



MELINA KORRES RAIMUNDI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
ISOLADOS BACTERIANOS PATOGÊNICOS AO
CAFEEIRO**

LAVRAS - MG

2013

MELINA KORRES RAIMUNDI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS
BACTERIANOS PATOGÊNICOS AO CAFEIRO**

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

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Raimundi, Melina Korres.

Caracterização e identificação de isolados bacterianos
patogênicos ao cafeeiro / Melina Korres Raimundi. – Lavras :
UFLA, 2014.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica* - Crestamento bacteriano. 2. *Coffea arabica* -
Mancha aureolada. 3. BOX-PCR. 4. Bactérias fitopatogênicas -
Tabtoxina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.32

MELINA KORRES RAIMUNDI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS
BACTERIANOS PATOGÊNICOS AO CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 18 de dezembro de 2013.

Dra. Antonia dos Reis Figueira UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Dra. Sandra Marisa Mathioni INCT Café

Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais, Teresa e Geraldo, exemplos de garra e determinação que me deram todo o apoio e incentivo para que hoje eu concluísse este trabalho, me tornando Mestre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e dar forças neste período.

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

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

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

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

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

À professora Dr^a Sandra Marisa Mathioni, pela disponibilidade, atenção e valiosas sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Ana Maria, Flávia, Daniel, Gustavo, Jaqueline, Thiago e Luciana pela amizade, colaboração nos trabalhos e pela convivência agradável.

À minha amiga Camila, pelo auxílio, ensinamentos e amizade.

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

Ao meu namorado Petrus, por estar sempre ao meu lado, me dando forças, amor e incentivo.

À minha família maravilhosa, sempre presente.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia.

A todos os amigos e, principalmente, àqueles que, de certa forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As doenças estão entre os fatores que afetam a produtividade e o rendimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), destacando-se as causadas pelas bactérias: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. cichorii*, *Burkholderia andropogonis* e *Xylella fastidiosa*. Dentre os principais desafios encontrados por fitopatologistas está a correta diagnose dessas doenças, pois os sintomas e testes bioquímicos não têm sido suficientes para diferenciar essas bacterioses aos níveis de espécie e patovar. Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm permitido a detecção de patógenos de forma rápida e com alto nível de sensibilidade, se comparada aos métodos tradicionais. Variações dessa, como a BOX-PCR, têm sido eficazes na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e avaliação da diversidade genética de fitopatógenos. Assim, objetivou-se, neste trabalho, caracterizar, identificar, e diferenciar isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro, por meio de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares. Para isso, foram coletados isolados de plantas de café infectadas em diversos municípios de Minas Gerais, os quais foram submetidos a testes de patogenicidade, bioquímicos e moleculares. De 160 isolados obtidos, 80 foram patogênicos ao cafeeiro e submetidos a testes bioquímicos, BOX-PCR e PCR, utilizando *primers* específicos. Foi possível a identificação dos isolados de *P. cichorii* e *Pseudomonas syringae* produtores de tabtoxina. No entanto, não foi possível a identificação dos isolados de *Pseudomonas syringae*, ao nível de patovar.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Mancha aureolada. Crestamento bacteriano. BOX-PCR. Tabtoxina.

ABSTRACT

Diseases are among the factors which affect the productivity and yield of coffee (*Coffea arabica* L.), highlighting those caused by bacteria: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. cichorii*, *Burkholderia andropogonis* and *Xylella fastidiosa*. Among the main challenges faced by plant pathologists is the correct diagnosis of these diseases, since the symptoms and biochemical tests have not been sufficient to distinguish these bacterial diseases at the species and pathovar levels. Molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) have allowed the detection of pathogens quickly and with a high level of sensitivity when compared to traditional methods. Variations of PCR, such as BOX-PCR, have been effective in identifying plant pathogenic bacteria, differentiating isolates and evaluating the genetic diversity of pathogens. Thus, the objectives of this work were: characterize, identify, and differentiate coffee plant pathogenic bacterial isolates through biological, biochemical and molecular techniques. In order to do this, isolates were obtained from infected coffee plants, collected in various municipalities in Minas Gerais, Brazil. They were submitted to pathogenicity, biochemical and molecular assays. Of 160 isolates obtained, 80 were pathogenic to coffee and subjected to biochemical tests, BOX-PCR and PCR using specific primers. It was possible to identify *P. cichorii* and *Pseudomonas syringae* isolates, which produce tabtoxin. However, it was not possible to identify *Pseudomonas syringae* isolates at the pathovar level.

Keywords: *Coffea arabica*. Bacterial halo blight. Bacterial blight. BOX-PCR. Tabtoxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colônias bacterianas isoladas de folhas de cafeeiro.....	35
Figura 2	Resposta hipersensível em folhas de fumo (A), pimentão (B) e tomate (C) induzida por isolados bacterianos provenientes de folhas de cafeeiro	43
Figura 3	Sintomas produzidos em folhas de cafeeiro inoculadas com os isolados (A) UFLA136 e (B) UFLA 138.....	46
Figura 4	Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o <i>primer</i> BOX A1R	58
Figura 5	Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação de isolados bacterianos obtidos do cafeeiro, a partir do <i>primer</i> BOX 1 AR, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice, por meio do Programa Past.....	59
Figura 6	Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de <i>primers</i> PscHrc662F e PscHrc751R para detecção de <i>Pseudomonas</i> <i>cichorii</i> (Pc)	61
Figura 7	Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de <i>primers</i> tabA1 e tabA2	65
Figura 8	Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de <i>primers</i> tblA1 e tblA2	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sintomas e características de colônias dos isolados bacterianos obtidos de plantas de cafeeiro, provenientes das regiões indicadas .	36
Tabela 2	Hipersensibilidade em plantas de pimentão, tomate e fumo incitada por isolados bacterianos obtidos de cafeeiro.....	44
Tabela 3	Patogenicidade de isolados bacterianos em folhas de cafeeiro cultivar Catuaí e Mundo Novo.....	47
Tabela 4	Características bioquímicas de isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A cultura do cafeeiro	14
2.2	Bacterioses que ocorrem na cultura do cafeeiro	15
2.3	Detecção e identificação das bactérias fitopatogênicas do cafeeiro ..	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Local de realização da pesquisa	24
3.2	Origem e obtenção dos isolados	24
3.3	Teste de hipersensibilidade	25
3.4	Teste de patogenicidade	25
3.5	Cultivo e preservação dos isolados	26
3.6	Testes diagnósticos	26
3.6.1	Testes bioquímicos	26
3.6.2	Testes moleculares	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Obtenção dos isolados, sintomas e características das colônias	35
4.2	Reação de hipersensibilidade (HR)	43
4.3	Teste de patogenicidade	46
4.4	Caracterização bioquímica	48
4.5	Caracterização molecular	54
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, o que justifica a importância desta cultura para a economia nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012). Entretanto, a cafeicultura brasileira tem se deparado com grandes desafios para uma produção sustentável e obtenção de produtos de qualidade, visando atender às exigências dos mercados consumidores. Neste contexto, as doenças estão entre os principais fatores que afetam a produtividade e o rendimento da cultura e, nos últimos anos, as doenças de etiologia bacteriana, como a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), o crestamento bacteriano (*Pseudomonas cichorii*), a mancha foliar bacteriana (*P. syringae* pv. *tabaci*), a mancha escura (*Burkholderia andropogonis*) e a atrofia dos ramos do cafeeiro (*Xylella fastidiosa*) têm se destacado. A diagnose adequada dessas doenças é um dos principais desafios encontrados por fitopatologistas, uma vez que essa tem sido baseada nos sintomas e testes bioquímicos que, embora fundamentais, não têm sido suficientes para a identificação dos patógenos como espécie e patovar. Portanto, métodos mais rápidos e eficientes na identificação dessas doenças são necessários, uma vez que a detecção e a correta identificação do agente causal de uma doença é fator essencial para se evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

A técnica de amplificação enzimática do DNA, direcionada por *primers* ou reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose para a detecção de fitobactérias em plantas, sementes e mudas (DEUNER et al., 2012), de forma mais rápida, fácil e com um alto nível de sensibilidade quando comparada aos métodos tradicionais,

trazendo economia de tempo e dinheiro nos trabalhos de rotina (GONÇALVES; ROSATO, 2002).

A rep-PCR, considerada uma variação da PCR, é uma técnica que se baseia na obtenção de *fingerprintings* do genoma bacteriano através da amplificação de regiões entre sequências repetitivas conservadas dentro do genoma de diversas bactérias e tem sido utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e avaliação da diversidade genética de populações (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002; BARBOSA, 2007). A BOX-PCR, uma das técnicas incluídas na rep-PCR, mostrou-se eficiente para a delimitação de espécies (ONFROY et al., 1999), subespécie (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999) ou patovares (LOUWS et al., 1994). A utilização do primer BOX é geralmente recomendada para caracterizações detalhadas de isolados, pois gera *fingerprintings* sólidos e produz padrões de fragmentos complexos (RADEMAKER; BRUIJIN, 1997).

Objetivou-se, com este trabalho: obter isolados bacterianos de cafeeiros provenientes de diversas regiões produtoras de Minas Gerais, caracterizar, identificar e diferenciar esses isolados por meio de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea* sp.) pertence à família Rubiaceae e está entre as culturas de maior importância econômica em todo mundo. É uma das culturas mais tradicionais no Brasil, país que se destaca como o maior produtor e exportador mundial. Entre as espécies cultivadas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner são as mais importantes economicamente (ABRAHAO et al., 2010).

No Brasil, a área cultivada de café é de aproximadamente 2,3 milhões de hectares, sendo São Paulo, Bahia e Minas Gerais os principais Estados produtores (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

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

2.2 Bacterioses que ocorrem na cultura do cafeeiro

a) Mancha aureolada

A mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956) Young; Dye; Wilkie, 1978 (Psg), foi observada pela primeira vez no Brasil em 1956, em cafeeiros no município de Garça, estado de São Paulo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). 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). Tais fatores têm sido limitantes para o cultivo do café em regiões produtoras dos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais, principalmente, nas regiões Sul, Triângulo Mineiro, Alto do Parnaíba e Cerrado (SERA; ALTEIA; PETEK, 2002; SERA et al., 2004; MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2008; PATRÍCIO et al., 2010; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Mundialmente, há relatos da ocorrência da mancha aureolada no Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976), Uganda e China (CHEN, 2002).

Os sintomas ocorrem nas folhas, flores, frutos novos e ramos do cafeeiro. Manchas de coloração pardo-escuro, 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 (1990) verificaram maior severidade em folhas e brotações novas do que em folhas adultas. Em viveiros, a doença causa necrose dos tecidos jovens e queima das folhas (ZAMBOLIM et al., 2005).

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

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

A disseminação da doença ocorre através de respingos de água contendo células bacterianas, que são dispersas pelo vento e em períodos de menor precipitação, pode ocorrer também por meio de mudas infectadas assintomáticas, uma vez que, a bactéria pode sobreviver de maneira epífita na planta (ROBBS, 1978; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

Pseudomonas syringae pv. *garcae* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, apresenta células em formato de bastonete, variando de 0,5-1,0 µm de diâmetro e 1,5-5,0 µm de comprimento e movimenta-se através de um a vários flagelos polares (MOORE et al., 2006). As colônias são de coloração creme com bordos irregulares, produzem pouco pigmento fluorescente em meio de cultura King B (KING; RANEY; WARD, 1954), mas em alguns isolados nota-se uma coloração marrom ao redor do crescimento bacteriano, resultante da produção de melanina (KAIRU, 1997; BARTA; WILLIS, 2005). Pertence ao filo Proteobacteria, classe Gamma Proteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas*, grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (L= produção de levana; O= reação de oxidase; P= atividade pectinolítica em discos de batata, A= atividade de arginina

dihidrolase; T= reação de hipersensibilidade em folhas de fumo) apresenta resultados positivos para produção de Levana e Hipersensibilidade em fumo e negativos para Oxidase, Podridão em discos de batata e Arginina dihidrolase. Hidrolisa gelatina e não acumula Poli- β - hidroxí- butirato (PHB). Utiliza rarnnose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, sacarose, insitol, D-quinato e apresenta fraca reação para trealose e celobiose. Não utiliza adonitol, trigonelina, lactose, L(+) tartarato e D(-)-tartarato (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981;SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; BARTA; WILLIS, 2005).

