



LEÔNIDAS LEONI BELAN

**DETECÇÃO DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*
EM SEMENTES, MICROANÁLISE DE RAIOS X
E DESENVOLVIMENTO DE ESCALA
DIAGRAMÁTICA PARA A MANCHA
AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

LAVRAS – MG

2014

LEÔNIDAS LEONI BELAN

**DETECCÃO DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* EM SEMENTES,
MICROANÁLISE DE RAIOS X E DESENVOLVIMENTO DE ESCALA
DIAGRAMÁTICA PARA A MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

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

Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

Coorientador

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

Coorientador

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior

LAVRAS – MG

2014

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

Belan, Leônidas Leoni.

Detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em sementes,
microanálise de raios X e desenvolvimento de escala diagramática
para a mancha aureolada do cafeeiro / Leônidas Leoni Belan. –
Lavras : UFLA, 2014.

126 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Edson Ampélio Pozza.

Bibliografia.

1. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. 2. Escala diagramática. 3.
Inóculo inicial. 4. Nutrição mineral. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 632.32

LEÔNIDAS LEONI BELAN

**DETECÇÃO DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* EM SEMENTES,
MICROANÁLISE DE RAIOS X E DESENVOLVIMENTO DE ESCALA
DIAGRAMÁTICA PARA A MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 30 de abril de 2014

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior - UFSCAR

Prof. Dr. Rubens José Guimarães – UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves – UFLA

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza – UFLA

Orientador

LAVRAS – MG

2014

A Deus,

pela vida, força e coragem para seguir na caminhada;

aos meus pais, Pedro Belan e Maria Angélica Leoni Belan;

aos meus irmãos, Leonardo e Pedro Henrique;

aos meus avós (*in memoriam*) Leônidas Leoni, Rita Dornelas Leoni e Jacy Belan;

ao Prof. Edson Ampélio Pozza pela confiança,
oportunidades concedidas,
e amizade.

Aos cafeicultores.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Deus, pela vida, pela saúde, paz, por todas as oportunidades, pelas graças concedidas e força para superar os desafios.

Aos meus, pais Pedro Alcântara Belan e Maria Angélica Leoni Belan, e aos meus irmãos, Leonardo Leoni Belan e Pedro Henrique Leoni Belan, por toda dedicação, apoio, paciência, compreensão e esforços, que me possibilitaram importantes conquistas e muitas mais que estão por vir.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para realização do curso de doutorado.

Ao Prof. Edson Ampélio Pozza pelo exemplo de profissionalismo, pela paciência, pelo estímulo, confiança e orientação, além de todas as oportunidades concedidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles professores e funcionários do DFP que identificaram em mim potencial para atuação na pesquisa, por todo conhecimento compartilhado, apoio e por todas as oportunidades concedidas.

À minha namorada Kmila, que esteve comigo acompanhando e colaborando tanto de forma pessoal como também profissional.

Ao amigo Marcelo Loran, que dedicou parte de seu raríssimo tempo, alguns finais de semana, encarando sol e chuva, superando barreiras e enfrentando desafios em nome da amizade, companheirismo e profissionalismo. À Camila Lage pela amizade, paciência, colaboração e companheirismo. À Melina Raimundi diante de todo apoio nos experimentos. Aos estagiários e bolsistas: Júlia Marques, Fernando Ferrari e Marina Reis pela amizade, por todo apoio e colaboração na realização dos experimentos.

Aos demais estudantes e pesquisadores do DFP, colegas de departamento que me acolheram, compartilharam conhecimentos e que enfim, junto comigo, empenharam-se em prol da realização deste estudo.

Aos coordenadores e técnicos da Fazenda NKG por conceder as lavouras para instalação de experimentos e compartilhar informações e conhecimentos. Aos produtores de mudas, Waldir, Wando, Everaldo, Dona Terezinha que cederam espaço para os experimentos e confiaram nos objetivos deste projeto para trazer-lhes soluções de manejo da mancha aureolada, por acreditar que serão atendidos seus anseios quanto à sustentabilidade da cafeicultura.

“Tomai *coragem e não tenhais medo*”.

(Is 35, 4)

RESUMO

São escassos os dados e a pesquisa de base e tecnológica para realizar estudos de controle e manejo da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) (PSG) do cafeeiro. Logo, os objetivos foram: 1) desenvolver e validar uma escala diagramática para quantificar a severidade da mancha aureolada em folhas de cafeeiro; 2) verificar se sementes de cafeeiro podem disseminar o inóculo de PSG considerando plantas com sintomas de mancha aureolada; 3) verificar diferenças na distribuição dos nutrientes nos tecidos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em torno de lesões de doenças foliares. Diante do primeiro objetivo, foi desenvolvida e validada um escala diagramática, para avaliar a severidade da mancha aureolada em folhas de cafeeiro, com base nos intervalos de distribuição de frequência dos valores de severidade da doença. Essa escala proporciona melhores níveis de acurácia, precisão e reprodutibilidade nas avaliações. Buscando identificar a origem do inóculo inicial da doença em viveiros, sementes provenientes de plantas com sintomas de mancha aureolada, foram imersas em solução salina estéril e o extrato bruto inoculado em folhas de mudas de cafeeiro. Houve sintomas de mancha aureolada nas folhas de plantas de cafeeiro inoculadas com o referido extrato, semelhantes aos desenvolvidos por folhas inoculadas com suspensão de inóculo do isolado padrão de referência PSG; enquanto as mudas inoculadas com extrato de sementes de plantas assintomáticas não apresentaram sintomas. Isolados bacterianos provenientes dessas sementes de cafeeiro apresentaram padrões bioquímicos e moleculares iguais ao isolado padrão PSG. Logo,

sementes de cafeeiro podem disseminar o inóculo de PSG com base em plantas com sintomas de mancha aureolada. Para conhecer a distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos, em torno da lesão de doenças foliares do cafeeiro, fragmentos de folhas foram submetidos à microanálise de raios X (MAX). Os nutrientes minerais potássio e cálcio apresentaram gradiente de distribuição e relação espacial com os tecidos assintomáticos e com sintomas de mancha aureolada. Maior teor de potássio foi encontrado no tecido assintomático em torno da lesão, decrescendo em direção ao tecido com o halo amarelo e atingindo teor mínimo no tecido necrosado. Relação espacial inversa a do potássio foi observada para o cálcio em torno da lesão. Logo, a MAX, associada à nutrição mineral, pode auxiliar no manejo e entendimento das reações de defesa contra a doença.

