



**VITÓRIA MORENO TEDARDI**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES E PATOVARES DE *Pseudomonas*  
CAUSADORAS DE LESÕES FOLIARES EM CAFEIEIRO  
EMPREGANDO *primers* ESPECÍFICOS**

**LAVRAS – MG  
2019**

**VITÓRIA MORENO TEDARDI**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES E PATOVARES DE *Pseudomonas* CAUSADORAS DE  
LESÕES FOLIARES EM CAFEIRO EMPREGANDO *primers* ESPECÍFICOS**

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

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Tedardi, Vitória Moreno.

Detecção de espécies e patovares de *Pseudomonas* causadoras  
de lesões foliares em cafeeiro empregando *primers* específicos /  
Vitória Moreno Tedardi. - 2019.

48 p. : il.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*;  
*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; *Pseudomonas cichorii*. 3. *rpoD*;  
*hrpS*. I. de Souza, Ricardo Magela. II. Título.

**VITÓRIA MORENO TEDARDI**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES E PATOVARES DE *Pseudomonas* CAUSADORAS DE  
LESÕES FOLIARES EM CAFEIRO EMPREGANDO *primers* ESPECÍFICOS**

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

APROVADA em 01 de agosto de 2019.

Dra. Antônia dos Reis Figueira  
Dra. Gláucia Mara Moreira

UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

*Aos meus pais,  
Vanete Aparecida Moreno e Maurílio dos Santos Tedardi (in memoriam);  
aos meus irmãos, Rodolfo Moreno Tedardi e Laura Valente Tedardi.*

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por me iluminar e dar forças durante essa jornada.

À minha mãe Vanete, ao meu pai Maurílio e aos meus irmãos Rodolfo e Laura, por todo amor, incentivo e compreensão que foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui. À minha família, meus queridos avós, tios e primos, que sempre torceram por mim.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade concedida para realização do curso de Mestrado.

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

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

À professora Pós-Dr<sup>a</sup> Antônia dos Reis Figueira, pelas sugestões e por disponibilizar equipamentos do seu laboratório para realização dos trabalhos.

À Pós-Dr<sup>a</sup> Sarah da Silva Costa Guimarães, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Ao professor Dr. Jorge Teodoro de Souza, pela atenção e auxílio em etapas do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Ana Maria, Bruna, Moysa, Sandra, Sílvia, Aline, Fernanda, Tarcísio e Rafael pela amizade e convivência.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Sérgio, Franciely, Thalyta, e Mirelly, pelo auxílio, colaboração no trabalho e amizade.

Ao meu namorado Victor, que sempre esteve ao meu lado, pelo amor, carinho e apoio nos momentos de dificuldade.

Aos demais amigos e pesquisadores do DFP, colegas de departamento que me auxiliaram, compartilharam seus conhecimentos que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

**MUITO OBRIGADA!**

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

*(Esopo)*

## RESUMO

A mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg), é a principal doença de etiologia bacteriana do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no Brasil. Além desta bacteriose, ocorrem a mancha bacteriana causada por (*P. syringae* pv. *tabaci* - Psta), o crestamento bacteriano (*P. cichorii* - Pc) e a mancha escura (*Burkholderia andropogonis* - Ba). O diagnóstico dessas doenças é problemático, pois é baseado em sintomas e testes bioquímicos que não são suficientes para a identificação dos patógenos aos níveis de espécie e patovar. Além disso, não existem ainda descritos na literatura *primers* específicos para a detecção de Psg. Sendo assim, o objetivo com este trabalho foi desenhar *primers* específicos para detecção de Psg e *primers* para detecção simultânea de Psg, Psta e Pc. Os *primers* foram desenhados com base no alinhamento de sequências do gene *rpoD*, que codifica a RNA polimerase, e *hrpS*. A especificidade dos *primers* foi testada utilizando a PCR convencional, com amostras de DNA extraídos de Psg, Psta, Pc, além de isolados representativos de outros gêneros e espécies bacterianas. A sensibilidade foi avaliada por meio da determinação da concentração do DNA genômico das bactérias em NanoDrop 2000 e sua diluição seriada (100 ng, 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg). Os *primers* foram validados em folhas de cafeeiros doentes coletadas no município de Lavras e em folhas de mudas de cafeeiro Catuaí Vermelho 144 inoculadas artificialmente. As amostras foram submetidas ao teste de exsudação em gotas e utilizadas na Bio-PCR. Os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 amplificaram uma única banda de 287 pb apenas para o isolado de Psg e apresentaram sensibilidade da reação de PCR de até 100 pg. O conjunto PsgRpod F1/PgtcRpod R1 amplificou fragmentos de 170 pb, 1400 pb e 250 pb para Psg, Psta e Pc respectivamente, enquanto que a sensibilidade da reação de PCR para as três bactérias foi de até 1 ng. A utilização da técnica de Bio-PCR permitiu identificar as amostras de folhas de cafeeiro infectadas com Psg, tanto de mudas inoculadas como do campo, quando testadas com os dois pares de *primers* desenhados nesse estudo. O conjunto PsgRpod F1/PsgRpod R2 demonstrou ser específico para identificação de Psg e foi capaz de detectar todos os isolados de Psg testados. O par PsgRpod F1/PgtcRpod R1, possibilitou a detecção simultânea das bactérias do gênero *Pseudomonas* causadoras de lesões foliares em cafeeiro. A diferenciação de Psg, Psta e Pc é importante para o monitoramento epidemiológico das doenças causadas por essas bactérias nas regiões produtoras de café, visto que frequentemente são confundidas no diagnóstico devido à similaridade dos sintomas.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Pseudomonas cichorii*. *rpoD*. *hrpS*.



## ABSTRACT

The bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg), is the main bacterial disease of coffee (*Coffea arabica* L.) in Brazil. In addition to this bacteriosis, the bacterial leaf spot (*P. syringae* pv. *tabaci* - Psta), the bacterial leaf blight (*P. cichorii* - Pc) and the dark spot (*Burkholderia andropogonis* - Ba) occur. The diagnosis of these diseases is problematic, because it is based on symptom and biochemical tests that are not enough to identify pathogens at species and patovar levels. In addition, there are no studies described in the literature of specific primers for the detection of Psg. The objective of this work was to design specific primers for detection of Psg and primers for simultaneous detection of Psg, Psta and Pc. The primers were designed based on the sequence alignment of the *rpoD* gene, that encoding RNA polymerase, and *hrpS*. Primers specificity was tested using conventional PCR, with DNA samples extracted from Psg, Psta, Pc, as well as isolates representative of other genera and bacterial species. The sensitivity was evaluated by determination of concentration of bacterial genomic DNA in NanoDrop 2000 and its serial dilution (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, and 1 fg). The primers were validated in diseased coffee leaves collected in the city of Lavras and in artificially inoculated Catuaí Vermelho 144 coffee seedling leaves. The samples were submitted to the exudation test and used in Bio-PCR. The PsgRpod F1/PsgRpod R2 primers amplified a single 287 bp band only for the Psg isolate and showed PCR reaction sensitivity of up to 100 pg. The PsgRpod F1/PgtcRpod R1 primers amplified 170 bp, 1400 bp and 250 bp fragments for Psg, Psta and Pc respectively, while the PCR reaction sensitivity for the three bacteria was up to 1 ng. Using the Bio-PCR technique, it was possible to identify Psg infected coffee leaf samples from both inoculated and field seedlings when tested with the two primer pairs designed in this study. The PsgRpod F1/PsgRpod R2 primers demonstrated to be specific for Psg identification and were able to detect all Psg isolates tested. The pair PsgRpod F1/PgtcRpod R1, made possible the simultaneous detection of bacteria of the genus *Pseudomonas* that cause leaf spots in coffee. The differentiation of Psg, Psta and Pc is important for the epidemiological monitoring of diseases caused by these bacteria in coffee producing regions, as they are often misdiagnosed due to similarity of symptoms.

**Key words:** *Coffea arabica*. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Pseudomonas cichorii*. *rpoD*. *hrpS*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 A importância econômica do café .....	14
2.2 Mancha aureolada do cafeeiro .....	14
2.2.1 Histórico .....	14
2.2.2 Etiologia .....	15
2.2.3 Processo infeccioso e sintomatologia.....	16
2.2.4 Epidemiologia .....	16
2.2.5 Manejo.....	17
2.3 Outras bacterioses em cafeeiro .....	18
2.4 Identificação molecular de bactérias fitopatogênicas .....	21
2.5 Detecção de bactérias causadoras de lesões foliares em cafeeiro.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Isolados avaliados .....	24
3.2 Desenho de <i>primers</i> .....	26
3.3 Extração do DNA genômico dos isolados .....	26
3.4 Otimização da PCR.....	27
3.5 Teste de especificidade .....	27
3.6 Teste de sensibilidade .....	27
3.7 Validação do protocolo de PCR em folhas de cafeeiro .....	28
4 RESULTADOS .....	29
4.1 Seleção, especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> .....	29
4.2 Detecção de bactérias causadoras de manchas foliares em folha de cafeeiro.....	35
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o maior exportador mundial de café e ocupa a segunda posição no consumo dessa bebida, com uma produção estimada de 50,92 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado em 2019 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019). No entanto, a cafeicultura enfrenta grandes desafios para aumentar a produção de forma sustentável e obter produtos de alta qualidade, tais como condições climáticas adversas, exigências nutricionais, pragas e doenças que contribuem para a redução do rendimento e produtividade da cultura. Entre as doenças que afetam o cafeeiro ocorrem as de etiologia bacteriana, como a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg) (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii* (Pc) (ROBBS et al., 1974), a mancha foliar bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Psta) (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010), a mancha escura, causada por *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*) (RODRIGUES NETO et al., 1981) e a atrofia dos ramos do cafeeiro, causada por *Xylella fastidiosa* (PARADELA FILHO et al., 1995).

Nos últimos anos a mancha aureolada, que anteriormente não era considerada uma doença de importância econômica, vem causando sérios prejuízos nas regiões produtoras de cafeeiro, afetando tanto a condução de lavouras quanto os viveiros de mudas. Isso ocorre em razão da sua rápida disseminação, difícil controle e epidemias. A disseminação da bactéria a longas distâncias ocorre principalmente por mudas infectadas e, a curtas distâncias, pela ação de respingos de chuvas, ventos, granizos e ferimentos decorrentes de tratamentos culturais. Os sintomas nas folhas são manchas de coloração pardo-escura, formato irregular, envolvidas por um halo amarelado, na qual a área necrosada normalmente se rompe, permanecendo um furo no centro da mancha, enquanto que nos ramos pode ocorrer necrose e seca. A diagnose dessa doença, baseada nos sintomas apresentados pelo cafeeiro, é complexa, pois pode ser facilmente confundida com outras bacterioses causadoras de manchas foliares (COSTA; SILVA, 1960; RODRIGUES et al., 2013; ZAMBOLIM et al., 2018).