A maioria dos isolados de Psg produz tabtoxina. Embora essa toxina não seja essencial para a patogenicidade, ela pode influenciar no grau de virulência e movimento das células bacterianas nos tecidos da planta (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

As cultivares Mundo Novo, Catuaí e Bourbon são consideradas suscetíveis a Psg (MORAES et al., 1974; MOHAN, 1976; MOHAN; CARDOSO; PAIVA, 1978; CARDOSO; SERA, 1983).

b) Crestamento bacteriano

O crestamento bacteriano foi observado pela primeira vez no Brasil por Robbs et al. (1974), com maior incidência em mudas enviveiradas, em períodos de temperaturas elevadas e chuvas frequentes e abundantes. A doença é causada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 (Pc), a qual é importante economicamente para ampla gama de plantas hospedeiras em todo o mundo (COTTYN et al., 2009). A bactéria apresenta uma fase epífita na superfície foliar do cafeeiro (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976) e, sob condições ambientais favoráveis, penetra na folha por meio de aberturas naturais (ROBBS et al., 1974). A penetração se dá também pelas lesões causadas por *Cercospora* sp. (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976; ROBBS et al., 1974), *Phoma* sp. e

“bicho mineiro” (*Leucoptera coffeella*) (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976), ou através de ferimentos causados por ventos ou chuva de pedra (GUIMARÃES; MENDES; BALIZA, 2010).

Os sintomas da doença são observados nas folhas mais velhas, as quais apresentam lesões necróticas, de formato irregular e coloração negra, normalmente com o tecido ao redor apresentando aspecto de encharcamento (GUIMARÃES; MENDES; BALIZA, 2010). Estrias concêntricas a partir dos pontos de infecção podem ser observadas ao se visualizar o material doente contra uma fonte de luz. As lesões evoluem rapidamente, podendo causar desfolha (ROBBS et al., 1974).

A irrigação por aspersão aumenta consideravelmente a incidência da doença em comparação à irrigação por gotejamento, por favorecer a disseminação e a penetração da bactéria (PAUWELYN et al., 2011). Segundo Guimarães, Mendes e Baliza (2010), irrigações frequentes favorecem a doença, principalmente em viveiros de tubetes, em que é realizada mais de uma vez ao dia.

Pseudomonas cichorii é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato de bastonete, com um tufo de flagelos polares. As colônias são de coloração creme e produtoras de pigmento fluorescente em meio King B. Nos testes LOPAT apresentam resultados positivos para oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo e negativos para a produção de Levana, Arginina dihidrolase e podridão em discos de batata. Não apresentam hidrólise de gelatina, nucleação de gelo e acúmulo de PHB. Utilizam manitol, 2-ketogluconato, meso-tartarato, D(-)-aspartato e não utilizam eritritol, adonitol, lactose, benzoato, geraniol, celobiose, sorbitol, sacarose, D(-)-tartarato, D-arabinose, L-ramnose e trealose (WILKI; DYE, 1973; RODRIGUE NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

c) Mancha escura bacteriana

Burkholderia andropogonis, (sin. *Pseudomonas andropogonis*) (Ba), causadora da mancha escura bacteriana, foi relatada em 1979 em folhas de cafeeiro cv. Catuaí amarelo (RODRIGUES NETO et al., 1981). Os sintomas são observados nas folhas por meio de manchas arredondadas, de coloração marrom escura, com centro necrótico e circundadas por halo clorótico. A bactéria é Gram-negativa, as colônias apresentam coloração creme, crescimento lento e não são fluorescentes. Nos testes LOPAT apresenta resultados negativos, confirmando não pertencer ao grupo das bactérias produtoras de pigmentos fluorescentes. Produz ácidos a partir de arabinose, frutose, galactose, manitol, manose, D-sorbitol, adonitol e lactose e não produz ácido a partir de celobiose, eritritol, maltose, sacarose e salicina. Apresenta resultado positivo para a produção de urease e acúmulo de PHB e negativo para hidrólise da gelatina (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001, ALMEIDA, et al., 2009).

d) Mancha foliar bacteriana

A mancha foliar bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Psta) foi observada em viveiros de café no estado de São Paulo por Rodrigues Neto et al. (2006) e Destéfano et al. (2010). 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. 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). O teste LOPAT confirma a classificação dessa bactéria como pertencente ao grupo das fluorescentes, devido aos resultados positivos para levana, hipersensibilidade em fumo, e resultados

negativos para a produção de oxidase, podridão em batata e arginina dihidrolase. Produzem ácido a partir de eritritol, sacarose D-sorbitol, inositol e D-manitol e não a partir de adonitol e lactose. D(-) tartarato e L-lactato não são utilizados. Utilizam L(+) tartarato, m-tartarato e trigonelina e hidrolisam gelatina, mas não acumulam PHB e apresentam resultado negativo para nucleação do gelo (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

2.3 Detecção e identificação das bactérias fitopatogênicas do cafeeiro

Muitos dos agentes causais de doenças bacterianas de plantas pertencem ao grupo *Pseudomonas syringae* (LELLIOT; BILLING; HAYWARD, 1966). São designados como espécies ou patovares, ou seja, subdivisão infraespecífica para estirpes especificamente ligadas a uma determinada planta hospedeira (MARQUES et al., 2008). Para o diagnóstico de doenças causadas por *Pseudomonas syringae*, testes bioquímicos e nutricionais são utilizados (YOUNG; TRIGGS, 1994). No entanto, muitas vezes não há correlação entre patogenicidade e características fenotípicas por meio das quais os patovares possam ser facilmente identificados. A identificação de bactérias através de descrições fenotípicas apresenta alguns limites, uma vez que nem todas as *genomospecies* podem ser distinguidas seguramente por outras técnicas que não seja a de hibridação quantitativa DNA-DNA, a qual não é adequada para as diagnoses de rotina (GARDAN et al., 1999; MARQUES et al., 2008). Várias técnicas, como os perfis de ácidos graxos (STEAD et al., 1992), perfis de proteína (VAN ZYL; STEYN, 1990) e métodos imunológicos (SAUNIER et al., 1996; WEINGART; VOLKSCH, 1997), já foram utilizadas para discriminar patovares. Porém, com o avanço da biotecnologia, as técnicas moleculares têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, no intuito de, rapidamente,

diagnosticar e caracterizar o patógeno (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido cada vez mais utilizada na rotina de laboratórios de diagnose, para a detecção de fitobactérias em plantas e sementes (DEUNER, 2007). A técnica permite uma rápida detecção de patógenos, além de apresentar alto nível de sensibilidade se comparada aos métodos tradicionais, facilitando dessa forma, os trabalhos de diagnose e identificação (GONÇALVES; ROSATO, 2002).

Uma variação desta técnica, a rep-PCR, tem sido utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999; BARBOSA, 2007; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002). A técnica baseia-se na obtenção de *fingerprintings* do genoma bacteriano através da amplificação por PCR, a partir de sequências repetitivas conservadas dentro do genoma de diversas bactérias, regiões chamadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), sequências repetitivas intergênicas, consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos BOX (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI JÚNIOR, 1991). Os *primers* comumente utilizados para análise de rep-PCR *fingerprinting* correspondem às sequências ERIC, REP e BOX e os protocolos são denominados ERIC-PCR, REP-PCR e BOX-PCR, respectivamente e, quando utilizados coletivamente, rep-PCR (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999). Esses *primers* são designados para amplificar a região entre dois elementos repetitivos adjacentes, entretanto, pode ocorrer o anelamento do *primer* a outras sequências de DNA homólogas (GILLINGS; HOLLEY, 1997).

Os *fingerprints* genômicos, gerados através da rep-PCR, permitem a diferenciação de isolados bacterianos em espécie, subespécie e estirpe. Assim, a técnica pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico (RADEMAKER; BRUIJIN, 1997).

A BOX-PCR foi eficiente para a delimitação de espécies (ONFROY et al., 1999), subespécies (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999) ou patovares (LOUWS et al., 1994). Essa, independente de outras técnicas de rep-PCR revela a possibilidade de evidenciar *genomoespécies* de *Pseudomonas syringae* (MARQUES et al., 2008).

Na diferenciação de patovares de *P. syringae* por métodos moleculares, além de rep-PCR (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999; BARBOSA, 2007; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002; LELIS, 2009), são utilizados *primers* específicos descritos para alguns patovares (ROMMEL; VALDEBENITO-SANHUEZA; DUARTE, 2010; LYDON; PATTERSON, 2001; CUPPELS; LOUWS; AINSWORTH, 2006).

Barta e Willis (2005) verificaram através de análises utilizando DNA “*fingerprint*” e “*southern blot*” que *P. syringae* pvs *coronafaciens*, *striafaciens* e *garcae* são molecularmente muito semelhantes. Esses autores verificaram também que Psg e *P. syringae* pv. *coronafaciens* além de produzirem tabtoxina, compartilham várias outras características fisiológicas e moleculares tais como “DNA *fingerprints*” e os padrões de bandas na região de biossíntese de tabtoxina parece ser conservado. Palacio-Bielsa, Cambra e Lopez (2009) registraram um total de 246 artigos descrevendo *primers* para bactérias fitopatogênicas. Desses, 30 descreveram *primers* para 19 membros do complexo *P. syringae*, porém, *primers* específicos para *P. syringae* pv. *garcae* ainda não foram descritos na literatura. Lydon e Patterson (2001) desenvolveram um protocolo baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), que utiliza *primers* derivados de sequências codificantes de genes *tblA* e *tabA* para a detecção rápida e confiável de bactérias produtoras de tabtoxina. Os autores relataram que, alguns isolados de *P. syringae* pv. *garcae* podem ser detectados utilizando-se *primers* da região que abrange o gene *tabA*, enquanto que, alguns isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* podem ser detectados utilizando-se *primers* da região que abrange os

genes *tblA* e *tabA*. Destéfano et al. (2010) utilizaram a técnica PCR-RFLP a partir do gene *hrp L* de *P. syringae* pv. *syringae*, seguida da utilização de endonucleases de restrição, e também testes bioquímicos como LOPAT, produção de ácidos a partir de D-manitol, inositol, D-sorbitol e eritritol, mas não a partir de adonitol, D(-)tartarato e L-lactato na identificação de isolados de *P. syringae* pv. *Tabaci*, a partir de folhas de cafeeiro infectadas.

A detecção de *Pseudomonas cichorii* pode ser realizada utilizando-se *primers* específicos desenhados a partir de genes obtidos de isolados de alface (COTTYN et al., 2011), os quais são utilizados na PCR em tempo real, sendo possível a detecção quantitativa dessa bactéria, baseando-se em fragmentos de genes conservados como *hrcRST* obtidos a partir da região de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*), encontrados apenas nessa espécie bacteriana (ARAKI et al., 2006).

Embora vários métodos relacionados à patogenicidade e testes bioquímicos tenham sido utilizados para identificar espécies bacterianas, principalmente, do gênero *Pseudomonas*, a utilização de PCR com *primers* específicos é considerada padrão pela sua especificidade e sensibilidade. Logo, a utilização dessa técnica associada à técnica de rep-PCR permitirá obter resultados que poderão auxiliar na diagnose adequada das bactérias que infectam o cafeeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização da pesquisa

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de plantas e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Minas Gerais, no período de setembro de 2011 a novembro de 2013.

3.2 Origem e obtenção dos isolados

Os isolados de referência de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg CFBP 1634) e *Pseudomonas cichorii* (Pc CFBP 2101) foram obtidos da “Collection Français e de Bactéries Phytopathogènes” (CFBP). Foram coletadas ou enviadas por produtores rurais folhas, hastes e mudas de cafeeiro provenientes dos seguintes municípios das regiões Sul e Alto Paranaíba do estado de Minas Gerais: Nepomuceno, Três Pontas, Santo Antônio do Amparo, Elói Mendes, São Sebastião do Paraíso, Varginha, Lavras, Candeias, Vargem Grande do Rio Pardo, Nova Rezende, Ijaci, Muzambinho, Santana da Vargem e Patrocínio. Três isolados foram fornecidos pela Fazenda Farroupilha, em Patos de Minas (Tabela 1).

A confirmação da etiologia bacteriana dos materiais sintomáticos foi feita pelo teste de exsudação em gotas e o isolamento em meio King B (KING; RANEY; WARD, 1954) e Kado e Heskett (1970), por meio de estrias paralelas (ROMEIRO, 2001) e incubação a 28 °C por 48 horas. Após a obtenção de colônias isoladas com características típicas do patógeno em placas de Petri, foi realizada a repicagem da bactéria para tubos contendo meio 523 sólido

inclinado, seguido de incubação a 28°C por 48 horas. Os isolados obtidos foram submetidos aos testes de patogenicidade.