Palavras-chave: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Escala diagramática. Inóculo inicial. Nutrição mineral.

ABSTRACT

Data and base research and technology to perform studies for the control and management of the coffee halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) (PSG) are scarce. Thus, the objectives were: 1) develop and validate a diagrammatic scale to quantify the severity of the halo blight in coffee leaves; 2) verify if coffee seeds may disseminate PSG inoculum considering plants with halo blight symptoms; 3) verify differences in the distribution of the nutrients in coffee leaf tissues (*Coffea arabica*) around the foliar disease lesions. Considering the first objective, a diagrammatic scale was developed and validated, to evaluate the severity of the halo blight in coffee leaves, based on the intervals of frequency distribution of the disease severity values. This scale provides better accuracy, precision and reproducibility levels for the evaluations. Seeking to identify the source of the initial inoculum of the disease in nurseries, seeds derived from plants showing halo blight symptoms were immersed in sterile saline solution and coffee seedling leaves were inoculated with crude extract. There were halo blight symptoms on the coffee plant leaves inoculated with said extract, similar to those developed by leaves inoculated with inoculum suspension of the standard isolate of PSG reference; while the seedlings inoculated with the extract of seeds derived from asymptomatic plants did not show symptoms. Bacterial isolates derived from these coffee seeds presented biochemical and molecular patterns equal to those of the standard PSG isolate. Thus, coffee seeds may disseminate the PSG inoculum based on plants with halo blight symptoms. To know the distribution of mineral nutrients on tissues

surrounding the coffee foliar disease lesion, leaf fragments were submitted to X ray microanalyses (XMA). The potassium and calcium mineral nutrients presented distribution gradient and spatial relation with the asymptomatic and halo blight symptomatic tissues. Higher potassium content was found in the asymptomatic tissue surrounding the lesion, decreasing towards the tissue with yellow halo and reaching the minimum content in the necrotic tissue. An inversed spatial relation to that of potassium was observed for calcium around the lesion. Thus, the XMA, associated to mineral nutrition, may aid in the management and in understanding the defense reactions against the disease.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Diagrammatic scale. Initial inoculum. Mineral nutrition.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Importância da cultura.....	16
2.2 Doenças do cafeeiro	16
2.3 A mancha aureolada do cafeeiro	17
2.3.1 Histórico	17
2.3.2 Etiologia.....	18
2.3.3 Sintomatologia.....	21
2.3.4 Epidemiologia.....	23
2.3.5 Manejo da mancha aureolada	25
2.3.6 Mancha aureolada X Outras doenças.....	27
2.3.7 Avaliação da intensidade da doença	28
2.4 Microanálise de raios X aplicada ao estudo de doenças de plantas	29
2.5 Transmissão de fitobacterias por sementes	33
3 REFERÊNCIAS	36
SEGUNDA PARTE	48
ARTIGO 1 - Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves	48
ARTIGO 2 - Potencial de disseminação de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> por sementes de cafeeiro.....	78
ARTIGO 3 - Microanálise de raios-x como ferramenta para localizar nutrientes em tecidos de folhas de cafeeiro com lesões de doenças foliares.	105

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral e referencial teórico.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, no entanto, vários fatores têm contribuído para reduzir a produtividade das lavouras cafeeiras, entre eles, as doenças de plantas. Atualmente são descritos vários agentes etiológicos, fungos, vírus, bactérias e nematoides capazes de infectar o cafeeiro e reduzir a produção. Com relação às doenças de etiologia bacterianas, quatro espécies infectam o cafeeiro e ocasionam sintomas de manchas foliares tanto em plantas no viveiro quanto em campo. São elas: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), agente etiológico da mancha aureolada, *P. cichorii*, *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*) e *P. syringae* pv. *tabaci*.

Recentemente, a mancha aureolada tem sido destaque em noticiários nas principais regiões produtoras de café, assumindo importância tanto em viveiros quanto na condução da lavoura cafeeira, em virtude da sua rápida disseminação, difícil controle e perdas associadas a sua epidemia. A disseminação da bactéria a longas distâncias ocorre, principalmente, por mudas infectadas e a curtas distâncias dentro da copa das plantas e de planta para planta, pela ação de respingos de chuva, vento, granizo e ferimentos provocados por operações culturais. A doença pode ocorrer nas folhas, rosetas e ramos. Nas folhas, os sintomas são lesões irregulares, inicialmente com aspecto encharcado, evoluindo para necrose dos tecidos. A área de tecido necrosado aumenta ao longo do tempo e, posteriormente, desenvolve halo de coloração amarela ao redor das lesões, sintoma típico da doença, que deu origem à denominação. Nos ramos pode ocorrer necrose e seca, tanto do ortotrópico, quanto dos plagiotrópicos. Esse

sintoma pode ser intensificado pela ação da colheita mecânica, capaz de ferir os ramos e abrir portas de entrada para a bactéria. Ainda, os sintomas de mancha aureolada são frequentemente confundidos com outras doenças do cafeeiro, além de fatores abióticos como desequilíbrio nutricional, dificultando o diagnóstico precoce.

A mancha aureolada, também, tem se tornado preocupante pela ausência de pesquisas de base teórica e prática, e medidas consolidadas de manejo. Embora a doença tenha sido reportada há 57 anos (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), até o momento são poucos os estudos epidemiológicos sobre essa doença. Esses estudos requerem métodos padronizados, para avaliar a severidade da doença, que devem ser simples e de rápida utilização em condições diferenciadas, bem como acurados, precisos e reprodutíveis. O uso de escalas diagramáticas tem sido um importante método para mensurar com precisão e de forma confiável a severidade de doenças de plantas.

Quanto ao manejo da mancha aureolada, ressalta-se a importância da sanidade das mudas. Em mudas nos viveiros, o contato direto das folhas do hospedeiro suscetível, associado ao excesso de umidade no ambiente, proporciona condições favoráveis para a ocorrência de epidemias da doença. No entanto, não se têm informações sobre a origem do inóculo inicial, mas em diversas espécies vegetais, o inóculo de alguns patógenos pode estar associado às sementes (ROMEIRO, 2005). Em se tratando de fitopatógenos, o inóculo inicial nas sementes pode ser transmitido e infectar as plântulas geradas com base em sementes e/ou ser transmitido para outras plantas no viveiro.

