



**MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS**

**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA  
MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS**

**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

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

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2017**

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

Freitas, Marcelo Loran de Oliveira.

Epidemiologia e controle da mancha aureolada do cafeeiro /  
Marcelo Loran de Oliveira Freitas. - 2017.

91 p.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

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

Bibliografia.

1. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. 2. Cobre. 3. Geoestatística.  
4. Variáveis ambientais. I. Souza, Paulo Estevão de. II. Título.

**MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS**

**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

***EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF COFFEE BACTERIAL BLIGHT***

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

APROVADA em 24 de abril de 2017.

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Alves	UFLA
Dr. Leônidas Leoni Belan	UFES

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

A Deus, princípio de todas as coisas e finalidade de nossas vidas.

À minha esposa Ana Valeria e a nossa filha Verônica.

Aos meus pais Elizabeth de Oliveira Silva Freitas e Sebastião Anisio de Freitas, ao meu irmão Caio Renan e aos meus avós.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus

Aos meus pais, pela paciência, auxílio e apoio na realização deste feito profissional.

Aos professores Paulo Estevão de Souza e Edson Ampélio Pozza pela orientação e coorientação, amizade, ensinamentos e auxílios.

Ao CNPq, por conceder a bolsa de Doutorado.

À FAPEMIG, a CAPES e ao CNPq, por financiarem o projeto.

Aos amigos do 202: Chico, Dênis, Cristian, Luiz, Gabriel, Douglas, João, Jhonata e ao meu irmão Caio, pela amizade, auxílio em alguns trabalhos, idas ao Rex e muitos cafés.

Ao Jhonata, por seus conselhos, seus sauxílios profissionais e sua grande amizade.

Ao Humberson, por seu auxílio estatístico em todos os experimentos da presente tese e sua amizade.

Ao Leônidas Leoni Belan, por encabeçar todos os trabalhos executados em campo e conduzir os trabalhos junto comigo.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Aos amigos do laboratório de Epidemiologia; Aurivan, Cristian, Marília, Marina, Jeany, Caio, Natan, Paulo Victor, José, Julia e Breno.

Aos técnicos Bruno Marques, Ana Maria, Carlos e Sílvio.

Aos amigos(as) de departamento; Claudio Ogoshi, Helon Santos, Felipe Moretti, Cecília, Samuel Júlio, Gustavo, Melina, Daniel, Willian Zancan, Mateus Comé, Manoel, Joyce, Silvino, Pedro Martins e Cleílson Uchôa.

À fazenda Neumann Kaffee Gruppe (NKG), por cederem suas instalações, mão de obra, ferramentas, lavouras e tempo para o estudo da mancha aureolada do cafeeiro em campo.

Ao viveirista Francisco (Chico) de Santana da Vargem, por disponibilizar mudas em ótimas condições para a realização dos experimentos.

Ao INCT café, por possibilitar secar o café em suas instalações.

## RESUMO

Nos últimos anos a mancha aureolada *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg) tem causado danos às lavouras de café situadas em várias regiões. Desde a sua epidemiologia até seu controle, ainda são necessários estudos. Com isso os objetivos foram avaliar a eficiência de diferentes moléculas do grupo químico dos cúpricos no manejo da mancha aureolada e seu potencial fitotóxico em mudas de cafeeiro; avaliar a multiplicação *in vitro* da bactéria em diferentes temperaturas e a interação da temperatura com a duração do molhamento foliar na severidade da mancha aureolada em mudas de cafeeiro inoculadas com e sem ferimento e estudar a distribuição espaço temporal da mancha aureolada do cafeeiro, dos atributos e fertilidade do solo, da altitude, da produção, do enfolhamento e da nutrição do cafeeiro utilizando a geoestatística, além de analisar correlação da doença com as variáveis climáticas. De acordo com os resultados, as moléculas de óxido cuproso e sulfato de cobre (calda bordalesa) a  $2500 \text{ mg.kg}^{-1}$  foram as mais eficientes no controle da mancha aureolada do cafeeiro, causando menor toxidez e proporcionando maior cobertura do tecido foliar das mudas de cafeeiro. No ensaio *in vitro* o maior crescimento populacional de Psg ocorreu no intervalo entre 23 e 31°C, com pico em 28,1°C. No ensaio *in vivo* a inoculação por ferimento proporcionou maior AACPS da mancha aureolada em relação à inoculação sem ferimento. Nas plantas inoculadas por ferimento a variação da duração do molhamento foliar influenciou pouco na AACPS. Sendo a máxima AACPS propiciada nas temperaturas de 20,9 e 19,3°C e nas durações de molhamento foliar de 48 e 35,5 horas quando inoculadas com e sem ferimento respectivamente. A mancha aureolada apresentou distribuição espacial e apareceu em um único grande foco na área localizado na face sul do terreno nos dois anos reduzindo a produção das plantas afetadas. Os maiores níveis da doença foram nos locais com maiores teores de fósforo no tecido foliar do café e maior altitude, sendo nas maiores altitudes, a maior velocidade do vento, e a menor temperatura média do ar. Enquanto os menores níveis da doença nos locais com os maiores de Cu presente na folha.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Cobre. Geoestatística. Variáveis ambientais. Correlação.

## ABSTRACT

In recent years, the *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae* (Psg) has caused damage to the coffee plantations located in several regions. From its epidemiology to its control, studies are still needed. The objectives were to evaluate the efficiency of different molecules of the cupric chemical group in the management of the bacterial blight of coffee and its phytotoxic potential in coffee tree seedlings; To evaluate the in vitro multiplication of the bacterium at different temperatures and the interaction of the temperature with the duration of leaf wetness on the severity of the bacterial blight of coffee seedlings inoculated with and without injury and to study the temporal distribution of bacterial blight of coffee, attributes and soil fertility, altitude, coffee production, enfollowing, and nutrition of coffee using geostatistics, as well as to analyze the correlation of the disease with climatic variables. According to the results, cuprous oxide and copper sulphate (Bordeaux mixture) at 2500 mg.kg<sup>-1</sup> were the most efficient in the control of bacterial blight of coffee, causing less toxicity and providing greater leaf tissue coverage of seedlings of coffee. In vitro assay the highest population growth of Psg occurred in the interval between 23 and 31 ° C, with a peak at 28.1 ° C. In the in vivo assay the wound inoculation provided higher AACPS of the bacterial blight of coffee in relation to the inoculation without injury. In the plants inoculated by injury, the variation of leaf wetness duration had little influence on AACPS. The maximum AACPS was achieved at temperatures of 20.9 and 19.3 ° C and leaf wetness durations of 48 and 35.5 hours when inoculated with and without injury, respectively. The bacterial blight of coffee showed spatial distribution and appeared in a single large focus on the area located on the south face of the land in the two years reducing the production of the affected plants. The highest levels of the disease were in the places with the highest levels of phosphorus in the foliar tissue of the coffee and higher altitude, being in the highest altitudes, the highest wind speed, and the lowest average air temperature. While the lowest levels of the disease in the sites with the highest Cu present in the leaf.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Copper. Geostatistic. Environmental variables. Correlation.



## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	9
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	9
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1 A mancha aureolada do cafeeiro</b> .....	12
<b>2.2 O Cobre na agricultura e no controle da mancha aureolada</b> .....	13
<b>2.3 Influência da temperatura e molhamento foliar em <i>Psg</i> e na mancha aureolada</b> ....	16
<b>2.4 A geostatística aplicada ao manejo de doenças de plantas</b> .....	18
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	30
<b>ARTIGO 1 - COPPER FORMULATIONS IN BACTERIAL BLIGHT CONTROL AND TOXIC EFFECTS ON COFFEE SEEDLINGS</b> .....	30
<b>ARTIGO 2 - TEMPERATURE AND LEAF WETNESS DURATION ON INFECTION OF COFFEE LEAVES BY <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i></b> .....	47
<b>ARTIGO 3 - DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO TEMPORAL DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS AMBIENTAIS</b> .....	67

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O café *Coffea arabica L.* é cultivado em vários países, entre eles destacam-se o Brasil, a Colômbia e o Vietnã. No entanto, os maiores consumidores e importadores de café são os países da União Europeia e os Estados Unidos, os quais não o produzem. O Brasil é o maior fornecedor de café para o mundo com aproximadamente 29% da produção mundial (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2017). No entanto, essa produção pode ser reduzida, em decorrência das adversidades climáticas, doenças e pragas, entre outros fatores.

Dentre as doenças, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg) (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), tem sido uma das doenças mais preocupantes nas lavouras em fase de implantação, situadas em regiões de altitude superior a 1000 metros e expostas a ventos (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Os sintomas são manchas necróticas nas folhas contendo ou não halo amarelo ao redor, morte de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos e podridão das gemas florais com a consequente redução da produção da planta e produtividade da lavoura (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; RODRIGUES et al., 2017; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

Devido ao fato de as lavouras implantadas, em sua maioria, serem de cultivares suscetíveis à mancha aureolada (CARVALHO et al., 2011; SERA, 2001), a principal medida de manejo é a pulverização com antibióticos (Kasugamicina) e bacteriostáticos (fungicidas cúpricos) (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014). Dentre esses, os fungicidas cúpricos são os mais utilizados no campo e estão na forma de hidróxido, sulfato, oxiclureto e óxido cuproso (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - FRAC, 2015). Uma de suas principais características é a de ser protetor, de contato, pouco absorvido pela cutícula e não sistêmico. Por atuarem como protetores, os fungicidas cúpricos devem ser aplicados antes do estabelecimento da doença na planta (ITHIRU et al., 2013) ou seja antes mesmo da planta manifestar os sintomas. Atua principalmente na desestruturação da membrana plasmática (RUPARELIA et al., 2008) paralisando a multiplicação celular e atuando como bacteriostático (ORDAX et al., 2006). Por não ser sistêmico necessita estar bem distribuído tanto na superfície adaxial quanto abaxial, para ter contato com o patógeno (GISIAND; SIEROTZKI, 2008). Sendo assim, é importante o produtor escolher qual a molécula do grupo químico e também a formulação, a dose e a tecnologia de aplicação a ser empregada.

Em áreas com histórico de ocorrência da doença, na qual a bactéria está presente e o hospedeiro é suscetível, os fatores determinantes para o início de um novo ciclo da doença e o início das pulverizações com produtos cúpricos, serão as condições ambientais favoráveis à doença (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014). Dentre as variáveis ambientais a temperatura e a duração do molhamento foliar destacam-se tanto em fases do ciclo das relações patógeno hospedeiro quanto no processo doença (ALVES et al., 2007; ANCO; MADDEN; ELLIS, 2013; CAMPBELL; MADDEN, 1990; MARCUZZO; FERNANDES; BECKER, 2009).. Entretanto, existem outros fatores ambientais como a altitude (MORRIS; MONTEIL; BERGE, 2013), a velocidade do vento (PAN et al., 2006), a precipitação (MONTEIL; BARDIN; MORRIS, 2014) e o relevo (GLINUSHKIN et al., 2016), os quais ocorrem no campo em variados níveis, exercendo influências na doença e não sendo possíveis de serem reproduzidos nos ensaios em ambiente controlado. Além dos fatores ambientais relacionados ao clima e ao relevo, o teor de nutrientes em diferentes órgãos também influencia na resistência de plantas a doenças (GARCIA et al., 2003; PÉREZ, 2015; POZZA et al., 2001). Desse modo, é importante conhecer não só o efeito de cada molécula de cobre (Cu), mas também dos fatores ambientais responsáveis por favorecer a infecção, para assim escolher a melhor época de pulverização, eliminar as desnecessárias e as pouco eficientes.

Nas lavouras de café onde a mancha aureolada está presente podem ser mensuradas inúmeras covariáveis ambientais, podendo estas influenciar ou não a doença. Para diagnosticar possíveis influências das variáveis ambientais com a doença no campo, pode-se utilizar a geoestatística, uma técnica associada aos sistemas de informação geográfica, ao sensoriamento remoto e à estatística (ALVES et al., 2011). Ao utilizar a geoestatística é possível analisar e mapear a distribuição espacial das variáveis e da doença e relacioná-los entre si, obtendo a dependência espacial ao longo do espaço, possibilitando construir mapas para visualizar o comportamento de cada variável. Com isso, aproveitam-se todas as informações das variáveis fornecidas no campo, para observar a possível relação com a doença.

Diante do exposto, os objetivos dessa tese foram avaliar a eficiência de diferentes moléculas do grupo químico dos cúpricos no manejo da mancha aureolada e seu potencial fitotóxico em mudas de cafeeiro, avaliar a multiplicação *in vitro* da bactéria em diferentes temperaturas, a interação da temperatura com a duração do molhamento foliar na severidade da mancha aureolada e estudar a distribuição espaço-temporal da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) do cafeeiro, dos atributos e da fertilidade do solo,

altitude, da produção, do enfolhamento, e da nutrição do cafeeiro, utilizando a geoestatística, além de analisar a correlação da doença com variáveis climáticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A mancha aureolada do cafeeiro

A mancha aureolada do cafeeiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), foi detectada pela primeira vez em 1955, em cafezal localizado no município de Garça, estado de São Paulo. Após seu primeiro relato, a doença apareceu em algumas lavouras de forma isolada, causando danos relativamente baixos, sendo considerada de menor importância (COSTA; SILVA, 1960; MOHAN; PAVAN, 1977). No entanto, a partir de 2010, a mancha aureolada foi relatada, causando grandes prejuízos nas lavouras das regiões produtoras de café dos estados do Paraná, São Paulo e em Minas Gerais, especialmente no Sul de Minas, Triângulo Mineiro, Alto do Paranaíba e Cerrado (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014). A mesma também já foi relatada em outros países produtores de café, como Quênia (KAIRU; NYANGENA; CROSSE, 1985), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997) e Uganda (HAKIZA et al., 2009), causando sérios danos às lavouras em produção.

Seu sintoma típico é a mancha necrótica de cor escura no centro da lesão com um halo amarelado na folha, daí o nome da doença. Pode incidir também nos ramos plagiotrópicos e ortotrópicos, iniciando a colonização no ápice, seguindo para a base. Com o progresso da doença tanto as folhas com sintomas de manchas quanto as presas nesses ramos murcham e caem, resultando, assim, na seca de ramos (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). A seca dos ramos e a desfolha comprometem a arquitetura da planta e reduzem a produtividade das safras posteriores (ITO et al., 2008). Além disso, constituirão fonte de inóculo, com capacidade de ser distribuído na mesma planta e ao longo do espaço entre outras na lavoura, principalmente durante a operação de colheita e os tratamentos culturais.

A fase de sobrevivência da bactéria ocorre nos períodos de baixa pluviosidade, entre maio a outubro. Nesse período, a bactéria sobrevive na forma epífita na superfície da face abaxial das folhas do cafeeiro (ROBBS, 1977; ZCOLLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Dentro desse período, próximo ao mês de junho é realizada a colheita do cafeeiro, muitas das vezes com colhedoras e derriçadoras. Esses equipamentos atuam como disseminadores da doença por carregarem em suas hastes a bactéria coletada em plantas doentes e levarem até as plantas saudáveis realizando ferimento nessas folhas, simulando uma inoculação artificial no campo (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Com o início das chuvas, as condições voltam a ser adequadas para as células bacterianas infectarem o hospedeiro (ROBBS, 1977).

Dessa forma, a bactéria sai do período de sobrevivência e entra na fase de disseminação. As chuvas e ventos formam os aerossóis contendo as células bacterianas e carregam para as plantas vizinhas e outras folhas da mesma planta (RODRIGUES et al., 2012). Ao entrar em contato com a folha do hospedeiro e havendo um filme de água sobre esta, as células bacterianas procuram ferimentos ou aberturas naturais para assim realizar a penetração (KIMATI et al., 2005). Os ferimentos ocorrem por fatores como: colheita, chuva de granizo e ação do vento friccionando as folhas (RODRIGUES et al., 2012; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011) enquanto as aberturas naturais ocorrem naturalmente na folha, são elas os estômatos (MELOTTO et al., 2006), os hidatódios (KOBAE et al., 2006), as lenticelas (FERRANTE et al., 2012) e os botões florais (RODRIGUES et al., 2012). Dentro da planta, as células bacterianas ocupam os espaços intra e intercelulares, utilizando dos exsudatos celulares como fonte de energia para se multiplicarem. Com a multiplicação, as bactérias colonizam as células vizinhas e, posteriormente, as células são exsudadas para fora da folha, iniciando um novo ciclo do patógeno (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014; RODRIGUES et al., 2012).

Dentre as medidas de manejo da doença, podem ser utilizados cultivares resistentes (ITO et al., 2008), plantio de mudas saudáveis, formação de quebra-vento na área, escolha do local a ser plantado e utilização de antibióticos e produtos cúpricos, bacteriostáticos (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014). O controle químico é o método de manejo mais empregado. Porém, a aplicação de antibióticos deve ser criteriosa, para evitar a seleção de populações de bactérias resistentes (MELLO et al., 2011) e os fungicidas cúpricos devem ser aplicados antes da penetração, apresentando baixo resultado quando aplicado após (ITHIRU et al., 2013).

## **2.2 O Cobre na agricultura e no controle da mancha aureolada**

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal da planta. Dentro das células das plantas forma complexos altamente estáveis e participa em reações de transferência de elétrons de enzimas, atuando na fotossíntese, na respiração, no metabolismo de carbono e nitrogênio e na proteção contra estresse oxidativo. (MARSCHNER, 2012). O Cu é um micronutriente requerido em pequenas quantidades nas plantas (RIBEIRO et al., 1999), portanto sua aplicação deve ser criteriosa visando ao fornecimento adequado. Para o cafeeiro, os níveis normais variam entre 8 e 16 mg.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca (MS) (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999). Níveis abaixo de 8 mg.Kg<sup>-1</sup> de MS causam deficiência na planta. Os sintomas de deficiência em plantas adultas são folhas novas com nervuras salientes e, em mudas, as folhas ficam voltadas para baixo com

o aparecimento de manchas necróticas (FAQUIN, 2002). Acima de  $16 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de MS, o Cu não necessariamente causa toxidez, pois o cafeeiro apresenta capacidade de suportar níveis acima do ideal. Carmo et al. (2012) observaram esse fato ao fazer um levantamento do teor de Cu nos cafeeiros cultivados na região sul do Estado de Minas Gerais e constataram níveis entre  $14$  e  $55 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de MS, sem causar distúrbios fisiológicos aparentes. Acima de  $55 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de MS o Cu passa a ser tóxico para a planta. Ao ultrapassar esse limite, fica livre no citoplasma, formam complexos com a maioria dos grupos sulfidríla de enzimas, impedindo a formação da sua forma quaternária e da reação chave-fechadura, causando desordem generalizada no metabolismo celular (CHILLAPPAGARI et al., 2010). Os sintomas visíveis de toxidez iniciam-se nas folhas novas com manchas aquosas, evoluindo para uma coloração parda e depois negra (FAQUIN, 2002).

Fungicidas cúpricos são utilizados no manejo de diversas doenças causadas por fitobactérias (GENT; SCHWARTZ, 2005; GILARDI; GULLINO; GARIBALDI, 2010; SANTO et al., 2011). As principais moléculas cúpricas utilizadas como fungicidas na agricultura para controlar doenças são: o Oxiclóreto, o Hidróxido, o Sulfato de Cu e o Óxido Cuproso (FRAC, 2015). Assim, são comercializados diversos fungicidas cúpricos, contendo diferentes moléculas, dosagens, granulometria e solubilidade (BRASIL, 2017). Mesmo com essa diversidade de formulações desse grupo químico, por fim, eles devem formar uma película uniforme e duradoura sobre a folha, sem intoxicar a planta, para, assim, atingir seu objetivo fitossanitário (FRAC, 2015). Nesses casos, o Cu atua como agente bacteriostático, ou seja, não permite a multiplicação das células bacterianas (ORDAX et al., 2006). Porém, não atua como bactericida, pois, ao retirá-lo do meio, a bactéria retoma seu crescimento. A dose mínima para paralisar a multiplicação celular das bactérias varia de acordo com a espécie e em qual substrato a bactéria se encontra. Em suspensão aquosa a concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  causa paralisia da multiplicação de *Pseudomonas syringae* (CHA; DONALD, 1993). Porém, Zocolli, Takatsu e Uesugi (2011) observaram a paralização do crescimento de *Psg* somente em concentrações acima de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ , em meio de cultura sólido, composto por 3 g de caseína hidrolisada, 0,6 g de extrato de levedura, 3 ml de glicerina e 18 g de ágar bacteriológico em 1,5 litro de água destilada. No entanto, no campo, a recomendação da maioria dos produtos cúpricos está entre as doses de 2000 e  $3500 \text{ mg.L}^{-1}$  (BRASIL, 2017), ou seja, aproximadamente 100 e 10 vezes superior à concentração dos meios líquidos e sólidos citados, respectivamente. Essa concentração superior deve-se, provavelmente, a perda por deriva, por não atingir o alvo, por absorção da planta e por interagir com outros ânions tanto

da calda aplicada quanto nas superfícies foliares, impedindo obter a dose mínima bacteriostática.

Os fertilizantes foliares cúpricos são utilizados para manter e corrigir o teor de cobre foliar visando ao crescimento normal da planta (FAQUIN, 2002; RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999). A quantidade de cobre recomendada via fertilizantes foliares para o cafeeiro varia de 150 a 600 ppm ou  $\text{mg.L}^{-1}$  (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999) sendo de 3,3 a 20 vezes menor em relação a menor dose de bula dos produtos cúpricos destinados ao controle de bacterioses. Os fertilizantes foliares de Cu muitas vezes são constituídos de ânions acompanhantes de alta solubilidade como o nitrato, substâncias ácidas ou quelatizantes, por exemplo aminoácidos e EDTA (CESAR; GISELA, 1999). As moléculas com nitrato são altamente dissociáveis em água (AGHAIE; AGHAIE; EBRAHIMI, 2007), proporcionando alta absorção simultânea deste na folha com seu íon acompanhante (PEYVAST et al., 2009). Brunetto, Melo e Kaminski (2008) observaram aumento na absorção de  $\text{Ca}^{+2}$  na folhas de pessegueiro tratadas com nitrato de cálcio em relação às demais formulações cúpricas, confirmando o papel do nitrato na absorção do cátion acompanhante. As substâncias ácidas ao reduzirem o pH da solução fertilizante e em contato com a folha alteram a permeabilidade da membrana plasmática, aumentando a absorção do  $\text{Cu}^{+2}$  (MARSCHNER, 2012). Enquanto, as substâncias quelatizantes complexam com o íon cobre e reduzem a atividade do metal, proporcionando absorção 5 vezes maiores em relação à mesma molécula sem quelatos (SILVA et al., 2014). Sendo assim, a absorção de Cu, na folha, é maior, com o emprego de fertilizantes à base de nitrogênio e quelatos, quando comparado mesmo a fungicidas em doses maiores.

Alguns cafeicultores utilizam os fertilizantes cúpricos, no lugar dos fungicidas, com o objetivo de nutrir a planta e protegê-la. Portanto, sua utilização deve ser criteriosa, pois além das dosagens serem menores, a maior parte do cobre tende a ser absorvida na folha (FAGERIA et al., 2009) e não forma a película protetora sobre estas (FRAC, 2016), com isso, a função do Cu como protetor fica comprometida. Uma vez absorvido na folha, o Cu para ter ação bacteriostática sobre as bactérias no parênquima foliar necessitaria estar em concentrações próximas a  $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de matéria seca (MS) (ZOCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011), sendo essa concentração muito acima do limite tolerado no cafeeiro, de  $55 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de MS.