3.3 Teste de hipersensibilidade

Para os testes de hipersensibilidade foram preparadas suspensões bacterianas a partir de culturas puras com 48 horas de incubação. A inoculação foi realizada utilizando-se uma seringa hipodérmica, sendo a suspensão bacteriana infiltrada nos espaços intercelulares da face abaxial das folhas totalmente expandidas de fumo, pimentão e tomate. O mesmo procedimento foi realizado com água destilada (controle). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas 12 e 24 h após inoculação, observando-se a reação de hipersensibilidade, a qual é caracterizada como uma lesão localizada, necrótica e dessecada (MARIANO et al., 2005).

3.4 Teste de patogenicidade

Nos testes de patogenicidade, foram utilizadas mudas de cafeeiro, cultivares Catuaí/99 e Mundo Novo 376/4, contendo cinco a oito pares de folhas. Os isolados bacterianos foram cultivados em meio King B por 24 h a 28 °C. Após esse período, a água destilada foi adicionada às placas de Petri contendo o crescimento bacteriano e a concentração da suspensão foi ajustada para $A_{600} = 0,2$, equivalente a $1,1 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990). As plantas foram inoculadas por infiltração da suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha, com uma seringa hipodérmica fina (KLEMENT, 1964) e mantidas por 24 horas em câmara úmida em casa-de-vegetação. O ensaio foi conduzido com três repetições, utilizando-se como controle mudas de cafeeiro infiltradas com água destilada (ASSIS; MARIANO, 2005). A avaliação dos

sintomas foi realizada 7 dias após inoculação. Após o aparecimento dos sintomas, foi realizado o teste de exsudação em gota para confirmação da etiologia bacteriana. As folhas sintomáticas foram herborizadas para a preservação da bactéria.

3.5 Cultivo e preservação dos isolados

Nas repicagens de rotina e preparo de inóculo para realização dos testes bioquímicos e moleculares foram utilizados os meios King B e 523. Os isolados foram preservados em água mineral estéril, mantidos à temperatura ambiente, e congelados a -20°C em peptona glicerol 15% (LAZO; ROFFEY; GABRIEL, 1987).

3.6 Testes diagnósticos

Diversos testes foram realizados para a identificação e diferenciação dos isolados bacterianos obtidos de plantas de cafeeiro. Assim, os isolados foram cultivados em meio 523, líquido e/ou sólido a 28°C por 48 horas. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

3.6.1 Testes bioquímicos

Os isolados bacterianos foram caracterizados bioquimicamente de acordo com Lelliott, Billing e Hayward (1966), Wilkie e Dye (1973), Rodrigues Neto et al. (1981), Young e Triggs (1994), Schaad, Jones e Chun (2001) e Barta e Willis (2005). Foram utilizados os seguintes testes: reação de Gram (RYU, 1940), oxidase, arginina dihidrolase, reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, hidrólise de gelatina, hidrólise de esculina, produção de pigmento

fluorescente em meio de cultura de King B e produção de ácidos a partir de: sorbitol, celobiose, trealose, sacarose, adonitol e lactose.

a) Reação de Gram

Colônias bacterianas foram transferidas com alça de repicagem para uma lâmina de microscopia, contendo uma gota de solução de KOH a 3%. Após a homogeneização do material durante 10 segundos, foi verificada a formação de muco, sendo considerados Gram-negativos os isolados bacterianos formadores de muco e Gram-positivos os não formadores (RYU, 1940).

b) Produção de oxidase

Tiras de papel filtro estéreis foram imersas em solução de tetrametilparafenilendiamino dihidroclorato a 1%. Em seguida, coletou-se com um bastão de vidro pequena quantidade de células bacterianas cultivadas em meio 523 sólido, a 28°C por 48 horas e fez-se o esfregaço em papel imerso na solução. Bactérias oxidase positivo produzem a coloração roxa em um intervalo de 10 segundos e as oxidase negativo, após 60 segundos, mantêm o papel na coloração branca (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

c) Arginina dihidrolase

Para verificar se os isolados são capazes de utilizar a arginina e se desenvolverem na ausência de oxigênio (anaerobiose), os mesmos foram repicados para o meio de arginina (1g de Peptona, 5g de NaCl, 0,3g de K_2KPO_4 , 3g de Agar 0,0032% de Vermelho de Cresol, 10g de Arginina-HCL e 1000ml de H_2O destilada) com uma alça de repicagem, em uma única perfuração. Para cada isolado foram utilizados dois tubos, sendo que em um deles foi adicionada uma camada de 0,5 cm de óleo mineral autoclavado, para simular a condição de anaerobiose. Os tubos com os isolados, juntamente com dois tubos controle (sem

a repicagem), foram levados para incubadora, à temperatura de 28°C, durante 96 horas. Os resultados foram considerados positivos quando ocorreu o crescimento bacteriano e a hidrólise da arginina, liberando NH₃, com conseqüente elevação do pH e mudança da cor vermelha para a rosa, conforme ação do indicador, nos dois tubos, na condição de aerobiose e de anaerobiose. A não alteração de coloração no meio contendo óleo mineral indicou resultado negativo (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

d) Liquefação de gelatina

Para verificar se a bactéria é capaz de hidrolisar a gelatina, suspensões bacterianas foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio de gelatina (3g de Extrato de carne, 5g de Peptona, 120g de gelatina (sem sabor) e 1000 ml de H₂O destilada) utilizando-se uma alça de repicagem e em seguida foram incubados a 28°C, por até 21 dias. Como controle, tubos sem a bactéria foram mantidos nessas mesmas condições. As avaliações ocorreram aos 3, 7 e 21 dias após a inoculação, colocando os tubos em geladeira a 5° C por 30 min. Para os isolados capazes de digerir a gelatina o meio permaneceu liquefeito após o período em refrigeração, sendo o resultado positivo. Os tubos que apresentaram resultados positivos a cada avaliação foram descartados e os demais mantidos na incubadora até os 21 dias. Os isolados que não liquefizeram a gelatina após esse período, foram considerados negativos para o teste. Um tubo sem a repicagem foi mantido sob as mesmas condições como controle (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

e) Hidrólise de esculina

Após o cultivo em meio 523 líquido, os isolados foram transferidos com a alça de repicagem para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de esculina (0,5g de NH₄H₂PO₄; 0,5g de K₂HPO₄; 0,2g de MgSO₄.7H₂O; 5g de NaCl; 5g de

Extrato de levedura; 0,5g de Citrato de Ferro e Amônio, 1g de Esculina e 1000 ml de H₂O destilada) autoclavado. Em seguida, os tubos foram levados para incubadora a 28°C, juntamente com um tubo controle, sem inoculação, durante 3 a 4 dias. Nos tubos onde ocorreu hidrólise da esculina, resultado positivo, foi observada a mudança de coloração do meio de marrom- escuro fluorescente para preto- fosco. Nos tubos onde não houve a perda de fluorescência e mudança de cor, o resultado foi negativo (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

f) Produção de fluorescência em meio King B

O teste diferencia as bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. dos grupos fluorescente e não fluorescente. Placas de Petri foram preparadas com o meio King B (20g de Peptona, 1,5g de K₂HPO₄, 1,5g de MgSO₄, 15 ml de Glicerol, 15 g de Agar e 1000 ml de H₂O destilada) e repicadas com os isolados bacterianos na forma de estrias paralelas, e incubadas a 28°C, por 1 a 7 dias. Uma placa sem ter sido feita a inoculação também foi submetida às mesmas condições. Após o período de incubação foi verificada a produção de pigmento fluorescente sob luz ultravioleta. A ausência de fluorescência caracterizou o resultado negativo (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

g) Produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono

Quatro e meio mL do meio básico para produção de ácido a partir de carboidrato (0,5 g de NH₄H₂PO₄, 0,5g de K₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 5 g de NaCl, 1 g de Extrato de levedura e 1000 ml de H₂O destilada, pH 6,6/6,8 acrescido do indicador Azul de Bromotimol 0,0016 g/ 100ml de meio) foram adicionados a cada tubo de ensaio e autoclavados. Após o resfriamento, 0,5ml dos seguintes açúcares foram adicionados aos tubos: sorbitol, celobiose, trealose, sacarose, adonitol e lactose. Posteriormente, cada isolado foi repicado para os diferentes tubos e mantidos a 28°C. As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e

28 dias após a incubação. Tubos sem bactéria, contendo cada tipo de açúcar, foram mantidos nas mesmas condições, servindo como controle. O resultado foi considerado positivo quando surgiu a coloração amarela no meio, ocasionada pela produção de ácidos. A ausência de mudança na coloração do meio indicou resultados negativos (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

3.6.2 Testes moleculares

a) Extração do DNA

Para a extração do DNA total do genoma bacteriano utilizou-se o protocolo modificado de Ausubel et al. (1992). Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas, de cada isolado cultivado sob agitação por 12 h a 24°C em meio líquido Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970), foram centrifugadas a 10.000 rpm por 40 segundos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 567µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA), 30 µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 1 hora. 100 µL de NaCl 5 M foram adicionados aos tubos, seguindo-se de agitação em vórtex. Novamente foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguindo-se de agitação manual e incubação em banho-maria a 65°C por 10 minutos. A seguir, à temperatura ambiente, foram adicionados 780 µL de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, seguindo-se de agitação em vórtex e centrifugação a 10.000 rpm por 7 minutos a 4°C. Após esse processo, a fase superior foi transferida para novo tubo, medindo-se o volume (geralmente 500 µL). Nessa etapa, foram adicionados 300 µL de álcool isopropílico, misturando-se gentilmente. Novamente procedeu-se à centrifugação a 10.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 7

minutos e posterior descarte do etanol 70%. Após o período de 30 minutos para secagem do *pellet*, o mesmo foi ressuspenso em 60 µL de TE e armazenado a -20°C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100 (Nano Drop Technologies™).

b) BOX-PCR

Foram analisados 83 isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro, os isolados referência Psg CFBP 1634 e Pc CFBP 2101, e também outros gêneros e espécies de bactérias presentes na coleção do Laboratório de Bacteriologia: *Pseudomonas syringae* pv. *helianti* (Psh), *Curtobacterium flacunfaciens* pv. *flacunfaciens* (Cff), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Psta) e *Ralstonia solanacearum* (Rs).

Para a técnica de rep-PCR foi utilizado o *primer* correspondente à região BOX, BOXAIR 5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3' (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI JÚNIOR, 1991; LOWS et al., 1994). O protocolo de amplificação foi utilizado de acordo com Lows et. al (1994), com algumas modificações. A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µL de dNTPs mix (10 mM); 0,5 µL do *primer*; 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 2 µL de DNA (10ng/µL) e 18 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 2 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C, por 30 seg, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C, por 5 min, com um ciclo final de extensão a 72°C, por 5 min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

c) Análise dos padrões de *fingerprinting*

Os perfis eletroforéticos obtidos por BOX-PCR foram analisados por sistema binário (bandas presentes 1 ou ausentes 0, para cada isolado). Os fragmentos abaixo de 100 pares de base (pb) não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída, utilizando-se o coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*), por meio do programa Past.

d) Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para detecção de *P. cichorii*

Foram analisados 83 isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro, os isolados referência Psg CFBP 1634 e Pc CFBP 2101 e também um clone dos fragmentos gerados através dos *primers* específicos para *P. cichorii* (miniprep Pc), sendo esse e o isolado referência considerados controles positivos de Pc.

Foi utilizado o par de *primers* PscHrc662F 5'-AGGCTTTATGGAAACCCT GACG- 3' e PscHrc751R 5'-ACAATCACCGCCACGATCAG-3', descrito originalmente para a detecção de *Pseudomonas cichorii* por PCR em tempo real. O fragmento amplificado foi de 90pb (COTTYN et al., 2011).

A reação foi realizada para o volume total de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão 5X, 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP mix (10 mM), 1,0 µL do *primer* anti-senso, 1,0 µL do *primer* senso, 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase, 2,0 µL do DNA (10 ng/µL) e 15,75 µL de água livre de nuclease.

A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100TM (*Programmable Thermae Controller*, MJ Research, Inc.), utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95° C, por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95° C por 1

min, 63° C por 1 min e 72° C por 30 segundos, e uma extensão final a 72° C por 10 min (COTTYN et al., 2011).