A diferenciação das espécies de bactérias supracitadas, especialmente de patovares de *Pseudomonas*, nem sempre é simples devido à semelhança das características bioquímicas e morfológicas das colônias (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001). Porém a discriminação das espécies de *Pseudomonas* pode ser feita por meio de isolamento em meios de cultura, testes de patogenicidade e alguns testes bioquímicos e fisiológicos, como o LOPAT e a utilização de L-trigoneline, L (+) tartarato e

lactato, bem como a produção de pectato liase. Esses quatro últimos testes permitem diferenciar os patovares de *P. syringae garcae* e *tabaci* (YOUNG; TRIGGS, 1994). Os testes bioquímicos apresentam um fator limitante, demandando aproximadamente 30 dias para a obtenção dos resultados, além de não serem práticos para um grande número de amostras. Uma das alternativas para diferenciar e identificar essas espécies e patovares causadoras de manchas foliares no cafeeiro de forma rápida, precisa e com alto nível de sensibilidade é a utilização de *primers* específicos em reação em cadeia da polimerase (PCR) (GONÇALVES; ROSATO, 2002).

Na literatura, são encontrados *primers* específicos para detecção molecular de *P. cichorii* (COTTYN et al., 2011). Os *primers* para detecção de bactérias produtoras de tabtoxinas são baseados nas sequências de genes responsáveis pela sua produção e, portanto, não discriminam as espécies produtoras dessa toxina, como *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* em cafeeiro (LYDON; PATTERSON, 2001). Rodrigues et al. (2017) detectaram infecções mistas de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* na mesma planta, em cafeeiros da cidade de Cascavel, no Paraná. A identificação correta dessas manchas foliares bacterianas é importante do ponto de vista epidemiológico, considerando que o café é o único hospedeiro natural de *P. syringae* pv. *garcae* (KIMURA et al., 1973) e *P. syringae* pv. *tabaci* tem uma ampla gama de hospedeiros (BRADBURY, 1986). O fato de hospedeiras de *P. syringae* pv. *tabaci* serem cultivadas em consórcio com o café, aliado a ocorrência do diagnóstico incorreto dessas bactérias devido à similaridade entre os sintomas, demonstra que essas doenças podem ser amplamente disseminadas.

Estudos filogenéticos utilizando o *locus* 16S rDNA e sequências de genes *housekeeping*, mostraram que estes foram mais eficazes na classificação e identificação de espécies e patovares de bactérias do gênero *Pseudomonas* (MULET et al., 2010). Portanto, sequências de genes *housekeeping*, como do gene *rpoD*, apresentam polimorfismo suficiente para discriminação de espécies do gênero *Pseudomonas* (RAIMUNDI, 2017) e podem ser utilizados para o desenho de *primers* específicos. A seleção do gene *rpoD* para o desenho de *primers* específicos para *P. syringae* pv. *garcae*, baseou-se empiricamente em estudos bem sucedidos realizados com *Pseudomonas* (MULET et al., 2010), com os patovares de *P. syringae* (PARKINSON et al., 2011) e com os patovares de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro (RAIMUNDI, 2017).

Os genes *hrp/avr* são considerados existentes em todos os patovares de *P. syringae* e está envolvido na patogenicidade e na determinação do intervalo de hospedeiros (GOPALAN; HE, 1996; BAKER et al., 1997). Entre esses genes, alguns estão envolvidos nos processos

fundamentais como controle da expressão gênica e eliminação de produtos de genes de uma estrutura chamada “*hrp gene cluster*” no genoma (SAWADA et al., 1999). O *hrpS* foi selecionado para representar esses genes relacionados à patogenicidade no desenho de *primers*.

Desse modo, objetivou-se com este trabalho o desenho de *primers* específicos, a partir de sequências de genes, para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e de *primers* para a detecção simultânea de espécies de *Pseudomonas* patogênicas ao cafeeiro. Assim, os *primers* desenhados neste trabalho possibilitarão a correta identificação e diferenciação dessas bactérias causadoras de manchas foliares em cafeeiro.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A importância econômica do café**

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor da bebida no mundo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), a safra brasileira em 2019 foi estimada em 50,92 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, somando-se as espécies arábica e conilon cultivadas em Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso, Amazonas e Pará. O café é o quinto produto na pauta de exportação e a produção ocupa uma área de dois milhões de hectares com cerca de 300 mil produtores, em aproximadamente 1.900 municípios (MAPA, 2018).

O país abrange o maior programa mundial de pesquisas em café, desenvolvidas anualmente pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café, coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa e contempla cerca de 50 instituições de ensino, pesquisa e extensão rural para fomentar a pesquisa cafeeira no país. Os avanços significativos na cafeicultura se devem aos pesados investimentos em áreas importantes, como o melhoramento genético, manejo de pragas e doenças, irrigação, qualidade da produção, biotecnologia, com preocupação na sustentabilidade econômica e preservação ambiental (MAPA, 2018).

Atualmente, o café é relevante fonte de receita para centenas de municípios, além de ser um importante setor na criação de postos de trabalho na agropecuária nacional. O expressivo desempenho da exportação e do consumo interno confere sustentabilidade econômica ao produtor e sua atividade (MAPA, 2018).

### **2.2 Mancha aureolada do cafeeiro**

#### **2.2.1 Histórico**

A mancha aureolada foi descrita no Brasil pela primeira vez em 1956, no município de Garça, no Estado de São Paulo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Durante os anos seguintes, não foi considerada uma doença de importância econômica (COSTA; SILVA, 1960), pois foram relatados apenas casos isolados. Na década de 70, foram observadas altas incidências nos viveiros do Instituto Agrônomo de Campinas e em lavouras no Estado do

Paraná, que se recuperavam da ocorrência da geada de 1975 (KIMURA et al., 1973; MOHAN, 1976). Essa doença é considerada preocupante em regiões mais frias, expostas ao vento, com lavouras em formação ou recém-podadas e em viveiros.

A partir de 2010, a mancha aureolada passou a ser considerada de grande importância na cafeicultura, por se tornar fator limitante para a produção de em algumas regiões. Há relatos da sua ocorrência em viveiros de café nos estados do Paraná, São Paulo e em Minas Gerais, especialmente no Sul, Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba (SERA et al., 2002; SERA et al., 2004; PATRÍCIO et al., 2010; ZOCCOLI et al., 2011; RAIMUNDI, 2014). Já foi detectada também no Quênia, onde está em rápida expansão (JANSEN, 2005; ITHIRU et al., 2013), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997), Uganda e China (CHEN, 2002).

### 2.2.2 Etiologia

A doença é causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), pertence ao filo Proteobactéria, classe Gamma Proteobactéria, ordem Pseudomonadales e família Pseudomonadaceae (MOORE et al., 2006). É uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita e apresenta células em formato de bastonetes retos ou levemente curvos, com medidas que variam de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e 1,5 a 4,0 µm de comprimento que se locomovem utilizando um ou vários flagelos polares (AGRIOS, 2005; FERREIRA; SALGADO, 1995). Quando cultivados em meio de cultura King B (KING; WARD; RANEY, 1954), os isolados produzem pouca quantidade de pigmento fluorescente e, em meios de cultura como batata dextrose ágar (BDA) e nutriente ágar (NA), produzem pigmento marrom, denominado melanina (BARTA; WILLIS, 2005), ao contrário dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* provenientes do Quênia, que produzem pigmento amarelo fluorescente em meio KB (KAIRU, 1997).

A bactéria enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (levana + oxidase + podridão em batata + arginina + hipersensibilidade em fumo) é positiva para levana e induz hipersensibilidade em fumo; é negativa para oxidase, podridão em discos de batata e arginina di-hidrolase. Hidrolisa gelatina e não acumula poli- β- hidroxi- butirato (PHB). Utiliza ramnose, trealose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, celobiose, sacarose, inositol, D-quinato, manitol, L- ascorbato, *meso*-inositol, D-xylose e triacetina e não utiliza adonitol, trigonelina, lactose, L(+) tartarato, D (-) tartarato, DL-lactato, DL-homoserina, α-lecitina,

linolenato, L-malato, L-histidina (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001; BARTA; WILLIS, 2005).

### **2.2.3 Processo infeccioso e sintomatologia**

A bactéria inicia o processo infeccioso após alcançar os órgãos vegetativos da planta de café, principalmente as folhas e, juntamente com a presença de água livre, as células bacterianas penetram por aberturas naturais ou por ferimentos (KIMATI et al., 2005) causados por ocasião dos tratos culturais, pela fricção entre folhas, pela abrasão de grãos de areia levados pelo vento ou ainda pela própria ação do vento, provocando microfissuras (RODRIGUES et al., 2013). Lesões nas folhas e ramos provocados pelo bicho mineiro, pela mancha de olho pardo, mancha de *Phoma* e de *Ascochyta* podem também facilitar a penetração da bactéria, em campo ou em viveiros de café (ZAMBOLIM, 2018).

Os sintomas ocorrem nas folhas, frutos novos e extremidade de ramos em crescimento. Nas folhas mais velhas são observadas manchas de coloração pardo-escura, formato irregular, envolvidas por um grande halo amarelo. A área necrosada normalmente se rompe, permanecendo um furo no centro da mancha. A auréola amarela, característica da doença, não pode ser notada em lesões de folhas novas, apenas a transparência das lesões nas folhas atacadas, quando observadas contra a luz. Na época do florescimento ou de frutos novos verifica-se necrose nos restos de flores e folhas. Em viveiros, a doença causa queima das folhas e necrose dos tecidos jovens, enquanto nas lavouras provoca desfolha e seca dos ramos laterais (ZAMBOLIM, 2018).

De acordo com Oliveira e Romeiro (1990) a mancha aureolada incide com maior severidade em folhas e brotações novas do que em folhas adultas. A severidade da doença é influenciada pela idade fisiológica das plantas, pois a estrutura mais tenra das folhas novas favorece a penetração dos patógenos e a presença de compostos de defesa em folhas velhas condiciona maior resistência.

### **2.2.4 Epidemiologia**

As condições de alta precipitação pluviométrica, temperaturas amenas, injúria mecânica ou lavouras situadas em maiores altitudes, desprotegidas da ação do vento, favorecem a ocorrência da doença (POZZA et al., 2010; ZAMBOLIM, 2018).



A bactéria coloniza os espaços intra e intercelulares, utiliza os exsudatos celulares como substrato e migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas deixando para trás o tecido necrosado, que fica circundado por halo amarelado, devido à liberação de toxinas pela bactéria. As células bacterianas presentes nas lesões são disseminadas de folha para folha ou para plantas vizinhas através da água ou carregadas pelo vento. Em períodos de menor índice pluviométrico ocorre diminuição da incidência da bactéria, pela ausência da água para sua disseminação (RODRIGUES et al., 2013).

