295,40 ab	4,61a	15,51 b	59,34 c
IPR 102	29,21 a	4,06 a	28,40 a	14,95 a	1,99a	616,93 a	311,60 a	4,14 a	17,01a	70,82 a
Catuaí	30,30 a	4,14 a	30,49 a	15,77 a	1,98 a	604,94 a	204,20 b	5,23 a	17,59 a	72,68 a

¹ Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11. Teores de magnésio presentes nas folhas das cultivares IPR 102 e Catuaí Vermelho IAC 144, cultivadas em soluções nutritivas contendo diferentes níveis de nitrogênio. Segundo experimento.

N (mmol.L ⁻¹ solução)	Cultivares			
	IPR 102		Catuaí Vermelho IAC 144	
Mg (g kg ⁻¹)				
0	4,16	A ab ¹	3,60	B a
5	4,36	A a	3,36	B a
10	3,50	A bc	3,16	A a
15	3,23	A c	3,03	A a

¹ Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas na horizontal.

² Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.2.2. Avaliação biométrica

Não foi observada interação para os fatores cultivar e nutrição com nitrogênio para nenhuma das variáveis biométricas avaliadas (Tabela 12). Também não se observou efeito de cultivar, mas houve efeito significativo da nutrição com nitrogênio sobre o número de folhas, o comprimento da parte aérea e a massa seca da parte aérea (MSPA) e total (MST) (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de probabilidade de F das variáveis número de folhas, comprimento do sistema radicular e da parte aérea, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST), em mudas de cafeeiro cultivadas em soluções contendo diferentes concentrações de nitrogênio.

Tratamentos	Número folhas	Comprimento (cm)		MSPA ¹	MST ²
		Caule	Sistema radicular		
Cultivares	0.30758	0.18035	0.96222	0.59817	0.51449
N	0.00001	0.00001	0.50022	0.00001	0.00001
Cultivares x N	0.51202	0.60572	0.57885	0.51323	0.50009
CV	41.678	11.243	27.869	47.678	45.693

¹MSPA – Massa seca da parte aérea

²MST – Massa seca total

Assim como observado no primeiro experimento, as mudas de cafeeiro apresentaram maior número de folhas nos tratamentos com nitrogênio, e não diferiram entre as doses de nitrogênio testadas. O mesmo ocorreu para o crescimento do caule, que foi maior nas mudas cultivadas nas soluções 15 mmol L⁻¹ de N e 10 mmol L⁻¹ de N. Não houve diferença entre os tratamentos com relação ao comprimento das raízes. Com relação à massa seca da parte aérea e à massa seca total, todos os tratamentos com N diferiram do controle sem N, porém não diferiram entre si (Tabela 13).

Tabela 13. Número de folhas, comprimento do caule e das raízes, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST). Segundo experimento

Tratamentos N (mmol.L ⁻¹ solução)	Número de folhas	Comprimento (cm)		MSPA ¹	MST ²
		Caule	Raiz		
0	13,35 b ³	28,04 c ³	33,14 a ³	2,60 b ³	3,87 b ³
5	26,29 a	36,56 b	34,70 a	6,76 a	8,32 a
10	33,58 a	39,75 ab	34,22 a	8,51 a	10,19 a
15	32,66 a	37,87 a	30,90 a	8,43 a	9,78 a
IPR 102	27,60 a	36,10 a	33,20 a	6,85 a	8,31 a
Catuaí Vermelho IAC 144	25,29 a	35,01 a	33,29 a	6,30 a	7,77 a

¹ MSPA – Massa seca da parte aérea

² MST – Massa seca total

³ Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No segundo experimento o teor de nitrogênio nas mudas cultivadas em solução sem nitrogênio, 17,25 g.kg⁻¹, ficou abaixo do sugerido para a cultura do cafeeiro, entre 18,0 e 25,0 g.kg⁻¹ (VAN RAIJ et al., 1997). Por outro lado, observou-se aumento no teor de N nas mudas adubadas com esse nutriente. Nas soluções com N as mudas apresentaram entre 30,5 e 35,4 g.kg⁻¹ de N nas folhas, acima do sugerido por Van R e colaboradores (1997), mas não apresentaram sintomas de fitotoxicidade. Pelo contrário, neste estudo se observou mais que o dobro de crescimento, especialmente da parte aérea das mudas de cafeeiro cultivadas nas soluções contendo diferentes doses de nitrogênio, em ambos os experimentos. Em condições de campo a resposta à adubação nitrogenada em cafeeiros também pode ser muito grande. Plantas adubadas com 300 kg de N/ha produziram 350% a mais que as plantas sem adubação com esse nutriente (MALAVOLTA et al., 1983). No estudo conduzido em condições de campo por Reis e colaboradores (2006) foi observada uma resposta positiva à adubação com nitrogênio no crescimento de plantas de cafeeiro. As plantas apresentaram aumento de produção até a dose de 250 kg de N/ha, que equivalia a 35 g.kg⁻¹ de teor de N nas folhas. Assim como observado neste estudo, Pozza e colaboradores (2001) verificaram que mudas de cafeeiro em solução nutritiva com nitrogênio apresentaram o dobro de crescimento das cultivadas sem esse nutriente e resultado semelhante foi observado em mudas de cafeeiro por Lima (2010). Recentemente, Perez e colaboradores (2017) obtiveram aumento de mais de 100% de matéria seca em mudas cultivadas com 23 mmol L⁻¹ de N, quando comparadas as cultivadas em 7 mmol L⁻¹ de N.