### 2.3 Influência da temperatura e molhamento foliar em Psg e na mancha aureolada

Em relação à doença, para o seu estabelecimento, é necessário à interação entre um hospedeiro suscetível, um patógeno virulento e ambiente favorável (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Nas lavouras de cafeeiro, onde já foi constatada a mancha aureolada, obrigatoriamente o patógeno Psg está presente e, na maioria das vezes, o hospedeiro é suscetível (CARVALHO et al., 2011; SERA, 2001), porém mesmo nessas áreas a severidade da doença não aumenta durante o ano todo (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014). Portanto, nessas lavouras o progresso da doença fica dependente das condições ambientais favoráveis.

As variáveis ambientais temperatura e a duração do molhamento foliar têm influência direta em várias fases do ciclo das relações patógeno hospedeiro de bactérias fitopatogênicas (MARCUIZZO; FERNANDES; BECKER, 2009). A temperatura exerce papel principal na multiplicação e na regulação da velocidade de reações de diversas enzimas das bactérias da espécie *Pseudomonas syringae* (HOCKETT; BURCH; LINDOW, 2013), porém há variações da atividade de cada gene ou enzima dentro dessa mesma espécie. Para *Pseudomonas syringae* os genes e enzimas controladores da motilidade do flagelo e da síntese de fitotoxinas são reprimidos a 30°C, enquanto as enzimas do metabolismo, do transporte de substâncias e da tradução de proteínas são induzidas na mesma temperatura (HOCKETT; BURCH; LINDOW, 2013). No patovar de *P. syringae* pv. *phaseolicola* a produção de faseolotoxina acontece a 18 °C, sendo acima desse valor paralisado. Enquanto no intervalo entre 18 e 30°C acontece a maior tradução de proteínas e maior crescimento. A multiplicação da Psg *in vitro* foi realizada a 28°C em diversos trabalhos (ITHIRU et al., 2013; PÉREZ, 2015; RODRIGUES et al., 2017; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011) entretanto, não se sabe ao certo qual temperatura proporciona maior crescimento *in vitro* e tampouco qual o intervalo possível para multiplicar essa bactéria. Em alguns patovares de *Pseudomonas syringae* foi observado em 24 horas de incubação a 27,9 e a 27°C houve a maior formação de UFC de *P. syringae* pv. *persicae* e *P. syringae* pv. *phaseolicola*, respectivamente (YOUNG et al., 1977; NÜSKE & FRITSCHKE, 1989). Além da temperatura de máximo crescimento existe uma faixa nas quais a multiplicação varia pouco em relação à máxima. No caso das bactérias *P. syringae* pv. *persicae* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* estudadas por Young, Luketina e Marshall (1977) e Nüske e Fritsche (1989) essa faixa está entre 23 e 31°C. Dessa forma, a utilização de qualquer valor situado nesse intervalo pode ser utilizada para multiplicar o inóculo *in vitro*. A temperatura capaz de proporcionar a maior atividade de alguma enzima ou maior expressão

de algum gene não coincide necessariamente com a melhor para multiplicação celular *in vitro* sendo necessário realizar investigações a respeito.

O molhamento foliar propicia a formação de filme de água sobre a folha sendo este necessário para a locomoção e multiplicação bacteriana (GOTO, 2012; ICHINOSE; TAGUCHI; MUKAIHARA, 2013). Na ausência do filme de água a bactéria pode dessecar e paralisar as atividades metabólicas (MARCUIZZO; FERNANDES; BECKER, 2009). A água proporciona a motilidade da bactéria sendo essa realizada por 2 a 7 flagelos polares na *Psg* (RODRIGUES et al., 2013), os quais além da locomoção percebem sinais químicos do meio e guiam as bactérias por quimiotactismo (MELOTTO et al., 2006). As bactérias, por serem unicelulares e não conseguem realizar a penetração e colonizar de forma isolada, necessitam se comunicar por *quorum sensing* para coordenar a penetração na planta (NG & BASSLER, 2009), essa comunicação só é possível com a presença de água livre sobre a folha. Portanto, a temperatura e o molhamento foliar exercem influência direta sobre o patógeno.

Além de atuarem de forma isolada, a interação temperatura e duração do molhamento é um importante fator nas fases de sobrevivência, penetração e colonização dos patógenos de etiologia bacteriana. A fase de sobrevivência dos patógenos é a mais influenciada por fatores ambientais os quais reduzem o inóculo inicial. A população da bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, sobrevivendo de forma epifítica, é reduzida acima de 32°C mesmo na presença de molhamento foliar enquanto abaixo dessa temperatura mesmo sem molhamento foliar esta é capaz de sobreviver por 14 dias (SCHNEIDER; GROGAN, 1977). Rojas et al. (2012) ao estudarem a bactéria *Erwinia tracheiphila* em melão observou maior sobrevivência entre 10 e 15°C com molhamento foliar contínuo, reduzindo em 10 vezes o número de bactérias em temperaturas superiores a 30°C ou depois de 12 horas sem molhamento. Na penetração, o patógeno geralmente sofre maior influência ambiental em relação à fase de colonização. Schneider e Grogan (1977), ao estudar *P. syringae* pv. *tomato*, observaram ser possível a penetração das bactérias epifíticas sobreviventes, somente após 24 horas de molhamento foliar com temperaturas inferiores a 32°C enquanto na fase de colonização apenas a temperatura influenciou a bactéria, sendo acima de 39°C o maior progresso da doença. Latorre, Rioja e Lillo (2002), ao estudarem *P. syringae* pv. *syringae* em pera observaram as temperaturas inferiores a 5°C impedirem a penetração e a colonização da bactéria, enquanto a 5°C os eventos ocorreram com duração de 5 dias e a 20°C em apenas 2 dias. No estudo dos patossistemas *P. cichorii* em *Polaris chrysanthemum* e *Scarlet Pelargonium*, Jones, Raju e Engelhard (1984) relataram penetração e colonização da bactéria somente na presença de molhamento foliar constante e temperaturas entre 16 e 28°C. Para a bactéria *Xanthomonas*

*axonopodis* pv. *Citri* em laranjas, Pria et al. (2006) observaram ser necessárias condições ambientais de 12 a 40°C e molhamento foliar acima de 4 horas, para haver a penetração e colonização da bactéria, sendo a faixa ótima entre 30 e 35°C combinada com 24 horas de molhamento. Marcuzzo, Fernandes e Becker (2009) estudaram *Xanthomonas* spp. em folhas de tomateiro e obtiveram maiores severidades da mancha bacteriana a 25°C e molhamento foliar acima de 20 horas.

Embora alguns trabalhos citassem, de forma isolada, a influência de variáveis climáticas na mancha aureolada do cafeeiro, não há consenso sobre os valores de temperatura e duração do molhamento foliar favoráveis à infecção, tampouco da sua interação (BOTREL, 2013; ITHIRU et al., 2013; PÉREZ, 2015; ZOCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Em experimentos de inoculação em mudas foram utilizadas diferentes valores. Essas temperaturas variaram entre 18°C (ITHIRU et al., 2013), 23°C (PÉREZ et al., 2017) e 25°C (BOTREL, 2013). Quanto à duração do molhamento foliar Botrel (2013) utilizou 24 horas e Pérez et al. (2017) 48 horas. Portanto, é importante estudar a influência da interação temperatura e do molhamento foliar na severidade mancha aureolada, para assim prever em quais situações a doença pode iniciar o processo infeccioso no campo. Essa informação poderá contribuir inclusive para definir datas de pulverização e desenvolver sistemas de apoio à decisão para previsão da doença.

Para selecionar intervalos de temperatura e duração do molhamento foliar a serem estudados é ideal realizar levantamento prévio nas regiões onde o café é cultivado e apresenta problemas com a enfermidade. Em cidades produtoras de café, como Três Pontas, Campos Altos e Capelinha, situadas no Estado de Minas Gerais, apresentam temperaturas de 20,1°C, 17,6°C e 21,3°C, respectivamente e precipitações médias de 1500 mm.ano<sup>-1</sup> (BOTELHO et al., 2011) concentradas de outubro a março (ÁVILA; MELLO; VIOLA, 2009). Esse volume de precipitação concentrado em seis meses possibilita a duração do molhamento foliar mais prolongado no cafeeiro (MEIRA; RODRIGUES; MORAES, 2009). A seleção das temperaturas bem como o intervalo de unidade entre elas e a seleção da duração do molhamento foliar aumentam consideravelmente as chances de delimitar as condições mais favoráveis à mancha aureolada.

#### **2.4 A geoestatística aplicada ao manejo de doenças de plantas**

Para diagnosticar possíveis relações de dependência espacial de covariáveis ambientais com a doença no campo pode-se utilizar a geoestatística, uma técnica capaz de ser associada aos sistemas de informação geográfica, ao sensoriamento remoto e à estatística

(ALVES et al., 2011). Ao utilizar a geoestatística, é possível analisar e mapear a distribuição espacial das variáveis e da doença e relacioná-las entre si com a distribuição espacial de cada variável a partir dos mapas construídos.

A análise geoestatística surgiu da necessidade de considerar a dependência espacial de variáveis, as quais apresentavam coeficientes de autocorrelação acima de 75% estimados na análise de regressão, porém com resultados de interpolação não satisfatórios (ZAMBOTI, 2001). Nesses casos, a dependência espacial das variáveis estaria mascarando o resultado da interpolação. Krige (1951) ao realizar estudo baseado na concentração de ouro obtido nas jazidas observou a necessidade de considerar a distância entre as unidades amostrais para assim descrever com precisão a distribuição espacial do fenômeno. A partir daí Matheron (1963) desenvolveu a teoria das variáveis regionalizadas, sendo esta uma função numérica com continuidade aparente no espaço, porém sem possível representação por uma função determinística (FREITAS, 2013; YAMAMOTO, 2001). Posteriormente, os pontos amostrais passaram a ser georreferenciados com o uso de GPS para obter boa precisão da localização dos pontos (ALVES et al., 2009).

A geoestatística fundamenta-se na construção de semivariogramas e na posterior krigagem dos modelos ajustados, obtendo mapas espaciais da variável em estudo. O semivariograma descreve a estrutura da variabilidade espacial (ALVES et al., 2009; FREITAS, 2013) e apresenta três parâmetros importantes: o efeito pepita ( $C_0$ ), o patamar ( $C_0+C_1$ ) e o alcance (A) (ALVES et al., 2006; SILVA et al., 2003). O ( $C_0$ ) refere-se ao valor da semivariância na distância zero e significa a variação não atribuída a dependência espacial, o ( $C_0+C_1$ ) é o valor da variância quando esta passa a ser constante correspondendo ao máximo da variância permitindo identificar a distância entre a dependência e a independência entre as amostras e o (A) é a distância da origem até o ponto onde o patamar atinge valores estáveis sendo considerado o limite da dependência espacial da grandeza mensurada (FREITAS, 2013). Após construir e selecionar semivariogramas, é possível observar a dependência espacial e quando existente pode-se realizar a interpolação. A Krigagem permite interpolar os valores não medidos com variância mínima e sem tendência (SILVA et al., 2003), pois estima valores de variáveis distribuídas no espaço, a partir de valores adjacentes enquanto considerados como interdependentes no semivariograma (LANDIM, 2006).

A técnica da geoestatística também já foi empregada na agricultura para estudar a distribuição espacial de bacterioses em plantas como o crestamento bacteriano da avelã e o mal de Pierce da videira (LAMICHHANE et al., 2013; PARK et al., 2011), de pragas e

doenças do cafeeiro (ALVES et al., 2009, 2011) e de nutrientes no solo (FERRAZ et al., 2015).

O crestamento bacteriano da Avelã (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*) apresentou forte correlação positiva com a precipitação e nitrogênio no solo e correlação negativa com Mg e K (LAMICHHANE et al., 2013). Esse estudo foi conduzido durante três anos em uma província da Itália onde cada ponto amostral representava uma lavoura de uma cidade, com plantas de 300 avelãs amostradas em cada local. A grande distância existente entre esses pontos amostrais permite um estudo de distribuição espacial, porém sem parâmetro para descrever a disseminação da bacteriose, pois estas são disseminadas no campo a curtas distâncias por chuva e vento (GOTO, 2012). Já no estudo do mal de Pierce da videira (*Xylella fastidiosa*), foi possível observar uma distribuição espacial restrita a focos, pois a avaliação utilizou de grids amostrais dentro da área estudada (PARK et al., 2011). Nesses estudos a variável incidência da doença foi amostrada uma única vez no ano, ficando dependente da escolha do momento adequado de amostragem para não perder a distribuição máxima da doença. O modelo matemático para semivariogramas avaliado nos dois experimentos foi o esférico, por ser o mais facilmente ajustado a qualquer nuvem de pontos com patamar (FERRAZ et al., 2015).

Em relação às doenças e pragas do cafeeiro as malhas utilizadas foram intercaladas na mesma área de 25 x 25 e 50 x 50 metros (ALVES et al., 2009; ALVES et al., 2011). A distância determinada na construção do grid amostral reflete, no parâmetro, alcance determinado no semivariograma. Se a distância entre pontos amostrados for superior à distância de influência do fenômeno avaliado a construção do semivariograma e as estimativas ficam comprometidas (ALVES et al., 2009, 2011). Porém, se a distância mostrada for pequena a avaliação fica demorada e se explora uma área menor. Portanto, quando não se conhece a distribuição da doença é importante montar uma malha amostral com distância entre os pontos maiores e outra com distâncias menores. No estudo da distribuição espacial da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro, estas ficaram distribuídas em focos ou reboleiras, apresentando alcance variando de 38 a 78 metros e de 40 a 74 metros respectivamente (ALVES et al., 2011). No estudo das pragas do cafeeiro, os insetos *Hypothenemus hampei* e *Leucoptera coffeella* estavam distribuídos em focos na área, sendo o alcance da broca de 35 metros e do bicho mineiro de 125 metros (ALVES et al., 2009). Nesses estudos, foram utilizados os modelos matemático, exponencial e esférico respectivamente para ajustar o modelo de distribuição espacial da variável em questão. Além da análise geoestatística Alves et al. (2009) utilizaram a correlação de quadrado de Pearson

para verificar a interação entre a incidência e a severidade da doença. O estudo de correlação entre duas variáveis é necessário para saber o nível de interação entre elas e se são direta ou inversamente proporcionais (TAYLOR, 1990).

Desse modo, a geoestatística permite observar a estrutura e a magnitude da variação espacial das covariáveis estudadas e correlacioná-las com a doença permitindo assim selecionar e discriminar aquelas passíveis de serem empregadas no controle da doença, possibilitando manejo eficiente.

## REFERÊNCIAS

- AGHAIE, M.; AGHAIE, H.; EBRAHIMI, A. Thermodynamics of the solubility of barium nitrate in the mixed solvent, ethanol + water, and the related ion-association. **Journal of Molecular Liquids**, London, v. 135, n. 1, p. 72-74, 2007.
- ALVES, M. C. et al. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum spp.* transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 6, p. 557-563, 2006.
- ALVES, M. C. et al. Geostatistical analysis of the spatial variation of the berry borer and leaf miner in a coffee agroecosystem. **Precision Agriculture**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 18-31, 2011.
- ALVES, M. C. et al. Intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] nas cultivares Conquista, savana e suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 239-244, 2007.
- ALVES, M. C. et al. Modeling spatial variability and pattern of rust and brown eye spot in coffee agroecosystem. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 82, n. 2, p. 137-148, 2009.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C. G.; PINHEIRO, E. D. A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- ANCO, D. J.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. Effects of temperature and wetness duration on the sporulation rate of *Phomopsis viticola* on infected grape canes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 5, p. 579-589, 2013.
- ÁVILA, L. F.; MELLO, C. D.; VIOLA, M. R. Mapeamento da precipitação mínima provável para o sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 906-915, 2009. Suplemento.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.
- BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; SOUZA, R. M. A mancha aureolada do cafeeiro. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 22, p. 227-256, 2014.
- BOTELHO, C. E. et al. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de café arábica em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 12, p. 1404-1411, dez. 2011.
- BOTREL, D. A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae*pv. *garcae***. 2013. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**.

Disponível em:

<[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=5369&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5369&p_tipo_janela=NEW)>. Acesso em: 2 mar. 2017.

BRITO, G. G. et al. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do Híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2007, Águas de Lindóia. **Resumos Expandidos...** Águas de Lindóia, 2007. 1 CD-ROM.

BRUNETTO, G.; MELO, W.; KAMINSKI, J. Foliar application of calcium in peach in Serra Gaúcha: evaluation of content of nutrients in the leaf, fruit and yield. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 528-533, 2008.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 523 p.

CARISSE, O.; KUSHALAPPA, A. P. Development of an infection model for *Cercospora carotae* on carrot based on temperature and leaf wetness duration. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 1233-1238, 1990.

CARMO, D. L. et al. Micronutrientes em solo e folha de cafeeiro sob sistema agroflorestal no sul de Minas Gerais. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 76-83, 2012.

CARVALHO, A. M. et al. Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 3, p. 269-275, mar. 2011.

CESAR, M. J.; GISELA, F. Adubos foliares quelatizados e sais na absorção de boro, manganês e zinco em laranja Pera. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 999-1004, 1999.

CHA, J. S.; DONALD, A. C. Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1671-1674, 1993.

CHILLAPPAGARI, S. et al. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, p. 2512-2524, 2010.

COSTA, A. S.; SILVA, D. M. A mancha aureolada do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 19, p. 92-98, 1960.

FAGERIA, N. K. et al. Foliar fertilization of crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 32, n. 6, p. 1044-1064, 2009.

FAQUIN, V. **Diagnose do estado nutricional das plantas**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 2002. 77 p.

FERRANTE, P. et al. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of



epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 94, n. 2, p. 455-461, 2012.

FERRAZ, G. A. S. et al. Variabilidade espacial da dose de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O para adubação diferenciada e convencional em lavoura cafeeira. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 3, p. 346-356, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO estatistical pocketbook coffee**. Rome, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2016.

FREITAS, A. S. **Sigatoka-amarela da bananeira em função da nutrição mineral em solução nutritiva e da distribuição espacial da fertilidade do solo**. 2013. 79 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **FRAC code list Sorted by mode of action**. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 286-291, 2003.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 631-639, 2005.

GHINI, R. et al. Risk analysis of climate change on coffee nematodes and leaf miner in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 2, p. 187-194, fev. 2008.

GILARDI, G.; GULLINO, M.; GARIBALDI, A. Evaluation of spray programmes for the management of leaf spot incited by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato cv. Cuore di bue. **Crop Protection**, Oxford, n. 29, p. 330-335, 2010.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, p. 157-167, 2008.

GLINUSHKIN, A. P. et al. Bacterial diseases of wheat in the southern ural: manifestations, biological characteristics and monitoring features. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Budapest, v. 51, n. 1, p. 57-67, 2016.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 2012. 364 p.

HAKIZA, G. J. et al. Coffee wilt disease in Uganda. In: FLOOD, J. (Ed.). **Coffee wilt disease**. Wallingford: CAB, 2009. p. 28-49.

HOCKETT, K. L.; BURCH, A. Y.; LINDOW, S. E. Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59850, 2013.

- ICHINOSE, Y.; TAGUCHI, F.; MUKAIHARA, T. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 79, n. 5, p. 285-296, 2013.
- ITHIRU, J. M. et al. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. **African Journal of Agriculture Research**, Lesotho, v. 8, n. 21, p. 2450-2454, 2013.
- ITO, D. S. et al. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p. 99-103, 2008.
- JONES, J. B.; RAJU, B. C.; ENGELHARD, A. W. Effects of temperature and leaf wetness on development of bacterial spot of geraniums and chrysanthemums incited by *Pseudomonas cichorii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 3, p. 248-251, 1984.
- 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.
- KAIRU, G. M.; NYANGENA, C. M. S.; CROSSE, J. E. The effect of copper sprays on bacterial blight and coffee berry disease in Kenya. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 207-213, 1985.
- KIM, K. W.; KIM, K. R.; PARK, E. W. Effects of interrupted wetness periods on conidial germination, germ tube elongation and infection periods of *Botryosphaeria dothidea* causing apple white rot. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2016.
- KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 44, p. 301-307, 1954.
- KITAJIMA, E. W. et al. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the *Coffee ringspot virus* (CoRSV). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 503-507, 2011.
- KOBAE, Y. et al. Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 3, p. 309-318, 2006.
- KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: RUDOLDH, K. et al. (Ed.). ***Pseudomonas syringae* and related pathogens**. New York: Springer, 1997. p. 538-541.
- KRIGE, D. G. **A statistical approach to some mine valuation and allied problems on the Witwatersrand**. 1951. 139 f. Thesis (Ph.D. in Science)-University of the Witwatersrand, Johannesburg, 1951.

- LAMICHHANE, J. R. et al. Epidemiological study of hazelnut bacterial blight in central Italy by using laboratory analysis and geostatistics. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e56298, 2013.
- LANDIM, P. M. B. Sobre geoestatística e mapas. **Terra e Didática**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 33-35, 2006.
- LATORRE, B. A.; RIOJA, M. E.; LILLO, C. The effect of temperature on infection and a warning system for pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Crop Protection**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2002.
- LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de *Alternaria* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 193-200, 2002.
- LIMA, L. M. D. et al. Relationship between nitrogen/potassium with Phoma spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 4, p. 223-228, 2010.
- MARCUZZO, L. L.; FERNANDES, J. M. C.; BECKER, W. F. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 229-230, 2009.
- MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 2012. 643 p.
- MATHERON, G. Principles of geostatistics. **Economic Geology**, Lancaster, n. 5, p. 1246-1266, 1963.
- MEIRA, C. A. A.; RODRIGUES, L. H. A.; MORAES, S. D. Modelos de alerta para o controle da ferrugem-do-cafeeiro em lavouras com alta carga pendente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 3, p. 233-242, mar. 2009.
- MELLO, M. et al. Use of antibiotics and yeasts for controlling Chinese cabbage soft rot. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.
- MELOTTO, M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, London, v. 126, n. 5, p. 969-980, 2006.
- MOHAN, S. K.; PAVAN, M. A. Resistência em cultivares e espécies de *Coffea* à *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 2, n. 1, p. 91-98, 1977.
- MONTEIL, C. L.; BARDIN, M.; MORRIS, C. E. Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 11, p. 2290-2304, 2014.
- MORRIS, C. E.; MONTEIL, C. L.; BERGE, O. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 85-104, 2013.

NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial *quorum-sensing* network architectures. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 43, p. 197-222, 2009.

NÜSKE, J.; FRITSCHKE, W. Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 29, n. 7, p. 441-447, 1989.

ORDAX, M. et al. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3482-3488, 2006.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PAN, Z. et al. Long-term prediction of soybean rust entry into the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 840-846, 2006.

PARK, Y. L. et al. Spatial distribution of Pierce's disease related to incidence, vineyard characteristics, and surrounding land uses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 62, n. 2, p. 229-238, 2011.

PÉREZ, C. D. P. **Interação do nitrogênio com o potássio na intensidade da ferrugem e da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PEYVAST, G. et al. Uptake of calcium nitrate and potassium phosphate from foliar fertilization by tomato. **Journal of Horticulture and Forestry**, Timișoara, v. 1, n. 1, p. 7-13, 2009.

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

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. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 67-106.

PRIA D. M. et al. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 657-663, 2006.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 25-32.

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

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

RODRIGUES, L. M. R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agronômico, 2012. 24 p.

RODRIGUES, L. M. R. et al. **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agronômico, 2013. 24 p.

ROJAS, E. S.; GLEASON, M. L. Epiphytic survival of *Erwinia tracheiphila* on muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 1, p. 62-66, 2012.

RUPARELIA, J. P. et al. Strainspecificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 707-716, 2008.

SANTO, C. E. et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 794-802, 2011.