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

e) Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* *tabA* e *tb1A* para a detecção de isolados produtores de tabtoxina

Foram analisados 83 isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro, os isolados referência, Psg CFBP 1634 e Pc CFBP 2101, e um isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Psta) utilizando-se os *primers* *tb1A* e *tabA*. Para o clone dos fragmentos gerados através dos *primers* específicos para *P.syringae* pv. *tabaci* (miniprep Psta), considerado controle positivo de Psta, foram utilizados apenas os *primers* *tb1A*. Para outros gêneros e espécies de bactérias presentes na coleção do Laboratório de Bacteriologia, Psh, Cff, Xcc, Pss e Rs, foram utilizados os *primers* *tabA*.

Os *primers* utilizados foram: 5'-GTGCCAATATCCGAAAGCTT-3' (*tabA1*) e 5'-ACTTGTCAAAGTTCTCGCAC-3' (*tabA2*), desenhados para amplificar a região do gene *tabA*, e 5'-CTGGTCACTGCGCTAGGC-3' (*tb1A1*) e 5'-CGTGATTGACTCAGGGCACTAG-3' (*tb1A2*), desenhados para amplificar a região do gene *tb1A* (LYDON; PATTERSON, 2001).

As amplificações por PCR utilizando cada par de *primer* descrito acima, foi realizada para o volume total de 25 µL. A mistura de reação consistiu de 5 µl de tampão 5X, 0,5 µl de dNTPs mix (10 mM), 2,5 µl de cada *primer*, 2,5 µl de MgCl₂ 25mM, 0,25 µl de enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega), 2 µL de DNA (10 ng/µL) e 9,75 µL de água livre de nuclease. A amplificação ocorreu em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação a 95°C por 10 min para o primeiro ciclo, 94°C por 30 segundos

para cada ciclo subsequente, anelamento a 58°C por 20 seg e extensão a 72°C por 30 seg por 5 ciclos, adicionando 2 seg ao tempo de anelamento por ciclo. Anelamento e extensão por 25 ciclos foram a 58 e 72° C por 30 seg, adicionando 1 seg ao tempo de anelamento e extensão por ciclo e uma extensão final a 72°C por 5 min (LYDON; PATTERSON, 2001).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos isolados, sintomas e características das colônias

A partir de plantas e mudas de cafeeiro infectadas, provenientes de diversos municípios das regiões Sul e Alto Paranaíba de Minas Gerais, foram obtidos 161 isolados, dos quais 83 foram patogênicos quando inoculados em folhas de cafeeiro (Tabela 1). Foram observados os sintomas produzidos nas plantas e mudas de cafeeiro infectadas, bem como as características das colônias obtidas a partir do isolamento em meio King B (Figura 1).

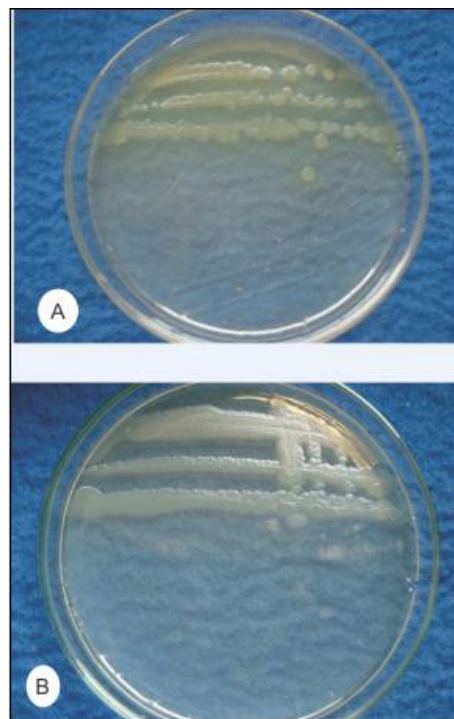


Figura 1 Colônias bacterianas isoladas de folhas de cafeeiro

Nota: (A) Isolado UFLA 136 (B) Isolado UFLA 138

Tabela 1 Sintomas e características de colônias dos isolados bacterianos obtidos de plantas de cafeeiro, provenientes das regiões indicadas

Isolados	Local	Data	Cultivar/Variedade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 06, UFLA 20, UFLA 21	Nepomuceno (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 43, UFLA 44	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 46	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme amarelado
UFLA 48; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Anasarca e necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 58	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose e queima de ponteiros	Amarela;escurecimento do meio
UFLA 59	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Amarela
UFLA 60 UFLA 61	Três Pontas (viveiro)	30/1/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme

“Tabela 1, continuação”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 69	Candeias (lavoura)	30/1/2012	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Esverdeado fluorescente
UFLA 77; UFLA 78	Nepomuceno (viveiro)	5/8/2012	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 79	Nepomuceno (viveiro)	28/8/2012	Catuaí/99	Lesão negra s/ halo amarelo	Creme
UFLA 80	Nepomuceno (viveiro)	29/8/2012	Catuaí /99	Lesão negra s/ halo amarelo (ponteiro)	Creme
UFLA 84	Lavras (viveiro)	11/6/2012	Catuaí/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme
UFLA 85	Nepomuceno (viveiro)	6/9/2012	Catuaí /99	Lesão negra s/ halo amarelo	Creme
UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89A UFLA 89C	Nepomuceno (viveiro)	6/9/2012	Catuaí /99	Lesão negra s/ halo amarelo	Creme
UFLA 90 UFLA 91A	Nepomuceno (viveiro)	6/9/2012	Catuaí /99	Lesão negras/ halo amarelo	Creme esbranquiçada

“Tabela 1, continuação”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 97	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Lesão marrom c/ halo amarelo	Creme
UFLA 98	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose s/ halo amarelo	Creme escuro
UFLA 99	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 101	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 105	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 106	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 107	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Lesão negras/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio

“Tabela 1, continuação”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 109	Nepomuceno (viveiro)	28/11/2012	Mundo Novo 376/4	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 112	Varginha (viveiro)	9/1/2013	Catuaí/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme
UFLA 113	Vargem Grande (viveiro)	24/1/2013	Catuaí/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 114; UFLA 115	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 116; UFLA 121	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 117	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose do ramo até a base da folha - ponteiro	Creme; escurecimento do meio
UFLA 118	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 119	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose c/ halo amarelo	Creme

“Tabela 1, continuação”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 120	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí vermelho/99	Necrose encharcada do ramo até a base da folha	Creme; escurecimento do meio
UFLA 122	Nova Rezende (lavoura)	24/1/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 123	Nova Rezende (lavoura)	24/1/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 125	São Sebastião do Paraíso (lavoura)	4/2/2013	Acaíá	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 126	Sto Antônio do Amparo (lavoura)	24/1/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio, pouco fluorescente
UFLA 127	Três Pontas (lavoura)	24/1/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio,
UFLA 128	São Sebastião do Paraíso (lavoura)	4/2/2013	Acaíá	Necrose s/ halo amarelo	Creme (esverdeado)
UFLA 129	São Sebastião do Paraíso (lavoura)	4/2/2013	Acaíá	Necrose s/ halo amarelo	Creme (amarelado)

“Tabela 1, continuação”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 130	Três Pontas (lavoura)	15/2/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133; UFLA 134	Patrocínio (lavoura)	10/2/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose c/ halo amarelo	Creme; escurecimento do meio
UFLA 135	Patrocínio (lavoura)	10/2/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose preta s/ halo amarelo	Esverdeado fluorescente
UFLA 136	Lavras (viveiro)	26/2/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose preta s/ halo amarelo	Esverdeado fluorescente
UFLA 138; UFLA 139	Elói Mendes (lavoura)	25/2/2013	Catuaí vermelho IAC 144	Necrose c/ halo amarelo	Creme
UFLA 142, UFLA 143B, UFLA 143F	São Sebastião do Paraíso (lavoura)	18/2/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme, pouco fluorescente
UFLA 143	São Sebastião do Paraíso (lavoura)	18/2/2013	Catuaí/99	Necrose s/ halo amarelo	Creme

“Tabela 1, conclusão”

Isolados	Local	Data	Cultivar/Varietade	Sintomas nas folhas	Cor da colônia
UFLA 145; UFLA 146; UFLA 147	Lavras (viveiro)	10/4/2013	Mundo Novo 376/4	Lesão negra s/ halo amarelo	Esverdeado fluorescente
UFLA 148; UFLA 149	Ijací (lavoura)	20/4/2013	Catuaí amarelo IAC 62	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 150; UFLA 151	Muzambinho (lavoura)	22/4/2013	Catuaí Vermelho IAC 144	Necrose s/ halo amarelo	Creme
UFLA 152; UFLA 153	Santana da Vargem (viveiro)	16/5/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose escura s/ halo amarelo	Creme
UFLA 154	Santo Antônio do Amparo (lavoura)	20/5/2013	Catuaí 2SL	Necrose c/ halo amarelo	Creme
UFLA 156	Santana da Vargem (viveiro)	16/5/2013	Mundo Novo 376/4	Necrose escura s/ halo amarelo	Creme

4.2 Reação de hipersensibilidade (HR)

A habilidade de bactérias fitopatogênicas em induzir HR em plantas não hospedeiras é uma ferramenta útil para se testar, de maneira rápida, a patogenicidade de isolados bacterianos (ROMEIRO, 2001).

Dos 161 isolados obtidos a partir de plantas de cafeeiro infectadas, 96 desses e os isolados referência Psg CFBP 1634 e Pc CFBP 2101 incitaram HR em pimentão, tomate e fumo (Figura 2). Quatorze isolados incitaram HR em ,pelo menos uma, das plantas testadas e 51 isolados não incitaram HR em nenhuma das plantas, sendo considerados não patogênicos e, portanto descartados (Tabela 2). Os 110 isolados que incitaram HR foram submetidos ao teste de patogenicidade.

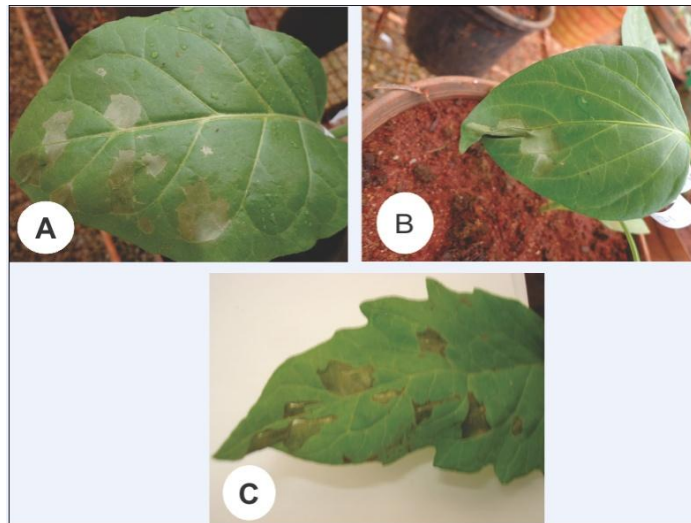


Figura 2 Resposta hipersensível em folhas de fumo (A), pimentão (B) e tomate (C) induzida por isolados bacterianos provenientes de folhas de cafeeiro

Tabela 2 Hipersensibilidade em plantas de pimentão, tomate e fumo incitada por isolados bacterianos obtidos de cafeeiro

Isolados	Pimentão	Tomate	Fumo
UFLA 06; UFLA 20; UFLA 21; UFLA 42; UFLA 43; UFLA 44; UFLA 46; UFLA 47; UFLA 48; UFLA 50; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54; UFLA 58; UFLA 59; UFLA 60; UFLA 61; UFLA 69; UFLA70; UFLA 71; UFLA 72; UFLA 76; UFLA 78; UFLA 79; UFLA 80; UFLA81; UFLA 82; UFLA 83; UFLA 84; UFLA 85; UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89 A; UFLA 89 C; UFLA 90; UFLA 91; UFLA 92; UFLA 93; UFLA 94; UFLA 95; UFLA 96; UFLA 97; UFLA 98; UFLA 99; UFLA 101; UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 109; UFLA 106; UFLA 107; UFLA 105; UFLA 112; UFLA 113; UFLA 114; UFLA 115; UFLA 116; UFLA 117; UFLA 118; UFLA 119; UFLA 120; UFLA 121; UFLA 122; UFLA 123; UFLA 125; UFLA 126; UFLA 127; UFLA 128; UFLA 129; UFLA 130; UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133; UFLA 134; UFLA 135; UFLA 136; UFLA 137; UFLA 138; UFLA139; UFLA 142; UFLA 143; UFLA 143 F; UFLA 143 B; UFLA 145; UFLA 146;UFLA 147; UFLA 148; UFLA 149; UFLA 150; UFLA 151; UFLA 152; UFLA 153; UFLA 154; UFLA 155; UFLA 156; PsgCFBP 1634 e Pc CFBP 2101	+	+	+
UFLA 65	+	+	-
UFLA 49; UFLA 51; UFLA 55	+	-	+
UFLA 37; UFLA 140;	+	-	-
UFLA 05; UFLA 10; UFLA 70; UFLA 108; UFLA 124; UFLA 141;	-	+	-
UFLA 45; UFLA 77	-	-	+