Não houve interação entre nutrição e cultivares de cafeeiro com relação ao teor de

nutrientes nas folhas e à resposta no crescimento das plantas de cafeeiro. Ambas as cultivares cresceram o dobro quando receberam nitrogênio na solução nutritiva. Vilela e colaboradores (2017) também não observaram interação entre adubação nitrogenada e o crescimento inicial de plantas de quatro genótipos de cafeeiro de porte baixo.

Este resultado de maior crescimento de mudas em soluções com N é esperado, pois o nitrogênio é o quarto nutriente mais abundante em plantas cultivadas, e essencial para a produção de aminoácidos, proteínas, enzimas, hormônios, fitoalexinas e compostos fenólicos. Uma vez que o nitrogênio é incorporado em glutamato ou glutamina, enzimas catalisam a formação de novos aminoácidos. O nitrogênio participa do ciclo de Calvin (formação do Carbono), da glicólise e do ciclo de Krebs. Praticamente 80% do nitrogênio presente nas plantas é usado na formação das proteínas que compõe as enzimas catalíticas ou catabólicas. O restante é distribuído em ácidos nucleicos e em aminoácidos solúveis. O nitrogênio também participa da formação de adenosina trifosfato (ATP) e dos processos que liberam energia para todas as atividades celulares. O nitrogênio também é essencial para o aparato fotossintético, sendo componente do anel tetrapirólico, comum a todas as moléculas de clorofila (HUBER; THOMPSON, 2007; MARSCHNER, 1995).

5.2.2.3. Severidade da mancha aureolada

A cultivar IPR 102, manteve-se resistente a mancha aureolada em todas as doses de nitrogênio testadas.

Na cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 observou-se redução da doença em todos os tratamentos com nitrogênio, assim como observado no experimento anterior. Na dose de 15 mmol L⁻¹ de N com relação à severidade da mancha aureolada (Figura 5).

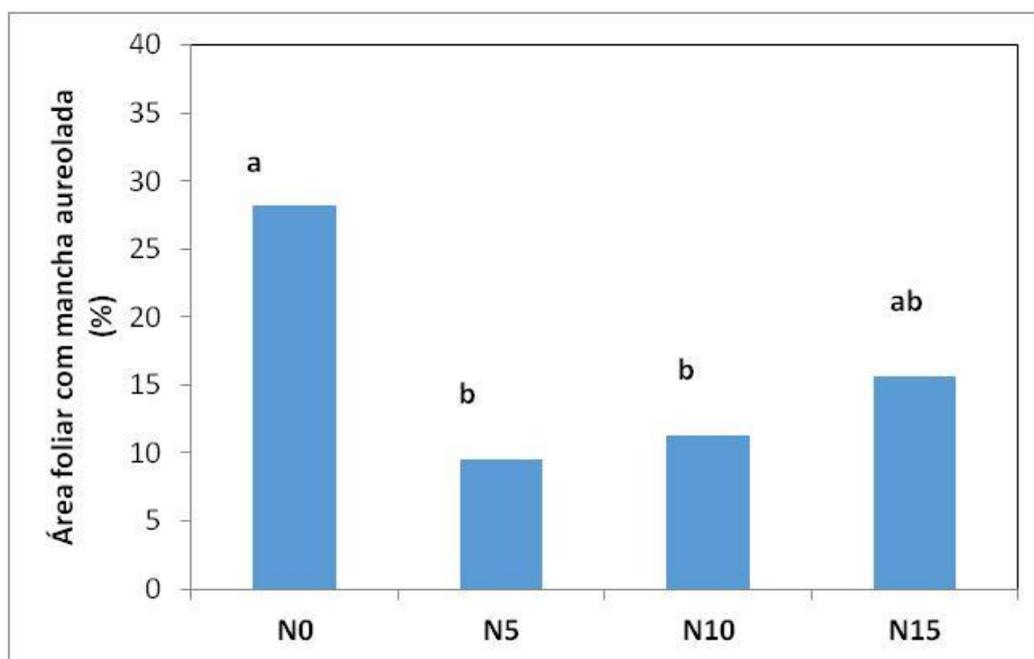


Figura 5 Severidade de mancha aureolada, estimada pela área foliar afetada pela doença, com auxílio do programa Leaf Doctor (PETHYBRIDGE et al., 2016) Médias comparadas por pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No primeiro experimento observou-se uma redução na área foliar afetada pela mancha aureolada, nos tratamentos com nitrogênio. Para a variável número de lesões por folha, a severidade da mancha aureolada foi reduzida nas doses de 5 e 10 mmol de N.L⁻¹ na solução, mas aumentou na dose de 15 mmol de N.L⁻¹ solução. O mesmo ocorreu para a área afetada pela doença no segundo experimento. Com resultados semelhantes, Perez e colaboradores (2017) observaram redução na severidade da mancha aureolada em mudas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 quando foram aplicadas as doses de nitrogênio de 11 e 15 mmolL⁻¹ de N, mas aumento nas doses de 19 e 23 mmolL⁻¹ do nutriente em solução nutritiva.