SCHNEIDER, R. W.; GROGAN, R. G. Bacterial speck of tomato: sources of inoculum and establishment of a resident population. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 3, p. 388-394, 1977.

SERA, T. Coffee genetic breeding at IAPAR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 179-190, 2001.

SILVA, A. D. A. et al. Soil and leaf micronutrient concentration with the application of sulfate and chelated sources and in common bean. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 28-37, 2014.

SILVA, A. F. et al. Variabilidade espacial de atributos químicos do solo cultivado com café arábica (*Coffea arabica* L.) sob diferentes manejos. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 173-182, 2010.

SILVA, V. R. Variabilidade espacial das características químicas do solo e produtividade de milho em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 6, p. 1013-1020, 2003.

TAYLOR, R. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 35-39, 1990.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Coffee**: world markets and trade Foreign Agricultural Service/USDA. Washington, 2017. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

WALLIN, J. R.; LOONAN, D. V. Effect of leaf wetness duration and air temperature on *Cercospora beticola* infection of sugar beet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 546-549, 1971.

YAMAMOTO, J. K. **Avaliação e classificação de reservas minerais**. São Paulo: EDUSP, 2001. v. 1, 226 p.

YOUNG, J. M.; LUKETINA, R. C.; MARSHALL, A. M. The effects on temperature on growth in vitro of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas pruni*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 345-354, 1977.

ZAMBOTI, J. L. **Mapas pluviométricos médios mensais no verão para o estado do Paraná, utilizando métodos geoestatísticos**. 2001. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Occurrence of halo bright in coffee trees in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba Region's, Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p. 843-849, 2011.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO 1 - COPPER FORMULATIONS IN BACTERIAL BLIGHT CONTROL AND TOXIC EFFECTS ON COFFEE SEEDLINGS**

Marcelo Loran de Oliveira Freitas\*<sup>1</sup>, Edson Ampélio Pozza<sup>2</sup>, Adélia Azis Alexandre Pozza<sup>3</sup>, Leônidas Leoni Belan<sup>4</sup>, Humberson Rocha da Silva<sup>5</sup>, Paulo Estevão de Souza<sup>6</sup>

<sup>1,2,4,5,6</sup>Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Soil Science, Federal University of Lavras, MG 37200-000, Brazil

\* Corresponding author <sup>1</sup>marceloloran@yahoo.com.br

<sup>2</sup>edsonpozza@gmail.com, <sup>3</sup>adeliapozza@gmail.com, <sup>4</sup>leonidas\_agronomia@yahoo.com.br,

<sup>5</sup>humbersonagronomo@yahoo.com.br, <sup>6</sup>pauleste@dfp.ufla.br

Artigo Preparado de acordo com as normas do periódico “**Crop protection**”

(VERSÃO PRELIMINAR)

## Abstract

Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) can be treated with antibiotic and copper-based fungicides. Copper compounds raise doubts among coffee growers regarding control efficiency and toxic potential. This study investigated bacterial blight management and toxicity in leaf tissues of coffee plants sprayed with different copper molecules. The experiment was conducted with coffee seedlings under controlled environmental conditions. Treatments were cuprous oxide, copper oxychloride, copper hydroxide 1 (Water dispersible granules) and 2 (Concentrated suspension), copper sulfate 1 (Fertilizer) and 2 (Bordeaux mixture), copper nitrate, kasugamycin in maximum recommended doses, control, and saline solution. All treatments were sprayed and inoculated with bacterial suspension after 24 hours. Analysis was performed every two days in a 16-day period for severity and incidence to calculate area under the severity progress curve and the incidence progress curve. Incidence and severity of phytotoxicity, dry weight, mapping and quantification of copper on tissue surface with x-ray microanalysis, and total copper content in leaf tissue were evaluated at the end of the experiment. Data were transformed by  $\sqrt{x + 0.5}$  and submitted to Scott-Knott test ( $p > 0.5$ ). Cuprous oxide and copper sulfate 2 at 2500 mg.kg<sup>-1</sup> proved most efficient to bacterial blight control, causing lower toxicity and more covering of leaf tissue in coffee seedlings.

**Key Words:** *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, coffee, copper, phytotoxicity

## 1. Introduction

Coffee (*Coffea arabica* L.) is consumed in all continents, mainly in temperate countries in the northern hemisphere (USDA, 2016 b.) which, however, are not coffee growers. Brazil is the largest producer and exporter, with 33% of world production, equivalent to 54.3 million 60-kg bags of product benefited in 2015 (USDA, 2016 a.). Although, this production may be reduced due to factors such as climatic adversities, diseases, and pests.

Bacterial blight of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al., 1956) has been an important disease in major coffee growing regions in Brazil and around the world, for causing significant losses (Pozza et al., 2010). It is the main disease of coffee crops in cold and windy areas (Sera, 2001). Disease outbreaks have been reported in seedling



nurseries and plantations in Kenya and Ethiopia (Ithiru et al., 2013). Symptoms are necrotic spots on leaves with or without a yellow halo, death of orthotropic and plagiotropic branches and rotten buds, with consequent reduction of crop productivity (Rodrigues et al., 2015; Zocolli et al., 2011). Predominant growing of cultivars susceptible to bacterial blight (Petek et al., 2006; Pozza et al., 2010) and absence of efficient measures, even of chemical control, has potentialized losses.

As coffee growers increase pesticide application in an attempt to contain the disease, production costs also rise. Farmers use often-inefficient sprays with antibiotics and copper products, mainly in the form of copper hydroxide, sulfate, oxychloride and nitrate, and cuprous oxide (FRAC, 2015). Copper compounds can have fungicidal and bacteriostatic effect. Furthermore, copper is an essential micronutrient for plant cells, acting as a cofactor responsible for aerobic respiration (Marschner, 2012).

Copper is a non-systemic protective substance, which acts by contact and is little absorbed by the cuticle. Affects the plasma membrane of pathogens (Ruparelia et al., 2008). Paralyzing cell multiplication and acting as a bacteriostatic agent (Ordax et al., 2006). Thus, it must be evenly distributed on leaves to affect the bacteria (Gisi & Sierotzki, 2008), depending on product choice, application dose, and application technology.

Product concentrations recommended for coffee disease control in Brazil are up to 2500 mg.kg<sup>-1</sup> (AGROFIT, 2016), with a minimum 200 mg.kg<sup>-1</sup> to avoid multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Zocolli et al., 2011). However, plant nutrition requires 37.1 mg.kg<sup>-1</sup> copper content (Reis et al., 2002) with values reaching up to 55 mg.kg<sup>-1</sup> (Carmo et al., 2012). Above this concentration, copper starts to affect plant cells and causes phytotoxicity.

Then this study evaluated the efficiency of different copper molecules in bacterial blight control and their potential phytotoxic effects on coffee seedlings.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Plant material and experimental conditions**

The experiment was conducted in plant growth chamber under controlled temperature  $23 \pm 2$  °C, relative humidity  $70 \pm 3\%$  and 12-hour photoperiod with 2000-Watt fluorescent bulbs.

Coffee seedlings from cv. Catuaí Vermelho IAC-99 with six pair of leaves were cultivated in substrate composed of soil, cattle manure, and sand in proportion 3:1:1 respectively. Irrigation was performed daily with the same amount of water per seedling, without reaching leaves.

Trials were conducted in randomized block design with 10 treatments and 4 replicates, with each experimental unit consisting of three coffee seedlings. The experiment was carried out in two periods to evaluate result repetition. Combined analysis of variance of data was performed over time.

## 2.2 Treatments

Commercial products were used as copper sources. Efficiency was evaluated in copper hydroxide, sulfate, oxychloride and nitrate, and cuprous oxide (Table 1). The trial used the highest doses of products registered at the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA), according to laws and guidelines to evaluate efficiency and toxicity to animals and humans (AGROFIT, 2016). Doses recommended by manufacturers ranged 167,5 to 2500 mg.kg<sup>-1</sup> of copper. Antibiotic kasugamycin was used for comparing efficiency of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* control. Treatments with saline solution and control were sprayed with sterilized distilled water (Table 1).

Table 1. Treatments evaluated for control of bacterial blight of coffee.

Treatments / active ingredient and controls	Commercial Name	Formulation	Dose of commercial product	Quantity of Cu <sup>2+</sup> in the commercial product (%)	Quantity of Cu <sup>2+</sup> applied (mg.kg <sup>-1</sup> or mg.L) <sup>1</sup>
Copper oxychloride	Recop <sup>®</sup>	Wettable powder	5 g.L <sup>-1</sup>	50	2500
Cuprous oxide	Big red <sup>®</sup>	Wettable powder	5 g.L <sup>-1</sup>	50	2500
Copper hydroxide1	Kocide <sup>®</sup>	Water dispersible granules	4.72 g.L <sup>-1</sup>	53	2500
Copper nitrate	Copper crop <sup>®</sup>	True solution	1.25 ml.L <sup>-1</sup>	13.4	167.5
Copper sulfate1	Copper glucone <sup>®</sup>	True solution	5 ml.L <sup>-1</sup>	6	300
Copper hydroxide 2	Supera <sup>®</sup>	Concentrated suspension	7.15 ml.L <sup>-1</sup>	35	2500
Copper sulfate 2	Copper sulfate	Soluble granules	10 g.L <sup>-1</sup>	25	2500
Kasugamycin	Kasumin <sup>®</sup>	Concentrated solution	3 ml.L <sup>-1</sup>		---
Saline solution	---	---	---		---
Control	---	---	---		---

<sup>1</sup> based on 400 L/ha

The trial used two copper hydroxide formulations, a concentrated suspension (SC), and water dispersible granules (WG). Foliar fertilizers had the lowest concentrations of metallic copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Differently from fungicides, they presented formulations with other products. Copper is complexed with nitrate in Copper crop, and Copper gluconate contains gluconic acid and sulfur.

Treatments were sprayed on both sides of all seedling leaves to the point of runoff, using a Strong® sprayer with cone nozzle filled at average pressure 30 lbs. After seven days the plants were inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

### 2.3 Inoculum production and inoculation

Reference isolate *P. syringae* pv. *garcae* souche pathotype (CFPB1634) was used for inoculating seedlings, multiplied in Petri dishes 9 mm with culture medium 523 Kado & Heskett (1970). Dishes were incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  and 12-hour photoperiod. After 48 hours, bacterial cells were suspended in sterilized saline solution (NaCl 0.85%). Bacterial concentration was determined in spectrophotometer at 600 nm (OD600), according to Oliveira & Romeiro (1990). Bacterial cell suspension was prepared by dilution in sterilized saline solution at  $1.1 \times 10^9$  UFC/mL concentration (absorbance 0.2). Inoculum suspension was sprayed on both sides to the point of runoff, using the same equipment and conditions described for spraying. As saline solution was used to calibrate bacterial suspension, which is composed of sodium chloride, a treatment with this solution without bacteria was used to differentiate its possible phytotoxic effect from symptoms of disease.

### 2.4 Evaluation of disease intensity

After first disease symptoms, seven incidence and severity assessment were performed in the first three pairs of leaves in seedlings, with two-day intervals. Incidence, or percentage of leaves with symptoms, was estimated from the relation between total injured leaves and total evaluated samples, and mean incidence per plot was calculated. To evaluate severity the diagrammatic scale of Belan et al. (2014) was used and calculated each plot mean in relation to total leaves.

In each experimental unit, incidence and mean severity rates over time were used to plot disease progress curves and calculate area under incidence progress curve (AUIPC) and area under severity progress curve (AUSPC), as proposed by Shaner & Finney (1977).

### 2.5 Weight of dried leaves and analysis of copper content in leaf tissue

After 30 days of application of treatments at the end of experiment, leaves were collected, previously washed in deionized water to remove impurities and spray residues (Malavolta, 1997), and dried in forced-air circulation oven at  $60^\circ\text{C}$ . Dried leaves were then

weighted (g) on a precision scale and analyzed for copper contents, according to the method by Malavolta (1997).

## 2.6 X-ray microanalysis of copper in outer leaf tissue

Spatial distribution of copper on the abaxial leaf surface was evaluated with X-ray microanalysis mapping in scanning electron microscopy (SEM). Fragments of leaves 5 cm<sup>2</sup> randomly collected from leaf blades were fixed in aluminum stubs with double adhesive carbon tape, identified and maintained for 24 hours in a desiccator with silica gel to dehydrate samples. Then, they were placed into sputter (MED 010, Balzer) for carbon coating. Samples were observed in scanning electron microscopy (Leo Evo 40 XVP) coupled to detection system MAX: EDS-X Flash Detector 5010 (Bruker) and analyzed with ESPIRIT 1.9 software (Bruker).

Five observations were made per treatment. A fixed size rectangular area was mapped for each examination, and the qualitative distribution of copper ions on leaf abaxial surface was represented in images. These were generated at 20 Kv, distance 8.5 mm, increase  $\pm$  80 times and Kcps ranging 3 to 4.

Images were processed using Assess® software for percentage of leaf area coated with copper. Five images were analyzed per treatment, corresponding to replicates.

## 2.7 Evaluation of phytotoxicity

By 21 days after inoculation, incidence and severity of toxicity symptoms were assessment in leaves. Incidence was based on the relation between total leaves with symptoms and total leaves sampled per plant. Severity was analyzed with digitized images of leaves, processed with Assess® software to quantify percentage of injured leaf area in relation to leaf total.

## 2.8 Data analysis

Data of variables AUIPC, AUSPC, incidence and severity of toxicity, dried leaf weight, copper content in leaf tissue, and percentage of leaf area covered by copper were submitted to analysis of variance. As data did not meet ANOVA assumptions of normality (Shapiro Wilk), homogeneity (Bartlett) and independence (Durbin Watson) tests, they were transformed. Treatments significant by F-test were compared by Scott-Knott grouping test ( $p = 0.05$ ). Statistical analyses were performed using R® software.

### 3. Results

Combined analysis of data over time showed no significant difference ( $p < 0.05$ ) for both experiments. Thus, results refer to the mean of experiments.

There was a difference ( $p < 0.05$ ) between treatments for AUIPC and AUSPC in bacterial blight control in coffee leaves. All copper molecules and the antibiotic reduced AUIPC and AUSPC in relation to control (Table 2). However, copper molecules in the form of cuprous oxide, oxychloride, nitrate, and sulfate were more efficient than copper hydroxide and antibiotic regarding AUIPC (Table 2). Treatments did not differ for AUSPC (Table 2). The treatment with saline solution showed no symptoms of disease.

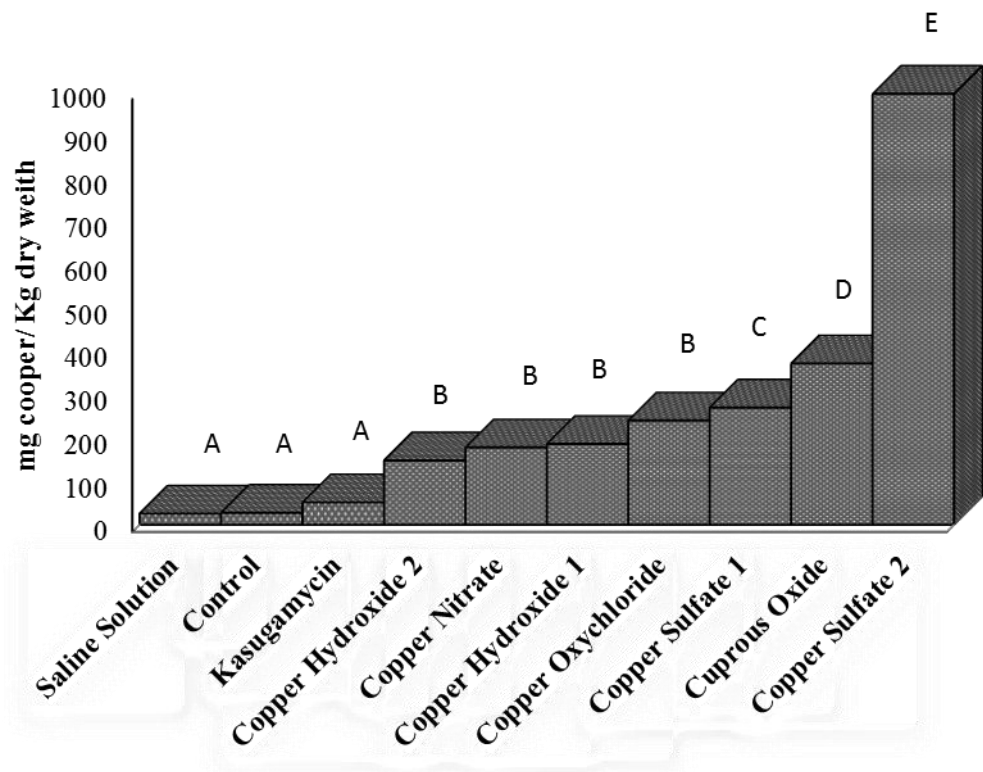
**Table 2** Mean values of area under the incidence progress curve (AUIPC) and severity progress curve (AUSPC) of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*).

Treatments	AUIPC	AUSPC
Cuprous oxide	5.2 C	0.02 B
Copper oxychloride	12.5 C	0.06 B
Copper nitrate	17.7 C	0.08 B
Copper sulfate 2	37.5 C	0.17 B
Copper sulfate1	37.5 C	0.18 B
Kasugamycin	40.6 B	0.2 B
Copper hydroxide1	45.8 B	0.25 B
Copper hydroxide2	111.4 B	0.62 B
Control	526.0 A	5.10 A
Saline solution	0 C	0 B

Means followed by the same letter in the column do not differ by Scott-Knott test at 5% significance. Means transformed by  $\sqrt{(x + 0.5)}$ .

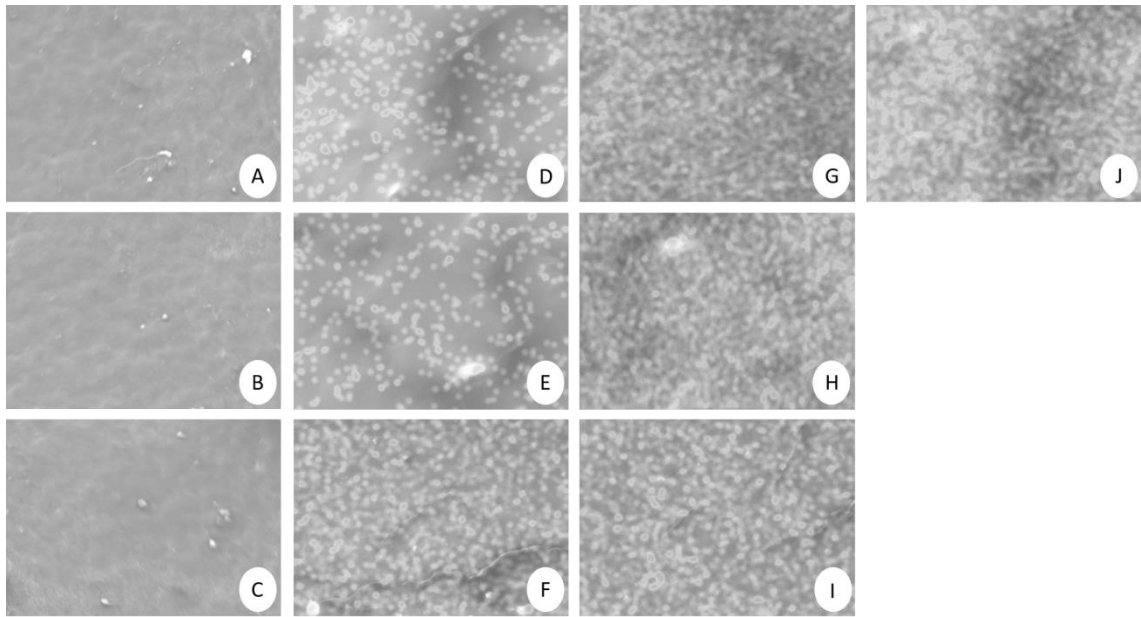
Treatments showed no significant difference for dry leaf weight ( $p < 0.05$ ), with mean 1.25 g.

There was a difference ( $p < 0.05$ ) between treatments in relation to copper content in leaf tissue (Figure 1). The highest copper content occurred in leaves of seedlings sprayed with copper sulfate 2. This content gradually decreased to minimum values in treatments with saline solution, kasugamycin and control (Figure 1).



**Figure 1** Mean values of copper contents in  $\text{mg.kg}^{-1}$  of dry weight of leaves in coffee seedlings sprayed with different copper formulations. Bars followed by the same letter in the column do not differ by Scott-Knott test at 5% significance. Means transformed by  $\sqrt{(x + 0.5)}$ .

There was a difference between treatments to percentage of foliar area covered with copper. The lowest percentage of copper on leaves occurred in saline solution, control and kasugamycin and the highest percentage in cuprous oxide, copper hydroxide1 and 2, copper oxychloride, and copper sulfate2 (Figure 2 and Table 3).



**Figure 2** X-ray microanalysis for mapping copper (white color) on the abaxial surface of coffee leaves in seedlings sprayed with the following treatments: A. saline solution; B. Control; C. kasugamycin; D. copper sulfate1; E. copper nitrate; F. copper hydroxide1; G. copper oxychloride; H. copper hydroxide2; I. cuprous oxide; and J. copper sulfate2.

**Table 3** Percentage of abaxial leaf area of coffee covered with copper, based on Assess® software processing of images generated by X - ray electron microscopy.

Treatment	Percentage of leaf area covered with copper
Saline solution	0.6 C
Control	0.7 C
Kasugamycin	0.9 C
Copper nitrate	26.6 B
Copper sulfate1	32.4 B
Copper hydroxide1	94.6 A
Copper hydroxide2	95.9 A
Copper oxychloride	96.8 A
Cuprous oxide	96.8 A
Copper sulfate2	98.3 A

Means followed by the same letter in column do not differ by Scott-Knott test at 5% significance. Means transformed by  $\sqrt{x + 0.5}$ .

Symptoms of toxicity in leaves were tanning followed by necrosis of the affected area. All treatments caused toxicity in leaves of coffee seedlings; however, there were differences ( $p < 0.05$ ) in incidence and severity of toxicity. The treatment containing copper nitrate showed higher incidence and severity of toxicity symptoms in leaves, although at the lowest dose of Cu (Table 4).

**Table 4** Mean values of incidence and severity of toxicity in coffee seedlings sprayed with different copper formulations.

Treatment	Toxicity	
	Incidence <sup>1</sup>	Severity <sup>2</sup>
Kasugamycin	4.17 D	0.03 C
Copper sulfate <sup>2</sup>	9.03 C	0.05 C
Saline solution	13.2 C	0.06 C
Copper hydroxide <sup>1</sup>	14.58 C	0.07 C
Control	14.59 C	0.07 C
Cuprous oxide	15.97 C	0.07 C
Copper hydroxide <sup>2</sup>	18.06 C	0.09 C
Copper oxychloride	16.67 C	0.09 C
Copper sulfate <sup>1</sup>	39.58 B	0.21 B
Copper nitrate	63.20 A	0.35 A

Means followed by the same letter in the column do not differ by Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). Means transformed by  $\sqrt{x + 0.5}$ . <sup>1</sup>Percentage of injured leaves. <sup>2</sup>Percentage of injured leaf area.