Além disso, a influência da nutrição mineral no progresso da mancha aureolada, ainda, não foi esclarecida. Entre as alternativas disponíveis para reduzir a aplicação de defensivos químicos, pode-se aprimorar o equilíbrio nutricional das plantas. Dessa forma, é favorecida a formação de barreiras de resistência, inibindo a penetração e colonização de patógenos, além de

incrementar outras barreiras de defesa, como as químicas (POZZA; POZZA, 2012; TAIZ; ZIEGER, 2013). Conhecer a distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de plantas pode auxiliar a entender os mecanismos de infecção e colonização de fitopatógenos, assim como os de defesa de plantas contra a infecção, a influência da nutrição mineral sobre o patossistema e, dessa forma, auxiliar a elaborar estratégias de manejo.

Enfim, sem conhecimento etiológico, fitossanitário e epidemiológico da doença, e medidas de manejo bem definidas, produtores, ainda, estão apoiados somente em suas próprias experiências e sendo obrigados a renovar precocemente o cafezal em regiões de alta suscetibilidade, acentuando, assim, os riscos já inerentes à atividade em decorrência da doença. Visando atender a essa demanda, pretende-se caracterizar alguns aspectos etiológicos e epidemiológicos do patossistema mancha aureolada do cafeeiro. Os objetivos foram: desenvolver e validar uma escala diagramática para quantificar a severidade da doença; verificar se sementes de cafeeiro podem disseminar o inóculo de *P. syringae* pv. *garcae*; e verificar a existência de diferenças na distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de folhas de cafeeiro em torno de lesões de doenças foliares (mancha aureolada, mancha-de-phoma e ferrugem).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura

É indiscutível a importância sócio-econômica da cafeicultura brasileira no mercado internacional. O país ocupa a posição de maior produtor de café, quando na safra 2012/13 produziu 37% da produção mundial (*Coffea spp*) e 45% da produção de café arábica (*Coffea arabica* L.) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, USDA, 2013).

O cultivo do cafeeiro estende-se, principalmente, na região Sudeste, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.238.270 mil hectares, predominando a espécie arábica com 98,87% no estado. A área total estadual representa 54,25% da área cultivada com café no país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012).

2.2 Doenças do cafeeiro

Vários fatores contribuem para reduzir a produtividade da lavoura cafeeira e entre esses as doenças ocupam lugar de destaque. A ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke), a mancha de phoma (*Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen,) são as principais doenças fúngicas em cafezais brasileiros (ACUÑA et al., 1998; CARVALHO; CHALFOUN, 1998), além daquelas de etiologia bacteriana e virótica (POZZA et al., 2010).

Com relação às doenças bacterianas, quatro espécies (incluindo dois patovares) de bactérias fitopatogênicas estão descritas na cultura, ocasionam sintomas de manchas foliares em viveiro e/ou campo. São elas: *Pseudomonas*

cichorii, agente etiológico do “crestamento bacteriano do cafeeiro”, detectada ocorrendo em viveiros e no campo no estado de Minas Gerais (ROBBS et al., 1974) e em viveiro, no estado de São Paulo (ALMEIDA; RODRIGUES; PATRÍCIO, 2012); *Burkholderia andropogonis* (sin. *P. andropogonis*), agente etiológico da “mancha escura bacteriana” (RODRIGUES NETO et al., 1981), constatada em viveiro de mudas no estado de Santa Catarina e *P. syringae* pv. *tabaci* agente etiológico da “mancha bacteriana” (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010), detectada em viveiro, no estado de São Paulo e *P. syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956) o agente etiológico da mancha aureolada, uma das principais doenças bacterianas do cafeeiro, e sobre as quais poucas pesquisas foram realizadas (RODRIGUES et al., 2013).

2.3 A mancha aureolada do cafeeiro

2.3.1 Histórico

A mancha aureolada do cafeeiro foi detectada pela primeira vez no fim de 1955, em cafezal localizado no município de Garça, estado de São Paulo, incidindo em folhas, ramos e frutos (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Posteriormente foi relatada sua ocorrência nos estados de Minas Gerais (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976) e Paraná (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976; MOHAN, 1976), principalmente, em regiões com temperaturas mais frias ou amenas. Além do Brasil, há relatos de sua ocorrência no Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997), Uganda e China (CHEN, 2002).

Após sua constatação, a doença foi considerada de menor importância econômica (COSTA; SILVA, 1960) e, por aproximadamente 17 anos após seu

aparecimento, apenas casos isolados da moléstia foram identificados (MOHAN, 1976). Na região do Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais, os primeiros relatos são da década de 1980 no município de São Gotardo, em épocas chuvosas, provocando intensa seca de ramos (VALE; ZAMBOLIM, 1997).

No entanto, nos últimos anos, a mancha aureolada tornou-se fator limitante para o cultivo do café em regiões mais frias e expostas ao vento, em lavouras em formação ou recém-podadas, e em viveiros, principalmente nas regiões produtoras dos estados do Paraná, São Paulo e em Minas Gerais, especialmente no Sul, Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba (MOHAN, 1976; SERA; ALTEIA; PETEK, 2002; SERA et al., 2004; PATRÍCIO et al., 2010; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011) realizaram levantamento sobre a ocorrência da mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Os referidos autores verificaram ocorrência da doença predominantemente em áreas montanhosas, de altitude acima de 1000 m, onde existem culturas estabelecidas sobre platôs ou terrenos com declividade acentuada, exposta a ventos fortes e/ou constantes e, também, às geadas esporádicas no inverno.

2.3.2 Etiologia

A mancha aureolada tem como agente etiológico a bactéria *P. syringae* pv. *garcae*. É uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, apresenta células em formato de bastonete (Figura 1A e 1B), movimenta-se por meio de um a vários flagelos polares (Figura 1B), com medidas que variam de 0,5-1,0 µm de diâmetro e 1,5-5,0 µm de comprimento. É pertencente ao filo Proteobactéria, classe Gamma Proteobactéria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas*, espécie *P. syringae* e patovar *P.*

syringae pv. *garcae* (MOORE et al., 2006). Verifica-se crescimento adequado desta bactéria a 28-30°C em meio de cultura King B (KING; WARD; RANEY, 1954), onde as colônias são de coloração branco/creme com bordos irregulares, produzem pouco pigmento fluorescente e nota-se uma coloração marrom ao redor do crescimento bacteriano, resultante da produção de melanina (Figura 1). Este pigmento, também, é verificado ao se cultivar a bactéria em meios de cultura como Nutriente Agar (NA) e Batata Dextrose Agar (BDA) (KAIRU, 1997; BARTA; WILLIS, 2005; MOORE et al., 2006).