Com base no presente estudo e no estudo conduzido por Perez e colaboradores (2017) pode-se inferir que em condições de deficiência de N as mudas de cafeeiro se tornam mais suscetíveis à mancha aureolada. Entretanto nas doses acima de 19 e 23 mmolL⁻¹ do nutriente no estudo de Perez e colaboradores (2017) e na dose de 15 mmolL⁻¹ de N do presente estudo a doença parece ter sido favorecida pelo excesso de N. De maneira geral se considera que o nitrogênio tende a aumentar as doenças de plantas, mas as observações do efeito de N sobre as doenças de plantas ocorrem após adubações com esse nutriente em condições de campo, em que não há quase deficiência desse nutriente. Outros fatores também, como a quantidade aplicada (a presença de deficiência, quantidade suficiente ou excesso), estágio de desenvolvimento da planta

em que o N foi aplicado ou do patógeno, forma de nitrogênio, (NH_4^+ ou NO_3), condições do solo e/ou interação com outros elementos podem estar envolvidos com o favorecimento ou não de doenças em plantas (HUBER; THOMPSON, 2007).

Em diversos experimentos em que se observou aumento da doença após aplicação de nitrogênio foram comparadas plantas adubadas adequadamente com plantas que receberam doses elevadas de nitrogênio. No presente estudo a bactéria *P. syringae* pv. *garcae* foi inoculada em mudas de cafeeiro induzidas a deficiência de nitrogênio com mudas que receberam o nutriente em doses adequadas e elevadas. Nas mudas deficientes em nitrogênio observou-se maior severidade da doença em ambos os experimentos. Resultado semelhante foi observado em outros patossistemas. Segundo Hofland, e colaboradores (2000) a nutrição das plantas pode afetar a suscetibilidade a doenças pelo fornecimento de nutrientes para os patógenos e pela presença de metabólitos secundários que promovem a resistência dos tecidos do hospedeiro. O resultado do balanço entre esses fatores pode favorecer ou não cada tipo de patógeno.

Por exemplo, a severidade de doenças provocadas por *Pyrenophora tritici-repentis*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria nodorum* em trigo e *Gaeumannomyces graminis*, em cereais foi reduzida com o aumento do nitrogênio em quantidade suficiente para suprir as necessidades das culturas (HUBER; THOMPSON, 2007). Em condições de deficiência de nitrogênio observou-se aumento de podridão do colmo em milho, causada por *Gibberella zeae*. As plantas de milho com deficiência em nitrogênio utilizaram as enzimas rubisco, carboxilase ácido fosfoenolpiruvico e proteínas estruturais como fonte de nitrogênio. Esse fenômeno reduziu a fotossíntese, e removeu as barreiras estruturais à maceração pelos patógenos, pois os componentes celulares foram usados para a formação dos grãos, reduzindo a resistência de plantas de milho à podridão do colmo (HUBER; THOMPSON, 2007).

Os efeitos do N sobre a severidade de doenças também dependem dos patógenos. Tomateiros apresentaram maior severidade de míldio pulverulento, causado por *Oidium lycopersicum* e mancha bacteriana, causada por *P. syringae* pv. *tomato*, quando submetidos a aumentos na concentração de N, mas foram mais suscetíveis a *Botrytis cinerea* em condições de deficiência de N (WALTERS; BINGHAM, 2007). MacGhire e colaboradores (1991) observaram menor queda de folhas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiros supridos com elevadas doses de N. Nas plantas ornamentais *Brassaia actinophylla* e *Schefflera arboricola* a adubação nitrogenada promoveu a redução na severidade de *Xanthomonas heteraderae* (CHASE; POOLE, 1987). Resultado semelhante foi observado em

outra ornamental folhosa, *Syngonium podophyllum* (WALTERS; BINGHAM, 2007). A deficiência em N reduziu a capacidade de plantas de *Arabidopsis thaliana* de resistirem à infecção por diversos patógenos (WALTERS; BINGHAM, 2007). Em plântulas de banana cultivadas em solução nutritiva, o aumento nos teores de N nas soluções promoveu redução na severidade da murcha provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (ATIM et al., 2013).