#### 4. Discussion

All cupric products provided a reduction in disease severity greater than 87%, mainly in concentrations  $2500 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ . Copper products are protective, as they form a barrier or layer of copper on plant surface (Gisi & Sierotzki, 2008). Thus, copper is absorbed by bacterial cells during infectious process on leaf surface, then becomes free in the cytoplasm and catalyzes reactions involving reactive oxygen. This oxygen molecule causes lipid peroxidation and protein oxidation (Santo et al., 2011) leading to bacteriostatic effect. Copper also forms complexes with sulfhydryl groups of enzymes (Chillappagari et al., 2010), causing



generalized metabolic disorder, which can lead to cell rupture and death (Gisi & Sierotzki, 2008). However, bacterial death is not widespread and part of the population still survives on leaf surface due to bacteriostatic effect. In addition, when copper concentration is not sufficient to cause death, bacterial cells protected by mucilaginous capsules still maintain their integrity, thus being able to infect the host (Marcuzzo et al., 2009; Ordax et al., 2006). Patricio et al. (2012) also found reduced severity of bacterial blight of coffee, however at dose 550 mg.kg<sup>-1</sup> copper oxychloride and hydroxide. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) in treatments with 200 to 550 mg kg<sup>-1</sup> of different copper formulations showed lower intensity of leaf spot caused by bacteria of the same species (*P. syringae* pv. *syringae*) (Gilardi et al. 2010). That is, copper-based products in different concentrations can reduce severity of bacterial diseases.

Both concentrated suspension and dispersible granules of copper hydroxide were less efficient in reducing incidence of disease in nursery seedlings. Yamada et al. (2014) found a lower efficiency of copper hydroxide in relation to cuprous oxide at dose 2500 mg.kg<sup>-1</sup> in the same pathosystem. Menkissoglu & Lindow (1991) and Gilardi et al. (2010) also found this result in other pathovars of species *Pseudomonas syringae*. Low efficiency of kasugamycin in relation to other treatments may be due to isolate resistance. Mello et al. (2011) found *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* resistance to kasugamycin in Chinese cabbage crop.

Different levels of disease and phytotoxicity did not influence weight of dried leaves, as inoculation and evaluations were performed on fully expanded leaves and no seedling defoliation occurred during the experimental period.

Nutritional analysis is used for calculating nutrient contents in leaf tissues (Malavolta, 1997). In this study, copper content in leaves sprayed with cupric molecules ranged from 200 to 1000 mg.kg<sup>-1</sup> (Figure 1), which are far above the tolerable limit for coffee, 13 to 55 mg.kg<sup>-1</sup>, according to Carmo et al. (2012). Copper sulfate 2 and cuprous oxide presented the highest leaf contents, however with low phytotoxicity levels (Table 4). This high copper content can be due to strong copper fixation outside the leaf, with a low amount absorbed and high resistance to washing, as analysis of leaf content requires previous washing with deionized water to remove impurities (Malavolta, 1997). Tecchio et al. (2015) also found strong copper fixation on leaves in lemon seedlings sprayed with copper sulfate and cuprous oxide under sprinkler irrigation. This greater persistence of product on leaf can increase plant protection period. Oliveira et al. (2002) found higher control of rust in coffee sprayed with cuprous oxide even by 60 days after application and under rain simulation.

Copper covering on the abaxial surface of leaves varied according to presence of copper in treatment and type of cupric molecule (Figure 2). In samples from treatments with kasugamycin, control and saline solution, copper was detected on leaf surface by mapping close to zero (Figure 2 and Table 3), as treatments contained no copper (Table 1). Amount applied (Table 1) and copper covering in treatments nitrate and copper sulfate1 (Figure 2) were smaller than in other copper treatments; however, copper leaf content found in these treatments was similar to the other treatments (Figure 1). Thus, copper content detected in these treatments was mostly absorbed in leaf, as they were foliar fertilizers (Fageria et al., 2009). In the other treatments leaf surface was evenly covered by copper, as it is desirable for protecting leaf against bacteria (FRAC, 2015).

Copper is essential for coffee plant nutrition, as it activates enzymes and provides higher plant growth (Dias et al., 2015). However, copper excess may cause phytotoxicity since its action sites in plant pathogens are proteins and membranes, which are also present in plants (Chillappagari et al., 2010; Santo et al., 2011). Copper toxicity symptoms in leaves are tanning followed by necrosis of the affected area (Paradela et al., 2006).

All copper treatments in this study showed phytotoxicity varying in intensity according to the molecule. Although most of the products were sprayed at  $2500 \text{ mg.kg}^{-1}$ , copper nitrate and copper sulfate1 were applied at  $167.5$  and  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  respectively, and presented the highest toxicity rates (Table 4). Thus, phytotoxicity is not necessarily linked to amount of  $\text{Cu}^{+2}$  but rather to properties of other product constituents, which influence the foliar absorption of copper. Nitrate molecules are highly dissociable in water (Aghaie et al., 2007), providing higher plant uptake of  $\text{Cu}^{+2}$  and accompanied ion (Peyvast et al., 2009). Brunetto et al. (2008) found increased cation  $\text{Ca}^{+2}$  absorption in peach leaves treated with calcium nitrate, thus confirming the role of nitrate in absorption of accompanied cation. Copper sulfate1 contains gluconic acid, which decreases pH on leaf surface and changes cuticular permeability, thus increasing absorption rate of  $\text{Cu}^{+2}$  ions in solution (Marschner, 2012) and consequently rising toxicity in plants. Acid pH of mixture promotes high absorption of  $\text{Cu}^{+2}$  in coffee leaf (Dias et al., 2015). Thus, copper absorbed in treatments can exceed  $55 \text{ mg.kg}^{-1}$  within tissue, which is the toxicity limit for coffee plant cells (Carmo et al., 2012).

Saline solution (0.85% NaCl) atomized in seedlings also caused toxicity. Symptoms were initially gray-brown spots progressing to tissue necrosis mainly in young tender leaves and leaf margins, where suspension concentrated after atomization. Thus, although saline solution is necessary to calibrate concentration of bacterial cell suspension (Jiang et al., 2009;

Lyon et al., 2005), it may cause toxicity symptoms which should be separated from disease symptoms during evaluation.

All copper molecules were efficient in disease control. Foliar fertilizers copper sulfate<sup>1</sup> and copper nitrate provided less tissue covering and more absorption, causing toxicity when compared with other compounds. Conversely, copper fungicides provided more leaf tissue covering and remained on the outer side of leaves without causing toxicity. In addition, copper sulfate<sup>2</sup> and cuprous oxide molecules were more resistant to removal by washing.

## 5. Conclusion

Cuprous oxide and copper sulfate 2 at 2500 mg.kg<sup>-1</sup> proved most efficient for bacterial blight control, causing lower toxicity and more covering of leaf tissue in coffee seedlings.

Micronutrients copper nitrate and copper sulfate complexed with gluconic acid should be used with caution, as they promote plant toxicity even in lower concentrations.

## 6 Acknowledgements

This work was supported by the FAPEMIG, CNPq and CAPES.

## 7. References

Aghaie, M., Aghaie, H., & Ebrahimi, A. Thermodynamics of the solubility of barium nitrate in the mixed solvent, ethanol+ water, and the related ion-association. **Journal of molecular liquids**, v. 135, n. 1, p. 72-74, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2006.10.005>

AGROFIT, 2016. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulao\\_tecnico=5369&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulao_tecnico=5369&p_tipo_janela=NEW) (accessed 2.07.2016).

Amaral, J.d., Teixeira, C., Pinheiro, E. A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. **Arquivo do Instituto Biológico** v. 23, p. 151. 1956.

- Belan, L. L., Pozza, E. A., Freitas, M. L. D. O., Souza, R. M., Jesus Junior, W. C., & Oliveira, J. M. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 11-12, p. 801-810, 2014. DOI: 10.1111/jph.12272
- Brunetto, G., MELO, W. & Kaminski, J. Foliar application of calcium in peach in Serra Gaúcha: evaluation of content of nutrients in the leaf, fruit and yield. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 02, p. 528-533, 2008. DOI : <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000200045>
- Carmo, D. L., Nannetti, D. C., Lacerda, T. M., Nannetti, A. N. & Santo, D. J. E. Micronutrientes em solo e folha de cafeeiro sob sistema agroflorestal no sul de minas gerais. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 76-83, 2012.
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A. & Miethke, M. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**. v. 192, p. 2512-2524. 2010. DOI: 10.1128/JB.00058-10
- Dias, K. G. L., Pozza, A. A. A., & Pozza, E. A. Cobre via foliar na nutrição e na produção de mudas de cafeeiro. **Coffee Science**, v. 10, n. 4, p. 516-526, 2015.
- Fageria, N. K., Filho, M. B., Moreira, A. & Guimaraes, C. M. Foliar fertilization of crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 1044-1064. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904160902872826>
- FRAC, 2015. FRAC code list Sorted by mode of action <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf>. (accessed 2.07.2016)
- Gilardi, G., Gullino, M. & Garibaldi, A. Evaluation of spray programmes for the management of leaf spot incited by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato cv. Cuore di bue. **Crop protection**. v. 29, p. 330-335. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2009.11.010>
- Gisi, U. & Sierotzki, H., Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology** . v.122, p. 157-167. 2008. DOI: 10.1007/s10658-008-9290-5

- Ithiru, J. M., Gichuru, E. K., Gitonga, P. N., Cheserek, J. J., & Gichimu, B. M. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. **African Journal of Agriculture Research**, v. 8, n. 21, p. 2450-2454. 2013. DOI: 10.5897/AJAR2013.6717
- Jiang, W., Mashayekhi, H. & Xing, B. Bacterial toxicity comparison between nano-and micro-scaled oxide particles. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 1619-1625. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>
- Kado, C. & Heskett, M. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, p. 969-976. 1970.
- Lyon, D.Y., Fortner, J.D., Sayes, C.M., Colvin, V.L. & Hughes, J.B. Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C60 water suspension. **Environmental toxicology and chemistry**. v. 24, p. 2757-2762. 2005. DOI: 10.1897/04-649R.1
- Malavolta, E. 1997. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.- 2. ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos.
- Marcuzzo, L. L. Importance of epiphytic populations in the epidemiology of bacterial diseases. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 146-151, 2009.
- Marschner, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press. 2012.
- Mello, M., Silveira, E., Viana, I.O., Guerra, M. d. L. & Mariano, R. d. L. Use of antibiotics and yeasts for controlling Chinese cabbage soft rot. **Associação Brasileira De Horticultura**, v. 29, n. 1, p. 78, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000100013>
- Menkissoglu, O. & Lindow, S. E. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. **Phytopathology**, v. 81, n.10, p. 1263-1270. 1991.
- Oliveira, J. R. de. & Romeiro, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF - Brasil, v. 15, n.4, p. 355-357, 1990.

- Oliveira, S. H., Santos, J. M. F. & Guzzo, S. D. Effect of rain on tenacity and efficiency of fungicides associated with vegetable oil in the control of rust coffee disease. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 581-585, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000600004>
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M. & Biosca, E.G. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and environmental microbiology**. v. 72, p. 3482-3488. 2006. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3482-3488.2006
- Paradela, A.L.; Galli, M.A.; Ferraz Neto, B.L.; Calsoni Neto, J.; Orcini, R.M.; Melle Zeni, G.F. & Calheiro, F. Avaliação do índice de fitotoxidez de triazóis em mudas de café e eficiência dos triazóis aplicados via foliar no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro (*Coffea arabica*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 72-81. 2006.
- Patrício, F. R. A., Almeida, I. M. G., Maciel, K. W., Lopes, M. V., & Borba, R. S. Avaliação da eficiência de fungicidas cúpricos no controle da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em mudas de cafeeiro. Anais do Congresso Brasileiro de pesquisas cafeeiras. v. 38, 2012. <http://www.sbicafe.ufv.br:80/handle/123456789/5285> (accessed 2.07.2016)
- Petek, M. R., Sera, T. U. M. O. R. U., Sera, G. H., Fonseca, I. D. B., & Ito, D. S. Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. **Bragantia**, v.65, n. 1, p. 65-73. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052006000100009>
- Peyvast, G., Olfati, J. A., Ramezani-Kharazi, P., & Kamari-Shahmaleki, S. Uptake of calcium nitrate and potassium phosphate from foliar fertilization by tomato. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 1, n. 1, p. 7-13, 2009. DOI: <http://www.academicjournals.org/journal/JHF/article-abstract/0EDD3FA4850>
- Pozza EA, Carvalho VL & Chalfoun SM. Sintomas de injurias causadas por doenças do cafeeiro. In: Guimarães RJ, Mendes ANG, Baliza DP (eds) **Semiologia do Cafeeiro**. Lavras, Editora UFLA, pp 67–106. 2010.
- Reis Jr, R. A., Corrêa, J. B., Carvalho, J. G., & Guimarães, P. T. G Nutritional diagnosis of coffee plantations in southern Minas Gerais state, Brazil: DRIS norms and adequate foliar contents. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 26, n. 3, p.801-808. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832002000300026>

- Rodrigues, L. M. Rivero, R. B. Q.V. & Oliveira G. F. Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 256-261. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2049>
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. Strainspecificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 707-716. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Santo, C.E., Lam, E.W., Elowsky, C.G., Quaranta, D., Domaille, D.W., Chang, C.J. & Grass, G., Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. **Applied and environmental microbiology**.v. 77, p. 794-802. 2011. DOI: 10.1128/AEM.01599-10
- Sera, T. Coffee genetic breeding at IAPAR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.179-190, 2001. DOI: 10.13082/1984-7033.v01n02a08
- Shaner, G. & Finney, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-milde wing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- Tecchio, M. A., Merlim, T. P. D. A., Leonel, S. & Grassi Filho, H. Copper fertilization in citric seedlings. **Irriga**, v. 1, n. 1, p. 87, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.15809/irriga.2015v1n1p87>
- USDA2016 a. Annual Report Coffee Annual Brazil. Brazil. 2016. [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Sao%20Paulo%20ATO\\_Brazil\\_5-16-2016.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_5-16-2016.pdf) (accessed 2.07.2016)
- USDA 2016 b. Coffee: World Markets and Trade Foreign Agricultural Service/USDA 2016. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf> (accessed 2.07.2016)
- Yamanda, J. K. **Resistência de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras. 2014.
- Zoccoli, D.M., Takatsu, A. & Uesugi, C.H. Occurrence of halo bright in coffee trees in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba Region's, Brazil. **Bragantia**. v.70, p. 843-849. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000400017>

**ARTIGO 2 - TEMPERATURE AND LEAF WETNESS DURATION ON INFECTION  
OF COFFEE LEAVES BY *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *GARCAE***

Freitas, M. L. O.; Pozza, E. A.; Belan, L. L.; Silva, H. R.; Raimundi, M. K.

Souza, P. E.

Artigo Preparado de acordo com as normas do periódico “**Plant disease**”

(VERSÃO PRELIMINAR)



## RESUMO

A Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* apresenta grande potencial destrutivo. Porém não há consenso sobre as melhores condições de temperatura para crescimento da bactéria *in vitro* bem como da temperatura e duração do molhamento foliar propiciadoras da infecção. Contudo os objetivos desse estudo foram determinar a temperatura proporcionadora do maior crescimento *in vitro* e a combinação da temperatura e duração do molhamento foliar propiciadores da maior severidade da mancha aureolada em folhas de mudas de cafeeiro inoculadas com e sem ferimento. Os experimentos foram conduzidos em esquema fatorial 5 x 4 x 2, sendo o fator 1, temperatura, composto por cinco níveis (15, 19, 23, 27 e 31°C), o fator 2, duração de molhamento foliar, por quatro níveis (0, 12, 24, e 48 horas) e o fator 3, metodologia de inoculação, composto por dois métodos de inoculação um com ferimento e outro sem. Foi avaliada a severidade da doença de dois em dois dias durante 16 dias utilizando a escala diagramática e posteriormente calculado o valor de área abaixo da curva de progresso da severidade de todas combinações de temperatura e duração do molhamento. No ensaio *in vitro* o maior crescimento populacional de Psg ocorreu no intervalo entre 23 e 31°C, com pico em 28,1°C. No ensaio *in vivo* a inoculação por ferimento proporcionou maior AACPS da mancha aureolada em relação à inoculação sem ferimento. Nas plantas inoculadas por ferimento a variação da duração do molhamento foliar influenciou pouco na AACPS. Sendo a máxima AACPS propiciada nas temperaturas de 20,9 e 19,3°C e nas durações de molhamento foliar de 48 e 35,5 horas quando inoculadas com e sem ferimento respectivamente.

**Palavras chaves:** epidemiologia, previsão de doença, *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Coffea arábica*.

## INTRODUÇÃO

O café é uma *commodity*, produzida principalmente por países tropicais e consumido principalmente nos países de clima temperado do hemisfério norte, como os Estados Unidos da América, o maior consumidor (35), e a União Europeia (10). O Brasil destaca-se por

produzir 33% das 164,5 milhões de sacas de 60 Kg colhidas no mundo, sendo assim o maior produtor (35). No entanto, vários fatores são responsáveis por reduzir essa produção, principalmente as doenças de plantas (30).

Dentre as doenças, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg) (1), tem sido responsável por perdas significativas em várias lavouras das principais regiões produtoras do Brasil (5). Apresenta grande potencial destrutivo por ocorrer em folhas, ramos, flores e frutos novos. Causa desfolha, seca de ramos, tanto plagiotrópicos quanto ortotrópicos e podridão de rosetas florais, reduzindo a produtividade, comprometendo a arquitetura da planta e suas safras futuras (30,16).

Devido à falta de cultivares de café resistentes à mancha aureolada, o seu principal método de controle é a pulverização de antibióticos ou bacteriostáticos (5). O principal grupo químico empregado no campo é o dos cúpricos, o qual além de ser fungicida tem efeito bacteriostático. Ou seja, atua de forma preventiva, impedindo a multiplicação celular e assim o aumento exponencial da população bacteriana na superfície foliar, limitando a infecção do patógeno. Porém, muitas vezes, são pulverizados após o início da epidemia, quando já ocorreram condições ambientais favoráveis para Psg multiplicar e penetrar, e assim consequentemente, com reduzida eficiência no controle. Desse modo, conhecer os fatores ambientais responsáveis por favorecer a multiplicação na superfície foliar e a infecção são importantes para realizar a tomada de decisão quanto a necessidade do manejo da doença (9) aumentando a sustentabilidade ambiental e financeira.

O aumento da severidade da mancha aureolada no campo é atribuído a pluviosidade média anual em torno de 1450 mm, ventos fortes e ocorrência de chuvas de granizo (39), no entanto não há consenso sobre os valores de temperatura e de duração do molhamento foliar favoráveis à infecção (7, 15, 28, 39). Na maioria das vezes são descritas apenas características empíricas como temperaturas baixas e regiões altas com predominância de ventos fortes (33).

Em experimentos de inoculação em mudas foram citadas diferentes temperaturas ótimas para ocorrer o processo infeccioso. Essas temperaturas variaram entre 18 (15), 23 (28) e 25°C (7). Quanto a duração do molhamento foliar Botrel (7) cita 0 horas, ou seja, não houve umidade na superfície foliar e Pérez et al. (28) 24 horas. Além de divergências quanto a necessidade de ferimento (15, 39) ou não (28). Ou seja, na literatura não há consenso quanto a temperatura e duração do molhamento foliar ideais para a bactéria penetrar, e também quanto ao efeito da interação dessas duas variáveis na infecção de *Psg*.

Essas condições microclimáticas no momento da inoculação podem influenciar o início da epidemia e sua respectiva taxa de progresso da doença, condições importantes para definir o manejo da doença no campo. Assim, os objetivos desse estudo foram determinar a temperatura proporcionadora do maior crescimento *in vitro* e a combinação da temperatura e duração do molhamento foliar propiciadores da maior severidade da mancha aureolada em folhas de mudas de cafeeiro inoculadas com e sem ferimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, sendo um *in vitro* e o outro *in vivo*. No ensaio *in vitro* avaliou-se a influência da temperatura na multiplicação de *Psg* e *in vivo* a severidade da doença em função da interação entre a temperatura e duração do molhamento foliar na presença ou ausência de ferimentos na folha.

Os experimentos foram repetidos duas vezes ao longo do tempo.

### **Ensaio *in vitro***

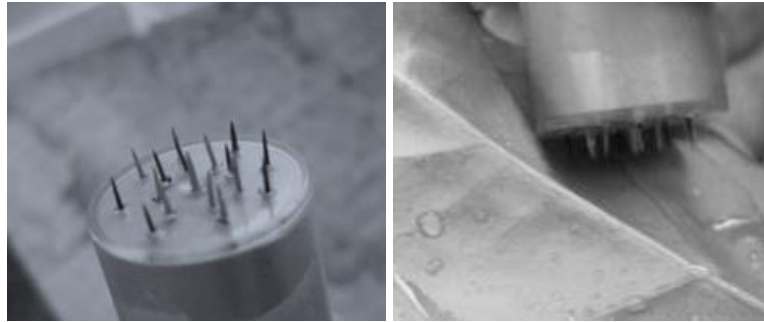
O inóculo de *Psg* foi multiplicado em meio 523 de Kado e Heskett (18) a 28°C. Após 24 horas, foi preparada sua suspensão com solução salina (NaCl a 0,85%). Essa suspensão foi calibrada em espectrofotômetro a 600 nm (OD600) para valor de absorbância igual a 0,2.

Nessas condições, o valor obtido na leitura foi convertido para número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>), conforme metodologia descrita por Oliveira & Romeiro (27), obtendo 1,1x10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 100µL foram pipetados, depositados e espalhados, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo 10mL do meio Kado and Heskett (1970). As placas foram incubadas por 24 horas em BOD nas temperaturas de 15, 19, 23, 27 e 31°C e fotoperíodo de 12 horas na presença de luz fluorescente (3707,41° lux). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. Ao fim das 24 horas de incubação, adicionaram-se 10 mL de água destilada por placa para estimatimar do número de UFC.mL<sup>-1</sup> em espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente.

### **Ensaio *in vivo***

Para avaliar a influência entre temperatura e duração do molhamento foliar na infecção da bactéria em mudas de café com ou sem fermento foi realizado ensaio em câmaras de ambiente controlado. Foram utilizadas mudas de cafeeiro, cultivar Catuaí Vermelho IAC-99, suscetível à doença, cultivadas em substratos compostos por solo, esterco bovino e areia na proporção 3:1:1, respectivamente. O experimento foi realizado em esquema fatorial de análise de variância 5 x 4 x 2, com 5 temperaturas (15, 19, 23, 27 e 31 °C), 4 períodos de duração de molhamento foliar (0, 12, 24 e 48 horas) e 2 métodos de inoculação (com e sem fermento), totalizando 40 tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por duas mudas de cafeeiro com seis pares de folhas.

A suspensão de inóculo foi preparada de acordo com a descrição para o ensaio *in vitro*, com concentração ajustada para 1,1x10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Na inoculação com fermento os dois pares de folha novos totalmente expandidos foram feridas com conjunto de multiagulhas (Figura 1), previamente mergulhado na suspensão bacteriana.



**Figura 1.** Conjunto de multiagulhas utilizado para realizar ferimentos e inocular *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em folhas de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*).

Nas parcelas sem ferimento, o inóculo foi distribuído por aspersão, na superfície abaxial das folhas conforme metodologia proposta por Rodrigues et al., (2016). A pulverização da suspensão bacteriana foi realizada com pulverizador manual acoplado com bico cônico vazio, até o ponto de escorrimento. Em ambos os casos, foram inoculados os dois pares de folhas mais novos.

Após inocular as plantas, essas foram imediatamente cobertas com sacos plásticos, a fim de constituir câmara úmida e manter o molhamento foliar. Decorrido o período equivalente ao respectivo tratamento, os sacos foram retirados. Para os tratamentos de 0 hora de molhamento foliar não foi utilizada câmara úmida. Após submetidas à respectiva duração de molhamento foliar, todas as câmaras de ambiente controlado foram reguladas para umidade relativa superior a 70%, e fotoperíodo de 12 horas, mantidas com lâmpadas de metal de 400 Watt. A temperatura e a umidade relativa das câmaras foram monitoradas por *datalogger* digital. A irrigação foi realizada diariamente, no solo, sem atingir as folhas para não causar molhamento foliar.