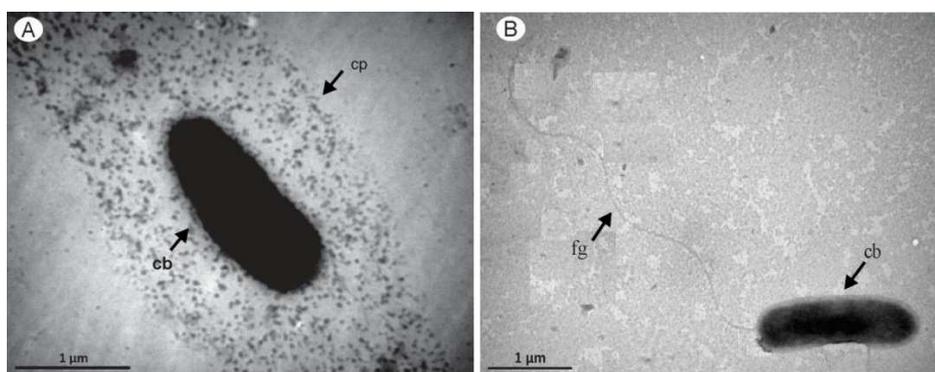


Figura 1 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*: A) Imagem de célula bacteriana (cb) em forma de bastonete em que se visualiza a cápsula (cp); B) Imagem de célula bacteriana em que se visualiza um flagelo (fg). Crédito de imagem: Leônidas Leoni Belan (2014)

Os isolados brasileiros produzem em meio King B pouco pigmento amarelo fluorescente, sendo este pigmento produzido, principalmente, por isolados originados do Quênia, mas, sim, um pigmento marrom não fluorescente difusível neste meio, causando o escurecimento do mesmo (KAIRU, 1997; BARTA; WILLIS, 2005). A maioria dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* produzem tabtoxina (BARTA; WILLIS, 2005). Embora esta toxina não seja essencial para a patogenicidade, pode influenciar no grau de virulência, ao

favorecer o aumento na severidade de algumas linhagens e, também, o movimento das bactérias nos tecidos da planta (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2013).

A bactéria pertence ao grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (L= produção de levana; O= reação de oxidase; P= atividade pectinolítica em discos de batata, A= atividade de arginina dihidrolase; T= reação de hipersensibilidade em folhas de fumo) é positiva para Levana e hipersensibilidade em fumo, e negativa para Oxidase, Podridão em discos de batata e Arginina di-hidrolase. Esta bactéria hidrolisa gelatina e não acumula Poli- β - hidroxí- butirato (PHB). Utiliza ramnose, trealose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, celobiose, sacarose, inositol, D-quinato, manitol, L- ascorbato, *meso*-inositol, D-xylose e triacetina, e não utiliza adonitol, trigonelina, lactose, L(+) tartarato, D(-)-tartarato, DL-lactato, DL-homoserina, α -lecitina, linolenato, L-malato, L-histidina (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; BARTA; WILLIS, 2005).

Diversas espécies do gênero *Coffea* são hospedeiras naturais desta bactéria (LELLIOTT; BILLING; HAYWARD, 1966). *Phaseolus vulgaris*, *Ligustrum lucidum*, *Solanum lycopersicum*, *Olea europea*, *Citrus* sp., *Solanum tuberosum*, *Solanum paniculatum* var. *acutilobum*, (BRADBURY, 1986) e *Avena sativa* (BARTA; WILLIS, 2005) são, também, hospedeiras por meio da inoculação artificial.

Em contato com a planta e juntamente com a presença de água livre, as células bacterianas penetram na planta por aberturas naturais e/ou por ferimentos, causados por ocasião dos tratamentos culturais, pela fricção entre folhas, pela abrasão de grãos de areia levados pelo vento ou, ainda, pela própria ação do vento, provocando microfissuras (COSTA et al., 1957; KIMURA; ROBBS; RIBEIRO, 1973; KIMATI et al., 2005).

O patógeno sobrevive, principalmente, na face inferior das folhas do cafeeiro como epífita, ou seja, na superfície das folhas sem causar doença, bem como em restos de cultura, presentes no solo, até que ocorram condições ideais para que as células bacterianas sobreviventes se constituam no inóculo primário para novas infecções (ROBBS, 1978; ZOCOLLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

2.3.3 Sintomatologia

A doença incide sobre folhas, rosetas, frutos novos e ramos do cafeeiro, atingindo mudas em viveiros e plantas mais novas no campo (COSTA; SILVA, 1960; GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; RODRIGUES et al., 2013). Folhas jovens são mais suscetíveis a *P. syringae* pv. *garcae*, enquanto as folhas velhas apresentam maior resistência à infecção (OLIVEIRA, 1988; OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990; 1991). De acordo com OLIVEIRA; ROMEIRO (1990; 1991), a severidade da doença é influenciada pela idade fisiológica das plantas, em que a estrutura mais tenra das folhas novas favorece a penetração do patógeno, além da presença de compostos de defesa em folhas velhas condicionar maior resistência à infecção. Assim, a mancha aureolada incide com maior severidade em folhas e brotações novas do cafeeiro do que em folhas adultas.

Os sintomas observados nas folhas são pequenas lesões irregulares, inicialmente com aparência de anasarcas, de coloração marrom-escura, que aumentam em tamanho e, posteriormente, desenvolvem halos amarelados ao redor das lesões, sintoma típico da doença, que deu origem à denominação. A manifestação dos sintomas em forma de halo amarelo está relacionada às toxinas produzidas pelas bactérias durante o processo de infecção e colonização do

tecido vegetal (GNANAMAICKAM; STARRATT; WARD, 1982; DURBIN, 1991).