A redução na severidade da mancha aureolada nas plantas que receberam as doses de 5 e 10 mmol.L⁻¹ de N, observada neste estudo, pode estar relacionada ao importante papel que esse nutriente tem nos processos fisiológicos de resistência a doenças das plantas. O nitrogênio participa da formação da celulose na parede celular (HUBER; THOMPSON, 2007). Segundo Lima (2010), a contribuição da adubação nitrogenada na resistência ou na suscetibilidade das plantas às doenças varia, entre outros fatores, em função do patógeno, genótipo, dose e fonte do nutriente utilizado e da interação entre nutrientes. Doses adequadas de N contribuem para a síntese de lignina, fitoalexinas e taninos, mas, em excesso, o N reduz a produção desses compostos, devido à demanda de carbono na fotossíntese via ciclo de Krebs, comprometendo a síntese dos metabólitos secundários pela via do ácido chiquímico e contribui para a liberação de polissacarídeos na superfície foliar (HUBER; THOMPSON, 2007). As paredes celulares de plantas adequadamente nutridas com nitrogênio podem dificultar a penetração de patógenos como *P. syringae* pv. *garcae*. Entre os fatores que podem favorecer a resistência a doenças bacterianas após adubações nitrogenadas encontram-se a relação entre carbono e nitrogênio e a presença de compostos fenólicos nos tecidos do caule. No estudo realizado por Cao e colaboradores (2005) plantas de pêssigo adubadas com N apresentaram menor número de lesões provocadas por *P. syringae* pv. *syringae*. Essas plantas apresentaram menor relação C/N e menores teores de compostos fenólicos nos tecidos. Também foi observado um efeito sobre o patógeno. Nas plantas adubadas com N o patógeno apresentou menor expressão do gene *syrB*, associado à formação das proteínas *SyrB1* e *SyrB2*, envolvidas na síntese da siringomicina, uma toxina relacionada à patogenicidade de *P. syringae* pv. *syringae*. Outras enzimas relacionadas à resistência a doenças, como quitinase, quitosanase e peroxidase foram detectadas em maior quantidade por até sete dias após a indução de resistência com N em plantas de *Arabidopsis* que receberam adubação nitrogenada (DIETRICH et al., 2004).

Nas doses mais elevadas do presente estudo e no de Perez e colaboradores (2017) o N promoveu aumento na severidade da mancha aureolada. Assim, o maior número de folhas afetadas pela doença em soluções com doses mais elevadas de N, pode estar relacionado à menor

lignificação dos tecidos, favorecendo a infecção por *P. syringae* pv. *garcae*. Neste estudo todos os tratamentos que receberam N tiveram um número muito maior de folhas. As plantas do segundo experimento, que foram submetidas a soluções com 15 mmol L⁻¹ de N apresentaram teor de nitrogênio nas folhas de 35,40 g kg⁻¹. Segundo Malavolta (1993), em lavouras em produção, teores de N acima de 35 g kg⁻¹, podem apresentar sintomas de toxidez e esse fato poderia interferir na suscetibilidade da planta à mancha aureolada. Resultados semelhantes foram observados em outros patossistemas. No estudo conduzido por Jones e colaboradores (1985) foi observado aumento na severidade de *Pseudomonas cichorii* em mudas de crisântemo que receberam doses crescentes de nitrogênio. A maior severidade de doenças em plantas com excesso de N pode estar relacionada à maior quantidade de tecidos jovens (WALTERS; BINGHAM, 2007), mais suscetíveis, especialmente porque as plantas que receberam as maiores doses de nitrogênio tinham de duas até quatro vezes mais folhas que as deficientes neste nutriente. O excesso de N pode provocar um desbalanço na fisiologia da planta que prejudica a formação de respostas de defesa, aumento na quantidade de aminoácidos livres que se tornam fonte de nutriente para o patógeno tanto nas raízes quanto nas folhas (HUBER; THOMPSON, 2007). Altos teores de N promovem aumento na produção de tecidos jovens e suculentos, por serem constituintes de ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas, entre outros. Além disso, aumentou a concentração de aminoácidos e amidas no apoplasto e na superfície foliar, favorecendo a germinação e a infecção, principalmente de fungos (MARSCHNER, 1995).

Os resultados do presente estudo e de Perez e colaboradores (2017) mostraram que o nitrogênio pode aumentar ou reduzir a severidade da mancha aureolada em mudas de cafeeiro. Em condições de deficiência desse nutriente as mudas se tornam mais suscetíveis ao ataque por *P. syringae* pv. *garcae*. O suprimento adequado desse nutriente para as mudas promoveu a redução na severidade da doença, indicando que adubações balanceadas com esse nutriente podem favorecer o manejo da doença.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidos dois *primers* a partir do gene *rpoD*, específicos para a detecção de *P. syringae* pv. *garcae*, o *primer* Psg3F e para *P. syringae* pv. *tabaci* o *primer* Pst3F

A partir dos dois *primers*, foi desenvolvido metodologia de PCR multiplex, para diagnóstico simultâneo de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci*.

Foi obtida a amplificação dos dois fragmentos também com suspensão das colônias bacterianas fervidas, eliminando a etapa de extração de DNA.

Houve crescimento significativo das plantas em resposta a adição de nitrogênio na solução nutritiva, com aumento do número de folhas, do tamanho das plantas e da massa seca da parte aérea nas cultivares Bourbon, Catuaí Vermelho IAC 144 e IPR 102.

As cultivares suscetíveis, Bourbon e Catuaí Vermelho IAC 144 apresentaram maior severidade da mancha aureolada no tratamento sem nitrogênio, redução nos tratamentos com 5 e 10 mmol de N.L⁻¹ e aumento da severidade no tratamento com 15 mmol de N.L⁻¹.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINEDEN, O. et al. Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. **International Journal of Food Microbiology**. Roma. v.65, p. 44-50, 2017.

ALMEIDA, I. M. G; RODRIGUES, L.; PATRÍCIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em café no estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 38, (Suplemento) 2012.