Após detectar os primeiros sintomas, foram realizadas sete avaliações da severidade da doença em todas as quatro folhas empregando a escala diagramática (4), em intervalos de dois dias. Posteriormente as notas atribuídas foram convertidas para porcentagem de área foliar

lesionada. Os valores de severidade da doença ao longo do tempo foram integralizados em valor de área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) (34).

#### Análise dos dados

Os dados de ambos os ensaios foram analisados para verificar se atendiam aos pressupostos da análise de variância (anava) observando os testes de normalidade (Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). Não atendidos os pressupostos da anava os dados foram transformados.

Para validar os resultados foi realizada a análise conjunta dos dados das repetições dos experimentos.

No ensaio *in vitro*, os dados de UFC.mL<sup>-1</sup> em função da temperatura foram submetidos à análise de variância ( $p=0,05$ ) utilizando o software "R" (versão 3.1.3) e quando significativos, ajustaram-se os modelos de regressão linear simples (1) e quadrático (2).

$$(1) \text{ UFC} = b_0 + b_1t$$

$$(2) \text{ UFC} = b_0 + b_1t + b_2t^2$$

Em que, UFC é o número de unidades formadora de colônias, t é temperatura em graus Celsius, e  $b_0$ ,  $b_1$  e  $b_2$  são os parâmetros do modelo.

No ensaio *in vivo*, os dados de AACPS em função dos tratamentos, foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial utilizando-se o software "R" (versão 3.1.3), verificando a significância das interações no teste F ( $p=0,05$ ). Quando a interação entre os fatores temperatura e duração do molhamento foi significativa, foram ajustados modelos de superfícies de resposta utilizando-se o software Sigma plot (versão 12.0). Para o fator ferimento, os tratamentos foram comparados por meio do próprio teste F ( $p=0,05$ ). Os modelos de superfície de resposta ajustados foram o modelo de regressão linear múltiplo parabolóide (1) e o modelo Gaussiano (2).

$$(1) AACPS = b_0 + b_1 * t + b_2 * u + b_3 * t^2 + b_4 * u^2$$

$$(2) AACPS = b_1 * \exp(-0,5 * ((t-t_0)/b_2)^2 + ((u-u_0)/b_3)^2)$$

Em que, AACPS é a área abaixo da curva do progresso da severidade, t é temperatura, u é duração do molhamento foliar e  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$  são os parâmetros do modelo.

O melhor modelo foi selecionado baseado na significância do teste t dos parâmetros dos modelos de regressão ajustados ( $p < 0,05$ ), maior  $R^2$  e menor quadrado médio dos desvios.

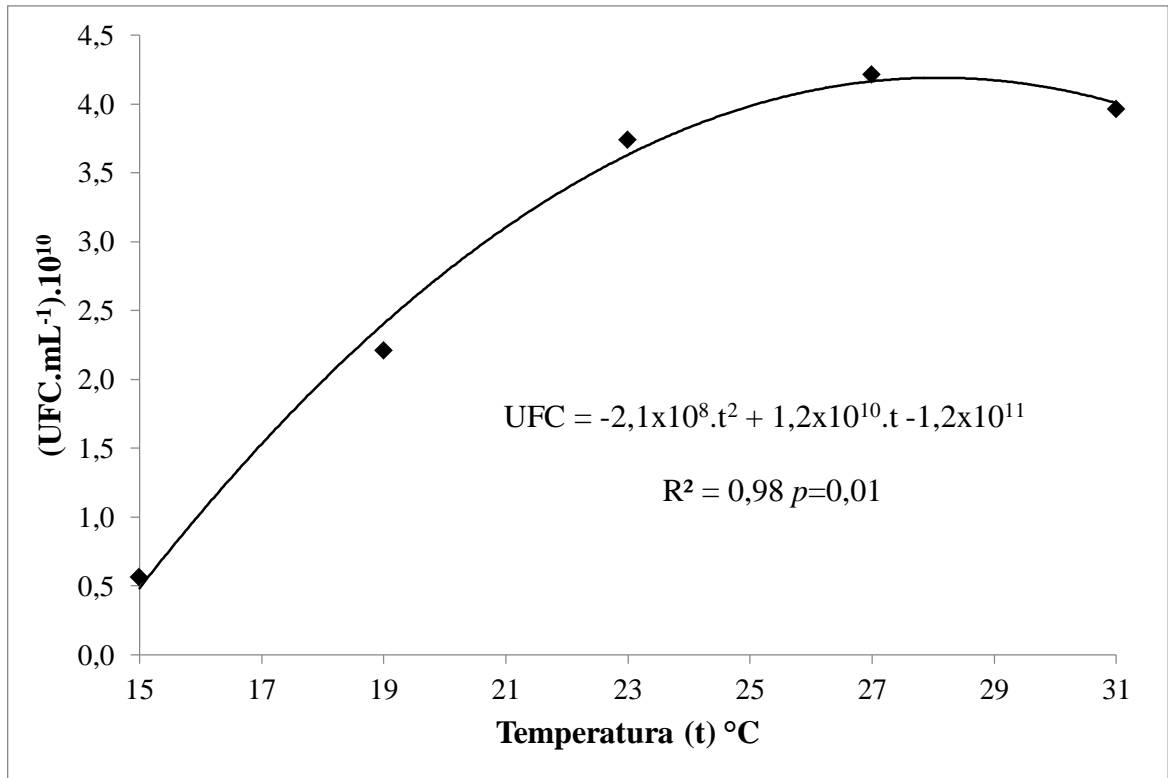
Os pontos de máximo das variáveis UFC.mL<sup>-1</sup> e AACPS's foram obtidos igualando-se a zero os modelos de regressão ajustados e então foi calculada sua derivada de primeira ordem.

## RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre as repetições dos dois experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sendo assim, os resultados abaixo referem-se à média dos dois experimentos.

### Ensaio *in vitro*

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre as temperaturas para a variável UFC.mL<sup>-1</sup>. Foi ajustado o modelo de regressão quadrático e estimou-se o máximo crescimento *in vitro* ( $4,2 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) na temperatura de 28,1°C. A partir de 28,1°C o aumento da temperatura até 31°C reduziu em 4,4% a quantidade de UFC.mL<sup>-1</sup>.

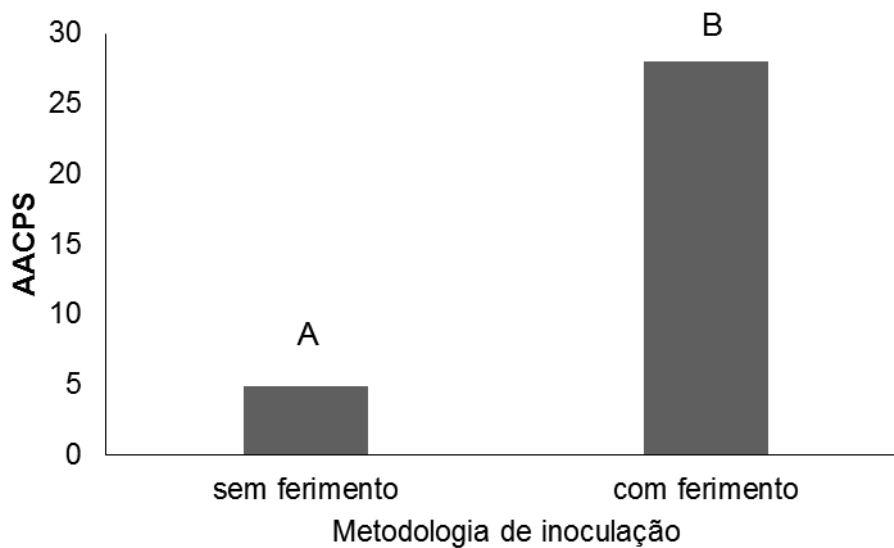


**Figura 2.** Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.ml<sup>-1</sup>) de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em função da temperatura.

#### Ensaio *in vivo*

Houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os três fatores analisados. A metodologia com fermento proporcionou valores de AACPS nove vezes maior em relação à inoculação sem fermento nas folhas de mudas de cafeeiro (Figura 3).



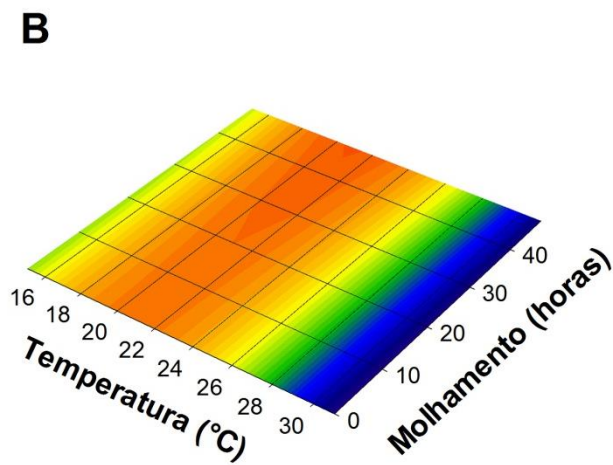
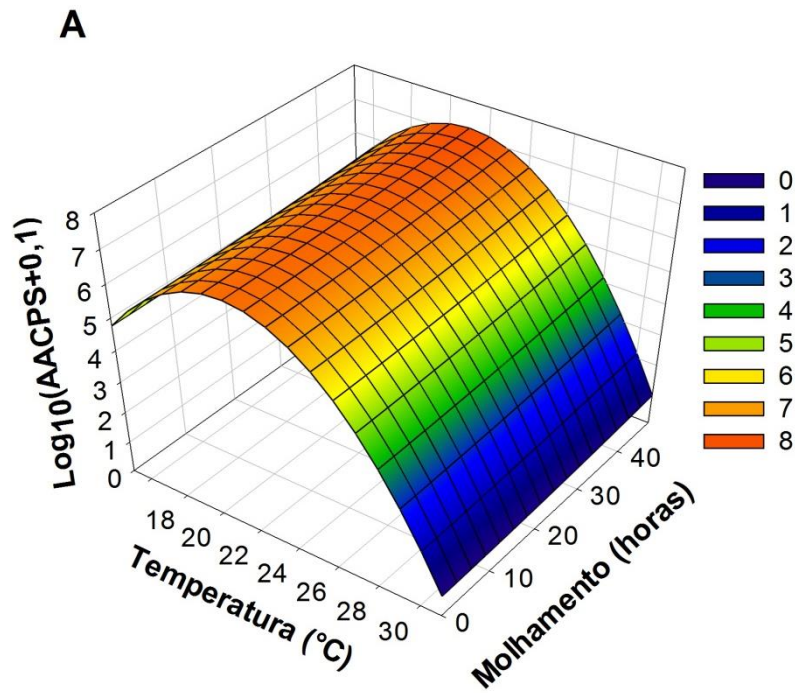


**Figura 3.** Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em folhas de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculadas sem e com ferimento. Colunas com letras distintas diferem entre si no teste F ( $p < 0,05$ ).

Nos tratamentos com inoculação com ferimento o modelo ajustado foi o linear múltiplo parabolóide. A máxima AACPS foi observada a 20,9°C. A partir desse ponto com o aumento da temperatura houve redução na AACPS da doença até 0 na temperatura de 31°C (Figura 4). De 0 a 48 horas de molhamento foliar em todas as temperaturas a variação na intensidade da doença foi inferior a 0,28 unidades de AACPS. Ou seja, com ferimento houve baixa influência do período de molhamento foliar.

$$\text{AACPS}(t,h) = -20,0898 + 2,5828*t + 0,0012* h - 0,0617*t^2 + 0,0001*h^2$$

$$R^2=0,93$$

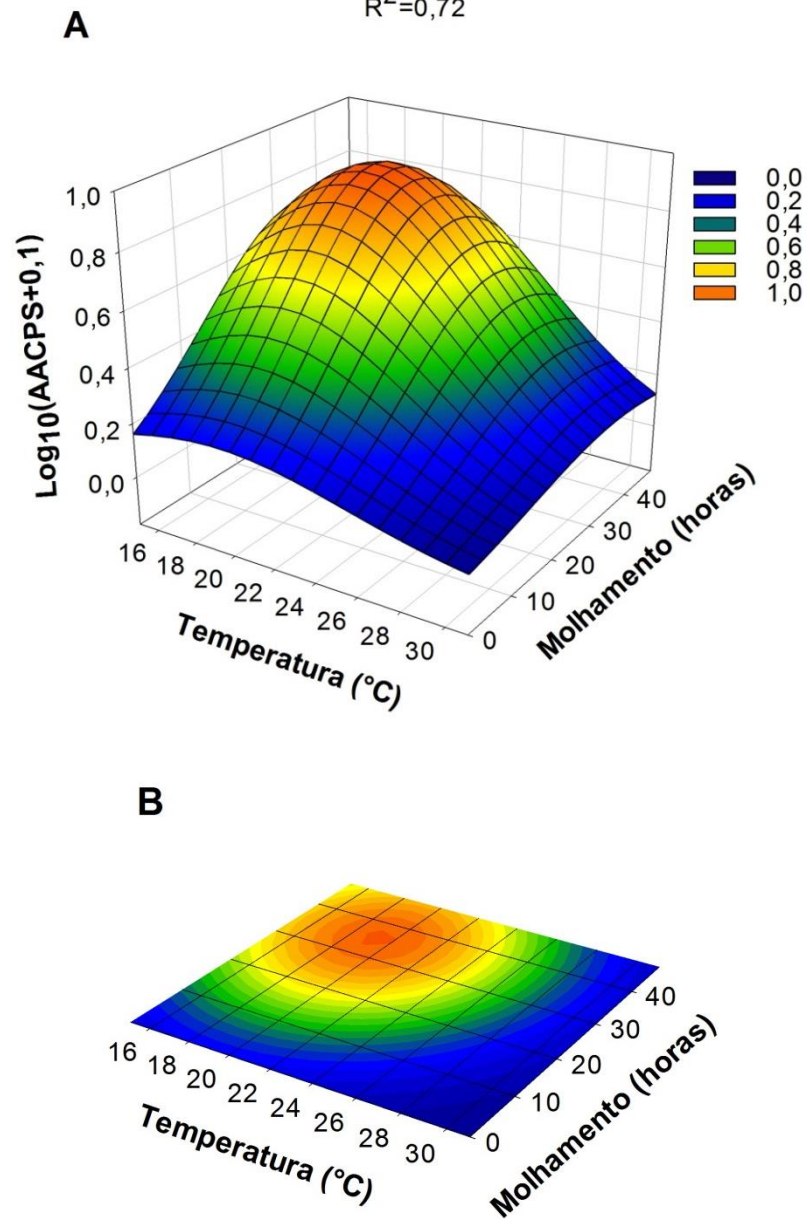


**Figura 4.** Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) da mancha aureolada em folhas de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculadas com (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) por ferimento, em diferentes temperaturas e número de horas de molhamento foliar, predita por ajuste de modelo parabolóide. **A)** Curva de superfície de resposta em perfil. **B)** Superfície de resposta projetada em duas dimensões.

Quando as folhas das mudas foram inoculadas sem ferimento o modelo ajustado foi o Gaussiano. Nessas condições o ponto de maior AACPS ocorreu na temperatura de 19,3°C e de 35,5 horas de molhamento foliar. Ao contrário dos tratamentos inoculados com ferimento, nesse caso o molhamento foliar influenciou o aumento da AACPS. Os menores valores de AACPS foram obtidos nas temperaturas acima de 27°C e nas durações do molhamento foliar abaixo de 10 horas (Figura 5).

$$\text{AACPS}(t,h)=0,8887*\exp(-0,5*((t - 19,2812) / 6,2027)^2 + ((h - 35,5242) / 20,7174)^2))$$

$$R^2=0,72$$



**Figura 5.** Área abaixo da curva do progresso da severidade AACPS da mancha aureolada em folhas de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculadas com (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), sem fermento, em diferentes temperaturas e números de horas de molhamento foliar, predita por ajuste de modelo Gaussiano. **A)** Curva de superfície de resposta em perfil. **B)** Superfície de resposta projetada em duas dimensões.

## DISCUSSÃO

A maior formação de colônias de *Psg in vitro* ocorreu a 28,1 °C, embora entre 23 e 31°C ocorreu pouca variação no número de unidades que permaneceu superior a  $3,5 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura. 2). Essa quantidade obtida de uma única placa de petri, nesse intervalo de tempo e temperatura, é suficiente para se obter 318 mL de suspensão na concentração de  $1,1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, utilizada em diversos estudos (15, 28, 39) para inoculação da bactéria.

Nesses estudos, as colônias de *Psg* foram crescidas *in vitro* a 28°C com o objetivo de se obter a suspensão com  $1,1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, porém como não foi quantificado o número de UFC.mL<sup>-1</sup> obtido por placa, não é possível a comparação com o presente estudo.

Para outros patovares de *Pseudomonas syringae* também foi observada a influência da temperatura no crescimento *in vitro*. Para *P. syringae* pv. *persicae* e *P. syringae* pv. *phaseolicola*, no mesmo período de incubação *in vitro* as temperaturas de 27,9°C e 27°C, respectivamente, proporcionaram maior número de UFC (38, 26). Para essas bactérias também houve pouca variação, no número de UFC, no intervalo de temperatura entre 23 e 31°C.

A inoculação por ferimento causou maior severidade da doença comparada à inoculação sem ferimento. Essa informação explica o fato das plantas submetidas à poda, colheita mecânica, chuva de granizo e ventos fortes serem mais suscetíveis à doença no campo, pois esses fatores causam ferimentos nas plantas (4, 39, 30). A presença de ferimento nos tecidos foliares facilita a penetração da bactéria no hospedeiro, fase considerada fundamental no ciclo do patógeno (23, 29). Para penetrar na planta as bactérias movimentam-se até os sítios de infecção por quimiotactismo e quando atingem determinada população, detectada por *quórum sensing*, penetram no hospedeiro (25). Quando realizados ferimentos, as substâncias atuantes no quimiotactismo são liberadas, fazendo as bactérias migrarem em

sua direção em menor tempo acelerando a penetração (13, 21). Lamas et al. (21) estudaram a bactéria *Dickeya dadantii* em chicória e observaram a liberação de ácido jasmônico nos ferimentos, atraindo 8 vezes mais células bacterianas por minuto em relação à área não ferida, promovendo a penetração mais rápida no tecido foliar. Essa penetração por ferimento por ser mais rápida resulta em maior severidade da doença comparada à penetração sem ferimento no mesmo intervalo de tempo. Jesus Junior et al. (17) ao estudar a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em laranjeiras também observaram a realização de ferimentos proporcionar maior severidade da doença.

Ao inocular as mudas de cafeeiro com ferimento, a temperatura exerceu maior influência na AACPS em relação à duração do molhamento foliar. Entre 16 e 23°C ocorreram os maiores valores de AACPS. Mesmo quando não ocorreu molhamento ocorreu a doença com o mínimo de diferença para os demais valores dessa variável. Inoculações utilizando ferimento na folha seguido da pulverização da suspensão, realizadas por Ithiru et al. (15) e Rodrigues et al. (31) sob temperaturas de 18 e 19°C respectivamente, foram bem sucedidas devido, provavelmente, a essas temperaturas estarem dentro da amplitude ótima para maior intensidade da doença nessas condições. Nesses mesmos ensaios, Ithiru et al. (2013) não mencionaram a duração do molhamento foliar enquanto Rodrigues et al. (31) utilizaram 48 horas, entretanto essa variável tem pouca influência na severidade da doença quando a inoculação é realizada com ferimento.

A inoculação com ferimento faz as células bacterianas serem inseridas no parênquima foliar pulando a etapa de penetração e iniciando a etapa de colonização, sendo esta fase considerada fundamental no ciclo do patógeno (29) e menos vulnerável às variações ambientais em relação à penetração (13).

As temperaturas entre 16 e 27°C e duração do molhamento foliar entre 12 e 48 horas proporcionaram maiores AACPS da mancha aureolada em mudas de cafeeiro inoculadas sem

ferimento, sendo a temperatura de 19,3°C e duração do molhamento foliar de 35,5 horas o ponto de maior AACPS. Esse intervalo, abrange as temperaturas de 23 e 25°C utilizadas por Pérez et al. (28) e Botrel (7) e Yamada (37) respectivamente, explicando a eficiência da inoculação obtida por esses autores em seus ensaios. Quanto ao período de molhamento foliar alguns autores inocularam Psg sem ferimento em condição de câmara úmida por 48 horas (28), 24 horas Botrel (7) e Yamada (37) somente mencionam ter deixado em câmara úmida por longo tempo. Contudo a infecção da bactéria poderia ser potencializada nesses ensaios utilizando a temperatura e molhamento foliar próximos a 19°C e 35 horas, respectivamente. Ao ser pulverizada, a bactéria é colocada em contato com a superfície externa da folha e para atingirem o parênquima foliar, realizam eventos pré-penetração, locomovendo-se até os sítios de infecção. Os sítios onde as fitobactérias infectam ou penetram geralmente são aberturas naturais, estômatos (23), hidatódios (19) e lenticelas (11) e ferimentos (12). Porém, para a bactéria se locomover até esses sítios, se multiplicarem, se comunicarem por *quorum sensing* e então penetrar no hospedeiro, as bactérias dependem de temperatura e duração do molhamento foliar favoráveis (13, 32), pois a ocorrência de água livre na superfície foliar tende a favorecer a sua infecção e posterior colonização (14). Outras bactérias da mesma espécie (*P. syringae* pv. *tomato*) utilizam os estômatos de suas plantas hospedeiras como porta de entrada (20). Contudo a penetração por estômatos é mais lenta em relação a por ferimento.

Os intervalos de temperatura e de molhamento foliar favoráveis à doença foram mais amplos quando realizada inoculação com ferimento em relação a sua ausência (Figura 4 e 5), portanto esse pode ser utilizado em condições de maiores oscilações térmicas e de molhamento foliar com maiores possibilidades de sucesso na inoculação de Psg.

A temperatura ótima para crescimento *in vitro* foi diferente da ideal para infecção em mudas inoculadas. Isso também ocorre com outras bactérias fitopatogênicas. Dentro da

espécie *P. syringae* os patovares *tomato* e *tabaci*, agentes etiológicos da pinta bacteriana do tomateiro e do fogo selvagem em feijoeiro, respectivamente, também foi observada essa diferença. Essas bactérias multiplicaram melhor *in vitro* nas temperaturas entre 28 e 30°C, sendo diferente da temperatura de 25°C, utilizada na inoculação (24, 36).

As condições ambientais encontradas nesse estudo apresentaram relação com as relatadas nas regiões produtoras onde a doença causa danos. Nas cidades de Três Pontas, Campos Altos e Capelinha, situadas no Estado de Minas Gerais, no Brasil, as temperaturas diurnas próximas de 28°C são frequentes e a temperatura média anual dessas cidades é de 19,2°C (6). Nesses locais a temperatura próxima de 28°C estaria favorecendo a multiplicação da bactéria nos eventos de pré e pós-penetração e as temperaturas próximas de 19,2°C estaria favorecendo a sua penetração e colonização. A precipitação média dessas regiões está em torno de 1500 mm anual (6) concentradas de outubro a março (3) proporcionando duração do molhamento foliar mais prolongado no cafeeiro (22).

As condições de ferimentos foliares utilizados neste trabalho ocorrem nas plantas em campo ao serem atacadas por insetos pragas (2), ao serem atingidas por chuvas de granizo (39) e nas operações de colheita e tratos culturais (9). Dessa forma as variáveis estudadas no presente trabalho podem apresentar relação com as descritas para o progresso da doença no campo.