As lesões podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e ocasionar deformação ou rompimento do limbo foliar (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; RODRIGUES et al., 2013). Com o desenvolvimento das lesões, a bactéria pode ser disseminada para própria planta e para plantas adjacentes, podendo colonizar, também, tecidos do caule e do ápice das mesmas, ocasionando necrose das folhas novas e morte do ponteiro. Em folhas novas, o halo amarelo nas lesões pode não ser notado, mas é possível perceber uma transparência desta região observando as folhas atacadas contra a luz (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). As lesões são mais frequentes nas bordas das folhas, onde a bactéria pode penetrar mais facilmente via ferimentos causados por danos mecânicos ou aberturas naturais (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; RODRIGUES et al., 2013).

A bactéria, também, pode infectar e colonizar tecidos do caule, provocando necrose das folhas novas, morte de ramos plagiotrópicos e/ou do terço superior da planta (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Nos ramos plagiotrópicos, os sintomas se manifestam, geralmente, da ponta para a base (ITO et al., 2008). Ao colonizar as hastes do cafeeiro, a bactéria interfere no “pegamento” das flores, o que limita a produção das plantas no ano seguinte. Na tentativa de se recuperar, as plantas emitem novos ramos originando sintomas de superbrotamento (RODRIGUES et al., 2013). O período chuvoso está associado com o período de expansão do fruto do café e emissão de brotações pelo cafeeiro, coincidindo com a favorabilidade à infecção ocorrendo nesta fase (COSTA; SILVA, 1960).

2.3.4 Epidemiologia

As condições climáticas e ambientais favoráveis à doença, ainda, são discutidas (SERA et al., 2004). De forma geral, sob condições de temperaturas amenas, alta pluviosidade ou em campos situados em altitudes elevadas, expostas a incidência direta e constante de vento, a ocorrência da doença é favorecida podendo ocasionar perdas na produção; sendo, nestas condições, considerada uma das principais doenças dos cafezais (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997, 2005; SERA, 2001; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; CARVALHO; CHALFOUN, 1998).

Cardoso e Mohan (1980) relataram que, no estado do Paraná, a maior intensidade da doença ocorreu quando a temperatura variou de 13,1 a 20,5 °C, umidade relativa de 57 a 73% e precipitação de 111,3 mm mensais. Entretanto, estudos realizados por Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011) na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba demonstraram, com análise comparativa dos dados climatológicos, incluindo temperaturas mensais e anuais (médias gerais, médias das máximas e das mínimas, extremas das máximas e mínimas), umidades relativas (médias, máximas e mínimas) e de precipitações pluviais (médias anuais e mensais, total máxima em 24 horas e dias de chuva mensais), que estes dados são insuficientes para definir as variáveis climatológicos que diferenciam as regiões favoráveis e desfavoráveis para a ocorrência, persistência e severidade da mancha aureolada. Os referidos autores evidenciaram que a definição destes parâmetros é fundamental para determinar estratégias adequadas de manejo integrado. Serão necessários dados climatológicos mais refinados tais como a faixa de temperatura em que as folhas são mais suscetíveis, o tempo de duração do molhamento foliar para haver a infecção, assim como a velocidade e a duração do vento.

A disseminação da bactéria ocorre a longas distâncias por mudas infectadas e a curtas distâncias dentro da copa das plantas e de planta para planta, pela ação de respingos de chuva, vento e ferimentos provocados por esses (CARVALHO; CHALFOUN, 1998). Sua disseminação é favorecida pela ocorrência de chuvas de granizo que, além do molhamento foliar, causam ferimentos que funcionam como portas de entrada para a bactéria. Do mesmo modo, as faces das plantas não expostas ao sol permanecem, durante períodos mais longos com as folhas molhadas, favorecendo o processo de infecção (RODRIGUES et al., 2013). Segundo os mesmos autores, a incidência da mancha aureolada tende a diminuir nos cafezais em períodos com menor ocorrência de chuvas, em virtude da diminuição de condições favoráveis para a dispersão, penetração e colonização da bactéria, porém são necessários estudos conclusivos sobre o assunto.

Em mudas cultivadas em viveiros, o adensamento e, conseqüentemente, o excesso de umidade nas folhas proporcionam ambiente ideal para o desenvolvimento do patógeno. Em condições de campo, a doença incide, principalmente, em lavouras em formação, com 3-4 anos de idade e, em cafezais reformados com podas e/ou sujeitos a ventos constantes e frios, especialmente, após longos períodos de umidade elevada (RODRIGUES et al., 2013).

Além disso, são raras as informações sobre as condições de ambiente ideais para a inoculação artificial da bactéria em estudos laboratoriais e de casa-de-vegetação (BELAN et al., 2013). Belan et al. (2013) verificaram que maiores valores de área abaixo da curva do progresso da incidência da mancha aureolada (AACPI) e área foliar lesionada (AFL) foram obtidas com inoculação artificial da bactéria via ferimento com conjunto multiagulhas. Além disso, não foi observada influência do período de câmara úmida após a inoculação (CAM) na presença de luz, na AACPI. No entanto, quanto maior a duração do período de CAM no escuro, menor foi a AACPI.

2.3.5 Manejo da mancha aureolada

Segundo Godoy, Bergamin Filho e Salgado (1997), a instalação de quebra-ventos na fase de formação do cafezal é uma prática eficiente para retardar a ocorrência da doença, interferindo na velocidade em que o vento atinge as plantas, uma das principais formas de disseminação do patógeno.

A disseminação a longas distâncias do patógeno pode ocorrer, por meio de mudas infectadas e/ou assintomáticas, provenientes de viveiros com histórico de ocorrência da doença nas mudas (ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Logo, é recomendado o plantio de mudas oriundas de viveiros reconhecidamente isentos da bactéria, a fim de se evitar a contaminação da área (RODRIGUES et al., 2013). Para evitar a ocorrência da doença nos viveiros de mudas, esses devem ser instalados em locais livres de ventos frios ou com barreiras laterais, além do manejo da irrigação e equilíbrio nutricional das mudas (RODRIGUES et al., 2013). Rodrigues et al. (2013) destacaram a importância do equilíbrio nutricional das plantas, principalmente, no estágio de desenvolvimento inicial, favorecendo o vigor do hospedeiro.