ALMEIDA, I.M.G. et al. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa v. 34, 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.D., TEIXEIRA, C., PINHEIRO, E. A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151. 1956.

ARAGON, I. M. et al. Diguanylate cyclase *DgcP* is involved in plant and human *Pseudomonas* spp. Infections. **Environmental Microbiology**. London, v. 17, n. 11, p. 4332-4351, 2015

ARJOMANDZADEGAN, M. Rapid detection of mutations in codon 43 of *rpsL* gene by RFLP method with BsaI and MboII restriction enzymes associated with resistance to Streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Iranian South Medical Journal**, Bushehr v.18, n. 6, p. 1115-1123, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Indicadores da indústria de café no Brasil. 2015. Disponível em : <http://www.abic.com.br/publico/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1389>. Acesso em: 25 set. 2015.

ATIM, M. et al. High potassium, calcium, and nitrogen application reduce susceptibility to banana *Xanthomonas* wilt caused by *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, p.123-130, 2013.

BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars coronafaciens, coronafaciens and garcae are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.

BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R. & GALLO, J.R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 48p. (Boletim Técnico 78)

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.

BERIAM, L. O. S. et al. Diferenciação de bactérias do gênero *Pseudomonas* patogênicas ao cafeeiro por técnicas serológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. v.84, 2017 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702016>> Acesso em 01 mai 2018.

BLISKA, M. M.; PEREIRA, S. P.; GIOMO, G. S.; **Do grão à xícara: como a escolha do consumidor afeta cafeicultores e meio-ambiente**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 60p.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. C.A.B Internacional ed. Slough 332p. 1986.

CAO, T. et al. Interaction between nitrogen-fertilized peach trees and expression of *syrB*, a gene involved in syringomycin production in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **Phytopathology**, Berlin, v. 95, p.581-586, 2005.

CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Distribuição da assimilação do nitrato e da matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v.50, p.29-37, 1991.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil**. Documentos IAC, 34, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas. 9p. 1997

CARVALHO, F. Estudo da atividade de redutase de nitrato em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivadas a meia sombra e pleno sol sob as formas nítricas e amoniacal de adubação nitrogenadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3., Curitiba, 1975. **Resumos**. Curitiba/IBC; GERCA, 1975. P.208-210.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of Coffee. In: CLIFFORF, M.N. e WILLSON, K.C. **Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage**. New York, p.13-47, 1985.

CHASE, A.R., POOLE, R.I. Effects of fertilizer rates on severity of *Xanthomonas* leaf spot of schefflera and dwarf schefflera. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 527-529, 1987.

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.

COELHO, F. S. **Nitrogênio no solo e na planta**. In: Fertilidade do solo. 2. Ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. p. 16-64.

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

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), **Boletim grãos**– Julho/2018. Disponível em < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

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

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.

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

DESTÉFANO, S.A.L. et al. Bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. **New Disease Reports**, London, v. 22, n. 5, 2010.

DIETRICH, R.; PLOB, K.; HEIL, M. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. **Plant, Cell and Environment**, Blackwell, v. 27, p. 896–906, 2004.

DURBIN, R. D. Bacterial phytotoxins: Mechanisms of action. **Experientia**, Birkhfiuser, v. 47, 1991.

EISEN, J. A. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of *recAs* and 16S rRNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, Washington, v. 41, p. 1105-1123, 1995.

EMBRAPA **Agrobiologia Sistemas de Produção**, 2 - 2ª Edição Versão Eletrônica, 2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/doencas.htm>. Acesso em 21 de jan. de 2012.

FALCO, L. **Fontes e doses de matéria orgânica na produção de mudas e na implantação de lavouras cafeeiras**. 1999. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FAO (**Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação**). (2011), FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em 23 mai 2017.

FRAPOLLI, M.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol **Environmental Microbiology**, London, v. 9, p. 1939–1955, 2007.

FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2779–2785, 2002.

FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R.; RESENDE, A. V.; GUILHERME, L. R. G.; GUEDES, G.A.A. **Fertilidade do solo**. 2001. 252f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Solos e Meio Ambiente) – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2001.

GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 66f. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia agroindustrial), Faculdade de Agronomia Eliseu Marciel – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GARCIA JUNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do

suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 p. 286-291. 2003.

GNANAMAICKAM, S. S.; STARRATT, A. N.; WARD, E. W. B. Coronatine production in vitro and in vivo and its relation to symptom development in bacterial blight of soybean. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60 p. 645-650, 1982

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

GOMES, T. S. **Diagnóstico diferencial do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* por Multiplex-PCR e PCR tempo real em amostras de fezes (TCC) 2008**, 56p. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. **Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants**. In: MORTVEDT, J.J., GIORDANO, P.M.; LINDSA, W.L. (eds), *Micronutrients and agriculture*. 2.ed. Madison: SSSA 1991. p.329- 370.

GUIMARAES, R. J. **Análise do crescimento e da quantificação de nutrientes em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica L.*), durante seus estádios de desenvolvimento em substrato padrão**. 1994. 113p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. **Semiologia do cafeeiro sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas: volume 1**. 215 p. il. Color, Lavras: Editora UFLA, 2010.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, Moscow, v. 142: p. 3-16, 1996.