O patógeno sobrevive principalmente na face inferior das folhas do cafeeiro como epífita, ou seja, sem causar doença, bem como, em restos de cultura presentes no solo, até que o próximo período chuvoso proporcione condições ideais para novas infecções (ROBBS, 1978; ZOCCOLI et al., 2011).

A disseminação da bactéria ocorre dentro da planta e de planta para planta pela ação de respingos de chuvas, chuvas finas e de granizo, que causam ferimentos que funcionam como portas de entrada para a bactéria. Do mesmo modo, as faces das plantas não expostas ao sol permanecem durante períodos mais longos com as folhas molhadas, favorecendo o processo de infecção. A doença pode incidir nas plantas de outubro a janeiro e de abril a julho e pode variar com a região e as condições climáticas (RODRIGUES et al., 2013; ZAMBOLIM, 2018).

### **2.2.5 Manejo**

As bactérias constituem um grupo de microrganismos de difícil controle e, portanto, o manejo deve se basear em medidas preventivas, a fim de se evitar sua entrada na lavoura e dificultar a sua disseminação em locais nos quais já foram detectadas. Para medidas culturais de controle da mancha aureolada, são recomendados a eliminação de mudas infectadas com a doença em viveiros, o plantio de mudas oriundas de viveiros reconhecidamente isentos da bactéria, para se evitar a contaminação da área, além de adubação equilibrada em cafezais novos ou recém-podados. É importante a formação de quebra-ventos ao redor da lavoura, para interferir na velocidade do vento, que é uma das principais formas de disseminação do patógeno (RODRIGUES et al., 2013).

O manejo químico da mancha aureolada é complexo e nem sempre eficiente (RODRIGUES et al., 2013). Em mudas é recomendado aplicações quinzenais de produtos contendo como princípio ativo o antibiótico cloridrato de casugamicina (300 mL/100L água), podendo ser intercaladas com pulverizações com oxicloreto de cobre (0,3%), para se evitar a

seleção e proliferação de linhagens resistentes da bactéria ao antibiótico (PARADELA et al., 2000). No entanto, o mesmo não é recomendado para pulverizações em campo, restando apenas um princípio ativo, do grupo dos cúpricos, para a utilização do produtor. Experimentos realizados por Patrício et al. (2008) alertaram que o controle da mancha aureolada com cloridrato de casugamicina ou oxicleto de cobre deve ser iniciado antecipadamente ao período chuvoso, para a maior proteção das plantas, resultando em menores índices de infecção pela bactéria.

O controle de doenças bacterianas com a utilização de cultivares resistentes é a medida com melhor custo-benefício para o produtor. Plantas resistentes apresentam menores níveis de infecção, proporcionando as vantagens de menor agressão ao meio ambiente pela diminuição do uso de produtos fitossanitários, reduzindo os custos de produção (RODRIGUES et al., 2013).

Moraes et al. (1974) identificaram que o fator genético Sh1, em *C. arabica*, observado nos cafés Harar, Dilla e Alghe, S12 Kaffa e Geisha, originados da Etiópia, confere resistência específica a determinadas raças de *Hemileia vastatrix* e também à bactéria *P. syringae* pv. *garcae*. Mohan et al. (1978) e Cardoso e Sera (1983) observaram variabilidade genética para resistência à mancha aureolada entre progênies derivadas do cruzamento "Caturra" x "Híbrido de Timor", concluindo que existem outros fatores além do gene Sh1 que também conferem resistência à mancha aureolada.

Estudos de resistência genética em cultivares de café a *P. syringae* pv. *garcae* revelaram que 'IPR 102' apresenta resistência completa e 'IPR 103', 'IPR 104', 'IPR 108' e 'IPR 59' apresentam resistência parcial (ITO et al., 2008), enquanto que as cultivares Mundo Novo, Catuaí e Bourbon são suscetíveis (MORAES et al., 1974; MOHAN et al., 1978; CARDOSO; SERA, 1983).

### **2.3 Outras bacterioses em cafeeiro**

Outras doenças de etiologia bacteriana já foram descritas no cafeeiro e também ocasionam sintomas de manchas foliares em viveiro e/ou campo, tais como o crestamento bacteriano, *Pseudomonas cichorii* (ROBBS et al., 1974) a mancha bacteriana, *P. syringae* pv. *tabaci* (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010) e a mancha escura *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*) (RODRIGUES NETO et al., 1981).

*Pseudomonas cichorii* foi observada pela primeira vez no Brasil por Robbs et al. (1974), ocorrendo em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais e, posteriormente, foi

detectada em viveiro, no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2012). Os sintomas característicos do crestamento bacteriano são áreas de coloração enegrecida, de formato irregular, com aspecto de encharcamento, que evoluem e provocam intenso desfolhamento em mudas de café (ROBBS et al., 1974; KIMURA et al., 1976).

*Pseudomonas cichorii* já foi detectada em diversas plantas como alface (ALMEIDA et al., 1999), girassol (ROBBS; ALMEIRA, 1981), mandioquinha-salsa (BERIAM et al., 1998a), melão (BERIAM et al., 1998b), calêndula (BERIAM et al., 2001), crisântemo (RODRIGUES NETO et al., 1976), almeirão, açafrão, berinjela, beterraba, brócolis, calêndula, cebola, cenoura, couve, corda de viola, dahlia, escarola, eucalipto, falsa-serralha, feijão, fumo, gérbera, inhame, mamona, manjeriço, pimentão, quiabo, rabanete, salsa, salsão e violeta (MALAVOLTA JR. et al., 2007). Diferencia-se da espécie *P. syringae* por se tratar de uma bactéria fluorescente do Grupo I rRNA; é Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato bastonete, com um tufo de flagelos polares; resultados negativos para produção de levana em meio de cultura nutriente-sacarose-ágar (NSA); a dihidrólise de arginina e a reação em discos de batata são negativos; a oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo são positivos, colocando este organismo no Grupo III de Lelliot (BRADBURY, 1986). Apresenta resultados negativos para nucleação de gelo e acúmulo de poli ( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB). Utiliza manitol, 2-ketogluconato, meso-tartarato, D(-) aspartato e não utiliza eritritol, adonitol, lactose, benzoato, geraniol, celobiose, sorbitol, sacarose, D(-)-tartarato, D-arabinose, L-ramnose e trealose (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981, YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD et al., 2001).

Atualmente a identificação de *P. cichorii* é feita através da PCR utilizando *primers* específicos, desenvolvidos a partir de genes conservados *hrcRST*, correspondentes à região de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade de *P. cichorii* isolados de alface (COTTYN et al., 2011).

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, causadora da mancha bacteriana do cafeeiro, foi observada em viveiros de café no Estado de São Paulo por Rodrigues Neto et al. (2006) e Destéfano et al. (2010), em lavouras de café no Estado do Paraná por Rodrigues et al. (2016) e no Estado de Minas Gerais por Raimundi (2017). O patovar *tabaci*, originalmente descrito como afetando *Nicotiana tabacum* L., já foi detectado em mais de 17 hospedeiros naturais de diversas famílias botânicas no Brasil como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e mamão (*Carica papaya* L.), sendo também relatado em plantas daninhas como *Ipomoea acuminata* L., *I. aristolochiaefolia* e *I. cynanchifolia*

(MALAVOLTA JR. et al., 2008). Possivelmente alguns desses hospedeiros atuem como uma fonte de inóculo primário para o café, pois geralmente são plantados em consórcio.

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

Os sintomas causados por *P. syringae* pv. *tabaci* são extremamente semelhantes aos causados por *P. syringae* pv. *garcae*. As folhas apresentam manchas de coloração pardo-escura circundadas por halo amarelado. Em poucos dias essas lesões coalescem, necrosam e causa a morte das folhas (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010). A diferenciação entre essas duas bactérias tem sido realizada apenas através de testes bioquímicos, com a utilização dos açúcares trigonelina e L(+) tartarato pelo patovar *tabaci*, os quais não são utilizados pelo patovar *garcae* (RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001). Os *primers* para detecção dessa bactéria são baseados nas sequências de genes produtores de tabtoxina e, portanto, não discriminam as espécies produtoras dessa toxina, como *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* em cafeeiro (LYDON; PATTERSON, 2001).

A tabtoxina é uma  $\beta$ -lactama monocíclica produzida por *P. syringae* pv. *tabaci*, *coronafaciens* e *garcae* (MITCHELL, 1991). A tabtoxina- $\beta$ -lactama (T $\beta$ L) inibe irreversivelmente a glutamina sintetase, resultando na diminuição dos níveis de glutamina e o acúmulo de amônia nos tecidos da planta. Uma variedade de efeitos nocivos foi atribuída à amônia nas plantas, incluindo a ruptura da membrana tilacóide do cloroplasto e o desacoplamento da fotofosforilação. As consequências são o bloqueio da fotossíntese, clorose e redução da capacidade de defesa das plantas (BENDER et al., 1999).

Embora isolados de *P. syringae* pv. *garcae* sejam produtores de tabtoxina, alguns deles demonstraram não produzir tabtoxina ou produzem em menores quantidades. A toxina não é essencial para a patogenicidade, mas fornece o aumento da virulência de algumas linhagens e também o movimento das bactérias nos tecidos da planta (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

*Burkholderia andropogonis*, causadora da mancha escura bacteriana, foi relatada em 1979 em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí amarelo (RODRIGUES NETO et al., 1981). Os sintomas são observados nas folhas por meio de manchas arredondadas, de coloração marrom escura, com centro necrótico e circundadas por halo clorótico. A bactéria é Gram-negativa, as

colônias apresentam coloração creme, crescimento lento e não são fluorescentes. Nos testes LOPAT apresenta resultados negativos, confirmando não pertencer ao grupo das bactérias produtoras de pigmentos fluorescentes (LELLIOTT et al., 1966).

Morfologicamente, *P. syringae* pv. *garcae* e *B. andropogonis* são facilmente diferenciáveis em meio de cultura e *B. andropogonis* não é fluorescente sob luz ultravioleta quando cultivada em meio KingB.

## 2.4 Identificação molecular de bactérias fitopatogênicas

Com a evolução dos conhecimentos e tecnologias no decorrer dos anos, foi possível elucidar a estrutura do DNA. Assim, surgiu uma era mais objetiva de taxonomia com a identificação e classificação dos microrganismos (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJIN, 1999).

Os primeiros estudos filogenéticos do gênero *Pseudomonas* utilizaram apenas o gene 16S rRNA (MOORE et al., 1996; ANZAI et al., 2000). Embora esta seja uma poderosa ferramenta para discriminação de gênero, não possui polimorfismo suficiente para a discriminação ao nível patovar (YAMAMOTO et al., 2000). Portanto, são necessárias análises filogenéticas de regiões gênicas adicionais para diferenciar e identificar patovares.