Em relação ao manejo genético na mancha aureolada, Moraes et al. (1974) identificaram que o fator genético Sh1, em *C. arabica*, observado nos cafés Harar, Dilla e Alghe, S12 Kaffa e Geisha, originados da Etiópia, confere resistência específica a determinadas raças de *Hemileia vastatrix* e, também, à bactéria *P. syringae* pv. *garcae*. Mohan, Cardoso e Paiva (1978) verificaram imunidade na variedade Geisha. No entanto, Mohan, Cardoso e Paiva (1978), Cardoso e Sera (1983) e Petek et al. (2001) concluíram que existem outros fatores além do gene Sh1 (MORAES et al., 1974), que, também, conferem resistência à mancha aureolada. Nos estudos realizados por Ito et al. (2008), no estado do Paraná, em avaliações de infecção natural de *P. syringae* pv. *garcae*

em campo, foi verificado que a cultivar IPR 102 apresenta resistência completa ao patógeno; no entanto, as cultivares Mundo Novo, Catuaí e Bourbon são consideradas suscetíveis (MORAES et al., 1974; MOHAN; CARDOSO; PAIVA, 1978; CARDOSO; SERA, 1984).

O manejo químico da mancha aureolada tem se mostrado complexo (RODRIGUES et al., 2013). A falta de informações sobre a dinâmica ou progresso espaço temporal desta doença, o restrito número de produtos específicos registrados (AGROFIT, 2014) e o desenvolvimento de resistência do patógeno a antibióticos dificultam o manejo químico da doença (JESUS JUNIOR et al., 2002). Compostos cúpricos vêm sendo utilizados no controle de doenças bacterianas em razão de sua relativa eficácia, de baixo custo e baixo efeito tóxico em mamíferos, o que os torna econômica e ecologicamente adequados (CHA; COOKSEY, 1991), porém sua eficiência é variável. Patrício et al. (2008) verificaram que cloridrato de kazugamicina (300mL/100L de água) e oxiclreto de cobre reduziram a incidência de mancha aureolada, e acibenzolar-s-methyl (BTH), indutor de resistência, resultou em proteção nas doses de 20 e 40 g, porém o primeiro não é recomendado para a pulverização no campo. Sendo assim, no campo o produtor conta com somente um princípio ativo, o grupo dos cúpricos.

Diante dessa situação, sem medidas de manejo bem definidas, produtores, ainda, estão apoiados somente em suas próprias experiências, e sendo obrigados a renovar precocemente o cafezal em razão das perdas irrecuperáveis, acentuando, assim, os riscos já inerentes à atividade em decorrência da doença (ZOCCOLI; RIBEIRO; UESUGI, 2011).

2.3.6 Mancha aureolada X Outras doenças

A ocorrência da mancha aureolada nas lavouras cafeeiras tem sido, frequentemente, negligenciada em muitas situações em decorrência do confundimento com outras doenças bióticas ou fatores abióticos. Sintomas semelhantes ao da bacteriose como manchas necróticas nas folhas circundadas ou não por halo amarelado, também, podem ser causados por outros patógenos do cafeeiro, tais como os fungos *C. coffeicola* e *P. tarda*, agentes etiológicos da cercosporiose e mancha de phoma, respectivamente. Outros sintomas decorrentes da infecção por *P. syringae* pv. *garcae*, como “seca de ponteiro”, morte de ramos plagiotrópicos, desfolha etc, podem, também, gerar confusão no diagnóstico, uma vez que *P. tarda* ou ainda distúrbios nutricionais ou climáticos podem causar sintomas semelhantes e em condições de campo pode haver ocorrência simultânea com a bactéria (RODRIGUES et al., 2013).

Os sintomas da mancha aureolada, também, podem ser confundidos com os causados por *P. cichorii*, agente do crestamento bacteriano do cafeeiro, bem como de outras bacterioses relatadas para a cultura (Tabela 1). Em consequência da semelhança de sintomatologia com outros patógenos, o diagnóstico correto da doença é muito importante. Portanto, uma melhor caracterização do agente etiológico será fundamental para uma diagnose mais precisa em cafeeiro (PATRÍCIO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2013).

Tabela 1. Diferenças entre sintomas de manchas foliares em cafeeiros causadas por patógenos bacterianos.

Bactéria	Nome comum da doença	Sintomas	Autores
<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	Mancha aureolada	Lesões pardo-escuras com bordos amarelados, de contorno irregular e tamanho variável; evoluem tornando-se necrosadas e quebradiças. Também nos bordos das folhas.	Amaral, Teixeira e Pinheiro (1956)
<i>P. cichorii</i>	Crestamento bacteriano do cafeeiro	Limbo foliar com lesões de coloração enegrecida, com dimensões variadas, que evoluem rapidamente causando desfolha das plantas.	Robbs et al. (1974)
<i>Burkholderia andropogonis</i>	Mancha escura bacteriana	Sintomatologia semelhante àquelas causadas por <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> e <i>P. cichorii</i> .	Rodrigues Neto et al. (1981)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Mancha bacteriana	Manchas necróticas, que variam de 0,2 a 1-2 cm, mais frequentes nos bordos foliares, e extenso halo amarelado.	Rodrigues Neto et al. (2006)

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al. (2013)

2.3.7 Avaliação da intensidade da doença

Embora a mancha aureolada do cafeeiro tenha sido reportada mundialmente pela primeira vez no estado de São Paulo há 57 anos (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956) e possa induzir danos à cultura, até o momento são poucos os estudos epidemiológicos sobre essa doença. Esses estudos requerem métodos padronizados, para avaliar a severidade da doença, que devem ser simples e de rápida utilização em condições diferenciadas, bem como acurados, precisos e reprodutíveis (BERGER, 1980).

Algumas escalas descritivas foram desenvolvidas e utilizadas, para avaliar a severidade da mancha aureolada, entre elas as de Costa e Silva (1960); Mohan, Cardoso e Paiva (1978); Ito et al. (2008); Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011), sendo estas aplicadas tanto para avaliar a intensidade da doença em

mudas quanto em campo, porém levaram em consideração a quantidade de lesões e/ou o percentual de folhas com lesões e não a quantidade da área foliar lesionada (AFL); e além disso não foram validadas. Jesus Junior et al. (2002) e Patrício et al. (2008) evidenciaram essa dificuldade, ou seja, a falta de escalas com área foliar lesionada, quando testaram defensivos agrícolas e produtos visando ao manejo da doença. Como não há escala diagramática para quantificar a severidade, esses autores avaliaram a eficiência dos tratamentos utilizando a escala descritiva proposta por Horsfall e Barrat (1945) e contaram o número de lesões por muda, respectivamente. Sendo assim, Patrício et al. (2008) ressaltaram que uma escala de severidade desenvolvida e validada para estimar a porcentagem de área foliar afetada (severidade) deve ser usada em estudos posteriores.