HAAG, H. P.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. III. Efeito das deficiências dos macronutrientes no crescimento e na composição química do cafeeiro (*Coffea arabica L.*) var. bourbon (B. Rodr.) Choussy cultivado em solução nutritiva. **Brasilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 35, p. 273-289, 1960.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequencealignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford.v.41, p. 95-98, 1999.

HARTUNG, J., S.; DANIEL, J., F.; PRUVOST, O., P.; Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1143-1148, 1993.

HATANO, K.; NISHII, T.; KASAI, H. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Stereovorticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Kato and Arai 1957), corrig., sp. nov. nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, p. 1519-1529, 2003.

HEIL, M.; SILVA BUENO, J. C. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 5467–5472, 2007. ([doi:10.1073/pnas.0610266104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610266104))

HOFFLAND E., JEGGER M.J., VAN BEUSICHEM M.L Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. **Plant Soil**. v.218, p. 239–247, 2000.

HUANG, W. M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.30, p 79–107, 1996.

HUBER, D.M., THOMPSON, I.A. **Nitrogen and plant disease**. In: Datnoff, L.E., Elmer, W.H., Huber, D.M. (Eds.) Mineral nutrition and plant disease. The American Phytopathological Society, 2ª Edição: St. Paul, MN, p. 31-44, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/default.shtm>> Acesso em: 25 set. 2017.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO), Disponível em: <http://www.ico.org/pt/new-historical_p.asp?section=Estatistica.> Acesso em 01 jun 2018.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Statistics**. Historical Data. Disponível em: <http://www.ico.org/pt/new-historical_p.asp?section=Estatistica.> Acesso em: 27 mar 2015.

INVITTI, A. L. **Identificação e caracterização do gene *rpoC* de *Herbaspirillum seropedicae*,**

2004 66p. (monografia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ITO, D.S. et al. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p. 99-103, 2008.

IWERIEBOR, B C. et al. Genetic profiling for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ticks collected in the Eastern Cape Province of South Africa. **BMC Microbiology**, London. n 17, p.45, 2017

JANSEN, A. **Plant protection in coffee: recommendations for the common code for the coffee community initiative**. Germany: GTZ, 2005. Disponível em: <http://www.sustainable-coffee.net/download/2006/4c-pestidereport.pdf>> Acesso em 05 jun 2012.

JONES, J. B. et al. Effect of leaf wetness, fertilizer, leaf age, and light intensity before inoculation on bacterial leaf spot of chrysanthemum. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69 p. 782-784, 1985.

KADOKURA H, BECKWITH J Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. **Cell**, Maryland, v. 138, n. 6, p. 1164-1173, 2009.

KASAI, H., EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 301–308, 2000a.

KASAI, H.; TAMUR, T.; HARAYAMA, S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB* basead phylogeny and DNA relatedness. **International journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, p. 127–134, 2000b.

KHAIRNAR K, PARIJA SC, A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. **BMC Microbiology**, London, v.7, p. 47, 2007.

KIM, B.-J.et al Differentiation of *Actinomicete* genera based on partial *rpoB* gene sequences. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 13, p. 846-852, 2003.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 623 p.

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

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.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por BIO-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 127p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

KREUTZER, R. D. et al. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland. v. 51, p. 301-307, 1994.

KRISHNAN, S. et al. Current status of coffee genetic resources: implications for conservation – case study in Madagascar **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v.1101, n. 3, 2015

LA DUC, M. T. et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 56, p. 383–394, 2004.

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.

LERAT, E.; DAUBIN, V.; MORAN, N.A. From genes trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-proteobacterial. **PLOS bio**, San Francisco, v. 1, p. 19, 2003.

LIMA, L. M. D. Relação nitrogênio/potássio com mancha de *Phoma* e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 35, p. 223–228, 2010.

LOPES SANTOS, L. et al. Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia*

andropogonis and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 110, p. 727-736, 2017.

LOPES, A.S. (trad. e adap.). **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo: ANDA/POTAFOS, 1989. 153 p

LOPES, I.M.; FERNANDES, L. G. Produção de café agroecológico no Sul de Minas Gerais: Sistemas alternativos a produção intensiva em agroquímicos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, 2012.

MACIĄG A.et al. In vitro transcription profiling of the σ subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the σ S regulon and identification of σ -specific promoter sequence elements. **Nucleic Acids Research**, Zurich, . 39, n. 13, p. 5338–5355, 2011.

MACIEL, K. W. et al. Bacterial halo blight of coffee crop: aggressiveness and genetic diversity of strains. **Bragantia**, Campinas, vol.77, no.1, p.96-106, 2018. ISSN 0006-8705

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

MAIDAK, B.L. A new version of the RDP. **Nucleic Acids Research**, Zurich, v. 27 p.171-173,1999.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, São Paulo, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro: colheitas econômicas máximas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 210 p.

MALAVOLTA, E. **Nutrição, adubação e calagem para o cafeeiro**. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, 1986. p. 136-274.

MALAVOLTA, E. **Reação do solo e crescimento das plantas**, In: *Seminário sobre corretivos agrícolas*. Campinas, SP, Fundação Cargill, 1983. Cap. I, p. 3-64.