“Tabela 2, conclusão”

Isolados	Pimentão	Tomate	Fumo
UFLA 01; UFLA 02; UFLA 03; UFLA 04; UFLA 07; UFLA 08; UFLA 09; UFLA 11; UFLA 12; UFLA 13; UFLA 14; UFLA 15; UFLA 16; UFLA 17; UFLA 18; UFLA 19; UFLA 22; UFLA 23; UFLA 24; UFLA 25; UFLA 26; UFLA 27; UFLA 28; UFLA 29; UFLA 30; UFLA 31; UFLA 32; UFLA 33; UFLA 34; UFLA 35; UFLA 36; UFLA 38; UFLA 39; UFLA 40; UFLA 41; UFLA 56; UFLA 57; UFLA 62; UFLA 63; UFLA 64; UFLA 66; UFLA 67; UFLA 68; UFLA 97; UFLA 100; UFLA 110; UFLA 111; UFLA 73; UFLA 74; UFLA 75; UFLA 144			- - -

4.3 Teste de patogenicidade

Dos 110 isolados que incitaram reação de hipersensibilidade, em pelo menos uma das 3 plantas testadas, 83 desses e os isolados referência Psg CFBP 1634 e Pc CFBP 2101, tiveram a patogenicidade confirmada (Tabela 3). A ocorrência de sintomas típicos (Figura 3), sete dias após a inoculação, como lesões necróticas, de formato irregular, envoltas ou não por um halo amarelado, nas plantas inoculadas pelo método de injeção, e a observação ao microscópio da exsudação bacteriana nos tecidos doentes foram as características usadas para a confirmação da patogenicidade.



Figura 3 Sintomas produzidos em folhas de cafeeiro inoculadas com os isolados (A) UFLA136 e (B) UFLA 138

Tabela 3 Patogenicidade de isolados bacterianos em folhas de cafeeiro cultivar Catuaí e Mundo Novo

Isolados	Presença de sintomas 7 dias após inoculação
UFLA 06; UFLA 20;UFLA 21;UFLA 43;UFLA 44;UFLA 46;UFLA 48;UFLA 52;UFLA 53;UFLA 54;UFLA 58;UFLA 59;UFLA 60;UFLA 61;UFLA 69;UFLA 77;UFLA 78;UFLA 79;UFLA 80; UFLA 81;UFLA 82;UFLA 83;UFLA 126;UFLA 127;UFLA 128;UFLA 129;UFLA 130;UFLA 131;UFLA 132;UFLA 133;UFLA 134;UFLA 135;UFLA 136;UFLA 138;UFLA 139;UFLA 142; UFLA 84;UFLA 85;UFLA 86;UFLA 87;UFLA 88; UFLA 89A;UFLA 89C;UFLA 90;UFLA 91;UFLA 97;UFLA 98;UFLA 99;UFLA 101; UFLA 102;UFLA 103;UFLA 104;UFLA 105UFLA 106;UFLA 107;UFLA 109;UFLA 112;UFLA 113;UFLA 114;UFLA 115;UFLA 116;UFLA 117; UFLA 118;UFLA 119;UFLA 120;UFLA 121;UFLA 122;UFLA 123;UFLA 125;UFLA 143; UFLA 143B;UFLA 143F;UFLA 145;UFLA 146;UFLA 147;UFLA 148;UFLA 149;UFLA 150;UFLA 151;UFLA 152;UFLA 153; UFLA 154;UFLA 156; PsgCFBP 1634 e Pc CFBP 2101	+
UFLA 05; UFLA 10, UFLA 37; UFLA 45; UFLA 49; UFLA 51; UFLA 55; UFLA 65; UFLA 108; UFLA 124; UFLA 140; UFLA 141	-

4.4 Caracterização bioquímica

Os 83 isolados patogênicos ao cafeeiro foram Gram negativos, arginina dihidrolase negativo, incitaram a hipersensibilidade em folhas de tabaco e hidrolisaram a esculina (Tabela 4). A maior parte dos isolados foi negativa para oxidase, exceto Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146 e UFLA 147 e também hidrólise da gelatina positivo, exceto Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147, UFLA 21, UFLA 48, UFLA 52, UFLA 60, UFLA 61, UFLA 79, UFLA 85, UFLA 87, UFLA 98, UFLA 102, UFLA 122 e UFLA 125 (Tabela 4). A maioria dos isolados produziu ácido a partir de sorbitol e sacarose (exceto UFLA44 e Pst, que não utilizaram sorbitol, e Pc CFBP 2101, UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146 e UFLA 147 que não utilizaram nenhum dos dois açúcares). Desses isolados, 23 apresentaram fraca reação para trealose e 11 forte reação positiva para esse açúcar. Oito isolados apresentaram fraca reação para celobiose e nove forte reação positiva para esse açúcar. Lactose e adonitol não foram utilizados pela maioria dos isolados, exceto UFLA 142, UFLA 143, UFLA 143B e UFLA 143F, que utilizaram lactose e UFLA 142, que utilizou também o adonitol.

O fato da maioria destes isolados utilizar os açúcares sorbitol e sacarose, alguns apresentarem fraca reação para celobiose e trealose, não utilizarem lactose e adonitol e apresentarem pouca fluorescência em meio king B indica que esses pertencem à espécie *P. syringae*. Em cafeeiro, podem ocorrer dois patovares dessa espécie: *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981, YOUNG; TRIGGS, 1994 e SCHAAD ; JONES; CHUN, 2001). Alguns dos isolados citados acima utilizaram lactose e/ou adonitol e não utilizaram sorbitol e/ou sacarose ou não hidrolisaram a gelatina, conforme esperado para *Pseudomonas syringae*. Tal fato é esperado, pois se considera um resultado

como positivo ou negativo para os testes bioquímicos quando 80% dos isolados testados apresentam essa característica (YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

Os isolados UFLA 135, UFLA136, UFLA 145, UFLA 146 e UFLA 147 apresentaram o mesmo padrão bioquímico do isolado Pc CFBP 2101 referência de *Pseudomonas cichorii* (Tabela 4), portanto pode-se concluir que eles pertencem a essa espécie (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966; WILKI; DYE, 1973; RODRIGUES NETO et al., 1981; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

Os isolados UFLA 69 e UFLA 143F também apresentaram fluorescência em meio King B, mas de acordo com Barta e Willis (2005), alguns isolados de *P. syringae* pv. *garcae* apresentam fluorescência nesse meio.

Tabela 4 Características bioquímicas de isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro

Isolados	Hipersensibilidade em fumo	Gram	Oxidase	Arginina	King B	Esculina	Hidrólise de gelatina	Açúcares					
								Sorbitol	Sacarose	Trealose	Lactose	Celobiose	Adonitol
Testemunha	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-6	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
UFLA-20	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-21	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
UFLA-43	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-44	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
UFLA-46	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-48	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-52	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
UFLA-53	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-54	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-58	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-59	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-60	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-/+	-	+	+
UFLA-61	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-69	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-
UFLA-77	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-/+	-
UFLA-78	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-79	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-80	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
UFLA-81	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-82	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-83	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-84	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-85	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

“Tabela 4, continuação”

Isolados	Hipersensibilidade em fumo	Gram	Oxidase	Arginina	King B	Esculina	Hidrólise de gelatina	Açúcares					
								Sorbitol	Sacarose	Trealose	Lactose	Celobiose	Adonitol
UFLA-86	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-87	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-88	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-89A	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-89C	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-90	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-91	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
UFLA-97	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-98	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-99	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-101	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-102	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-103	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-104	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-/+	-	-	-
UFLA-105	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-106	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-107	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-109	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-112	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-113	+	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-
UFLA-114	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-115	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-116	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-117	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

“Tabela 4, continuação”

Isolados	Hipersensibilidade em fumo	Gram	Oxidase	Arginina	King B	Esculina	Hidrólise de gelatina	Açúcares					
								Sorbitol	Sacarose	Trealose	Lactose	Celobiose	Adonitol
UFLA-118	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
UFLA-119	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-120	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-121	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-122	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-123	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-125	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFLA-126	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-127	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-128	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-129	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-130	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-131	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-132	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-133	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-134	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+/-	-
UFLA-135	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-136	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-138	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-139	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-142	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
UFLA 143	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+/-	+	-
UFLA-143B	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA-143F	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA-145	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

“Tabela 4, conclusão”

Isolados	Hipersensibilidade em fumo	Gram	Oxidase	Arginina	King B	Esculina	Hidrólise de gelatina	Açúcares					
								Sorbitol	Sacarose	Trealose	Lactose	Celobiose	Adonitol
UFLA-146	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-147	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-148	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-149	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-150	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-151	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
UFLA-152	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-153	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
UFLA-154	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFLA-156	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	+	-
Pc CFBP													
2101	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Psg CFBP													
1634	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	+/-
Pst	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

4.5 Caracterização molecular

a) BOX-PCR

Os padrões de bandas gerados pela amplificação de sequências repetitivas do DNA genômico utilizando o *primer* BOX A1R foi diversificado (Figura 4). Através das análises desses padrões de *fingerprinting* gerados, foi possível a separação dos isolados em dois grandes grupos denominados I e II, com aproximadamente 40% de similaridade entre eles (Figura 5). No grupo I foi possível observar uma clara distinção entre dois subgrupos: “a” e “b”. No subgrupo “a”, os isolados se agruparam com o isolado referência *Pseudomonas cichorii* CFBP 2101, com similaridade que variou de 58 a 75%. O subgrupo “b” congrega a maioria dos isolados e se agrupou com o isolado referência *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* CFBP 1634, com similaridade entre 58 e 74%, alcançando 89% com UFLA 149, e também com o isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, com similaridade entre 58 a 80%, chegando a 87% para UFLA 06 e 91% para UFLA 123 e UFLA 131. Os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* (Ph) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) foram incluídos no subgrupo “a” e o isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestres* (Xcc), no subgrupo “b”. A similaridade entre os dois subgrupos “a” e “b” foi de, aproximadamente, 48%. O grupo II ficou representado pelos isolados UFLA 152, UFLA 153, UFLA 156 (100% de similaridade); UFLA 48 e UFLA 115 (100% de similaridade); UFLA 142; UFLA 83, UFLA 116, UFLA 20 e *Ralstonia solanacearum* (100% de similaridade). 26 grupos foram agrupados com 70% de similaridade. No total, 15 grupos com similaridade 100% foram formados: 1 dentro do grupo I, subgrupo “a” (PC UFV e UFLA 147); 12 dentro do grupo I, subgrupo “b” (UFLA 112 e UFLA 146; UFLA 113, UFLA 53 e Psg CFBP 1634; UFLA 117, UFLA 118, UFLA 121 e UFLA 127; UFLA 21 e UFLA52; UFLA 105, UFLA 126, UFLA 128 e UFLA 154; UFLA

133 e UFLA 134; UFLA 106, UFLA 104, UFLA 103, UFLA 102, UFLA 97, UFLA 88, UFLA 78, UFLA 80, UFLA 82, UFLA 90, UFLA 91A, UFLA 101, UFLA 107, UFLA 109, UFLA 130, UFLA 138, UFLA 139, UFLA 145, UFLA 43, UFLA 46 e UFLA 120 ; UFLA 98 e UFLA 114; UFLA 122, UFLA 148, UFLA 87, UFLA 125, UFLA 119 UFLA 132 e UFLA 50; UFLA 59, UFLA 89C, UFLA 84, UFLA 77, UFLA 79, UFLA 85, UFLA 89A, UFLA 58 e UFLA 54; UFLA 123 e UFLA 131) e 3 dentro do grupo II (UFLA 152, UFLA 153 e UFLA 156; UFLA 48 e UFLA 115; UFLA 83, UFLA 116, UFLA 120 e *Ralstonia solanacearum*(Rs) (Figura 5).