Na elaboração de escalas diagramáticas devem ser considerados importantes aspectos como: o limite superior da escala deve corresponder à intensidade máxima de doença observada; a determinação da intensidade real de doença e sua representação na escala devem ter alta precisão; as subdivisões da escala devem respeitar as limitações da acuidade visual humana definidas pela lei de estímulo-resposta de Weber-Fechner, na qual a acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (HORSFALL; COWLING, 1978). Além disso, para verificação da qualidade das estimativas propiciadas pela escala diagramática, os níveis de acurácia, precisão e reprodutibilidade devem ser analisados (CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ et al., 1988; NUTTER; SCHULTZ, 1995).

2.4 Microanálise de raios X aplicada ao estudo de doenças de plantas

A microscopia eletrônica é amplamente utilizada como instrumento de pesquisa, permitindo contribuições para o progresso nas diversas áreas da

ciência (ECHLIN, 2001). Todavia, o emprego dessa ferramenta na fitopatologia, comumente se restringiu à obtenção de informações a respeito da morfologia da interação. Dessa forma, subutilizam-se informações possíveis de serem inferidas acerca da composição elementar da interação em pesquisa.

A microanálise de raios X (MAX) é um dos instrumentos acessíveis em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) para a análise química de materiais de origem orgânica ou inorgânica. O princípio da técnica baseia-se na identificação dos raios-X emitidos pela amostra quando da interação com um feixe de elétrons incidido. A detecção pode ser realizada tanto pela medida da energia dos raios X, como do seu comprimento de onda, sendo denominada, respectivamente, de Espectroscopia por Energia Dispersiva – EDS e Espectroscopia por Comprimento de onda – WDS (ECHLIN, 2001; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Dessa forma, é possível determinar de maneira não destrutiva a composição elementar de materiais com até 1 µm de diâmetro (GOLDSTEIN et al., 1992; ECHLIN, 2001). As primeiras aplicações da microanálise de raios X na fitopatologia datam da década de 80 (BLANCHETTE, 1984).

Dentre as particularidades dessa técnica, existe a possibilidade de se obter um mapa composicional da região em observação, permitindo a correlação da composição elementar da amostra, com distribuição espacial nos tecidos vegetais. A relevância da MAX para a fitopatologia consiste na possibilidade de se correlacionar a morfologia detalhada de tecidos, estruturas ou órgãos de plantas, afetados ou não por fitopatógenos, observada por meio do MEV, com a composição amostral. Além disso, a microanálise possibilita a avaliação de quase todos os elementos de interesse fisiológico, celular e subcelular (FREY, 2007). Dessa forma, é possível compreender a influência dos elementos minerais na ocorrência e progresso das doenças de plantas, contribuindo para esclarecer mecanismos da interação planta-patógeno.

A importância do equilíbrio nutricional das plantas, bem como o conhecimento da essencialidade e funcionalidade de cada elemento, é primordial para assegurar alta produtividade das culturas agrícolas (FAQUIN, 1994), além de garantir o equilíbrio fisiológico e fitossanitário (POZZA; POZZA, 2012; MARSCHNER, 2012; TAIZ; ZIEGER, 2013). Considerando que o desequilíbrio nutricional pode ocasionar distúrbios fisiológicos irreversíveis às plantas e que fitopatógenos requerem certas quantidades de elementos minerais para estabelecer relações parasitárias, conhecer a influência de cada elemento na interação planta-patógeno pode contribuir para o direcionamento de táticas de manejo de doenças. Assim, uma das pesquisas pioneiras demonstrando a influência de um elemento mineral na interação planta-patógeno com o uso da MAX foi conduzida pelo professor Blanchette da Universidade de Minnessota (EUA) (BLANCHETTE, 1984). Blanchette (1984) relatou que manchas que contrastavam com regiões brancas em fragmentos de madeira, degradados por fungos causadores de podridão branca, eram áreas com acúmulo de manganês. Além disso, os autores verificaram que havia relação espacial com deslignificação seletiva da madeira, sugerindo que o manganês pode regular o mecanismo de ataque dos patógenos à parede celular vegetal. De forma análoga, Leite e Andersen (2009) utilizaram a MAX para estudar as diferenças químicas entre tecido de folhas de videira assintomáticas e aqueles com sintomas foliares típicos da doença de Pierce (*Xylella fastidiosa*) e observaram acúmulo de silício (Si) como resposta de defesa das plantas.

Até então, a técnica havia sido utilizada em estudos com a cultura do cafeeiro apenas para descrever a distribuição do Si nas folhas de plantas cultivadas em solo com adição desse elemento (POZZA et al., 2004). Os autores realizaram análise dos elementos presentes nas amostras e mapeamento de Si na área analisada, verificando distribuição uniforme de Si em toda a superfície abaxial das folhas de cafeeiro, contribuindo para redução na intensidade da

cercosporiose (*C. coffeicola*), no entanto não analisaram a localização desse elemento em relação aos tecidos infectados. Já em folhas de Videira, Bowen, Menzies e Ehret (1992) observaram a concentração de Si ao redor da área infectada por *Uncinula necator*.

Da mesma forma, Sugimoto et al. (2009; 2010) estudaram os respectivos efeitos da aplicação de nitrato de potássio e fontes de cálcio na redução da podridão radicular em soja (*Phytophthora sojae* (Kauffm. & Gerd.)). Utilizando a análise morfológica em MEV, combinada ao mapeamento dos elementos presentes em cortes transversais do caule da planta, os autores demonstraram acúmulo de potássio e cristais de cálcio na região da medula, no xilema, floema e córtex, formando um sítio de inibição à penetração do patógeno.