## CONCLUSÃO

No ensaio *in vitro* o maior crescimento populacional de Psg ocorreu no intervalo entre 23 e 31°C, com pico em 28,1°C. No ensaio *in vivo* a inoculação por ferimento proporcionou maior AACPS da mancha aureolada em relação à inoculação sem ferimento. Nas plantas inoculadas por ferimento a variação da duração do molhamento foliar influenciou pouco na AACPS. Sendo a máxima AACPS propiciada nas temperaturas de 20,9 e 19,3°C e nas durações de molhamento foliar de 48 e 35,5 horas quando inoculadas com e sem ferimento respectivamente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral, J. D., Teixeira, C., Pinheiro, E. 1956. A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. Arquivos do Instituto Biológico. 23: 151-1956.
2. Assis, G. A., Assis, F. A., Scalco, M. S., Parolin, F. J. T., Fidelis, I., Moraes, J. C., & Guimarães, R. J. 2012. Leaf miner incidence in coffee plants under different drip irrigation regimes and planting densities. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 47: 157-162.
3. Ávila, L. F., Mello, C. D., Viola, M. R. 2009. Mapeamento da precipitação mínima provável para o sul de Minas Gerais. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 13: 906-915.
4. Belan, L. L., Pozza, E. A., Freitas, M. L. D. O., Souza, R. M., Jesus Junior, W. C., Oliveira, J. M. 2014. Diagrammatic Scale for Assessment of Bacterial Blight in Coffee Leaves. Journal of Phytopathology. 162: 11-12.
5. Belan, L. L., Pozza, E. A., Souza, R. M. 2014. A Mancha Aureolada do Cafeeiro. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 22: 227-256.
6. Botelho, C. E., de Rezende, J. C., Carvalho, G. R., de Carvalho, A. M., Andrade, V. T., Barbosa, C. R. 2011. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de café arábica em Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 45: 1404-1411.
7. Botrel, D. A. 2013. Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
8. Campbell, C. L., Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, New York.
9. Cassia, M. T., Silva, R. P. D., Chioderolli, C. A., Noronha, R. H. F., Santos, E. P. D. 2013. Quality of mechanized coffee harvesting in circular planting system. Ciência Rural. 43: 28-34.
10. FAO. 2016. FAO Estatistical Pocketbook Coffee 2015. <http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf> Acessado 2 Março 2017.
11. Ferrante, P., Fiorillo, E., Marcelletti, S., Marocchi, F., Mastroleo, M., Simeoni, S., & Scortichini, M. 2012. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. Journal of Plant Pathology. 94: 455-461.
12. Gao, X., Huang, Q., Zhao, Z., Han, Q., Ke, X., Qin, H., & Huang, L. 2016. Studies on the Infection, Colonization, and Movement of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Kiwifruit Tissues Using a GFPuv-Labeled Strain. Plos One. 11: 151-169.
13. Goto, M. 2012. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press.

14. Huber, L.; Gillespie, T. J. 1992. Modeling wet leafness in relation to plant disease epidemiology. *Annuals Reviews Phytopathology*. 30: 553-577.
15. Ithiru, J. M., Gichuru, E. K., Gitonga, P. N., Cheserek, J. J., & Gichimu, B. M. 2013. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. *Afr J Agric Res*. 8: 2450-2454.
16. Ito, D.S., Sera, T., Sera, G.H., Del Grossi, L., Kanayama, F.S. 2008. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 8: 99-103.
17. Jesus Junior, W. C., Belasque Júnior, J., Amorim, L., Christiano, R. S. C., Parra, J. R. P., Bergamin Filho, A. 2006. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. *Fitopatologia Brasileira*. 31: 277-283.
18. Kado, C., Heskett, M. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60: 969-976.
19. Kobae, Y., Sekino, T., Yoshioka, H., Nakagawa, T., Martinoia, E., & Maeshima, M. 2006. Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant and Cell Physiology*. 47: 309-318.
20. Kumar, A. S., Lakshmanan, V., Caplan, J. L., Powell, D., Czymbek, K. J., Levia, D. F., Bais, H. P. 2012. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *The Plant Journal*. 72: 694-706.
21. Lamas, M. A., Cabrera, E., Solanilla, E. L., Solano, R., Melendi, P. G., Chico, J. M. Palenzuela, P. R. 2009. Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Molecular microbiology*. 74: 662-671.
22. Meira, C. A. A., Rodrigues, L. H. A., Moraes, S. D. 2009. Modelos de alerta para o controle da ferrugem-do-cafeeiro em lavouras com alta carga pendente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44: 233-242.
23. Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. 126: 969-980.
24. Messaadia, N.; Harzallah, D. 2011. Regulatory Effects of Carbon Sources on Tabtoxin Production (A  $\beta$ -lactam Phytotoxin of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*). *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 5: 26-30.
25. Ng, W. L., Bassler, B. L. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*. 43: 197-222.
26. Nüske, J., Fritsche, W. 1989. Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. *Journal of basic microbiology*. 29: 441-447.

27. Oliveira, J. R. de. Romeiro, R. S. 1990. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Fitopatologia Brasileira. 4: 355-357.
28. Pérez, C. D. P., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Freitas, A. S., & Silva, M. G. 2017. Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva. Coffee Science. 12: 60-68.
29. Petriccione, M., Salzano, A. M., Di Cecco, I., Scaloni, A., & Scortichini, M. 2014. Proteomic analysis of the *Actinidia deliciosa* leaf apoplast during biotrophic colonization by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Journal of proteomics. 101: 43-62.
30. Pozza E. A., Carvalho V. L., Chalfoun S. M. 2010. Sintomas de injurias causadas por doenças do cafeeiro. In: Guimarães R. J, Mendes A. N. G., Baliza D. P. Semiologia do Cafeeiro. Editora UFLA, Lavras.
31. Rodrigues, L. M., Almeida, I. M., Patrício, F. R., Beriam, L. O., Maciel, K. W., & Braghini, M. T. 2016. Aggressiveness of Strains and Inoculation Methods for Resistance Assessment to Bacterial Halo Blight on Coffee Seedlings. Journal of Phytopathology. 165: 105-114.
32. Romantschuk, M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. Annual review of phytopathology. 30: 225-243.
33. Sera, T. 2001. Coffee genetic breeding at IAPAR. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 1: 179-190.
34. Shaner, G., & Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology. 67: 1051-1056.
35. USDA. 2017. Coffee: World Markets and Trade Foreign Agricultural Service/USDA 2016. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf> Acessado 2 Março 2016.
36. Wei, C. F., Kvitko, B. H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J. R., Lin, N. C., Collmer, A. A. 2007. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. The Plant Journal. 51: 32-46.
37. Yamada, J. K. 2014. Resistência de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
38. Young, J. M., Luketina, R. C., & Marshall, A. M. 1977. The effects on temperature on growth *in vitro* of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas pruni*. Journal of Applied Bacteriology. 42: 345-354.
39. Zoccoli, D. M., Takatsu, A., Uesugi, C. H. 2011. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Bragantia. 70: 843-849.

**ARTIGO 3 - DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO TEMPORAL DA MANCHA AUREOLADA  
DO CAFEIEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS AMBIENTAIS**

**Marcelo L. O. Freitas · Edson A. Pozza · Leônidas L. Belan · Humberson R. Silva ·  
Marcelo C. Alves · Paulo E. Souza**

Artigo Preparado de acordo com as normas do periódico “*Precision Agriculture*”

(VERSÃO PRELIMINAR)

**Abstract** Os objetivos desse trabalho foram estudar a distribuição espaço temporal da mancha aureolada do cafeeiro e sua relação com variáveis do solo e do clima utilizando a geoestatística. O experimento foi conduzido no período de julho de 2013 a junho de 2015 em uma área de 7.65 ha, georeferenciada em 85 pontos amostrais com cafeeiro da cultivar Catuaí Amarelo 2SL. A incidência e a severidade da mancha aureolada e o enfolhamento das plantas foram amostrados mensalmente e depois calculadas as áreas abaixo da curva para as três variáveis (AACPI), (AACPS) e (AACPE) respectivamente. A análise da fertilidade, textura, nutrição da planta, produção e altitude foram avaliados anualmente. Posteriormente foi realizada correlação entre AACPI e as demais variáveis em cada ano. Quando a correlação da variável com a AACPI foi superior a 36%, a AACPI foi decomposta em incidência mensal e observados os meses onde a incidência foi superior a incidência média anual para assim correlacionar a incidência destes meses com as variáveis para então constatar se a correlação é frequente. A partir da seleção das variáveis, foram construídos mapas quantitativos e posteriormente estimado a semivariância das variáveis utilizando o método de máxima verossimilhança com ajuste da função esférica. Foi ajustada para a altitude e fósforo foliar 2013/14, AACPI 2013/14, AACPI 2014/2015, produção 2013/14 e cobre foliar 2014/2015. A mancha aureolada apresentou distribuição espacial e apareceu em um único grande foco na área localizado na face sul do terreno nos dois anos reduzindo a produção das plantas afetadas. Os maiores níveis da doença foram nos locais com maiores teores de fósforo no tecido foliar do café e maior altitude, sendo nas maiores altitudes, a maior velocidade do vento, e a menor temperatura média do ar. Enquanto os menores níveis da doença nos locais com os maiores de Cu presente na folha.

## **Introdução**

A cafeicultura é importante atividade agrícola em vários países da América central, no Brasil, na Colômbia e no Vietnã, entre outros ao redor do mundo (USDA, 2017). Esses países apresentam em suas áreas cultivadas, média pluvial acima de 1200 mm.ano<sup>-1</sup> e temperaturas entre 18 e 23°C, consideradas ideais para o cultivo dessa cultura (Camargo, 1977). No entanto os maiores consumidores e importadores de café são os países da União Europeia e os Estados Unidos, os quais apresentam condições climáticas limitantes para a produção. O Brasil é o maior fornecedor de café para o mundo, produzindo aproximadamente 29% da demanda

mundial (USDA, 2017). Porém essa produção é constantemente ameaçada por pragas e doenças (Pozza et al., 2010).

Nos últimos anos, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al., 1956) Young, Dye & Wilkie 1978, tem sido a doença de maior preocupação, entre os produtores, nas lavouras em fase de implantação, situadas em regiões de altitude superior a 1000 metros e expostas a ventos fortes (Belan et al., 2014). Essa bactéria é capaz de infectar mudas em viveiro e plantas adultas no campo, causar desfolha e seca de ramos, comprometendo a arquitetura da planta e, portanto, a sua produtividade. A principal medida de manejo da mancha aureolada é a pulverização com antibióticos e produtos à base de cobre, pois a maioria das cultivares plantadas são suscetíveis a doença (Carvalho et al., 2011; Pozza et al., 2010). Porém, os consumidores têm exigido grãos produzidos de forma sustentável e com aplicações mínimas de agroquímicos (Vandermeer et al., 2010). Para atender a esse princípio, pode-se empregar estratégias de manejo cultural e ambiental, já utilizadas com sucesso no cafeeiro para o bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*) (Pereira et al., 2007) e para a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) (Santos et al., 2008 B). Sendo, portanto, necessário conhecer as variáveis ambientais climáticas e do solo capazes de favorecerem a mancha aureolada, para modifica-las de modo a desfavorecer a doença.

Dentre as variáveis ambientais, a temperatura e a duração do molhamento foliar são as de maior correlação com doenças de plantas, sendo as mais estudadas (Alves et al., 2007; Anco et al., 2013; Campbell and Madden, 1990; Marcuzzo et al., 2009). Em relação às condições nutricionais, já foi observada a predisposição das plantas a doenças em relação ao desequilíbrio de nutrientes presentes em seus tecidos (Garcia et al., 2003; Pozza et al., 2001; Pérez et al., 2017). Entretanto existem outros fatores ambientais como a altitude (Morris et al., 2013), a velocidade do vento (Pan et al., 2006), a precipitação (Monteil et al., 2014), o relevo (Glinushkin et al., 2016) e demais características do solo, como, classe, textura e estrutura (Santos et al., 2008 A), capazes de influenciar a suscetibilidade do hospedeiro. Essas características estão presentes em todas as lavouras no campo, em variados níveis e intensidades, influenciando tanto o patógenos quanto o hospedeiro e o processo doença, sendo esses fatores difíceis de serem reproduzidos nos ensaios em ambiente controlado. Para diagnosticar possíveis relações das variáveis ambientais com a doença no campo pode-se utilizar a geoestatística, a qual possibilita analisar e mapear a distribuição espacial das variáveis e da doença e relaciona-los entre si a partir dos mapas construídos. (Alves et al., 2011).

Essa ferramenta já foi empregada para estudar bacterioses em plantas, como o crestamento bacteriano da avelã e o mal de Pierce da videira (Lamichhane et al., 2013; Park et al., 2011) e também as doenças cercosporiose e ferrugem do cafeeiro (Alves et al., 2009). Nesses estudos foram verificadas a distribuição espacial dessas doenças e a relação com demais variáveis amostradas no campo. O crestamento bacteriano do Avelã (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*) apresentou forte correlação positiva com a precipitação e nitrogênio no solo e correlação negativa com Mg e K (Lamichhane et al., 2013). Já no estudo do mal de Pierce da videira (*Xylella fastidiosa*), foi possível observar distribuição espacial restrito a focos (Park et al., 2011). Enquanto nos estudos da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro Alves et al. (2009) observaram distribuição e dependência espacial a partir de focos da doença, podendo assim ser empregadas estratégias de controle pontuais no início da epidemia ao invés de pulverização área total.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram estudar a distribuição espaço temporal da mancha aureolada do cafeeiro e sua relação com variáveis do solo e do clima utilizando a geoestatística.

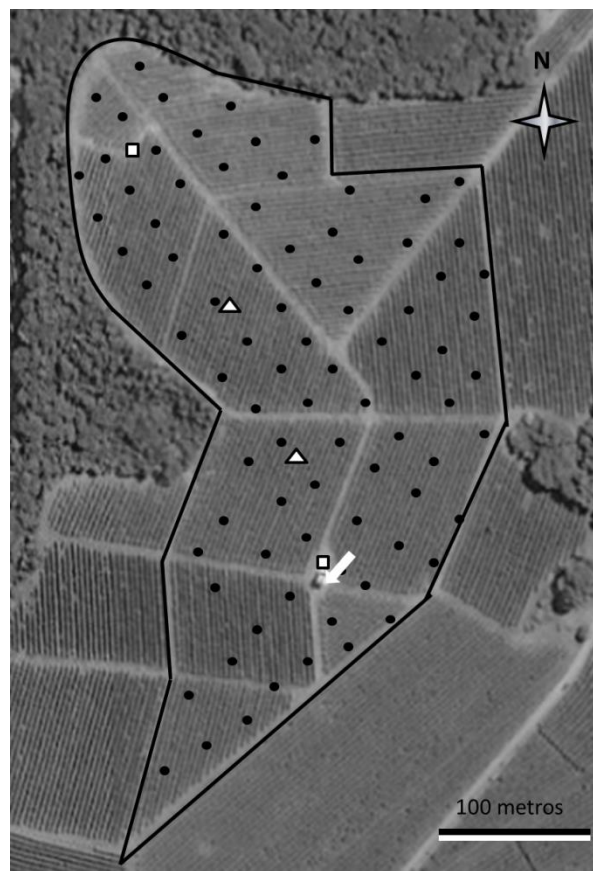
## **Material e métodos**

### Condições experimentais

O experimento foi conduzido de julho de 2013 a julho de 2015 na fazenda Neumann Kaffee Gruppe, localizada na latitude 20°53'23,7" Sul, longitude 44°52'56,9" Oeste e altitude de 1145,9 metros, no município de Santo Antônio do Amparo, no Sul de Minas Gerais, Brasil. A lavoura de café (*Coffea arabica* L.), onde foi conduzido o experimento, foi da cultivar Catucaí Amarelo 2SL, resistente à ferrugem, porém suscetível à mancha aureolada, com 4 anos de idade, plantada no espaçamento de 3,7 m entre linhas e 0,7 m entre plantas, totalizando 3.862 plantas.ha<sup>-1</sup> em área de 7,65 ha com produtividade média de 40 sacas.ha<sup>-1</sup>. Nessa lavoura havia plantas com sintomas da mancha aureolada (Psg), sendo confirmada sua presença em laboratório.

Para estabelecer a malha amostral, obtendo latitude, longitude e altitude, os pontos foram georreferenciados com GPS Topcon Hiper Lite L1 L2 RTK com pós-processador. A área foi composta de 85 pontos amostrais contendo 5 plantas cada, com distância de 30 x 30 metros (Figura 1).

Para mensurar a temperatura média do ar, a velocidade média do vento, a pluviosidade e o período de molhamento foliar, foram instaladas duas estações climatológicas Campbell Scientific®, uma CR10X e outra CR1000, nas altitudes de 1.131,7 e 1.145,4 metros, respectivamente. Entre as duas estações foram colocados 2 termo higrômetros Dataloggers Instruterm HT-500® nas altitudes de 1.140,6 e 1.143 metros com o objetivo de medir a temperatura média.



**Fig. 1** Malha amostral georeferenciada utilizada para avaliar a mancha aureolada do cafeeiro, fertilidade do solo e nutrição das plantas na fazenda Newmann Kaffee Group no município de Snto Antônio do Amparo MG. Onde cada ponto circular negro representa um ponto amostral os quais estão distanciados de 30 em 30 metros. Os quadrados brancos representam as estações climatológicas Campbell Scientific CR10X (extremo norte) e CR1000 (ao sul). Os triângulos representam os termo higrômetros (Data loggers) e a seta negra indica o ponto de referência na área com (latitude 20°53'23,7" Sul, longitude 44°52'56,9" Oeste e altitude 1145,9 m).



Os tratos culturais foram uniformes em toda área. A correção química do solo foi realizada de acordo com análise de solo (Tabela 1).

**Tabela 1** Corretivos e fertilizantes, quantidades e datas das aplicações na área experimental.

Corretivos / Fertilizantes	Quantidade aplicada	Data
Corretivos		
Geox <sup>®</sup> (CaO e MgO)	600 Kg.ha <sup>-1</sup>	Jul/2013
Calage <sup>®</sup>	7 L.ha <sup>-1</sup>	Jul/2013
Gesso agrícola	1 ton.ha <sup>-1</sup>	Out/2014
Fertilizantes (N-P-K+B)		
20-5-20 + 0,2	566 Kg.ha <sup>-1</sup>	Set/2013
16-16-16 + 0,2	700 Kg.ha <sup>-1</sup>	Nov/2013
20-5-20 + 0,2	566 Kg.ha <sup>-1</sup>	Jan/2014
20-5-20 + 0,2	585 Kg.ha <sup>-1</sup>	Nov/2014
20-5-20 + 0,2	470 Kg.ha <sup>-1</sup>	Fev/2015

CaO – óxido de cálcio, MgO – óxido de magnésio, N – nitrogênio, P – fósforo, K – potássio, B – boro, L – litro, Kg – quilograma, ha – hectare.

As pulverizações de nutrientes, inseticidas e fungicidas, para controlar demais doenças, seguiram as recomendações técnicas para o cultivo do cafeeiro e prescritas segundo equipe técnica da propriedade (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2** Datas das pulverizações, produtos e quantidades utilizadas para fornecer nutrientes, controlar pragas e doenças na área experimental.

Produto comercial	Ano e mês das pulverizações								
	2013		2014				2015		
	Set	Nov	Dez	Fev	Set	Nov	Jan	Fev	Abr
Quimifol Café <sup>®</sup>	1,5L								
Fera Café <sup>®</sup>	0,06L	0,15L	0,1L	0,1L	0,1L	0,1L	0,1L		0,1L
Quimifol Boro <sup>®</sup>	0,5L		0,5L	2L	2L				
Priori Xtra <sup>®</sup>		0,5L	0,5L	0,5L					
Nimbus <sup>®</sup>		0,25L	0,25L	0,25L					
Fulland <sup>®</sup>		0,8L	1L					1L	1L
Quimifol Café Cerrado <sup>®</sup>					3L	2L			
Stoller Boro <sup>®</sup>						2L	1L	1L	1L
Dacafé Cerrado <sup>®</sup>							3L	1L	1L
Dacafé Sul de Minas <sup>®</sup>								1 L	1L
Sphere Max <sup>®</sup>								0,4L	
Aureo <sup>®</sup>								0,5L	
Altacor <sup>®</sup>								0,09Kg	
Abacus <sup>®</sup>									0,4L
Assist <sup>®</sup>									0,5L

L – Litros por hectare, Kg – Quilograma por hectare.

**Tabela 3** Produtos utilizados e seus respectivos princípios ativos para controlar doenças do cafeeiro.

<b>Produto comercial</b>	<b>Princípio ativo</b>
Quimifol Café <sup>®</sup>	10N-2Mg-1B-6Zn
Fera Café <sup>®</sup>	6N-15P
Quimifol Boro <sup>®</sup>	1B
Priori Xtra <sup>®</sup>	Azoxistrobina + Ciproconazol
Nimbus <sup>®</sup>	Óleo mineral parafínico
Fulland <sup>®</sup>	Ácido fosfórico + Etanolamina + CuSO <sub>4</sub>
Quimifol Café Cerrado <sup>®</sup>	10N-1B-4Mn-0,5Cu-6Zn
Stoller Boro <sup>®</sup>	10B
Dacafé Cerrado <sup>®</sup>	10N-0,5B-6Zn-3Fe
Dacafé Sul de Minas <sup>®</sup>	N10-0,5B-6Zn-4Mn
Sphere Max <sup>®</sup>	Trifloxistrobina + Ciproconazol
Aureo <sup>®</sup>	Éster metílico de óleo de soja
Altacor <sup>®</sup>	Clorraniliprole
Abacus <sup>®</sup>	Piraclostrobina + Epoxiconazol
Assist <sup>®</sup>	Óleo mineral

N – nitrogênio, P – fósforo, Mg – magnésio, B – boro, Zn – zinco, Cu – cobre, Mn – manganês, Fe – ferro.

#### Amostragens

Os registros das variáveis meteorológicas foram amostrados uma vez por hora e posteriormente foi calculada a média mensal e anual para temperatura média do ar e para a velocidade média do vento enquanto para a pluviosidade foi calculada a precipitação mensal e para o período de molhamento foliar foi contabilizado o número de horas com molhamento foliar no mês.

Para avaliar a incidência, a severidade e o enfolhamento, as cinco plantas componentes de cada ponto georeferenciado foram avaliadas mensalmente. A incidência foi obtida contando o número de plantas sintomáticas em um total de cinco e calculando a porcentagem de plantas doentes por ponto. Para obter a severidade, cada uma das cinco plantas foi avaliada utilizando a escala proposta por Ito et al (2008), modificada, atribuindo-se notas de 1 a 5, sendo: 1 = ausência de lesões; 2 = 1 a 15% de folhas com doença; 3 = 16 a 30% de folhas com doença; 4 = 31 a 45% de folhas com doença e 5 = mais de 45% de folhas com doença e morte de ponteiros e/ou do terço superior da planta. Para estimativa do enfolhamento as avaliações

seguiram a mesma metodologia da severidade, porém utilizando a escala de enfolhamento proposta por Boldini (2001).

As notas de severidade e do enfolhamento foram convertidas para porcentagem de área foliar lesionada e de enfolhamento por planta, respectivamente. Posteriormente foi calculada a média das cinco plantas avaliadas por ponto amostral.

Os dados mensais da incidência, da severidade e do enfolhamento foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI), da severidade (AACPS) e do enfolhamento (AACPE), por ano agrícola (Shaner and Finney, 1977). Dessa forma, foram obtidos os valores de AACPI, AACPS e AACPE para 2013/14 e também para 2014/15.