Analisando-se os padrões de bandas gerados por BOX-PCR, foi detectada diversidade interespecífica entre os isolados obtidos do cafeeiro, pois houve a separação do subgrupo "a", contendo isolados caracterizados bioquimicamente como *Pseudomonas cichorii*, e o subgrupo "b", contendo isolados caracterizados bioquimicamente como *Pseudomonas syringae*. Como exceção, os isolados UFLA 145 e UFLA 146, com o mesmo padrão bioquímico do subgrupo "a", não foram incluídos nesse subgrupo. No entanto, não foi possível a identificação dos isolados incluídos dentro do subgrupo "b" em patovar, devido à alta similaridade com os patovares *garcae* (Psg CFBP 1634) e *tabaci* (Psta). Além dos grupos I e II um terceiro grupo (III) foi formado, sobre o qual não se pode inferir a respeito da espécie, visto que se agrupou com uma baixa similaridade com o restante dos isolados. Os isolados Pss e Ph foram agrupados no subgrupo "a" e o isolado de Xcc no subgrupo "b", entretanto eles não infectam o cafeeiro e foram considerados apenas como "outgroup" (Figura 5).

Numa análise geral, pode-se considerar que houve alta diversidade genética entre os isolados, visto que o padrão de bandas foi diversificado, contudo não foi possível identificar os isolados ao nível de patovar.

O método BOX-PCR tem sido utilizado para a caracterização de isolados de diferentes espécies de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. syringae*, *Pseudomonas putida*, *P. viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens* (SYRMIS et al., 2004; DAWSON; FRY; DANCER, 2002; CURRIE et al., 2007; MARQUES et al., 2008; MORELLI; MELIOLI; MENTASTIM, 2008).

Segundo Louws et al. (1994), o conjunto dos protocolos REP-, ERIC-e BOX-PCR, conhecido conjuntamente como rep-PCR, é adequado para uma rápida caracterização molecular de bactérias patogênicas de plantas, especialmente ao nível de patovar. Eles utilizaram a técnica para distinguir patovares de *Xanthomonas campestris* e de *P. syringae*. Cada conjunto de primers (REP, BOX e ERIC) foi eficaz para distinguir diferentes patovares. Na diferenciação dos patovares de *P. syringae*, os *fingerprints* gerados foram altamente característicos para a maioria dos patovares testados e houve poucas variações intrapatovares.

Marques et al. (2008) obtiveram a diferenciação de espécie pertencentes às *genomoespécies* de *Pseudomonas syringae* e *P. viridiflava* designadas por Gardan et al. (1999), utilizando a técnica BOX-PCR.

Costa et al. (2012) utilizaram a técnica de BOX-PCR para a identificação de isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro, em nível de espécie, para se constatar a ocorrência relativa na região de Caçador-SC. Assim foi possível identificar a ocorrência de *X. gardneri*, *X. perforanse* *X. vesicatoria*, comparando os perfis de bandas aos isolados referência das respectivas espécies. Esses isolados tiveram também a confirmação da espécie através da PCR com os *primers* específicos.

Çepni e Gurel (2012), relatam que a técnica rep-PCR tem capacidade limitada de discriminar patovares e isolados estreitamente relacionados pertencentes a uma mesma espécie. Diante disso, esses autores propuseram a possibilidade de diferenciação em nível intraespecífico para a espécie *P. syringae*

e subsequente análise genética da diversidade de linhagens de um mesmo patovar.

No presente trabalho, a técnica BOX-PCR foi útil na identificação de espécies, mas não de patovares. É possível que a utilização do conjunto das técnicas BOX- , ERIC- e REP-PCR possa ser mais eficaz na diferenciação dos isolados do cafeeiro em patovares, visto que cada uma dessas técnicas amplifica diferentes regiões entre sequências repetitivas conservadas do genoma bacteriano, obtendo-se assim, diferentes *fingerprints* genômicos, que podem diferenciar patovares.

Maciel (2013), buscando avaliar a diversidade genética de 29 linhagens de *P. syringae* pv.*garcae* verificou que o BOX-PCR não foi eficaz, pois foram gerados perfis genéticos muitos similares entre elas. Entretanto os padrões gerados por ERIC-PCR e REP-PCR, numa análise conjunta, revelaram a diversidade entre os genótipos testados com a formação de grupos distintos.

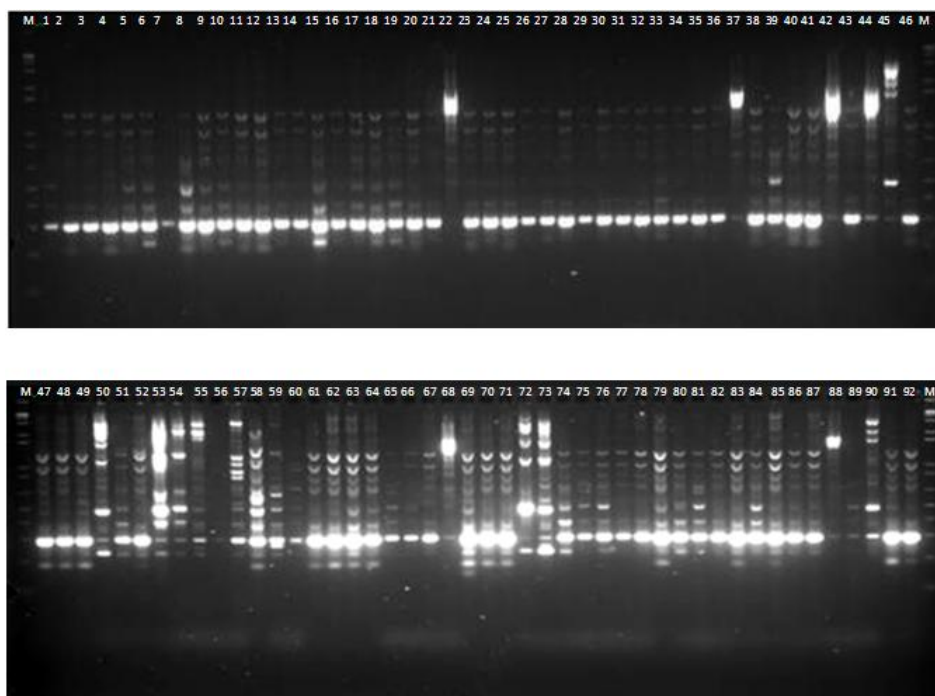


Figura 4 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* BOX AIR

Nota: (M) Marcador de Peso Molecular 1 Kb, (1)UFLA 53, (2) UFLA 77, (3) UFLA78, (4) UFLA 79, (5) UFLA 80, (6) UFLA82, (7) UFLA 83, (8) UFLA 84, (9) UFLA 85, (10) UFLA 88, (11) UFLA 89A, (12) UFLA 89C, (13) UFLA 90, (14) UFLA 91A, (15) UFLA 97, (16) UFLA 98, (17) UFLA 101, (18) UFLA 102, (19) UFLA 103, (20) UFLA 104, (21)UFLA 105, (22) UFLA 143, (23) UFLA 106, (24) UFLA 107, (25) UFLA 109, (26) UFLA 112, (27) UFLA 113, (28) UFLA 114, (29) UFLA 116, (30) UFLA 117, (31) UFLA 118, (32) UFLA 121, (33) UFLA 123, (34) UFLA 126, (35) UFLA 127, (36)UFLA 128, (37) UFLA 129, (38) UFLA 130, (39) UFLA 131, (40) UFLA 138, (41) UFLA 139, (42) UFLA 143B, (43) UFLA 154, (44) UFLA 143F, (45) UFLA 145, (46) UFLA 151, (47) UFLA 152, (48) UFLA 153, (49) UFLA 156, (50) *Pseudomonas cichorii* UFV, (51) Kit Psg CFBP 1634 (52) Psg CFBP 1634, (53) Kit Pc CFBP 2101., (54) Pc CFBP 2101., (55) *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*, (56) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, (57) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, (58) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (59) *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (60) *Ralstonia solanacearum*, (61) UFLA 122, (62) UFLA 148, (63) UFLA 58, (64) UFLA 59, (65) UFLA 06, (66) UFLA 20, (67) UFLA 21, (68) UFLA 69, (69) UFLA 86, (70) UFLA 87, (71) UFLA 125, (72) UFLA 135, (73) UFLA 136, (74) UFLA 43, (75) UFLA 44, (76) UFLA 46, (77) UFLA 48, (78) UFLA 52, (79) UFLA 54, (80) UFLA 60, (81) UFLA 61, (82) UFLA 115, (83) UFLA 119, (84) UFLA 120, (85) UFLA 132, (86) UFLA 133, (87) UFLA 134, (88) UFLA 142, (89) UFLA 146, (90) UFLA 147, (91) UFLA 149, (92) UFLA 150.

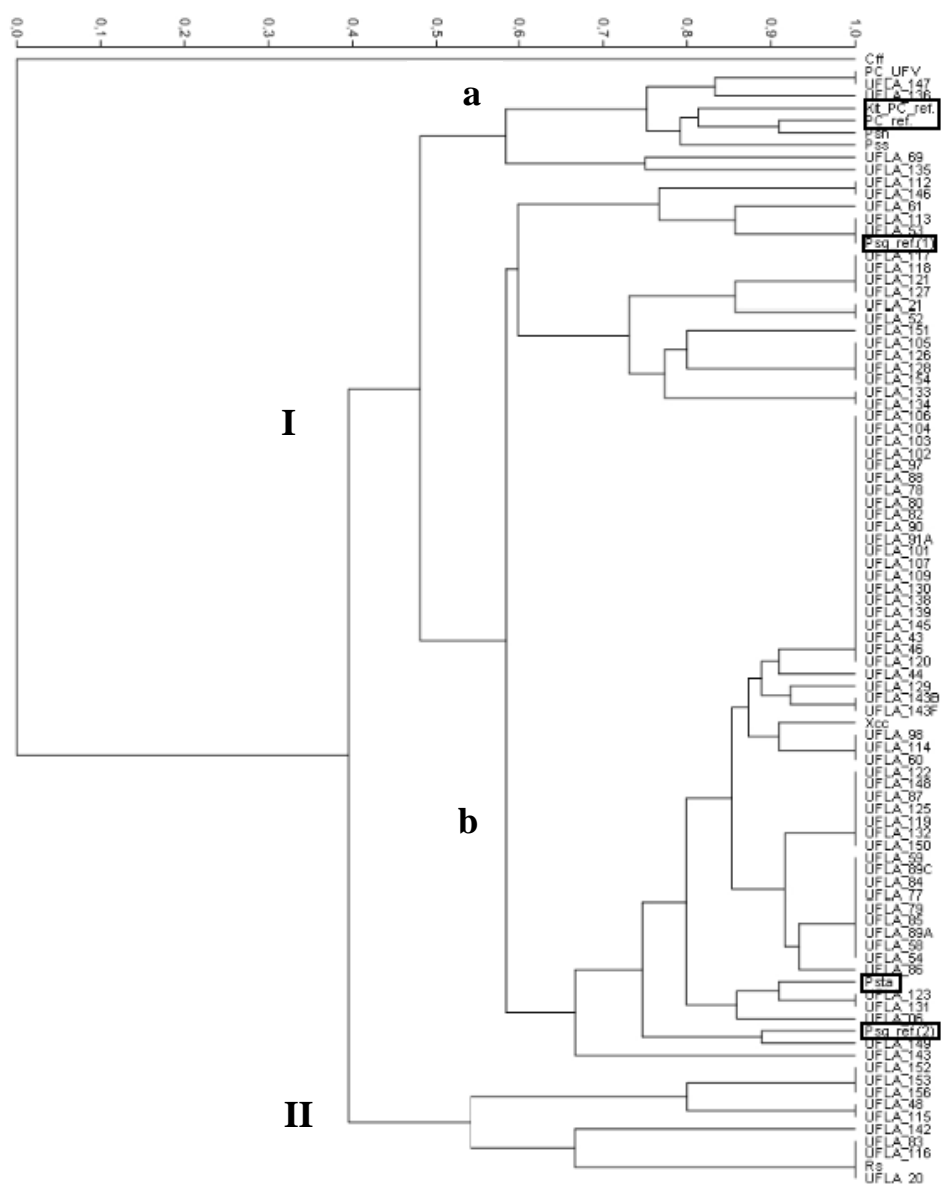


Figura 5 Dendrograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação de isolados bacterianos obtidos do cafeeiro, a partir do *primer* BOX 1 AR, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice, por meio do Programa Past

b) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para *Pseudomonas cichorii*

Dos 88 isolados testados, apenas Pc CFBP 2101, Pc UFV, UFLA 135, UFLA 136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147 e o miniprep Pc, apresentaram o produto de amplificação de 90 pb, quando se utilizou o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R, o que permite concluir que esses isolados pertencem à espécie *Pseudomonas cichorii* (Figura 6).