Muitos argumentos apoiam a utilização de genes *housekeepings* (KONSTANTINIDIS et al., 2006) para estudos filogenéticos, visto que eles são uma classe altamente expressa, altamente conservada e genes codificadores de proteínas que exibem alto grau de viés de códon. Esses genes são constituintes do genoma bacteriano, os quais codificam proteínas essenciais para a bactéria (FIGUEIRA et al., 2011; MARTINO et al., 2011).

A seleção dos genes a serem estudados pode ser visualizada sob dois pontos de vista. Uma possibilidade é procurar genes distribuídos universalmente que estão presentes em todas as bactérias; outra é selecionar um conjunto de genes que podem ser usados em todos os isolados de uma espécie, gênero ou família. A razão por trás desse pensamento é que os genes que são informativos para um determinado gênero ou família podem não ser úteis ou presentes em outras taxa (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005a; GEVERS; COENYE, 2007).

Mulet et al. (2010) analisaram sequências parciais de quatro genes (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*) para entender a relação filogenética dentro do complexo *Pseudomonas*. Entre os genes testados, o *rpoD* foi o gene mais discriminante, seguido por *gyrB*, *rpoB* e o gene 16S rRNA. Verificou-se que este gene é ortólogo, ou seja, oriundo de processo de especiação de *P. syringae* e que esse não se originou de um processo de transferência horizontal de gene ou

por evento de duplicações gênicas. Os autores Parkinson et al. (2011) estudaram a diversidade e filogenia dentro do complexo *P. syringae*, na qual utilizaram o *locus rpoD* para produzir uma filogenia de todos os 67 patovares isolados-tipo que foram validamente publicados. Os resultados mostraram que todos os patovares foram agrupados em clados principais que correspondiam a filogrupos previamente definidos, exceto por duas linhagens de genomospecies e *P. carica papayae*, que foram identificadas como um novo filogrupo. Sendo assim, esse *locus* pode ser usado como referência na identificação e monitoramento de importantes patógenos do complexo *P. syringae*.

O *rpoD* é um gene *housekeeping*, está presente em todas as *Pseudomonas syringae*; não é transferido horizontalmente; é altamente discriminativo (oito vezes mais que o *rpoB*); é longo o suficiente para conter informações significativas, mas curto o suficiente para permitir sequenciamento adequado. Esse gene contém uma quantidade apropriada de informações filogenéticas e não é nem muito conservado nem muito variável (MULET et al., 2010).

Em um estudo filogenético, Rombouts et al. (2015) utilizaram sequências dos genes *hrpL* e *hrpS* em adição à sequências do gene *rpoD* para diferenciar *Pseudomonas syringae* pv. *porri* de outros patovares de *P. syringae*. Somente sequências do gene *rpoD* não foram suficientes para diferenciar o patovar *porri* de *striafaciens*. As sequências do gene *hrpL* foram capazes de diferenciar os patovares *porri*, *striafaciens* e *zizaniae*, porém, os outros patovares da genomoespécie apresentaram a mesma sequência *hrpL* de *P. syringae* pv. *porri*. O sequenciamento do gene *hrpS* levou à descoberta de que apenas *P. syringae* pv. *porri* e *P. syringae* pv. *oryza* tinham sequências idênticas, enquanto todos os outros patovares se diferiram ligeiramente. Esses resultados demonstram que o sequenciamento dos genes relacionados à patogenicidade, *hrpL* e *hrpS*, em conjunto com o *rpoD* auxiliou na diferenciação de *P. syringae* pv. *porri*.

O gene *hrpS* existe em todos os patovares de *P. syringae*, é um dos primeiros que se expressam depois que a bactéria entra nos tecidos da planta e está envolvido no processo básico de determinação da patogenicidade e do hospedeiro. Sua sequência é similar a uma família de proteínas bacterianas que regulam genes envolvidos em diversas funções metabólicas, incluindo genes relacionados ao metabolismo e transporte de nutrientes. A similaridade de sequência do *hrpS* com genes envolvidos na nutrição, parece apoiar a hipótese de que genes *hrp* também estão envolvidos na nutrição bacteriana (GOPALAN; HE, 1996).

## 2.5 Detecção de bactérias causadoras de lesões foliares em cafeeiro

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 técnica de detecção de fitopatógenos por PCR é uma ferramenta eficaz em casos nos quais a diagnose é dificultada devido à semelhança nos sintomas causados e as características fenotípicas são compartilhadas entre espécies de bactérias. Essa técnica é altamente sensível e eficaz na detecção do patógeno até mesmo antes do surgimento dos sintomas, por utilizar sequências gênicas específicas (*primers*) (Ma; Michailides, 2006). Durante a PCR ocorre a amplificação de fragmentos de DNA por *primers*, para cada uma das fitas do DNA-molde, em ciclos onde ocorrem a desnaturação, anelamento e por fim a extensão com a amplificação de sequências de nucleotídeos. O resultado obtido com essa técnica é de fácil interpretação porque se baseia na presença ou na ausência de um fragmento de DNA (ALFENAS et al., 2016).

*Primers* específicos para a detecção de *P. cichorii* e *P. syringae* pv. *tabaci* já foram desenvolvidos (COTTYN et al., 2011; LYDON; PATTERSON et. al., 2001). Entretanto, os *primers* para detecção de *P. syringae* pv. *tabaci* são baseados nas sequências de genes responsáveis pela produção de tabtoxina (*tabA* e *tabIA*), portanto, não discriminam espécies produtoras dessa toxina, como os isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. syringae* pv. *garcae* em cafeeiro (LYDON E PATTERSON et. al., 2001). Não existem ainda *primers* específicos para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção desse patovar.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bacteriologia de Plantas e Virologia Molecular e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Minas Gerais.

#### 3.1 Isolados avaliados

Os isolados de referência de *P. syringae* pv. *garcae* (CFBP 1634) e *P. cichorii* (CFBP 2101) foram obtidos da *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes* (CFBP) e os isolados de referência *P. syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 1822, IBSBF 974) foram obtidos da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas/SP (IBSBF). Os demais isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii* avaliados neste estudo foram obtidos de um estudo prévio de Raimundi (2017), bem como outros isolados de *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pectobacterium* e *Ralstonia*. Todos os isolados avaliados encontram-se preservados no Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1).

Os isolados preservados em peptona glicerol à temperatura de -80 °C foram recuperados e transferidos para placas contendo meio King B (KING; WARD; RANEY, 1954), pelo método de estrias paralelas e incubados a 28 °C por 48h. As colônias isoladas de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii* foram transferidas para tubos contendo o meio 523 (KADO; HESCKET, 1970), antes da extração de DNA.



**Tabela 1.** Isolados bacterianos utilizados neste estudo.

Isolados <sup>a</sup>	Espécie/patovar	Hospedeiro	Origem
CFBP 1634	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
UFLA 119	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Três Pontas, MG <sup>b</sup>
UFLA 43	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Três Pontas, MG
UFLA 131	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Patrocínio, MG
UFLA 154	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Sto. Antônio do Amparo, MG
UFLA 97	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Nepomuceno, MG
UFLA 150	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Muzambinho, MG
UFLA 159	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Lavras, MG
UFLA 59	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Três Pontas, MG
UFLA 112	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Varginha, MG
UFLA 113	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Vargem Grande, MG
UFLA 81	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Patos de Minas, MG
UFLA 148	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Coffea arabica</i>	Ijací, MG
IBSBF 1822	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Carica papaya</i>	Brasil
IBSBF 974	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Desmodium canum</i>	Brasil
UFLA 142	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	São Sebastião do Paraíso, MG
UFLA 128	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	São Sebastião do Paraíso, MG
UFLA 129	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	São Sebastião do Paraíso, MG
CFBP 2101	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Cichorium endivia</i>	Sri Lanka
UFLA 135	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Patrocínio, MG
UFLA 136	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Lavras, MG
UFLA 145	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Lavras, MG
UFLA 146	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Lavras, MG
IBSBF 166	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil
IBSBF 1012	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil
UFLA Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lavras, MG
UFLA Xap	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lavras, MG
UFLA Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	Lavras, MG
UFLA Xv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lavras, MG
16AAUB	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Vicia faba</i>	Etiópia, África
UFLA 285	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Gossypium</i>	Brasil
7AAUB	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Vicia faba</i>	Etiópia, África
UFLA 577	<i>Acidovorax avenae</i>	<i>Cucumis melo</i>	Brasil
UFLA Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lavras, MG
UFLA Cff	<i>Curtobacterium flacumefaciens</i> pv. <i>flacumefaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lavras, MG
UFLA Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Lavras, MG
UFLA Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lavras, MG

<sup>a</sup>CFBP, *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes*; IBSBF, Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP; UFLA, Coleção de Bactérias do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG. <sup>b</sup>MG, Minas Gerais, Brasil. Fonte: Do autor (2019).

### 3.2 Desenho de *primers*

Para o desenho dos *primers* foram utilizadas sequências de nucleotídeos do gene *hrpS*, presente no genoma das bactérias do gênero *Pseudomonas* e de outras bactérias fitopatogênicas disponíveis no Genbank. Sequências do gene *rpoD* geradas por Raimundi (2017), analisadas em estudo filogenético para diferenciação e identificação de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*, também foram utilizadas e regiões específicas das sequências foram selecionadas para o desenho de *primers*.

Alinhamentos múltiplos foram gerados no CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) implementado no programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2008), utilizando sequências de nucleotídeos das regiões mencionadas. As sequências dos *primers* foram comparadas, por meio do programa BLAST, para verificar sua homologia com sequências previamente depositadas no NCBI. Os *primers* desenvolvidos seguiram os critérios de GC%  $\geq 40-50$ , comprimento = 18–22 pb, analisados pelas características de desempenho, tais como estrutura de *hairpin*, potencial formação de *self-dimer* e estabilidade dos terminais 3' utilizando o OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Os *primers* foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies, em Iowa, EUA.

### 3.3 Extração do DNA genômico dos isolados

Para a extração do DNA total do genoma bacteriano foi utilizado o protocolo modificado de Ausubel et al. (1992). Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas de cada isolado foram centrifugadas e o pellet ressuscitado em 567  $\mu$ L de TE (pH 8,0), 30  $\mu$ L de SDS (10% g/v) e 3  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 1 hora. Em seguida, 100  $\mu$ L de NaCl 5 M e 80  $\mu$ L de CTAB/NaCl (10%) foram adicionados aos tubos, seguindo-se de incubação em banho-maria a 65°C por 10 minutos. As etapas seguintes consistiram em adicionar clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, realizar a separação de fases e adicionar 300  $\mu$ L de álcool isopropílico. Os pellets foram lavados com 1 mL de etanol 70% e, após a secagem dos mesmos, foram ressuscitados em 60  $\mu$ L de TE e armazenados a -20°C. As amostras foram quantificadas em

espectrofotômetro Nano Drop TM Espectrophotometer ND-100 (Nano Drop Technologies TM).