MALAVOLTA, E.; MOREIRA, A. *Nutrição e adubação do cafeeiro adensado*. Piracicaba:

Informações Agronômicas, n. 80, p. 1-7, 1997. (Encarte técnico).

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

MARSCHNER H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2ª. Ed. London. Academic Press. 1995

MATIELLO, J. B. **Gosto do meu cafezal**. Rio de Janeiro: Globo Rural, 1997. 139 p,

MC GUIRE, R.G. et al. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization. **Phytopathology**, Berlim, v. 61, p. 656-660, 1991.

MENDES, A. N. G. et al História das Primeiras Cultivares de Café Plantadas no Brasil In: CARVALHO, C. H. S. (Ed) Cultivares de Café: origem, características e recomendações. Brasília, Embrapa Café. p. 69 – 78, 2008.

MENEGUIM, L. et al. Avaliação da eficiência de Kasugamicina no controle da mancha aureolada em mudas de cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, p.113, 2004.

MESQUITA, C. M. DE et al. **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2016. 62 p.

MILLS, H.A., AND J.B. JONES. **Plant analysis handbook II. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide**. MicroMacro Publishing, Inc. Athen, GA. 1996.

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

MOLIN, J. P. et al. Teste procedure for variable rate fertilizer on coffee. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá. v. 32, n. 4, p. 569-575, 2010.

MOORE, E.R.B. et al. 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.

MORAES, F. R. P. DE et al. Fontes e doses de nitrogênio na adubação química do cafeeiro. I.

Lotossolo roxo transição para Vermelho-amarelo horto. **Bragantia**, Campinas, v. 35, n.6, p. 63-77, 1976

MORAES, S.A. et al. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 1, n. 1, p. 105-110, 1975.

MULET M. et al. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. **Molecular and Cellular Probes**, Columbia, v. 23, p. 140–147, 2009.

MUN, H. S. et al. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, p. 401-407, 2007.

NIEMANN, S. et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3231-3234, 2000.

OH, C. et al. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. **Plant Pathology Journal**, Seoul. v.15, n.1, p.57-61, 1999.

OJEDA, S.; VERDIER, V. Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Vancouver, v. 22, p. 241-247, 2000.

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.

OLIVEIRA, J.R.; 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.

ÖZDEMİR, Z. Development of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 2. p. 495-97, 2009.

PAITAN, Y. et al. Molecular analysis of the *gyrB* gene from *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, Moscow, v.144, p. 1641-1617, 1998.

PALYS, T., NAKAMURA, L. K., COHAN, F.M. Discovery and classifications of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.47, p. 1145-1156, 1997.

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

PASSOS, V. I. H., **Taxonomic characterization of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from tomato pith necrosis in Portugal** (Dissertação mestrado) 2009 Instituto Superior de Agronomia Disponível em <<http://hdl.handle.net/10400.5/2014>> Acesso: 11 mar 2018.

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

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

PATRÍCIO, F. R. A. et al. **Mancha aureolada volta a preocupar cafeicultor**. Comunicados Técnicos, n.148, 2011. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=148> Acesso em: 03 ago. 2012.

PAYNE, G. W. et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the Entire *Burkholderia* genus. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3917-3927, 2005.

PEIXOTO, M. F. DA S. P. **Ciclo do nitrogênio. Aula 3. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, 2008. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/4671/2990>>. Acessado em: 1º de setembro de 2011.

PELCHOVICH Get al. Ribosomal mutations affecting the translation of genes that use non-optimal codons. **The FEBS Journal**, Oxford. v. 281, n. 16, p. 3701-3718, 2014

PÉREZ, C. D. P. et al. Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro

em solução nutritiva. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, p. 60-68, 2017.

PÉREZ-GARCÍA, F. et al. Germination studies in endemic plant species of the Iberian Peninsula. **Israel Journal of Plant Sciences**, Jerusalem. v. 43, p. 239-247, 1995.

PETEK, M.R. et al. Resistência à bacteriose (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) derivado do cruzamento entre 'IAPAR 59' e *Coffea arabica* Sh1 x 'CATUAÍ'. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais**. Londrina: IAPAR, 2001. p.133-134.

PETEK, M.R. et al. Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada. **Bragantia**, Campinas, v. 65, p. 65-73, 2006. DOI: 10.1590/S0006-87052006000100009

PETHYBRIDGE S. J., NELSON S. C. Leaf doctor: a new portable application for quantifying plant disease severity. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 99, p. 1310–1316, 2015.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 1140-1148, 2001.

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.

POTRYKUS, M. et al. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. **Annals of Applied Biology**, Bethesda, v. 165, p. 474 – 487, 2014.

POZZA, A.A.A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 53-60, 2001.

PRADO, R.M. **Efeito da aplicação de calcário no desenvolvimento, estado nutricional e produção de frutos de goiabeira e de caramboleira durante três anos em pomares em implantação**. Jaboticabal, 2003, 68p. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2003.

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

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

REIS, A.R. et al. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, pp. 163-171, 2006.

REIS, L. P. et al. Detection of *Campylobacter* spp. in chilled and frozen broiler carcasses comparing immunoassay, PCR and real time PCR methods. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.8 n.2, 2018.