Em estudos realizados por Cottyn et al. (2011), utilizando PCR em tempo real, os autores detectaram a bactéria *Pseudomonas cichorii* em alface por meio desses *primers* específicos, o que foi igualmente observado no presente estudo, porém utilizando PCR convencional. Além dos *primers* específicos, esses autores também utilizaram uma sonda que tem como alvo um fragmento dos genes conservados *hrcRST* da região de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (genes *hrp*), gerando um produto de amplificação de 90 pb, confirmando a amplificação do gene, na reação por meio da PCR.

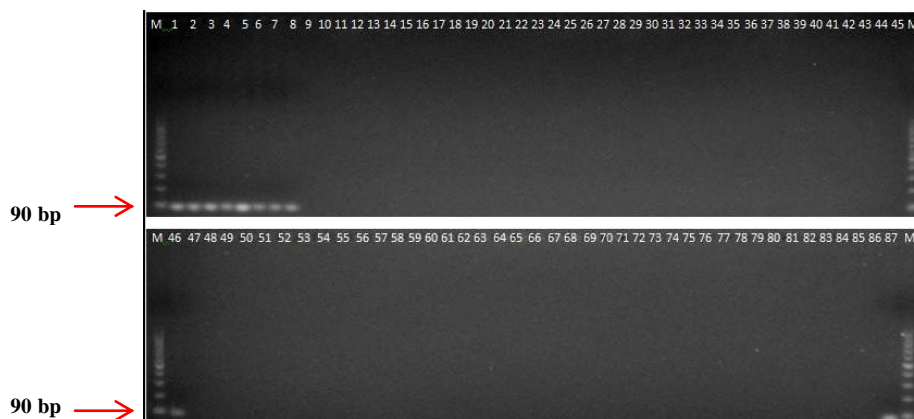


Figura 6 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R para detecção de *Pseudomonas cichorii* (Pc)

Nota: (M) Marcador de Peso Molecular 100pb, (1) miniprep Pc, (2) Pc CFBP 2101, (3) Pc UFV, (4) UFLA 135, (5) UFLA 136, (6) UFLA 145, (7) UFLA 146, (8) UFLA 147, (9) Psg CFBP 1634, (10) UFLA 83, (11) 82, (12) UFLA 78, (13) UFLA 79 (14) UFLA 88, (15) UFLA 84, (16) UFLA 85, (17) UFLA 80, (18) UFLA 77, (19) UFLA 53, (20) UFLA 89A, (21) UFLA 90, (22)91A, (23) UFLA 97, (24) UFLA 98, (25) UFLA 101, (26) UFLA 102, (27) UFLA 103, (28) UFLA 104, (29) UFLA 105, (30) UFLA 143 (31) UFLA 106, (32) UFLA 107, (33) UFLA 109, (34) UFLA 112, (35) UFLA 113, (36) UFLA 114, (37) UFLA 116, (38) UFLA 117., (39) UFLA 118, (40) UFLA 121, (41) UFLA 123, (42) UFLA 126, (43) UFLA 120, (44) UFLA 132, (45) UFLA 133, (46) MINIPREP Pc, (47) UFLA 134, (48) UFLA 127, (49) UFLA 128, (50) UFLA 129, (51)UFLA 130, (52) UFLA 131, (53) UFLA 138, (54) UFLA 139, (55) UFLA 143B, (56) UFLA 143F, (57) UFLA 149, (58) UFLA 156, (59) UFLA 150, (60) UFLA 151, (61) UFLA 152, (62) UFLA 153, (63) UFLA 154, (64) UFLA 89C, (65) UFLA 122 (66) 148 (67) UFLA58 (68) UFLA 59, (69) UFLA 06, (70) UFLA 20, (71) UFLA 21, (72) UFLA 69, (73) UFLA 86, (74) UFLA 87, (75) UFLA 125, (76) UFLA 142, (77) UFLA 43, (78) UFLA 44, (79) UFLA 46, (80) UFLA 48, (81) UFLA 52, (82) UFLA 54, (83) UFLA 60, (84) UFLA 61, (85) UFLA 115, (86) UFLA 119, (87) MINIPREP Pc.

c) Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* *tabA* e *tblA* para a detecção de isolados bacterianos do cafeeiro produtores de tabtoxina

Noventa e dois isolados bacterianos foram testados para a produção de tabtoxina utilizando-se o par de *primers* *tabA1* e *tabA2*. A maioria dos isolados produziu o produto de amplificação de 1020 bp (Figura 6), característico da produção de tabtoxina (Lydon e Patterson, 2001). Os isolados Psh, Cff, Xcc, Pss, Rs, não apresentaram o referido produto de amplificação (Figura 7), portanto não produzem tabtoxina. Esse fato é esperado, pois essas espécies e patovares não são produtoras desta toxina, entretanto, UFLA 85, UFLA 89C, UFLA 43, UFLA 46, UFLA 142, UFLA 136, UFLA 146, UFLA 147, UFLA 135 e UFLA 145, Psg CFBP 1634 e Psta, patogênicas ao cafeeiro, também não o produziram.

Oitenta e oito isolados bacterianos foram testados para a produção de tabtoxina utilizando-se o par de *primers* *tblA1* e *tblA2*. Desses isolados, 74 produziram o produto de amplificação de 829 bp (Figura 8). Lydon e Patterson (2001) verificaram que esse produto de amplificação é característico da produção de tabtoxina e que somente isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* BR2, naturalmente produtores de tabtoxina, geraram o produto. Entretanto, no presente trabalho, somente os isolados Psta, Psg CFBP 1634, UFLA 85, UFLA 98, UFLA 114, UFLA 78 e UFLA 20, patogênicos ao cafeeiro, não apresentaram o referido produto de amplificação (Figura 8). Assim, é possível inferir que esse *primer* esteja anelando também com os isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, haja vista que as características das colônias, como crescimento em meio de cultura, baixa fluorescência e escurecimento do meio, levam a supor que a maioria dos isolados são do patovar *garcae*. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade desses isolados serem *P. syringae* pv. *tabaci*. Portanto, recomenda-se que novos estudos sejam realizados, como a

utilização de trigonelina e L(+) tartarato e sequenciamento dos produtos de amplificação gerados.

Os isolados Pc CFBP 2101, Pc UFV, UFLA 135, UFLA 136, UFLA 145, UFLA 146, UFLA 147 não apresentaram os referidos produtos de amplificação (Figura 7 e 8), fato esperado, pois *P. cichorii* não é produtora de tabtoxina.

O fato dos *primers* *tb1A1* e *tb1A2* terem anelado com a maioria dos isolados em estudo, com exceção dos isolados citados acima, permite inferir que pode ter ocorrido perda da especificidade desses *primers*. Além desse fator, outras possibilidades seriam: nos estudos de Lydon e Patterson (2001), utilizaram-se células bacterianas e não apenas o DNA para as reações de PCR, como realizado nesse estudo; os isolados de *Psta* utilizados são de diferentes países e diferentes plantas hospedeiras, como fumo, feijão e soja; como a multiplicação de bactérias é um processo rápido, pode ter havido perda da seqüência em *Psta*, pois utilizando o miniprep verificou-se a produção da banda, fato não observado quando se utilizou o próprio isolado que a originou; a possibilidade de transferência do gene *tb1A* entre isolados; o gene *tb1A* é imediatamente “*upstream*” ao gene *tabA* podendo ser transcrito conjuntamente, o que pode explicar a presença de bandas na maior parte dos isolados (BARTA et al., 1993).

Segundo Lydon e Patterson (2001), os protocolos de PCR utilizando os conjuntos de *primers* para amplificar os genes *tb1A* e *tabA* são específicos para organismos produtores de tabtoxina. Entretanto, dois isolados não produtores de tabtoxina, *E.coli* DH5 α (pRTb1823) e *Psta* 2835, apresentaram produtos de amplificação com ambos os conjuntos de *primers*, pois, embora o plasmídeo pRTb1823 contenha os genes estruturais requeridos para a produção de tabtoxina, não possui os genes regulatórios requeridos para essa produção (BARTA et al. 1992; HRABAK; WILLIS, 1992). Por outro lado, alguns

isolados de *P.syringae* pv. *garcae* não produziram tabtoxina ou o produto de amplificação de 1020 em reações de PCR, provavelmente por possíveis deleções na região cromossomal do gene requerido para a produção da tabtoxina. Portanto, no presente estudo, o fato dos isolados, que supostamente deveriam produzir tabtoxina, não terem apresentado os produtos de amplificação, pode ser explicado pela possível deleção na região cromossomal dos genes *tabA* e *tblA* (UFLA 85, Psg CFBP 1634 e Psta), ou apenas na região cromossomal do gene *tabA* (UFLA 89C, UFLA 43 e UFLA 46) e do gene *tblA* (UFLA 98, UFLA 114, UFLA 78 e UFLA 20) (KINSCHERF et al., 1991; ENGST; SHAW, 1992; BARTA et al., 1993; LIU; SHAW, 1997).

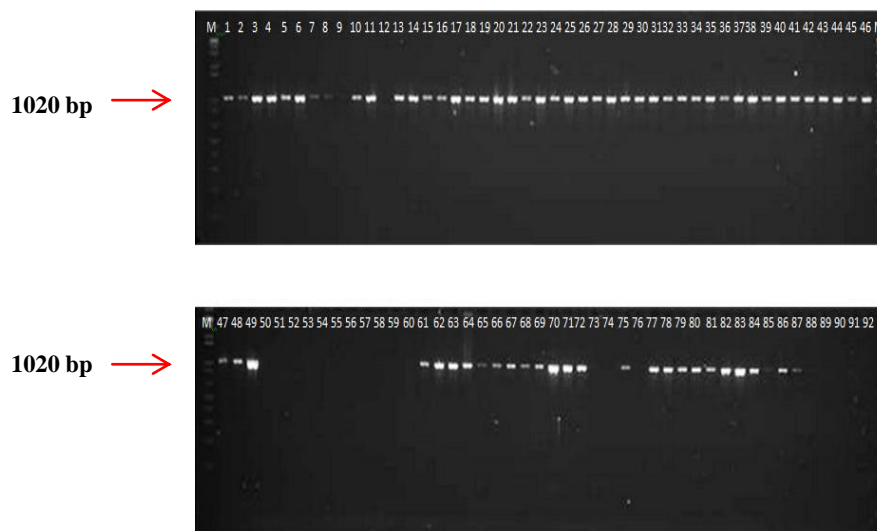


Figura 7 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* *tabA1* e *tabA2*

Nota: (M) Marcador de Peso Molecular 1 Kb, (1)UFLA 53, (2) UFLA 77, (3) UFLA 78, (4) UFLA 79, (5) UFLA 80, (6) UFLA82, (7) UFLA 83, (8) UFLA 84, (9) UFLA 85, (10) UFLA 88, (11) UFLA 89A, (12) UFLA 89C, (13)UFLA 90, (14) UFLA 91A, (15) UFLA 97, (16) UFLA 98, (17) UFLA 101, (18) UFLA 102, (19) UFLA 103, (20)UFLA 104, (21)UFLA 105, (22) UFLA 143, (23) UFLA 106, (24) UFLA 107, (25) UFLA 109, (26) UFLA 112, (27) UFLA 113, (28) UFLA 114, (29) UFLA 116, (30) UFLA 117, (31) UFLA 118, (32) UFLA 121, (33) UFLA 123, (34) UFLA 126, (35) UFLA 127, (36) UFLA 128, (37) UFLA 129, (38) UFLA 130, (39) UFLA 131, (40) UFLA 138, (41) UFLA 139, (42) UFLA 143B, (43) UFLA 154, (44) UFLA 143F, (45) UFLA 150, (46) UFLA 151, (487) UFLA 152, (48) UFLA 153, (49) UFLA 156, (50) Pc UFV, (51) Kit Psg CFBP 1634, (52) Psg CFBP 1634, (53)Kit Pc CFBP 2101, (54) Pc CFBP 2101(55) *Pseudomonas syringae* *pv. helianthi*, (56) *Curtobacterium flaccumfaciens* *pv. flaccumfaciens*, (57) *Xanthomonas campestris* *pv. campestris*, (58) *Pseudomonas syringae* *pv. syringae*, (59) *Pseudomonas syringae* *pv.tabaci*, (60) *Ralstonia solanacearum*, (61) UFLA 122, (62) UFLA 148, (63) UFLA 58, (64) UFLA 59, (65) UFLA 06, (66) UFLA 20, (67) UFLA 21, (68) UFLA 69, (69) UFLA 86, (70) UFLA 87, (71) UFLA 125, (72) UFLA 149, (73) UFLA 136, (74) UFLA 43, (75) UFLA 44, (76) UFLA 46, (77) UFLA 48, (78) UFLA 52, (79) UFLA 54, (80) UFLA 60, (81) UFLA 61, (82) UFLA 115, (83) UFLA 119, (84) UFLA 120, (85) UFLA 132, (86) UFLA 133, (87) UFLA 134, (88) UFLA 142, (89) UFLA 146, (90) UFLA 147, (91) UFLA 135, (92) UFLA 145