### 3.5 Otimização da PCR

Os pares de *primers* desenhados com base nas sequências dos genes *hrpS* e *rpoD* foram empregados na PCR. As reações foram realizadas com volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (2X) (Promega), 2,5 µL de cada primer específico (10 mM), 5 µL de água Milli-Q® autoclavada e alíquotas de 2 µL de DNA (10 mM). As amplificações foram realizadas em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 5 min; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C, por 1 min, anelamento por 45 segundos a diferentes temperaturas de 59 a 64°C e extensão a 72°C, por 30 segundos; extensão final a 72°C, por 10 minutos. Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

Os produtos amplificados da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). Os marcadores utilizados foram 1 Kb DNA Ladder (BioLabs) e Ladder 100 pb (Ludwig).

### 3.6 Teste de especificidade

A especificidade dos *primers* foi testada com a amplificação por PCR dos DNA's genômicos extraídos de isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. cichorii* e de outros diferentes patógenos (Tabela 1). A PCR foi realizada nas mesmas condições descritas acima, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 5 min; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C, por 1 min, anelamento por 45 segundos a 62°C e extensão a 72°C, por 30 segundos; extensão final a 72°C, por 10 minutos. Todos os produtos amplificados da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®), com marcadores 1 Kb DNA Ladder (BioLabs) e Ladder 100 pb (Ludwig), visualizados em um transiluminador UV MiniBis Pro (Uniscience). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

### 3.7 Teste de sensibilidade

A sensibilidade dos *primers* selecionados após o teste de especificidade foi avaliada através de diferentes concentrações de DNA genômico das bactérias (100 ng, 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg). A diluição em série das amostras foi baseada nas concentrações previamente determinadas em NanoDrop 2000. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®), com marcadores 1 Kb DNA Ladder (BioLabs) e Ladder 100 pb (Ludwig).

### 3.8 Validação do protocolo de Bio-PCR em folhas de cafeeiro

O potencial de diagnóstico do protocolo de PCR utilizando os *primers* selecionados foi avaliado em folhas de cafeeiro oriundas de plantas sintomáticas no campo e mudas artificialmente inoculadas.

Amostras de folhas de cafeeiros doentes coletadas no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, foram submetidas ao teste de exsudação em gotas, ao isolamento em meio King B e, posteriormente, à extração de DNA bacteriano para a realização da PCR.

Mudas de cafeeiro cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, com três pares de folhas verdadeiras, foram incubadas durante 48 horas em câmara úmida e posteriormente inoculadas artificialmente através do método de atomização. Foram utilizadas suspensões bacterianas em solução salina (NaCl 0,85) (10 mmol l<sup>-1</sup>) dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* (UFLA 97), *P. syringae* pv. *tabaci* (UFLA 128) e *P. cichorii* (UFLA 145), na concentração ajustada para A<sub>600</sub> = 0,6. Após a inoculação, as plantas foram mantidas durante 48 horas em câmara úmida. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados (DBC) com cinco repetições. A avaliação foi realizada após o aparecimento dos sintomas, que ocorreu 12 a 15 dias DPI, na qual foi coletada uma folha de cada repetição para a extração de DNA e os procedimentos da PCR.

A extração de DNA das folhas foi realizada utilizando o protocolo modificado de Taylor e Powell (1982). Folhas coletadas de cafeeiro foram lavadas em água corrente para retirada de 250 g de fragmentos e posterior trituração com nitrogênio líquido. Foi adicionado 1,8 mL de CTAB/NaCl (10%) aos tubos seguindo-se de incubação em banho-maria a 65°C por 30 minutos. As etapas seguintes consistiram em adicionar clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1, realizar a separação de fases, adicionar 0,6 V de álcool isopropílico e 150 µL de acetato de sódio 3M. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado, o pellet foi lavado com 600 µL de etanol 70%, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi

lavado novamente com etanol 100%. Após a secagem do mesmo, foi ressuspendido em 60 µL de TE+RNase e armazenado a -20°C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nano Drop TM Espectrophotometer ND-100 (Nano Drop Technologies TM).

Após a extração do DNA genômico as amostras das folhas sintomáticas do campo e das mudas inoculadas foram utilizadas na PCR para validar os *primers*. Todos os produtos amplificados da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®), com os marcadores 1 Kb DNA Ladder (BioLabs) e Ladder 100 pb (Ludwig) e visualizados com um transiluminador UV MiniBis Pro (Uniscience). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Seleção, especificidade e sensibilidade dos *primers*

Os *primers* desenhados neste estudo foram sintetizados e utilizados na PCR convencional. Primeiramente, sequências de nucleotídeos da região *hrpS*, presentes em todos os patovares de *P. syringae* (GOPALAN; HE,1996; BAKER et al., 1997), foram alinhadas com sequências do genoma de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. cichorii* e de outras bactérias não alvo, depositadas no GenBank. Os testes de especificidade dos *primers* PsgHrps F1/PsgHrps R1 e PsgHrps F1/PsgHrps R2 (Tabela 2) desenhados com base nessa região, demonstraram que estes não são específicos para a detecção de *P. syringae* pv. *garcae* e nenhum foi capaz de detectar as bactérias do gênero *Pseudomonas* causadoras de manchas foliares, simultaneamente (Tabela 1).

O mesmo aconteceu com os *primers* PsgRpod F2/PsgRpod R1 e PsgRpod F2/PsgRpod R2 desenhados com base em outra região genômica, como o gene *rpoD* (Tabela 2). Ainda assim, essa foi a região que apresentou polimorfismo adequado para o desenho de *primers* capazes de discriminar *P. syringae* pv. *garcae* de outros gêneros e espécies de bactérias testadas (Tabela 1), em que foram selecionados os pares de *primers* PsgRpod F1 (5' -AGAAGGTGACGACGAAGGGA- 3') e PsgRpod R2 (5' -GCACGAAGGCGCTCTAGG- 3') para detecção específica desse patovar (Tabela 2). Essa região apresentou alta conservação em todos os isolados testados da bactéria causadora de mancha aureolada em cafeeiro. Além disso, foram selecionados os *primers* PsgRpod F1 e PgtcRpod R1 (5' -TTGTCGTCGCGGCCAAGC- 3') para a detecção de *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv.

*tabaci* e *P. cichorii* simultaneamente, também desenhados a partir da região genômica *rpoD* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pares de *primers* desenhados neste estudo.

<i>Primers</i>	Sequências	Temperatura de anelamento (°C)	GC (%)	Tamanho (pb)
PsgHrps F1	5' CGACGC TGTGGAGGACGGTCG 3'	64,6	71,4	151
PsgHrps R1	5' CGACATTCAGCTCGGCAC 3'	56,6	61,1	
PsgHrps F1	5' CGACGCTGTGGAGGACGGTCG 3'	64,6	71,4	174
PsgHrps R2	5' GCCGGGCAGACAGTAGGCAC 3'	63,3	70	
PsgRpod F1	5' AGAAGGTGACGACGAAGGGA 3'	57,9	55	170
PsgRpod R1	5' TTGTCGTCGCGGCCAAGC 3'	61,8	66,7	
PsgRpod F1	5' AGAAGGTGACGACGAAGGGA 3'	57,9	55	287
PsgRpod R2	5' GCACGAAGGCGCTCTAGG 3'	58,6	66,7	
PsgRpod F2	5' AGAAGACGAGGTCGAGAGCGGC 3'	62,9	63,6	116
PsgRpod R1	5' GCACGAAGGCGCTCTAGG 3'	58,6	66,7	
PsgRpod F2	5' AGAAGACGAGGTCGAGAGCGGC 3'	62,9	63,6	233
PsgRpod R2	5' GCACGAAGGCGCTCTAGG 3'	58,6	66,7	

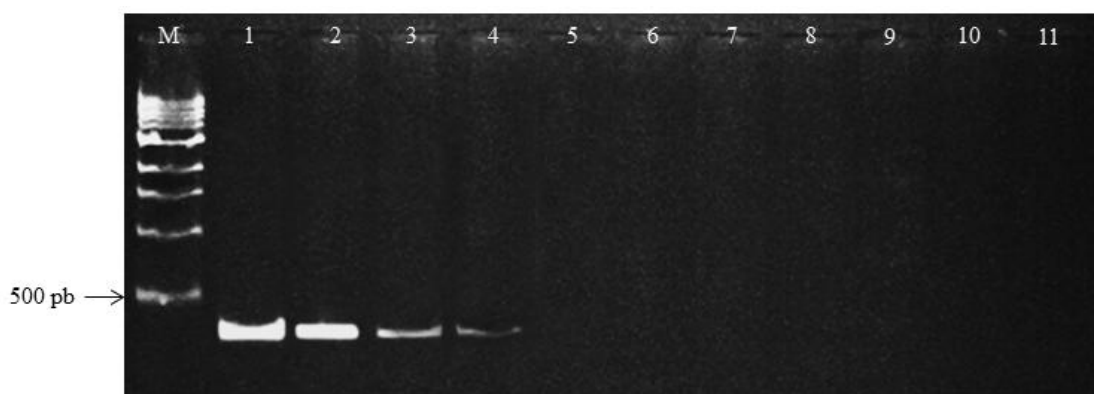
Fonte: Do autor (2019).

Análise *in silico* dos pares de *primers* desenhados utilizando a pesquisa BLASTn mostrou alta especificidade com as sequências de *P. syringae* pv. *garcae* depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os resultados mostraram 100% de similaridade de sequência com *P. syringae* pv. *garcae* para os isolados NCPPB 588 (MF684753.1), 1634 (DQ072708.1) e 2708 (DQ072705.1), porém, não mostraram sequências homólogas a *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*.

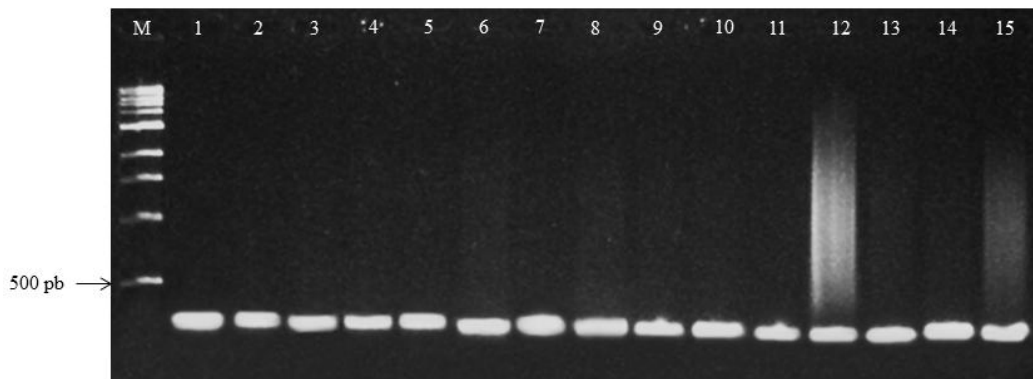
A especificidade dos *primers* foi confirmada através da PCR utilizando DNAs genômicos extraídos dos isolados utilizados (Tabela 1). Os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 amplificaram especificamente um fragmento de 287 pb para *P. syringae* pv. *garcae* e não amplificaram DNAs extraídos de outros isolados associados ao gênero *Pseudomonas* ou de outras espécies testadas (Figura 1; Tabela 1) A amplificação com esse par de *primers* utilizando o DNA extraído do isolado de referência CFBP 1634 produziu uma banda visível para as concentrações de 100 ng, 10 ng, 1ng e 100 pg (Figura 2). Esse conjunto foi capaz de amplificar um fragmento de mesmo tamanho para todos os isolados de *P. syringae* pv. *garcae* testados, na concentração de 10 ng (Figura 3; Tabela 1) e obteve o mesmo resultado em todas as temperaturas testadas (59 a 64 °C).