A análise de fertilidade, textura do solo e do estado nutricional das plantas foi realizada anualmente em janeiro de 2014 e 2015. A análise de fertilidade e da textura do solo foi realizada em cada ponto, coletando 5 sub amostras de solo, na projeção da copa, de cada planta, na profundidade de 0 a 20 cm. Para análise nutricional, foram coletadas seis folhas em cada uma das 5 plantas, do terceiro e do quarto pares dos ramos plagiotrópicos, três por lado, na entrelinha. Totalizando assim, 30 folhas por ponto amostral georreferenciado. Em seguida, as amostras de solo foram encaminhadas para Laboratório de Análise de Solo, para determinar sua fertilidade e textura, segundo as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999). As amostras de folhas foram encaminhadas ao Laboratório de Análise Foliar, para quantificar os teores dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e dos micronutrientes boro (B), cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), ferro (Fe) e molibdênio (Mo), conforme metodologia proposta por Malavolta et al., (1997).

As cinco plantas, componentes do ponto, foram colhidas manualmente, no mês de junho dos anos de 2014 e 2015, os frutos *in natura* foram pesados e foi calculada a média de produção das cinco plantas por ponto. Posteriormente, a produção em peso foi convertida em sacas.ha<sup>-1</sup>, considerando 0.620 Kg de frutos *in natura* equivalente a 1 litro e sendo necessário 480 litros para comporem uma saca de 60 Kg de café beneficiado (Andrade et al., 20014).

#### Análise descritiva

Para observar o comportamento das variáveis meteorológicas durante o período experimental, foram plotados gráficos com os valores mensais médios obtidos entre as duas estações.

A curva de progresso da incidência e da severidade da mancha aureolada e da porcentagem de enfolhamento do cafeeiro foi plotada em gráfico, sendo cada mês a média obtida dos 85 pontos avaliados. Para determinar os meses de maior intensidade de doença foi plotada a incidência média de todo período experimental juntamente com a curva de progresso da incidência. Os picos da doença foram quando a incidência no mês foi superior a média anual.

#### Análise de correlação de Pearson

As variáveis estudadas foram correlacionadas entre si utilizando o teste *Casewise* ( $p=0,05$ ) do *software R*<sup>®</sup>. Primeiramente os dados anuais de AACPS e da AACPI foram correlacionados entre si e em seguida com a AACPE, altitude, textura do solo e teores de macro e micronutrientes no solo e na planta. Havendo interação dessas variáveis com a forma integralizada da doença (AACPI), estas, foram correlacionadas com os meses de incidência acima da média anual e foi verificado se houve correlação em mais de 50% dos meses. Nesse caso, essas variáveis foram selecionadas para a análise geoestatística.

#### Análise geoestatística

A geoestatística foi empregada para avaliar as variáveis AACPI, AACPS e as correlacionadas com a primeira acima de 36%. Também foi utilizada para avaliar as duas maiores incidências em cada ano agrícola. Inicialmente foi analisada a presença da componente tendência e quando presente foi eliminado para não ser confundida com a dependência espacial existente entre os pares de ponto da variável analisada. Posteriormente foi verificada a presença de autocorrelação, por meio da inspeção dos semivariogramas calculados pelo método máxima verossimilhança. (Equação 1).

Quando constatada a presença de autocorrelação, os dados das variáveis foram modelados por modelo esférico (Olea, 2003) (Equações 2, 3 e 4).

$$\text{Esférico} = \gamma(h) = \begin{cases} C_0 + C_1 \left[ 1,5 \frac{h}{a} - 0,5 \left( \frac{h}{a} \right)^2 \right] & 0 \leq h < a, \\ C_0 + C_1 & h \geq a, \end{cases} \quad (2)$$

Em que:

$\gamma(h)$  é a semivariância estimada,  
 $C_0$  é o efeito pepita,  
 $C_1$  é a contribuição,  
 $h$  é o alcance e  
 $a$  é a dependência espacial.

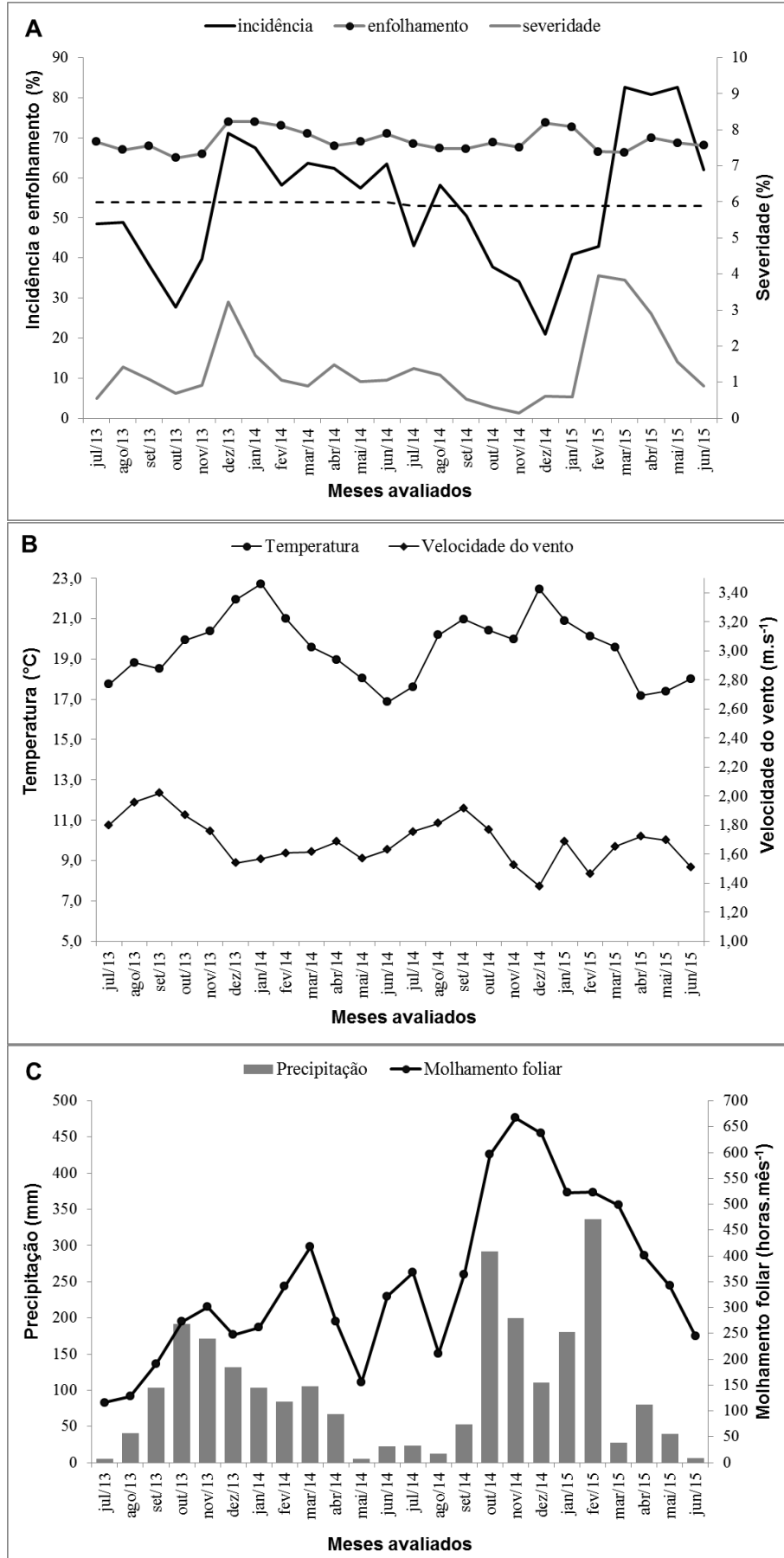
A seleção dos modelos foi realizada com base nos critérios da validação cruzada, sendo escolhido, para cada variável, o modelo com erro médio mais próximo de 0 (Equação 5) e raiz do erro quadrático médio mais próxima de 1 (Equação 6) (Webster and Oliver, 2007a, b).

Após ajustar os semivariogramas, os dados foram interpolados por meio da krigagem ordinária, e em seguida, foram gerados os mapas da distribuição espacial de cada variável. As análises geoestatísticas foram efetuadas no software R.

## **Resultados**

Análise temporal da doença, do enfolhamento e das variáveis meteorológicas

A mancha aureolada ocorreu durante todo o período de avaliação apresentando comportamento semelhante da incidência com a severidade. No ano de 2013/14 o progresso da doença iniciou em outubro, teve seu pico em dezembro com 70% de plantas doentes, já no ano 2014/15 iniciou em dezembro, teve seu pico de março a maio com 80% de plantas doentes. O aumento da severidade e da incidência da doença nos dois anos estudados foi possibilitado com as combinações de temperatura entre 20 e 22°C, precipitação acima de 125 mm por mês e molhamento foliar acima de 275 horas/mês. O enfolhamento permaneceu praticamente constante durante todo o período experimental por volta de 70% (Figura 2).



**Fig. 2** Curva de progresso da mancha aureolada e do enfolhamento do cafeeiro e comportamento das variáveis meteorológicas na fazenda Newmann Kaffee Group no município de Snto Antônio do Amparo MG durante julho de 2013 a julho de 2015. A: Curva de progresso da incidência, da severidade da mancha aureolada e do enfolhamento do cafeeiro, B: comportamento da temperatura média do ar e velocidade média do vento, C: Comportamento da precipitação e molhamento foliar.

#### Correlações

A correlação entre as variáveis AACPI e AACPS dos anos 2013/14 e 1014/15 foi positiva e acima de 75% (Tabela 4). Sendo assim, a AACPI foi utilizada nas demais análises de correlação.

**Tabela 4** Correlações significativas da área abaixo da curva do progresso da incidência da mancha aureolada (AACPI) com área abaixo da curva do progresso da severidade da mancha aureolada (AACPS), altitude e teores de Macro e Micronutrientes no solo e na planta.

Variáveis	AACPI 2013/2014	AACPI 2014/2015
<b>AACPS</b>	+ 76%	+ 83%
<b>Nitrogênio foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>	+ 28%	ns
<b>Fósforo foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>	+ 47%	ns
<b>Potássio foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>	+ 30%	ns
<b>Cálcio (dag.dcm<sup>3-1</sup>)</b>	ns	+ 26%
<b>Magnésio (dag.dcm<sup>3-1</sup>)</b>	ns	+ 22%
<b>Cobre (dag.dcm<sup>3-1</sup>)</b>	ns	- 41%
<b>Manganês foliar (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>	ns	- 23%
<b>Cobre foliar (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>	ns	- 36%
<b>Produção (Kg. Planta<sup>-1</sup>)</b>	- 57%	-22%
<b>Altitude (m)</b>	+ 81%	+ 80%

AACPI: área abaixo da curva do progresso da incidência, AACPS: área abaixo da curva do progresso da severidade. Correlações expressas em porcentagem são significativas no teste Quadrado de Pearson ( $p=0.05$ ), + correlação diretamente proporcional, - correlação inversamente proporcional e ns: correlação não significativa.



Houve correlação significativa e negativa da AACPI com a produtividade nos dois anos estudados. Ou seja, quanto maior a AACPI menor a produtividade. Em relação a altitude houve correlação direta com a AACPI nos dois anos acima de 80%. Para o P foliar a correlação com a AACPI foi significativa e positiva no ano 2013/14, enquanto para o Cu foi negativa no ano de 2014/15.

Essas variáveis foram correlacionadas com a incidência dos meses os quais apresentaram incidência superior a incidência média anual para assim verificara a frequência de correlação. As variáveis com correlações média e forte em relação a AACPI (>36%) também correlacionaram com mais de 50 % dos meses selecionados, entretanto as variáveis com correlação fraca (<36%) com a AACPI não correlacionaram significativamente com mais de 50% dos meses (Tabela 5).

**Tabela 5** Resultado das correlações das variáveis significativas com a incidência média dos meses situados acima da média anual da incidência para os anos 2013/14 e 2014/15 expressos em porcentagem.

<b>Incidência 2013/2014</b>	<b>Fósforo foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produção (Kg)</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Nitrogênio foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Potássio foliar (dag.Kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Dezembro</b>	+ 34%	- 48%	+ 79%	ns	ns
<b>Janeiro</b>	+ 39%	- 46%	+ 81%	ns	ns
<b>Fevereiro</b>	+ 38%	- 52%	+ 71%	+ 26%	+ 33%
<b>Março</b>	+ 45%	- 42%	+75%	+ 25%	+ 33%
<b>Abril</b>	+ 45%	- 51%	+ 74%	ns	+ 38%
<b>Mai</b>	+ 44%	- 51%	+ 69%	+ 29%	+ 25%
<b>Junho</b>	+ 39%	- 43%	+ 76%	ns	ns

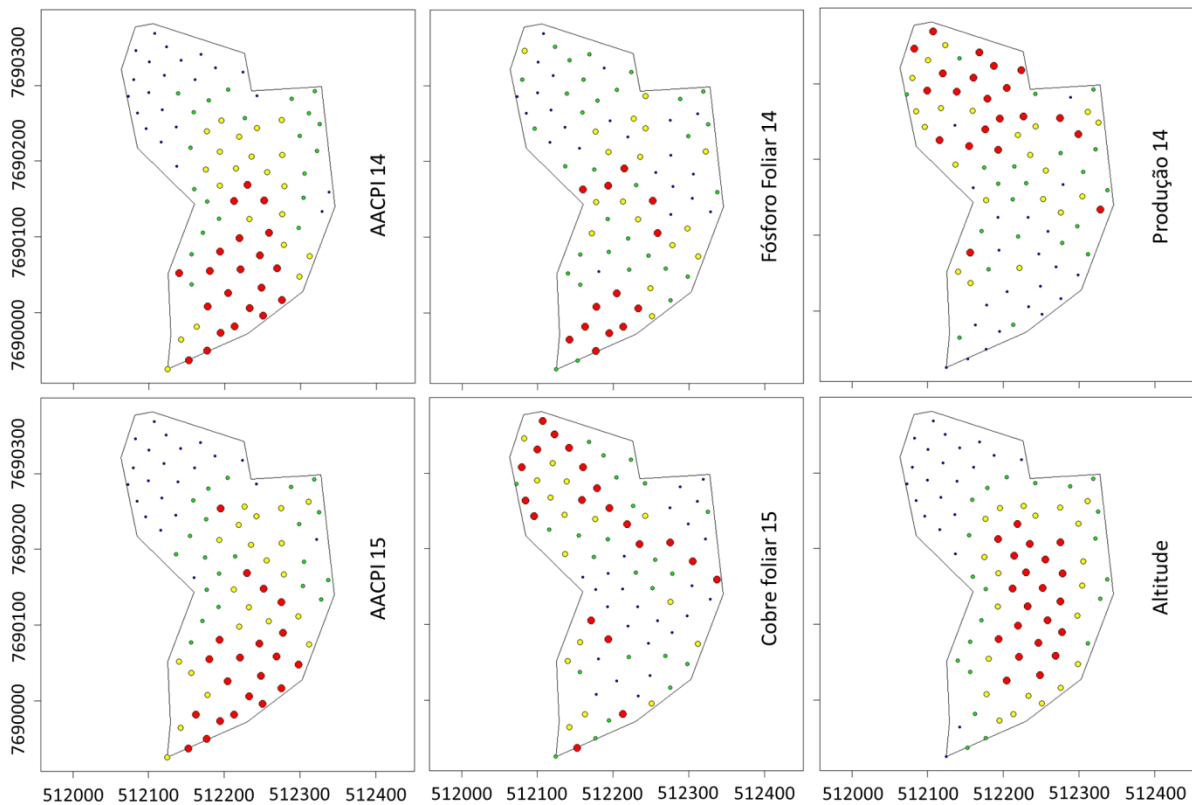
  

<b>Incidência 2014/2015</b>	<b>Cobre foliar (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Produção (Kg)</b>	<b>Ca (dag.dcm<sup>3-1</sup>)</b>	<b>Mg (dag.dcm<sup>3-1</sup>)</b>	<b>Mn Foliar (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Agosto</b>	- 42%	+ 72%	ns	ns	+ 27%	ns
<b>Março</b>	- 38%	+ 85%	+ 23%	+ 25%	ns	- 26%
<b>Abril</b>	- 32%	+ 80%	ns	+ 27%	ns	- 27%
<b>Mai</b>	ns	+ 63%	ns	ns	ns	ns
<b>Junho</b>	- 28%	+ 63%	ns	+ 26%	+ 24%	ns

AACPI: área abaixo da curva do progresso da incidência, AACPS: área abaixo da curva do progresso da severidade. \* correlação significativa no teste Quadrado de Pearson ( $p=0.05$ ), + correlação diretamente proporcional, - correlação inversamente proporcional e ns: correlação não significativa.

## Análise exploratória dos dados

A partir das análises anteriores foram selecionadas as variáveis com correlações significativas durante os meses de maior incidência da doença e a própria AACPI e foram avaliados por análise espacial exploratória e mapas quantitativos (Figura 3). Todas variáveis estudadas mostraram forte evidência de dependência espacial sendo possível observar as correlação diretas e inversas das variáveis ao observar os mapas.



**Fig. 3** Mapa quantitativo da Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) do ano 2014 e 2015, fósforo foliar 2014, produção 2014, cobre foliar 2015 e altitude.

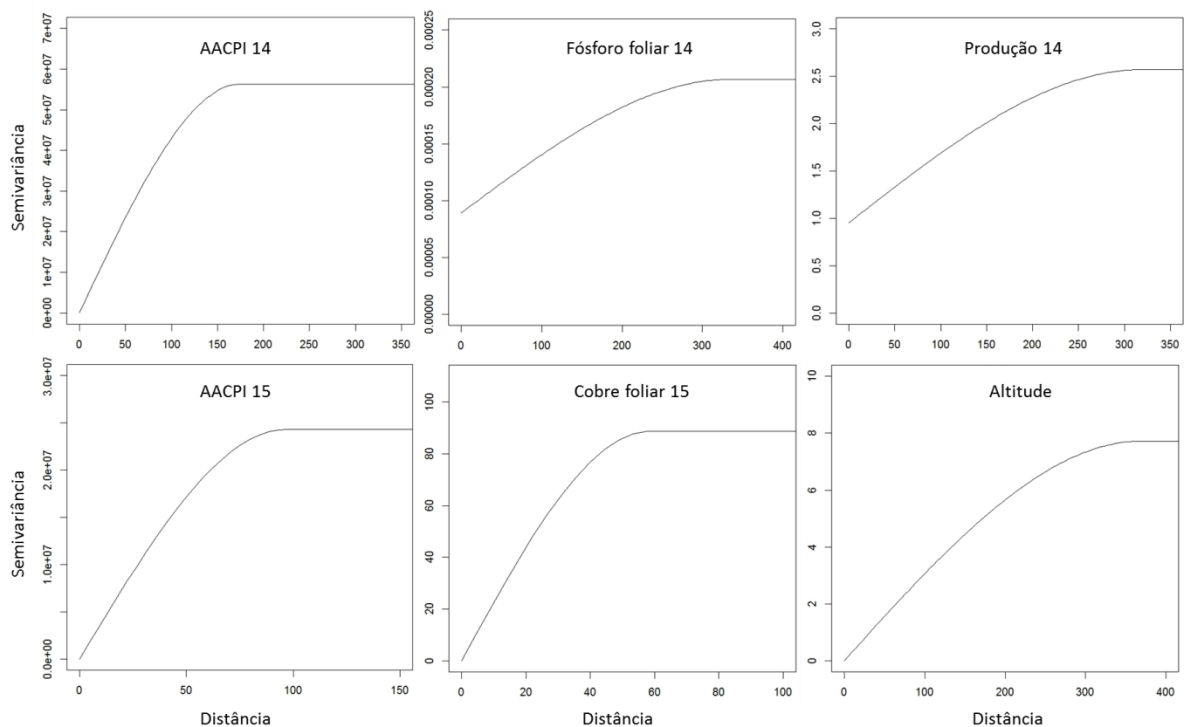
## Geoestatística

As mesmas variáveis estudadas na análise exploratória foram ajustadas utilizando o modelo esférico para a representação do variograma e construção dos mapas de krigagem (Tabela 6, Figura 4 e Figura 5).

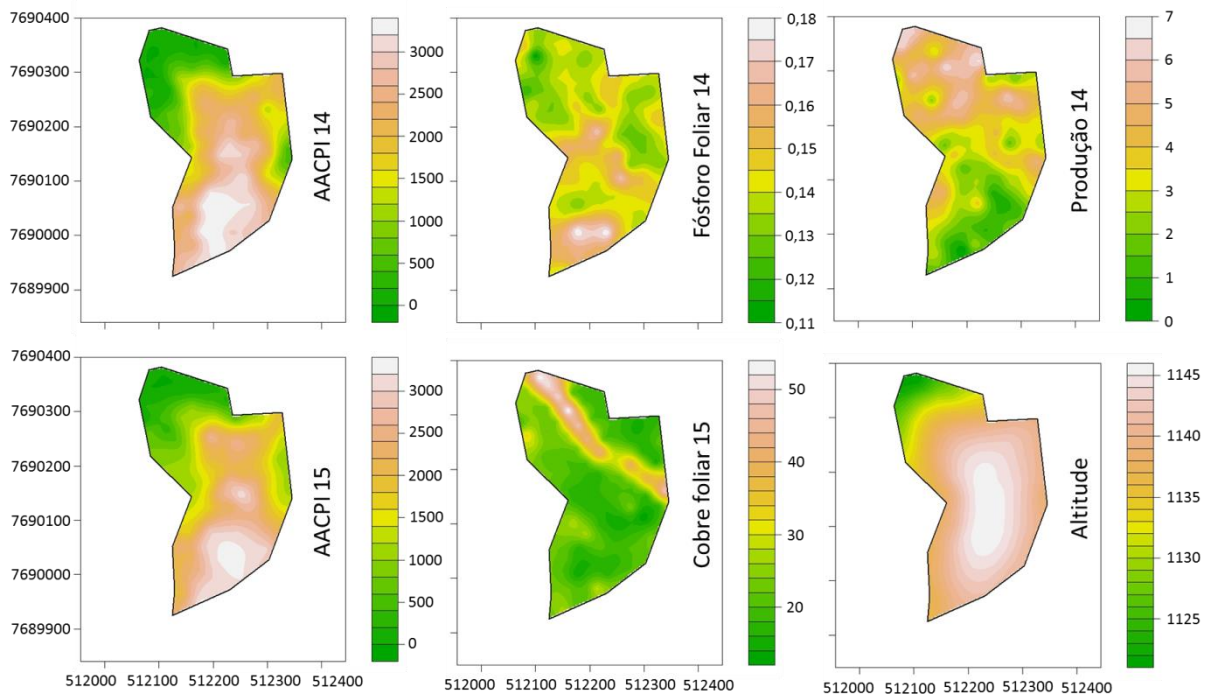
**Tabela 6** Parâmetros e coeficientes dos semivariogramas das funções esférica estimada por métodos de máxima verossimilhança, para área abaixo da curva do progresso da incidência da mancha aureolada (AACPI), altitude, produção, fósforo e cobre foliares.

Variáveis	Efeito pepita ( $C_0$ )	Patamar ( $C_0+C_1$ )	Alcance (a)
AACPI <sup>1</sup>	105.953	56.288.392	175,4
P foliar (dag.Kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	0,0001	0,0001	334,4
Produção <sup>1</sup> (Kg) <sup>1</sup>	0,9541	1,618	319,2
AACPI <sup>2</sup>	0	24.338.441	96,81
Cu foliar (mg.Kg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0	88,69	58,44
Altitude (m) <sup>1</sup>	0	7,72	369,6

<sup>1</sup> ano 2013/14. <sup>2</sup> ano 2014/15.