REUTER, D.J.; ROBINSON, J.B. **Plant analysis: An interpretation manual**. Melbourne, Inkata, 1988. 218p.

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

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.

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

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

RODRIGUES, E. A.; MARQUES, A. S. A. **Caracterização molecular, serológica e nutricional de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* provenientes de fumo, feijão e soja**. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento Embrapa, Brasília, 2004. v. 52, 28p.

RODRIGUES, L. M. R. et al. First report of mixed infection by *Pseudomonas syringae* pathovars *garcae* and *tabaci* on coffee plantations. **Bragantia**. Campinas v.76 n.4 , 2017

RODRIGUES, L.M.R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Boletim Técnico IAC 212, Campinas, 24p, 2013.

SAETTLER, A. W. et al. Detection of bacteria in seed and other planting material. **The American Phytopathological Society**. Saint Paul, 125p. 1995.

SAKTHIVEL, N.; MORTENSEN, C.N.; MATHUR, S.B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 435-441, 2001.

SCHAAD, N. W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Eds.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Third Edition APS Press, St. Paul, MN. 2001.

SCHAAD, N.W. et al. Combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Berlim, v. 85, p. 243-248, 1995.

SERA, G. H.; SERA, T; FAZUOLI L. C. IPR 102 – Dwarf Arabica coffee cultivar with resistance to bacterial halo blight, **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 17 p. 403-407, 2017.

SERA, G.H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agrônômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. **Ciência Agrotecnológica**, 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.

SEVERINO, F.E. **Isolamento e caracterização de um gene que codifica uma isoflavona redutase like de café (*Coffea arabica* L.) e análise de sua região promotora**. Botucatu-SP. Universidade Estadual Paulista. 97p., 2008. (Dissertação Mestrado).

SNOEIJERS, S.S. et al. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal pathogens. **European Journal of Plant Pathology** Wageningen, v. 106, p. 493–506. 2000

SONG, W.Y. et al. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Phytopathology**, Berlim, v. 152, p. 667-676, 2004.

SOUSA, M. V.; SIQUEIRA, C. S.; MACHADO, J. C. Conventional PCR for detection of

Corynespora cassiicola in soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Viçosa. v.38, n.2, p.085-091, 2016 <<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v38n2152049>>

SOUZA, Z.M. et al. Influência da variabilidade espacial de atributos químicos de um latossolo na aplicação de insumos para cultura de cana-de-açúcar. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.371-377, 2007.

STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

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

THOMPSON, C. C. et al. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, p. 919-924, 2004.

THOMPSON, J. D. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. Zurich v. 15 n. 25 p. 4876-82, 1997.

VAN DER WOLF, J.M. et al. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. **Journal Applied Bacteriology**, London, v.80, p.487-495, 1996.

VAN RAIJ, B. et al. **Recomendações para adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2ª Ed. Campinas, Instituto Agrônomo, 1997. 285 p.

VENTURA, M. et al. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3110–3121, 2004.

VIANA, A.C.C. Ensaio de adubação nitrogenada-fosfatada para mudas de café. **Experimentação cafeeira**, Campinas. p.270-281, 1967.

VILELA, D.J.M. et al. Crescimento inicial de cultivares de cafeeiro com diferentes doses de nitrogênio, fósforo e potássio. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 552 - 561, 2017.

VOJTKOVÁ, H., et al. Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. **Folia Microbiologica**, Prague. v 60, n. 5, p.411, 2015

WALTERS, D.R., BINGHAM, I.J. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. **Annals of Applied Biology**, Bethesda, v. 151, p. 307-324, 2007.

WATT, P. M.; HICKSON, I. D. Structure and function of type II DNA topoisomerases. **Biochemical Journal**, London, v. 303 p. 681–695. 1994.

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

WILSON, K. C. **Mineral Nutrition and fertilizer needs**. In: CLIFORD, N. N>: WILSON, K. C. (ed.) Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage. Croom Helm, 1985. Part 6, p. 135-156.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.;36, n. 12 p. 1251-75, 1992.

YAMAMOTO, S., HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 48 p. 813-819, 1998.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 49, p. 87–95, 1999.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London, v. 46, p. 506–511, 1996.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 48, p. 813–819, 1998.

YAÑEZ, M. A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *GyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.53, p. 875-883, 2003.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.): **Controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus**. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 1997. p.83-180.

ZAMBOLIM, L. et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Informe Agropecuário** v. 20 p. 114-125, 1999.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E.M. **Doenças do cafeeiro**. In: KIMATI, H; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças de plantas cultivadas. 4. Ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 53, p. 1893–1900, 2003.

ZENGEL, J.M., ARCHER, R.H., LINDAHL, L. The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *fus* gene, coding for elongation factor G. **Nucleic Acids Research** .Zurich, v.12, n. 4,p. 2181–2192, 1984.

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.

ZULLO JUNIOR, J. et al. de. Potential for growing arabica coffee in the extreme South of Brazil in a warmer world. **Climatic Change**, Princeton, v.109, p. 535-548, 2011. DOI:10.1007/s10584-011-0058-0.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