**Figura 1.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 e DNA de isolados bacterianos: (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) CFBP 1634 *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, (2) IBSBF 974 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (3) CFBP 2101 *Pseudomonas cichorii*, (4) *Burkholderia andropogonis*, (5) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (6) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, (7) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, (8) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, (9) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, (10) *Bacillus amyloliquefaciens* (11) *Serratia marcescens*, (12) *Acidovorax avenae*, (13) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (14) *Curtobacterium flaccumefaciens* subsp. *flaccumefaciens*, (15) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, (16) *Ralstonia solanacearum*.



**Figura 2.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 com diferentes concentrações do DNA bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* CFBP 1634. (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) 100 ng, (2) 10ng, (3) 1ng, (4) 100 pg, (5) 10 pg, (6) 1pg, (7) 100 fg, (8) 10 fg, (9) 1 fg, (10) Controle negativo.

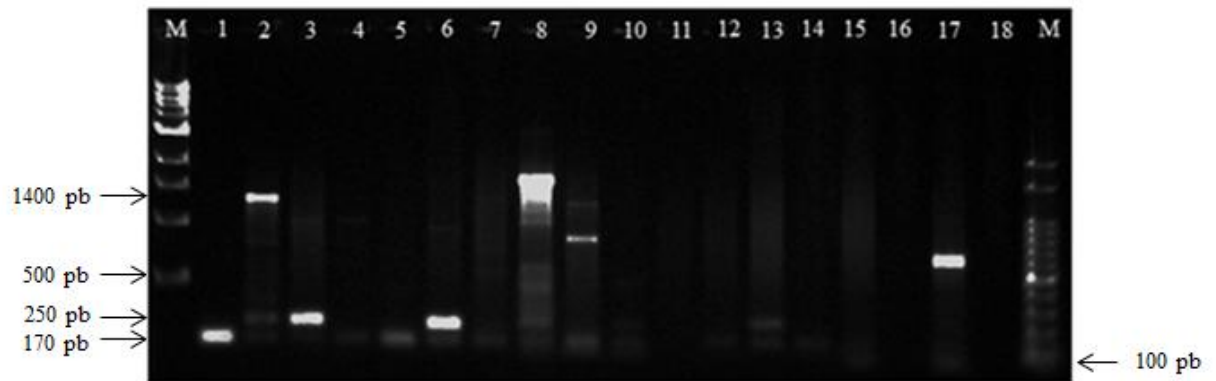


**Figura 3.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 e DNA bacteriano de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. (M) Marcador molecular 1Kb, (1) CFBP 1634, (2) UFLA 119, (3) UFLA 43, (4) UFLA 131, (5) UFLA 154, (6) UFLA 159, (7) UFLA 84, (8) UFLA 112, (9) UFLA 113, (10) UFLA 122, (11) UFLA 134, (12) UFLA 139, (13) UFLA 148, (14) UFLA 150, (15) UFLA 156.

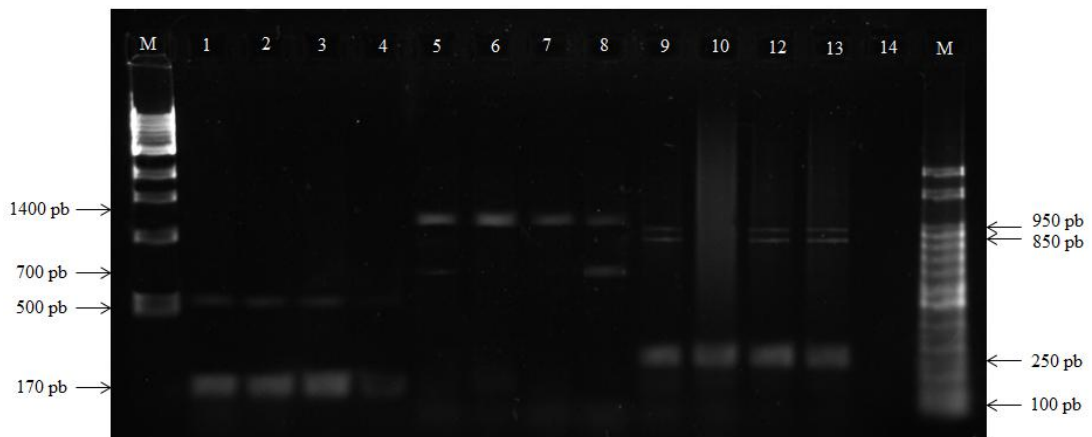
Os *primers* PsgRpod F1 e PgtcRpod R1 quando utilizados conjuntamente amplificaram bandas para os DNAs extraídos dos isolados *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Burkholderia andropogonis*, *Acidovorax avenae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Serratia marcescens* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* enquanto que as ampliações a partir de DNAs extraídos dos isolados *Bacillus amyloliquefaciens*, *Curtobacterium flacumefaciens* subsp. *flacumefaciens* e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, foram negativas quando testadas com esses *primers* (Figura 4; Tabela 1).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* causadoras de manchas foliares em cafeeiro, apresentaram fragmentos de tamanhos diferentes. Para os isolados de *P. syringae* pv. *garcae* foram amplificadas bandas de 170 pb e 500 pb. Os isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* amplificaram bandas de 170 pb, 700 pb e 1400 pb, enquanto que em *P. cichorii*, foram amplificadas bandas de 170 pb e 250 pb, além de outras duas de aproximadamente 850 pb e 950 pb (Figura 5; Tabela 1). As ampliações a partir de DNA extraído dos isolados *P. syringae* pv. *garcae* CFBP 1634, *P. syringae* pv. *tabaci* UFLA 128 e *P. cichorii* UFLA 136 produziram bandas até concentrações de 10 ng e 1ng para os três isolados testados (Figura 6).

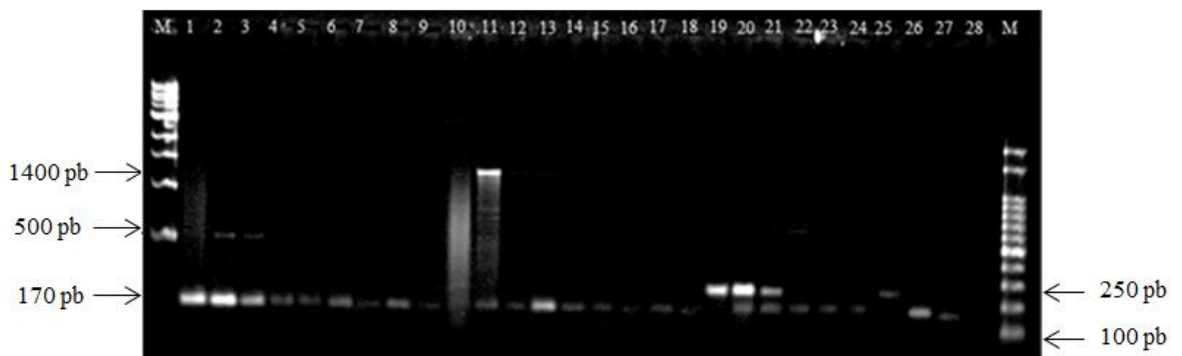




**Figura 4.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 e DNA de isolados bacterianos: (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) CFBP 1634 *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, (2) IBSBF 974 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (3) CFBP 2101 *Pseudomonas cichorii*, (4) *Burkholderia andropogonis*, (5) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (6) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, (7) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, (8) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, (9) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, (10) *Bacillus subtilis*, (11) *Bacillus amyloliquefaciens* (12) *Serratia marcescens*, (13) *Acidovorax avenae*, (14) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (15) *Curtobacterium flacumefaciens* subsp. *flacumefaciens*, (16) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, (17) *Ralstonia solanacearum*, (18) Controle negativo, (M) Marcador molecular 100 pb.



**Figura 5.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PgctRpod R1 e DNA de isolados bacterianos: (M) Marcador molecular 1 Kb, (1-4) *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (1) UFLA 119, (2) UFLA 154, (3) UFLA 81, (4) UFLA 43, (5-8) *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (5) UFLA 128, (6) UFLA 129, (7) UFLA 69, (8) UFLA 142, (9-12) *P. cichorii* (9) UFLA 135, (10) UFLA 136, (11) UFLA 145, (12) UFLA 146, (13) Controle negativo, (M) Marcador molecular 100pb.



**Figura 6.** Análise eletroforética dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PgctRpod R1 e concentrações de DNAs bacterianos de 100 ng, 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg. (M) Marcador molecular 1Kb, (1-9) Psg CFBP 1634, (10-18) PstaUFLA 128, (19-27) Pc UFLA 136, (28) controle negativo, (M) Marcador molecular 100 pb.

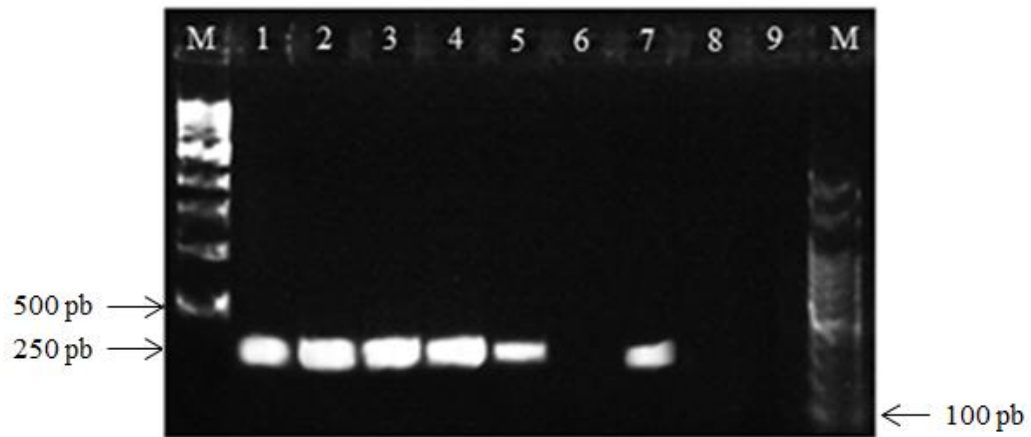
#### 4.2 Detecção de bactérias causadoras de manchas foliares em folhas de cafeeiro

Para a validação dos *primers* foram utilizadas plantas de cafeeiro inoculadas e naturalmente infectadas. A detecção de bactérias a partir de DNAs metagenômicos das plantas pode amplificar fragmentos de células não viáveis dando um falso positivo, pois se as bactérias estão mortas não causarão doença. Além disso, a utilização do DNA extraído diretamente da planta pode conter inibidores de PCR, como polifenóis, e a concentração do DNA alvo pode estar abaixo da que os *primers* conseguem detectar, apresentando assim falsos negativos. Para sanar estes problemas foi necessária a utilização da BIO-PCR, a fim de obter somente células viáveis e evitar essas desvantagens (RASMUSSEN; WULFF, 1991; PROSEN et al., 1993; WELLER et al., 2000a).