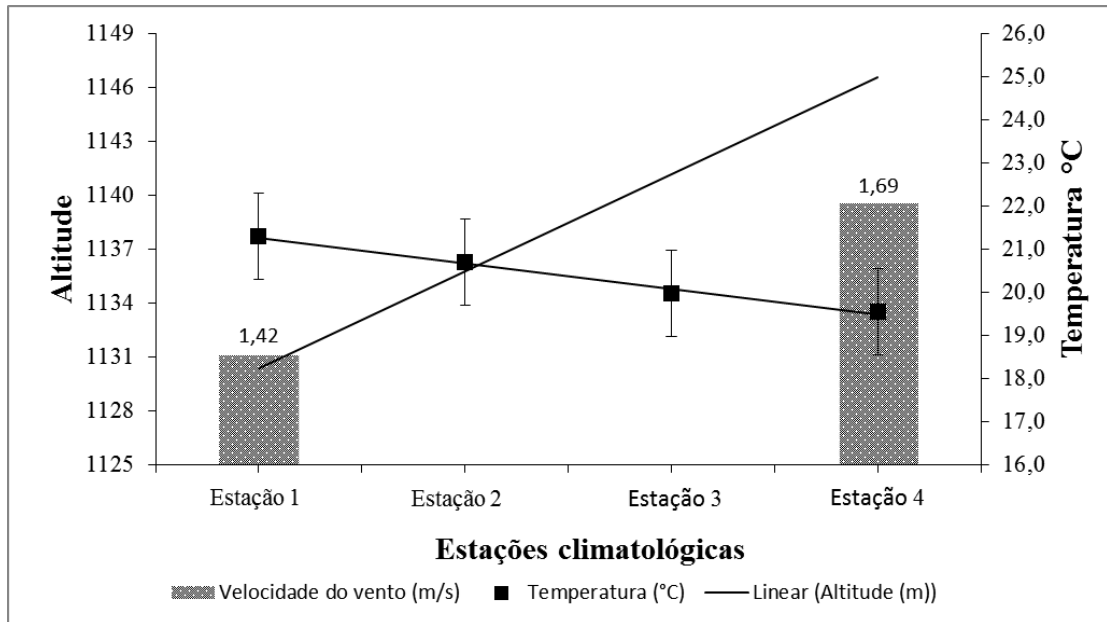
**Fig. 4** Semivariogramas da Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) do ano 2014 e 2015, fósforo foliar 2014, produção 2014, cobre foliar 2015 e altitude.



**Fig. 5** Mapas da krigagem da Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) do ano 2014 e 2015, fósforo foliar 2014, produção 2014, cobre foliar 2015 e altitude.

A mancha aureolada não ocorreu em área total formando um único foco localizado na face sudeste do terreno nos dois anos (Figura 3 e 5). Ao seguir da posição sudeste para posição noroeste a AACPI diminuiu gradativamente até zero. A incidência da mancha aureolada nos meses de pico da doença chegou a 100% nas face sul do terreno portanto todas as plantas avaliadas nessa face do terreno apresentaram ao menos uma folha doente.

Na área experimental a altitude variou de 1121 a 1145 metros, sendo as maiores altitudes localizadas na parte central e sul do terreno (Figura 3 e 5). Houve correlação da altitude com a AACPI da mancha aureolada nos dois anos conforme identificado nos mapas de distribuição espacial onde as maiores AACPIs ocorreram nos pontos acima de 1141,6 metros de altitude. Também foi possível observar um aumento de 4% da AACPI com o aumento da elevação do terreno em 1 metro. A variação da AACPI de acordo com a altitude também está ligada a variáveis ambientais como temperatura do ar e velocidade do vento as quais estão ligadas a altitude. Nas áreas próximas de 1121 onde a AACPI foi baixa, a velocidade do vento foi menor  $1,42 \text{ m.s}^{-1}$  e a temperatura média do ar foi maior  $21,3^\circ\text{C}$  (Figura 6), ao contrário das áreas próximas a 1145 metros onde a AACPI foi alta, a velocidade do vento maior  $1,69 \text{ m.s}^{-1}$  e a temperatura média menor  $19,6^\circ\text{C}$ .



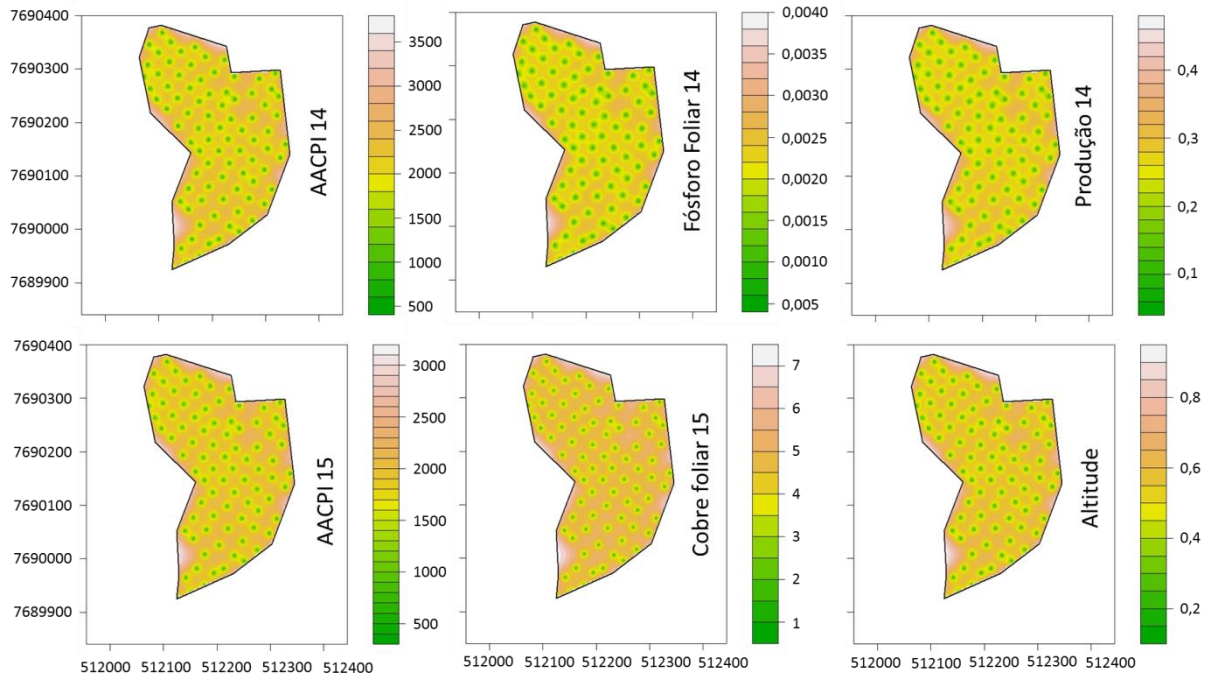
**Fig. 6** Temperatura média (°C), velocidade do vento (m/s) de julho de 2013 a julho de 2015 e altitude (m) nos locais das estações climatológicas. Estação 1 Campbell CR10X, Estação 4 Campbell Scientific CR1000 com medição da temperatura e velocidade do vento. Estações 2 e 3 termos-higrômetros Data loggers com medição da temperatura.

A distribuição espacial da produção de café no ano de 2013/14 variou em relação as direções norte e sul do terreno, aumentando de  $1,1 \text{ Kg.planta}^{-1}$  ( $14,2 \text{ sacas.ha}^{-1}$ ) na face sul para  $6,63 \text{ Kg.planta}^{-1}$  ( $72,6 \text{ sacas.ha}^{-1}$ ) na face norte (Figura 5). Para a distribuição espacial também foi observado a correlação negativa entre a AACPI e a produção podendo ser estipulado a redução em  $1 \text{ sacas.ha}^{-1}$  com aumento de 1,38% da AACPI.

A distribuição espacial do P foliar no ano 2013/14 formou um foco com a quantia de  $0,166 \text{ dag.Kg}^{-1}$  na matéria seca, no ponto mais ao sul do terreno diminuindo gradativamente na direção norte do terreno e nas menores altitudes até a quantidade de  $0,124 \text{ dag.Kg}^{-1}$  (Figura 5 B e F). A correlação numérica entre o teor de P foliar e a AACPI também foi observada na distribuição espacial das duas variáveis (Figura 5). O aumento do P foliar em  $1 \text{ dag.Kg}^{-1}$  causou um aumento de 2,3% na AACPI da mancha aureolada.

No segundo ano a distribuição espacial do teor de Cu formou focos com diferentes concentrações do nutriente, sendo possível observar dois grandes focos no centro da área com teores de  $12 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e um foco na face norte do terreno com teores de  $55 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (Figura 5). Em relação a correlação negativa apresentada do teor de Cu foliar com a AACPI, os maiores teores de Cu foliar estão nos locais onde a AACPI foi menor, sendo possível estipular uma aumento da AACPI em 2% conforme diminui  $1 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de cobre na folha.

Os maiores erros de Krigagem ocorreram em locais mais distantes dos pontos de amostragens. A maior variância foi observada para a variável cobre foliar enquanto as menores foram para fósforo e produção.



**Fig. 7** Mapa de krigagem do erro da Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) do ano 2014 e 2015, fósforo foliar 2014, produção 2014, cobre foliar 2015 e altitude.

## Discussão

As correlações podem ser direta ou inversa e são consideradas fracas quando inferiores a 36%, moderadas de 36 a 75% e fortes acima de 75% (Taylor et al., 1990). A correlação entre a AACPI e AACPS foi direta e forte, ou seja, ambas foram capazes de mediar o progresso da doença. Essa correlação positiva entre incidência e severidade também foi observada nas enfermidades ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro, estudadas no campo (Alves et al., 2009). Dessa forma para as demais análises de correlação foi utilizada a AACPI. Quando possível à utilização da incidência pode ser usada em relação à severidade, pois a avaliação da incidência é mais precisa e exige pouco treinamento (Campbell and Madden, 1990).

A distribuição espacial da mancha aureolada nos dois anos estudados formou um único grande foco na área localizado na face sul do terreno portanto o manejo da enfermidade

deve ser direcionado ao foco da doença. A distribuição em focos parece ser uma característica de bacterioses, pois já foi observado esse padrão de distribuição em outras bacterioses como, crestamento bacteriano do Avelã (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*), mal de Pierce da videira (*Xylella fastidiosa*) e crestamento bacteriano da cebola (*Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*) (Roumagnac et al., 2004; Lamichhane et al., 2013; Park et al., 2011). Em relação a face sul do terreno, a menor exposição à radiação solar e o maior período de molhamento foliar podem ter favorecido a doença, pois a bactéria necessita de molhamento foliar para colonizar o cafeeiro (Pozza et al., 2010). A face de exposição sul do terreno já foi observado por outros autores favorecendo doenças como a ferrugem do cafeeiro (Custódio et al., 2011).

O Cu no solo correlacionou de forma inversa e moderada com AACPI, porém não foi feito a análise espacial dessa variável por ser um micronutriente e estar presente em quantidades muito pequenas sofrendo interação de outros cátions no solo como Ca, Mg, cloro, sulfato e nitrato na absorção radicular (White and Broadley, 2009), com isso a quantidade presente de Cu no solo em determinado ponto não significa necessariamente a quantidade de Cu a ser assimilada. Além disso, o Cu fornecido para o cafeeiro é realizado via adubação foliar (Ribeiro et al., 1999), portanto a quantidade presente no solo pouco representa a quantidade fornecida para nutrição.

Em relação ao teor foliar de nutrientes, houve correlação moderada do P e Cu com a AACPI. O P é um elemento limitante do crescimento e produção do cafeeiro (Silva et al., 2010) e o Cu é um elemento atuante como cofator de enzimas da fotossíntese e da respiração (Marschner, 2012). A alteração da quantidade desses nutrientes pode modificar o metabolismo da planta predispondo a planta a doenças. Segundo Ribeiro et al. (1999) o teor normal de P na planta varia de 0.15 a 0.2 dag.Kg<sup>-1</sup>. Desse modo em alguns locais as plantas estavam deficientes e apenas em parte da área estava dentro da faixa normal para o nutriente. As áreas com teores adequados desse nutriente na folha foram mais afetadas pela doença (AACPI). O teor adequado de P permitem as plantas maior emissão de folhas novas (Silva et al., 2010) e essas folhas são mais suscetíveis a mancha aureolada (Pozza et al., 2010; Zoccoli et al., 2011) e contra partida nos locais com teores baixos de P na folha o crescimento da planta é reduzido, reduzindo as portas de entrada da bactéria na planta. O teor normal de Cu na folha é entre 14 e 26 mg.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca para as lavouras no sul de Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999). Portanto em alguns pontos da face sul o Cu estava abaixo do teor normal levando a AACPI ser maior nesses locais. Isso pode ser devido ao fato do Cu ser um micronutriente atuante como cofator de enzimas relacionado a fotossíntese e respiração (Marschner, 2012), com isso a sua deficiência provoca distúrbio nessas funções predispondo a

planta a doença. O Cu pode também formar uma barreira contra os fitopatógenos na parte externa da folha (FRAC, 2015). Desse modo quanto maior o teor de Cu na folha maior proteção estaria ocorrendo.

O aumento da doença em 1,38% diminuiu a produção em 1 saca.hectare<sup>-1</sup>, porém a variação percentual é calculada sobre a AACPI desse modo o aumento de 1,38% da AACPI equivale a 52 plantas. Contudo espera-se uma redução na produção das plantas com mancha aureolada, pois esta causa desfolha, seca de ramos e podridão das rosetas florais (Belan et al., 2014). As perdas relacionadas a produção do cafeeiro com a mancha aureolada são descritas como significativas por diversos autores, todavia estes não informam numericamente a relação doença e perdas (Ito et al., 2008; Rodrigues et al., 2012; Zoccoli et al., 2011). Em outros patossistemas do cafeeiro essa correlação também acontece. (Pozza et al., 2010; Ito et al., 2008). Santos et al., (2008 B) observaram o aumento da AACPI da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) reduzindo a produção do cafeeiro.

A relação entre a altitude e a mancha aureolada além do presente trabalho já foram mencionados por outros autores (Sera, 2001; Zoccoli et al., 2011). A altitude é considerada um dos principais fatores propiciador para o aumento da AACPI da mancha aureolada, porém não é um fator exclusivo devido ao fato de lavouras situadas a altitudes inferiores a 1120 metros apresentarem relatos da doença (Zoccoli et al., 2011). Desse modo a altitude influencia em variáveis como velocidade do vento e temperatura as quais também apresentam correlação com a mancha aureolada. Em relação a velocidade do vento alguns autores mencionaram correlação direta com a mancha aureolada baseado em observações (Pozza et al., 2010; Ito et al., 2008; Zoccoli et al., 2011). O vento causa ferimento nas folhas das plantas aumentando os sítios de infecção da bactéria (Zoccoli et al., 2011) além de auxiliar na disseminação carregando os aerossóis com bactéria para as plantas vizinhas (Rodrigues et al., 2012). As maiores velocidades do vento também foram descritas por outros autores aumentando a intensidade da mancha aureolada no campo (Pozza et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Zoccoli et al., 2011). Quanto à temperatura, informações imprecisas como, baixas ou amenas são descritas como favoráveis a doença (Ito et al., 2008; Ithiru et al., 2013). As temperaturas menores estariam auxiliando na colonização da bactéria por serem propícias na manutenção da água livre sobre a folha por maior tempo auxiliando na locomoção da bactéria até os sítios de infecção (Goto et al., 2012).

Os erros de krigagem observado na figura 7 são naturais, pois ao estimatimar por modelos o valor de um ponto não avaliado localizado entre dois pontos avaliados por mais que a estimativa seja precisa existe um erro associado (Alves et al., 2009, Freitas, 2013).



## Conclusão

A mancha aureolada apresentou distribuição espacial e apareceu em um único grande foco na área localizado na face sul do terreno nos dois anos reduzindo a produção das plantas afetadas.

Os maiores níveis da doença foram nos locais com maiores teores de fósforo no tecido foliar do café e maior altitude, sendo nas maiores altitudes, a maior velocidade do vento, e a menor temperatura média do ar. Enquanto os menores níveis da doença nos locais com os maiores de Cu presente na folha.

## Referências

- Alves, M. C., Silva, F. M., Moraes, J. C., Pozza, E. A., de Oliveira, M. S., Souza, J. C., & Alves, L. S. (2011). Geostatistical analysis of the spatial variation of the berry borer and leaf miner in a coffee agroecosystem. *Precision Agriculture*, 12, 18-31.
- Alves, M. C., Silva, F. M., Pozza, E. A., & De Oliveira, M. S. (2009). Modeling spatial variability and pattern of rust and brown eye spot in coffee agroecosystem. *Journal of pest science*, 82, 137-148.
- Alves, M. C.; Pozza, E. A.; Ferreira, J. B.; Araújo, D. V.; Costa, J. C. B.; Deuner, C. C.; Muniz, M. F. S.; Zambenedetti, E. B.; & Machado, J. C. (2007). Intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] nas cultivares Conquista, savana e suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. *Summa Phytopathologica*, 33, 239-244.
- Amaral, J. D., Teixeira, C., & Pinheiro, E. (1956). A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. *Arquivo do Instituto Biológico*, 23, 151.
- Anco, D. J., Madden, L. V., & Ellis, M. A. (2013) Effects of temperature and wetness duration on the sporulation rate of *Phomopsis viticola* on infected grape canes. *Plant Disease*, 97, 579-589.
- Andrade, W. E. B., Guimarães, P. T. G., Faquin, V., & Guimarães, R. J. (2014). Produtividade do cafeeiro arábica em condições de adensamento, no noroeste Fluminense. *Coffee Science*, 9, 90-101.
- Belan, L. L., Pozza, E. A., & Souza, R. M. (2014). A Mancha Aureolada do Cafeeiro. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 22, 227-256.
- Boldini, J. M. (2001). Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado. *Tese de Doutorado* Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Camargo, A. P. (1977). *Zoneamento de aptidão climática para a cafeicultura de arábica e robusta no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE.

- Campbell C L, & Madden L V. (1990). *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York: John Wiley.
- Carvalho, A. M., Mendes, A. N., Carvalho, G. R., Botelho, C. E., Gonçalves, F. A., & Ferreira, A. D. (2011). Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 45, 269-275.
- Custódio, A. A. P., Pozza, E. A., de Paiva Custódio, A. A., de Souza, P. E., Lima, L. A., & Lima, L. (2011). M. Intensidade da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro quanto à face de exposição das plantas. *Coffee Science*, 5, 214-228.
- FRAC. (2015). *FRAC code list Sorted by mode of action*. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf> Accessed 2 March 2017.
- Freitas, A. S. (2013). Sigatoka-amarela da bananeira em função da nutrição mineral em solução nutritiva e da distribuição espacial da fertilidade do solo. *Tese de Doutorado* Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Garcia Júnior, D., Pozza, E.A., Pozza, A.A.A, Souza, P.E., Carvalho, J.G. & Balieiro, A.C. (2003) Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 286-291.
- Glinushkin, A. P., Beloshapkina, O. O., Solovykh, A. A., Sudarenkov, G. V., & Molnár, J. (2016). Bacterial Diseases of Wheat in the Southern Ural: Manifestations, Biological Characteristics and Monitoring Features. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 51, 57-67.
- Goto, M. (2012). *Fundamentals of bacterial plant pathology*. San Diego: Academic Press.
- Ithiru, J. M., Gichuru, E. K., Gitonga, P. N., Cheserek, J. J., & Gichimu, B. M. (2013). Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. *African Journal of Agriculture Research*, 81, 2450-2454.
- Ito, D. S.; Sera, T.; Sera, G. H.; Del Grossi, L.; & Kanayama, F. S. (2008). Resistance to acterial blight in arabica coffee cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8, 99-103.
- Lamichhane, J. R., Fabi, A., Ridolfi, R., & Varvaro, L. (2013). Epidemiological study of hazelnut bacterial blight in central Italy by using laboratory analysis and geostatistics. *PloS one*, 8, e56298.
- Malavolta E, Vitti G, & Oliveira S. (1997). *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba: Potafos.
- Marcuzzo, L. L., Fernandes, J. M. C., & Becker, W. F. (2009). Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 35, 229-230.
- Marschner, H. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. London: Academic press.

- Monteil, C. L., Bardin, M., & Morris, C. E. (2014) Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *The ISME journal*, 8, 2290-2304.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual review of phytopathology*, 51, 85-104.
- Olea, R. A. (2003). *Geostatistics for engineers and earth scientists*. Norwell: Kluwer Academic Publishers.
- Pan, Z., Yang, X. B., Pivonia, S., Xue, L., Pasken, R., & Roads, J. (2006). Long-term prediction of soybean rust entry into the continental United States. *Plant Disease*, 90, 840-846.
- Park, Y. L., Perring, T. M., Krell, R. K., Hashim-Buckey, J. M., & Hill, B. L. (2011). Spatial distribution of Pierce's disease related to incidence, vineyard characteristics, and surrounding land uses. *American journal of enology and viticulture*, 62, 229-238.
- Pereira, E. J. G., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., & Guedes, R. N. C. (2007). Seasonal mortality factors of the coffee leafminer, *Leucoptera coffeella*. *Bulletin of Entomological Research*, 97, 421-432.
- Pérez, C. D. P., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Freitas, A. S., & Silva, M. G. (2017). Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva. *Coffee Science*, 12, 60-68.
- Pozza, A. A. A.; Martinez, H. E. P.; Caixeta, S. L.; Cardoso, A. A.; Zambolim, L.; & Pozza, E. A. (2001). Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 36, 53-60.
- Pozza E. A., Carvalho V. L., & Chalfoun S. M. (2010). 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 UFPA.
- Ribeiro, A.C., Guimarães, P.T.G., & Alvarez V., V.H. (1999). *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5. Aproximação*. Viçosa : CFSEMG.
- 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. (2012). *Mancha aureolada do cafeeiro causada por Pseudomonas syringae pv. garcae*. Campinas: Instituto agrônômico.
- Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F., & Hughes, G. (2004). Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology*, 94, 138-146.
- Santos, F. S., Souza, P. E., Pozza, E. A., Miranda, J. C., Barreto, S. S., & Theodoro, V. C. Progress of brown eye spot (*Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke) in coffee trees in organic and conventional systems. (2008). *Summa Phytopathologica*, 34, 48-54. a

- Santos, F. S., Souza, P. E., Pozza, E. A., Miranda, J. C., Carvalho, E. A., Fernandes, L. H. M., & Pozza, A. A. A. (2008). Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *43*, 783-791. b
- Sera, T. (2001). Coffee genetic breeding at IAPAR. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *1*, 179-190.
- Shaner, G. & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, *67*, 1051-1056.
- Silva, L. D., Marchiori, P. E. R., Maciel, C. P., Machado, E. C., & Ribeiro, R. V. (2010). Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *45*, 965-972.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of diagnostic medical sonography*, *6*, 35-39.
- USDA. (2017). *Coffee: World Markets and Trade Foreign Agricultural Service*. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf> Accessed 2 March 2017.
- Vandermeer, J., Perfecto, I., & Philpott, S. (2010). Ecological complexity and pest control in organic coffee production: uncovering an autonomous ecosystem service. *BioScience*, *60*, 527-537.
- Webster, R., & Oliver, M. A. (2007). Sample adequately to estimate variograms of soil properties. *Journal of Soil Science*, *43*, 177-192. a
- Webster, R., & Oliver, M. A. (2007). *Geostatistics for environmental scientists*. England: Wiley. b
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, *182*, 49-84.
- Zoccoli, D. M., Takatsu, A. & Uesugi, C. H. (2011). Occurrence of halo bright in coffee trees in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba Region's, Brazil. *Bragantia*, *70*, 843-849.