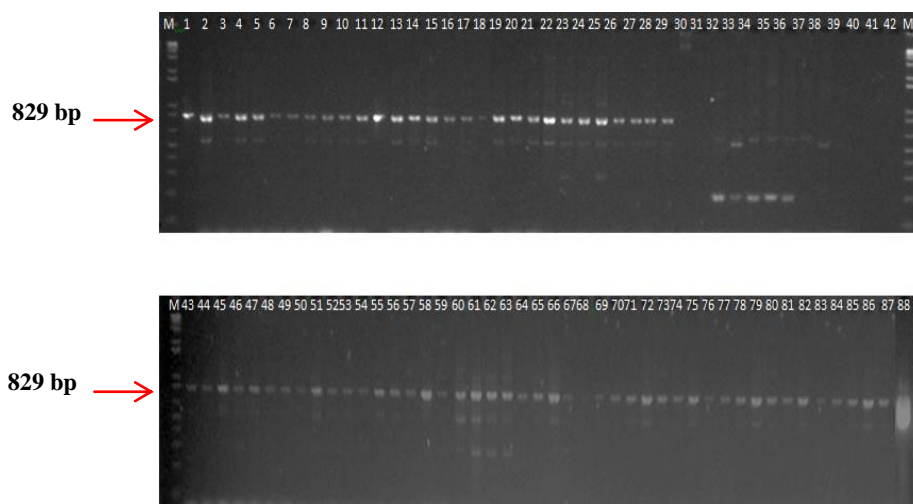


Figura 8 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* *tblA1* e *tblA2*

Nota: (M) Marcador de Peso Molecular 1Kb, (1)miniprep Psta, (2) UFLA 79, (3) UFLA 88, (4) UFLA 77, (5) UFLA 89A, (6) UFLA 90, (7) UFLA 91A, (8) UFLA 97, (9) UFLA 101, (10) UFLA 102, (11) UFLA 104, (12) UFLA 143, (13) UFLA 106 (14) UFLA 107, (15) UFLA 109, (16) UFLA 112, (17) UFLA 113, (18) UFLA 129, (19) UFLA 143B, (20) UFLA 143F, (21) UFLA 156, (22)UFLA 151, (23) UFLA 152, (24) UFLA 153, (25) UFLA 148, (26) UFLA 58, (27) UFLA 59, (28) UFLA 69, (29) UFLA 86, (30) Psta, (31) Pc CFBP 2101, (32) Pc UFV, (33) UFLA 135, (34) UFLA 136, (35) UFLA 145, (36) UFLA 146, (37) UFLA 147, (38) Psg CFBP 1634; (39) UFLA 85, (40) UFLA 98, (41) UFLA 114, (42) UFLA 78, (43) UFLA 83, (44) UFLA 82, (45) UFLA 80, (46) UFLA 84, (47) UFLA 53, (48) UFLA 103, (49) UFLA 105, (50) UFLA 116, (51) UFLA 117, (52)UFLA 118, (53) UFLA 121, (54) UFLA 123, (55) UFLA 126, (56) UFLA 127, (57) UFLA 128, (58) UFLA 130, (59) UFLA 131, (60) UFLA 138, (61) UFLA 139, (62) UFLA 149, (63) UFLA 150, (64) UFLA 154, (65) UFLA 89C, (66) UFLA 122 (67) UFLA 06, (68) UFLA 20, (69) UFLA 21, (70) UFLA 87, (71) UFLA 125, (72) UFLA 142, (73) UFLA 136, (74) UFLA 43, (75) UFLA 44, (76) UFLA 46, (77) UFLA 48, (78) UFLA 52, (79) UFLA 54, (80) UFLA 60, (81) UFLA61, (82) UFLA 115, (83) UFLA 119, (84) UFLA 120, (85) UFLA 132, (86) UFLA 133, (87) UFLA 134, (88) UFLA 129

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Futuramente, deve ser feito o sequenciamento dos produtos de amplificação gerados quando se utilizou o conjunto de *primers* *tabA* e *tblA*, para que seja possível a identificação desses isolados como *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ou *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Além disso, faz-se necessário o desenho de *primers* específicos para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

6 CONCLUSÃO

Os sintomas produzidos em cafeeiro, as características bioquímicas, a BOX-PCR e a PCR com os *primers* PscHrc662F e PscHrc751R permitem a diferenciação dos isolados de *Pseudomonas cichorii* das demais espécies patogênicas ao cafeeiro.

Diferentes espécies bacterianas patogênicas ao cafeeiro produzem sintomas semelhantes.

A técnica de BOX-PCR separa os isolados patogênicos ao cafeeiro em dois grupos, sendo o grupo I formado por isolados de *Pseudomonas cichorii*.

Os testes bioquímicos permitiram identificar os isolados patogênicos ao cafeeiro pertencentes à espécie *Pseudomonas syringae*.

A utilização dos *primers* *tabA* e *tblA* permite identificar os isolados de *Pseudomonas syringae* produtores de tabtoxina.

A técnica BOX-PCR não foi suficiente para a determinação dos patovares de *Pseudomonas syringae* patogênicos ao cafeeiro.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

ALMEIDA, I. M. G. et al. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 339-342, 2009.

ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRICIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em mudas de café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., 2012. 1 CD-ROM.

AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.

ARAKI, H. et al. Presence/absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of América**, Washington, v. 103, n. 15, 5887–5892, Apr. 2006.

ASSIS, M. P. S.; MARIANO, R. L. R. Inoculação de bactéria fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRPE, 2005. p. 67-111.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology: volume 1**. New York: John Wiley, 1992.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods: current protocols in molecular biology**. 3. ed. New York: Greene, 1987.

BARBOSA, J. F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2007. 134 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARTA, T. M. et al. DNA sequence and transcriptional analysis of the *tblA* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 2, p. 458-466, Feb. 1993.

BARTA, T. M. et al. Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 9, p. 3021-3029, May 1992.

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

BERESWILL, S. et al. Identification and relatedness of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2924-2930, Aug. 1994.

CARDOSO, R. M. L.; SERA, T. Obtenção de cultivares de *Coffea arabica* L. com *Garcae* no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983, Oeiras. **Resumos...** Lisboa: CIFC, 1983. p. 417-419.

CARDOSO, R. L.; MOHAN, S. K. Ocorrência e intensidade do cretamento bacteriano causado por *Pseudomonas garcae* em relação a alguns fatores climáticos, no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1980. p. 65-66.

ÇEPNI, E.; GÜREL, F. Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 3, p. 650-656, July 2012.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries.** 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasília: CONAB, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasília: CONAB, 2013.
Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 20 de setembro de 2013.

COSTA, A. S. et al. Bacterial halo blight of coffee in Brazil.
Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, v. 28, p. 427-444, 1957.

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

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies
causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe,
SC. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 149-154, mar./abr. 2012.

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

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, Alemanha, v. 32, n. 3, p. 211-225,
May 2009.

CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; AINSWORTH, T. Development and
evaluation of PCR based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial
spot pathogens of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 4, p. 451-458,
Apr. 2006.

CURRIE, B. J. et al. Using BOX-PCR to exclude a clonal out break of
melioidosis. **BMC Infectious Diseases**, Washington, v. 30, n. 7, p. 68-71, June
2007.

DAWSON, S. L.; FRY, J. C.; DANCER, B. N. A comparative evaluation of five
typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads.
Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 9-22, June
2002.

DESTÉFANO, S. A. L. Bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv.
tabaci in Brazil. **New Disease Reports**, London, v. 59, n. 6, p. 1162-1163, 2010.

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

ENGST, K.; SHAW, P. D. Identification of a lysA-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain PTBR2.024. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, n. 4, p. 322-329, July/Aug. 1992.

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

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 17-21, Oct. 1997.

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.

GONCALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e primers específicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 1, p. 20-27, 2002.

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

HRABAK, E. M.; WILLIS, D. K. The lemA gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on beans a member of a family of two-component regulators. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 9, p. 3011-3020, May 1992.

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

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-pesticidereport.pdf>>. Acesso em 05 jun 2012>.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

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

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

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

KINSCHERF, T. G. et al. A Pathogenicity island a drift Over-production of tabtoxinine-b- lactam by a carnosinase mutant of *Pseudomonas syringae*. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 99., 1999, Chicago. **Proceedings...** Chicago: American Society for Microbiology, 1999. p. 58.

KINSCHERF, T. G. et al. Cloning and expression of the tabtoxin biosynthetic region from *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 3, p. 4124-4132, July 1991.

KLEMENT, Z. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, Londres, v. 199, p. 209-300, July 1964.

LAZO, G. R.; ROFFEY, R.; GABRIEL, D. W. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Flórida, v. 37, n. 3, p. 214-221, July 1987.

LELIS, F. M. V. **Primers development detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum***. 2009. 32 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

LIU, L.; SHAW, P. D. Characterization of *dapB*, a gene required by *Pseudomonas syringae*pv. *tabaci* BR2.024 for lysine- and tabtoxinine- b-lactam biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 507-513, 1997.

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

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJIN, F. J. de. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, Sept. 1999.

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

MACIEL, K. W. **Caracterização de linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro**. 2013. 55 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico da Agência Paulista da Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, nesp., p. 9-88, 2008.

MARIANO, R. L. R. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Ed.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 67-111.

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

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

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

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

MORAES, S.A.; SUGIMORI, M.H.; TOMAZELLO FILHO, M.; CARVALHO, P. C. T. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 1., 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1974. p. 183.

MORELLI, P. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from Italian cystic fibrosis patients. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Barcelona, v. 1, p. 19–22 Apr. 2008.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of coffee in comprehensive natural products II: chemistry and biology, **Citeulike**, Illy, May 2010. Disponível em: <<http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy/>>. Acesso em: 13 abr. 2013.

OLIVE, M. D.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661–1669, June 1999.

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

ONFROY, C. et al. Cultural, molecular and pathogenic variability of *Mycosphaella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* isolates from dried pea (*Pisum sativum*) in France. **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 48, p. 218- 229, 1999.

PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LOPEZ, M. M. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria updated review of protocols (1989-2007). **Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 91, n. 2, p. 249-97, June 2009.

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

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

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. S119, 2010.

PAUWELYN, E. et al. Epidemiology of *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of lettuce midrib rot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 4, p. 298-305, 2011.

RADEMAKER, J. L. W.; BRUJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA markers: protocol application and overviews**. New York: John Wiley, 1997. p. 51-71.

RAMOS, A. H.; SHAVDIA, L. D. A dieback of coffee in Kenya. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 60, n. 10, p. 831-835, 1976. resistência simultânea a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Pseudomonas syringae* pv.

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

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

RODRIGUES NETO, J. et al. 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, Jan./Dec. 1981.

RODRIGUES, L. M. R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agronômico, 2013. (Série Tecnologia Apta. Boletim técnico IAC, 212).

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

ROMMEL, C. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V. V. Detecção de bactérias associadas a gemas de pereiras europeias no Rio Grande do Sul. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 360-367, nov./dez. 2010.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato Archives of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.

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

SERA, G. H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agronômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 974-977, set./out. 2004.

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

SORENSEN, K. N.; KIM, K.; TAKEMOTO, J. Y. PCR detection of cyclic lipodepsinona peptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 1, p. 226-230, 1998.

STEAD, D. E. et al. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid accurate identification of plant pathogenic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 315-371, Apr. 1992.

STEAD, D. E.; HENMESSY, J.; WILSON, J. Modern methods for identifying bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 1-2, p. 17-25, 1998.

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

SYRMIS, M. W. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element based PCR assays. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 53, n. 11, p. 1089–1096, Nov. 2004.

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

VAN ZYL, E.; STEYN, P. L. Differentiation of phitopathogenic *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas* and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 13, n. 1, p. 60-71, Mar. 1990.

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

WEINGART, H; VOLKSCH, B. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, n. 8-9, p. 339-345, 1997.

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

WOLSKA, K. et al. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Palo Alto, v. 49, n. 4, p. 734–738, 2011.

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

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

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

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

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