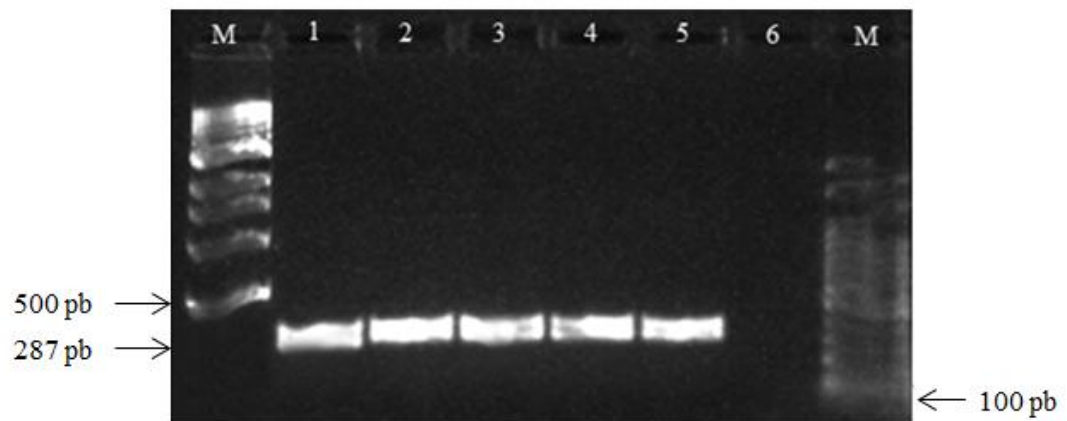
O isolado *P. syringae* pv. *garcae* (UFLA 97) foi capaz de infectar as mudas de cafeeiro em quatro repetições, induzindo sintomas iniciais de lesões cloróticas, evoluindo para necróticas, circundadas por um halo amarelado. Os isolados de *P. syringae* pv. *tabaci* (UFLA 128) e *P. cichorii* (UFLA 136) não causaram doenças nas mudas de cafeeiro.

Ambas as amostras de folhas de cafeeiro coletadas do campo e da casa de vegetação, foram utilizadas no teste de exsudação e isolamento em meio King B. As colônias obtidas no isolamento das bactérias presentes nas lesões em folhas de cafeeiro mostraram-se semelhantes às colônias originais de *P. syringae* pv. *garcae* provenientes do isolado de referência CFBP 1634. Os cinco isolados obtidos de cafeeiro no campo e os quatro isolados obtidos de mudas inoculadas foram utilizados para extração de DNA e testados na PCR utilizando os dois pares de *primers* selecionados neste estudo.

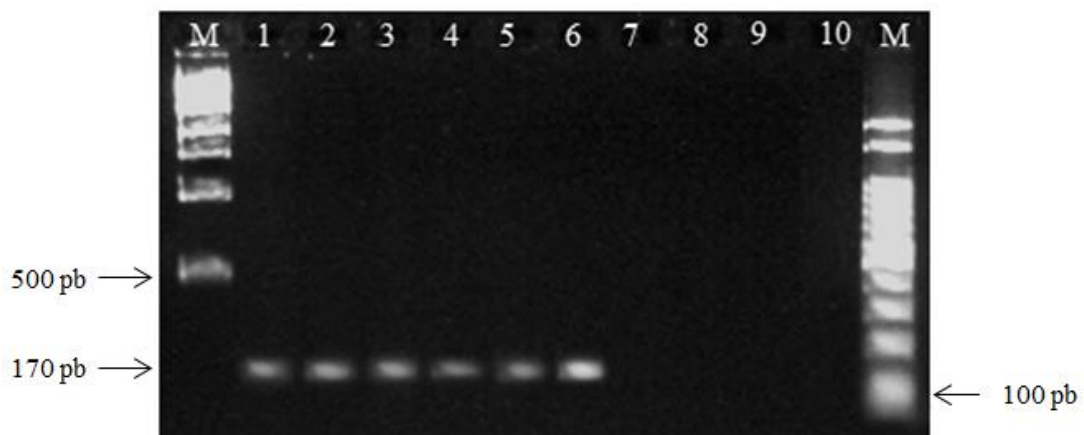
Os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 amplificaram um fragmento de 287 pb tanto para os DNAs extraídos de folhas sintomáticas do campo quanto para os DNAs das mudas inoculadas (Figura 7, Figura 8). O par PsgRpod F1/PgtcRpod R1 amplificaram um fragmento de 170 pb para os mesmos DNAs extraídos (Figura 9, Figura 10). As amplificações apresentaram padrão de banda semelhante ao DNA extraído do isolado de referência CFBP 1634 para ambos *primers* testados.



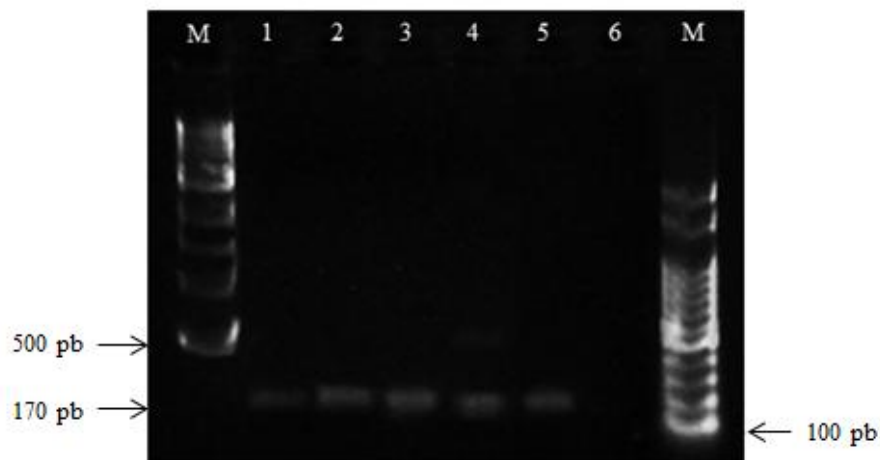
**Figura 7.** Análise eletroforética dos produtos da BIO-PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 e DNA bacteriano de folhas sintomáticas do campo. (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) Amostra 1, (2) Amostra 2, (3) Amostra 3, (4) Amostra 4, (5) Amostra 5, (6) Controle negativo, (7) Isolado-referência CFBP 1634, (M) Marcador molecular 100pb.



**Figura 8.** Análise eletroforética dos produtos da BIO-PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 e DNA bacteriano de isolados obtidos de mudas inoculadas. (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) Repetição 1, (2) Repetição 2, (3) Repetição 3, (4) Repetição 4, (5) Isolado-referência CFBP 1634, (6) Controle negativo, (M) Marcador molecular 100pb.



**Figura 9.** Análise eletroforética dos produtos da BIO-PCR utilizando o par de *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 e DNA bacteriano de isolados de folhas sintomáticas do campo. (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) Amostra 1, (2) Amostra 2, (3) Amostra 3, (4) Amostra 4, (5) Amostra 5, (6) Isolado-referência CFBP 1634, (7) Controle negativo, (M) Marcador molecular 100 pb.



**Figura 10.** Análise eletroforética dos produtos da BIO-PCR realizada com os *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 e DNA bacteriano de mudas inoculadas. (M) Marcador molecular 1 Kb, (1) Repetição 1, (2) Repetição 2, (3) Repetição 3, (4) Repetição 4, (5) Isolado-referência CFBP 1634, (6) Controle negativo, (M) Marcador molecular 100pb.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois protocolos de diagnose de bactérias fitopatogênicas ao cafeeiro por meio de PCR convencional com a utilização de *primers*. O primeiro protocolo utilizando o par PsgRpod F1/PsgRpod R2 para a detecção específica de *P.*

*syringae* pv. *garcae*, agente etiológico da mancha aureolada e, o segundo protocolo utilizando o par PsgRpod F1/PgtcRpod R1 para detecção simultânea das bactérias *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*, causadoras respectivamente, da mancha aureolada, mancha bacteriana e crestamento bacteriano do cafeeiro. *Primers* para detecção de *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii* já foram relatados em estudos anteriores, no entanto, esse é o primeiro estudo que utiliza *primers* específicos para detecção de *P. syringae* pv. *garcae* e apenas um conjunto de *primers* para detecção simultânea das bactérias do gênero *Pseudomonas* causadoras de manchas foliares em cafeeiro.

Uma vez que os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 amplificaram um fragmento de 287 pb somente para os isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, coletados de diferentes regiões geográficas, tanto de mudas de cafeeiro quanto em lavouras, e não houve amplificação para os outros patógenos do café, como *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*, nem de outras espécies testadas, pode-se confirmar assim a especificidade deste par de *primers*.

Como as ampliações dos *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 para os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Burkholderia andropogonis*, *Acidovorax avenae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Bacillus subtilis* e *Ralstonia solanacearum* apresentaram padrão de bandas diferentes quando comparadas com *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*, não serão confundidas no diagnóstico. Os isolados *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Serratia marcescens* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* amplificaram um único fragmento do mesmo tamanho que *P. syringae* pv. *garcae*, porém, deve-se considerar que não são bactérias causadoras de doenças em cafeeiro e podem ser facilmente diferenciadas em análises de rotina.

Esses resultados demonstram que esses *primers* não são específicos, mas foram eficientes na detecção das bactérias causadoras de manchas foliares em cafeeiro. Os fragmentos de 170 pb, 1400 pb e 250 pb amplificados para *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *P. cichorii*, respectivamente, se repetiram em todos os isolados testados e são suficientes para diferenciá-las.

Apesar de as concentrações dos DNAs bacterianos serem detectadas até 100 pg na PCR quando utilizados com os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2 e de 1ng quando utilizados com o conjunto PsgRpod F1/PgtcRpod R1, uma maior sensibilidade pode ser alcançada utilizando-os em outras técnicas. A qRT-PCR, é capaz de detectar e quantificar concentrações de ácido nucleico muito mais baixas do que a PCR convencional, bem como a técnica nested PCR, que possui a vantagem de melhorar a sensibilidade devido a utilização de dois conjuntos

de *primers* nas reações em dois ciclos de PCR realizados (LAM et al., 2007; SONG et al., 2009; DING et al., 2017). Hong et al. (2019) verificaram a sensibilidade de *primers* desenvolvidos para detecção de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, utilizando-se as técnicas de qRT-PCR e nested PCR, as quais foram 10 e 100 vezes, respectivamente, mais sensíveis quando comparadas com a técnica de PCR convencional.

A BIO-PCR consiste no isolamento do patógeno e o seu cultivo em meio de cultura (enriquecimento viável) combinado com a extração de DNA da cultura pura e PCR com *primers* específicos, o que permite o aumento da sensibilidade de detecção (SCHAAD et al., 1995). A utilização dessa técnica possibilitou identificar as espécies de *Pseudomonas* que estavam causando doenças em cafeeiro. O conjunto PsgRpod F1/PsgRpod R2 teve como objetivo detectar apenas *P. syringae* pv. *garcae* e comprovou ser específico para essa bactéria, ou seja, foi capaz de diferenciá-la de *P. syringae* pv. *tabaci*, o que não é possível quando se usa os *primers* da região que abrange os genes *tblA*e *tabA*, capazes de identificar isolados de *P. syringae* produtores de tabtoxinas (LYDON; PATTERSON, 2001).

Os *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 detectaram simultaneamente, em uma única etapa, os agentes causadores de manchas foliares em cafeeiro, conferindo agilidade ao diagnóstico. A mancha aureolada causada por *P. syringae* pv. *garcae* é predominante em lavouras e viveiros de café, visto que esse patovar é específico do cafeeiro, porém, a mancha bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tabaci* e o crestamento bacteriano causado por *P. cichorii* também podem ocorrer. A presença ou prevalência dessas bacterioses juntas em uma mesma planta ou região cafeeira específica é muito difícil, sendo assim, estes *primers* podem ser utilizados para a detecção de qualquer uma dessas espécies bacterianas em uma amostra, situação mais comum a ser encontrada. No entanto, esse protocolo não precisará ser ajustado para diferentes formatos, tais como um *duplex* ou *multiplex* PCR, pois possui a vantagem de ser realizado apenas com a utilização de um par de *primers*.

## 6 CONCLUSÃO

Um protocolo de PCR convencional foi desenvolvido para detecção específica de *P. syringae* pv. *garcae* com os *primers* PsgRpod F1/PsgRpod R2, que foram eficientes quando testados com todos os isolados desse patovar utilizados nesse estudo. Os *primers* PsgRpod F1/PgtcRpod R1 permitem a detecção simultânea de Psg, Psta e Pc com amplificação de bandas de tamanhos diferentes para cada um dos patógenos. Esse protocolo para detecção

simultânea poderá ser utilizado para monitorar a ocorrência dessas três bactérias que infectam mudas e plantas de cafeeiro evitando-se epidemias em campo.



## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. M. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016. 516p.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; MALAVOLTA, V. M. A. Colo preto da alface causado por *Pseudomonas cichorii*. **Biológico**, São Paulo, v. 61, n.1, p. 1-4, jan./jun., 1999.
- ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRICIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em mudas de café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., mês, 2012. 1 CD-ROM.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, n. 4, p.1563-1589, 2000.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology: volume 1**. New York: John Wiley, 1992.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 726-733, 1997.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* *patovars coronafaciens, striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 153, p. 492-499, 2005.
- BENDER, C. L.; ALARCÓN, C. F.; GROSS, D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Stillwater, v. 63, n. 2, p. 266-292, 1999.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Crestamento bacteriano em calêndula. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 149-152, 2001.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; RODRIGUES NETO, J. Crestamento bacteriano em folhas de meloeiro (*Cucumis melo* L.) causado por *Pseudomonas cichorii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1, p. 103-105, jan/jun., 1998b.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Mandioquinha-salsa, novo hospedeiro de *Pseudomonas cichorii*. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 24, n. 3/4, p. 261-262, 1998a.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986.

CARDOSO, R.M.L.; SERA, T. Obtenção de cultivares de *Coffea arabica* L. com resistência simultânea a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Amaral et al. no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983. Oeiras. **Resumos...** Lisboa, CIFC/IICT, 1984, p. 417-419.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra Brasileira de Café - Boletim Café Janeiro de 2019. Brasília: CONAB, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2894-levantamento-indica-producao-de-50-92-milhoes-de-sacas-de-caffe-em-2019>>. Acesso em: 23 de maio de 2019.

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

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

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

DING, F.; PAUL, C.; BRLANSKY, R.; HARTUNG, J. S. Immune tissue print and immune capture-PCR for diagnosis and detection of *Candidatus liberibacter asiaticus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 46467, 2017.

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

FERREIRA, L. P.; SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. 1995. v. 1, cap. 5, p. 97-130.

GEVERS, D.; COENYE, T. Phylogenetic and genomic analysis. In **Manual of Environmental Microbiology**, 3<sup>rd</sup> edn. Hurst, C., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., and Stenzenbach, L. (eds). Whashington, DC, USA: ASM Press, p. 157-168, 2007.

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

GOPALAN, S.; HE, S. Y. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. **Plant Disease**, v. 80, p. 604-610, 1996.

HONG, Y.; LUO, Y.; YI, J.; HE, L.; DAI, L.; YI, T. Screening nested-PCR *primer* for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing and application in Hunan, China. **PLoS ONE**14(2):e0212020, 2019.

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

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

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

JANSEN, A. **Plant protection in coffee**: recommendations for the common code for the coffee community initiative. Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GmbH, 2005. Disponível em: <[http://www.evb.ch/cm\\_data/4C\\_Pesticide\\_Annex\\_final.pdf](http://www.evb.ch/cm_data/4C_Pesticide_Annex_final.pdf)>. Acesso em: 05 Junho 2019.

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

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

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. 1995. v. 1, cap. 5, p. 97-130.

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

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

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

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n. 11, p.7286-7293, 2006.

- KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J. M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, v.187, n. 18, p. 6258-6264, 2005a.
- KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: **Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens**. Springer Netherlands, p. 538-541, 1997.
- KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, p. 299-306, 2008.
- LAM, W. Y.; YEUNG, A. C.; TANG, J. W.; CHAN, E. W.; HUI, M.; CHAN, P. K. et al. 2007. Rapid *multiplex* nested PCR for detection of respiratory viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3631-3640, 2007.
- LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.
- LYDON, J.; PATTERSON, P. D. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.166-170, 2001.
- MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. Molecular characterization of the two-component histidine kinase gene from *Monilinia fructicola*. **Pest Management Science**, Society of Chemical Industry, v. 2, n. 10, p. 991-998, 2006.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 988, 2008.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n.2, 2007. (Suplemento).
- MARTINO, A. et al. Selection of reference genes for normalization of *real-time* PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF- $\alpha$  mRNA expression. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 92-99, 2011.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Café no Brasil. MAPA, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe>>. Acesso em: 23 de maio de 2019.
- MITCHELL, R. E. Implicações de toxinas na ecologia e evolução de microrganismos patogênicos de plantas: bactérias. **Experientia**, v. 47, p. 791- 803, 1991.
- MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* em cafeeiros, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambú. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 56.

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

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

MORAES, S.A.; SUGIMORI, M.H.; TOMAZELLO-FILHO, M.; CARVALHO, P.C.T. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2,1974, Poços de Caldas. **Resumos**. Rio de Janeiro: IBC, 1974, p.183.

MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, Palma de Mallorca, v. 12, p. 1513-1530, 2010.

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.

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.

PARADELA, A.; ALVAREZ, J.A.A.; BATISTA, M.F.; SILVA, C.L. Eficiência do fungicida-bactericida Hokko Kasumin (kasugamicina) no controle de mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em mudas de café (*Coffea arabica* L.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 26°, 2000, Marília. **Trabalhos Apresentados**. Ministério da Agricultura, PROCAPÉ, 2000. p. 247-248.

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

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

PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S.; FRARE, P.M. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.152, p.29-39, 2008.

POZZA E. A., CARVALHO V. L., & CHALFOUN S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças do cafeeiro. In: Guimarães R. J., Mendes A. N. G., Baliza D. P. (eds) **Semiologia do Cafeeiro**. Lavras: Editora UFLA, 2010.

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

RAIMUNDI, M. K. **Caracterização e identificação de isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro**. 79 p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

RAIMUNDI, M. K. **Identificação de isolados bacterianos de cafeeiros de Minas Gerais por características bioquímicas, rep-PCR e análises filogenéticas utilizando o locus *rpoD***. 94 p. Tese de Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2017.

RASMUSSEN, O. F.; WULFF, B. S. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pti* using PCR. **In Proceedings 4th International Working Group on *Pseudomonas syringae* Pathovars**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 369-376, 1991.

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.

ROBBS, C. F.; ALMEIRA, A. M. R. Crestamento bacteriano das folhas de girassol causado por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp: Primeira constatação no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 127-130, jun. 1981.

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

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

RODRIGUES NETO, J.; PEREIRA, A. L. G.; ZAGATTO, A. G. "Mancha bacteriana" em folhas de *Chrysanthemum morifolium* Ram. no Estado de São Paulo, causado por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, 1928. **O Biológico**, v. 42, p. 118-122, 1976.

RODRIGUES, L. M. R. et al. First report of mixed infection by *Pseudomonas syringae* pathovars *garcae* and *tabaci* on coffee plantations. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 4, p. 543-549, 2017.

RODRIGUES, L. M. R.; ALMEIDA, I. M. G.; PATRICIO, F. R. A.; BERIAM, L. O. S.; MACIEL, K. W.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2013.

ROMBOUTS, S.; VAN VAERENBERGH, J.; VOLCKAERT, A.; BAEYEN, S.; DE LANGHE, T.; DECLERCQ, B.; LAVIGNE, R.; MAES, M. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *porri* from leek in Flanders. **European Journal of Plant Pathology**, Belgium, set., 2015.

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

SAWADA, H.; SUZUKI, F.; MATSUDA, I.; SAITOU, N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 627-644, 1999.

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

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

SERA, G. H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agrônomicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. **Ciência Agrotecnologia**, 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 Agrônômico do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 217-251.

SONG, M. K.; CHANG, J.; HONG, Y.; HONG, S.; KIM, S. W. Direct multiplex reverse transcription- nested PCR detection of influenza viruses without RNA purification. **Journey Microbiology Biotechnology**, v. 19,p. 1470-1474, 2009.

TAYEB, L.; AGERON, E.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, v.156, p. 763-773, 2005.

TAYLOR, B.; POWELL, A. Isolation of Plant DNA and RNA. **Focus**, v. 4, p. 4-6, 1982.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

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

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D. L.; JACKSON, R. W.; VIVIAN, A., HARAYAMA, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v.146, p. 2385-2394, 2000.

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

ZAMBOLIM, L. Doenças do cafeeiro. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, v.2, p.193-213.

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