A MAX, também, tem sido aplicada para estudar os mecanismos de ataque dos patógenos às plantas, bem como as respostas de defesa das plantas contra a infecção. Tendo em vista que o ácido oxálico possui importante papel como fator de patogenicidade para alguns fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* (WILLIAMS et al., 2011), Rio et al. (2008) demonstraram que o agente etiológico da vassoura de bruxa em cacaueteiro *Moniliophthora perniciosa*, produz cristais de oxalato de cálcio o qual foi observado em MEV e, então, comprovado na MAX. Em analogia, Guggiari et al. (2011) estudaram a capacidade de produção de oxalato de cálcio em meio de cultura, por parte de 26 espécies de fungos causadores de podridão branca em madeira. Os autores demonstraram, utilizando a MAX, que a maioria das espécies formaram cristais de oxalato de cálcio na fase de crescimento micelial em meio de cultura malte agar, na ausência de fonte adicional de cálcio. Por outro lado, Novo et al. (2007) aplicaram a técnica para estudar a diferença quanto à produção da fitoalexina enxofre elementar (S⁰) por plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) resistentes e suscetíveis à murcha de *Verticillium* (*Verticillium dahliae* Kleb). Os autores demonstraram acúmulo de enxofre elementar em plantas de cultivares

resistentes e ausência em plantas suscetíveis. Além disso, verificaram que o enxofre elementar não é acumulado de forma localizada em tecidos infectados, mas, sim, de forma generalizada e bem distribuída ao longo do tecido vascular.

2.5 Transmissão de fitobactérias por sementes

Sementes constituem um meio favorável para sobrevivência e disseminação de fitobactérias, podendo essas permanecer viáveis em associação por períodos de tempo indeterminado (SCHUSTER; SAYRE, 1967, SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; SILVA et al., 2002; CORRÊA; CARVALHO; CARMO, 2008, ROMEIRO, 2005). Dessa forma, podem ser disseminadas de forma eficiente, a longas distâncias, introduzidas em áreas onde a enfermidade não existe e atuar como fonte de inóculo inicial para epidemias (NEERGAARD, 1979; ROMEIRO, 2005, MACIEL et al., 2010).

Bactérias fitopatogênicas, em geral, podem estar associadas às sementes de diferentes formas, aderidas aos tricomas, ao tegumento ou embrião e ou sob o tegumento e serem eficientemente transmitidas (PARASHAR; LEBEN, 1972; GOTO, 1992; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; SILVA et al., 2002; ROMEIRO, 2005, MACIEL et al., 2010; SILVA et al., 2013). Em geral, não se conhece a localização do inóculo em relação à semente, ou seja, se a fitobactéria estava infectando ou infestando a semente, ou mesmo, das duas formas concomitantemente (ROMEIRO, 2005). Esse autor recomenda, nesse caso, referir-se ao lote de sementes ao qual a bactéria encontra-se, de alguma forma, associada. No entanto, mesmo quando o inóculo bacteriano é encontrado apenas infestando as sementes, esse pode ser um fator importante para disseminação. Guthrie (1970) demonstrou, experimentalmente, que a contaminação externa de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) com inóculo de *P. syringae* pv. *phaseolicola* proporcionou epidemia da doença. Para a associação entre *X.*

vesicatoria e sementes de tomateiro existem relatos do transporte superficial, aderida ao tegumento e tricomas, o que nem sempre implica em danos à qualidade fisiológica das sementes e/ou resulta em plantas infectadas (SILVA et al., 2002; TEBALDI; PANIZZI; SADER, 2007, CORRÊA; CARVALHO; CARMO, 2008). O fato que um lote de sementes contenha inóculo bacteriano não garante que essas sementes, quando plantadas, originarão plantas infectadas (ROMEIRO, 2005). Fatores ambientais (temperatura, umidade), tempo de armazenamento, quantidade de inóculo, capacidade de sobrevivência da espécie bacteriana, bem como fatores relacionados à germinação das sementes podem determinar o sucesso ou não da infecção das plantas e ocorrência da doença (SAETTLER; SCHAAD; ROTH, 1989, ROMEIRO, 2005).

Da mesma forma, sementes mesmo que assintomáticas podem veicular o patógeno e serem efetivas na transmissão de bacterioses de plantas (ROMEIRO, 2005). Parashar e Leben (1972) utilizaram sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) aparentemente saudáveis, mas que haviam sido colhidas em lavouras onde o patógeno *P. syringae* pv. *glycinea* estava presente e verificaram que o patógeno se manifestava nas plantas geradas, quando era exposto às condições ideais de infecção. Nesses casos, condições favoráveis para que o patógeno se manifeste podem ser utilizadas como estratégia de detecção em lotes de sementes (ROMEIRO; MOURA; MONTEIRO, 1998; ROMEIRO, 2005; PARASHAR; LEBEN, 1972).

São descritos, na literatura específica, diversos métodos utilizados para a detecção de bactérias em sementes (MARINGONI; CAMARA, 2006; TEBALDI; PANIZZI; SADER, 2007; BRASIL, 2009). Dentre esses podemos citar: 1) plantio de sementes em substrato esterilizado; 2) inocular plantas suscetíveis com extrato obtido pela imersão de sementes em água, solução salina ou tampão (extrato bruto), seguida da observação dos sintomas desenvolvidos; e 3) plaquear sementes ou o extrato bruto em meios seletivos ou semisseletivos,

bem como foram descritos alguns métodos específicos para cada espécie (BRASIL, 2009). Por exemplo, para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, existem poucos métodos descritos na literatura e os mais adotados são: exame visual, isolamento direto, testes de aglutinação e imunofluorescência, avaliação da patogenicidade em plantas hospedeiras (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002), plaqueamento de sementes em meio seletivo (BEHLAU; LEITE, 2003) e inoculação de plantas de feijoeiro com o líquido de maceração de sementes (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PATHOLOGY ORGANIZATION, EMPTO, 1994).

Avanços na biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos para a detecção de patógenos em sementes. Alguns pesquisadores têm utilizado a técnica de amplificação enzimática, direcionada por primers de DNA ou reação da polimerase em cadeia (PCR), para a detecção e diagnóstico de algumas fitobactéria (DEUNER et al., 2012; SILVA et al., 2013).

SUBMISSÃO PARA PERIÓDICO

Parte desse referencial teórico foi aceito para ser publicado no volume 22 (2014) do periódico “Revisão anual de Patologia de Plantas”.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, R. S. et al. Estudo epidemiológico da ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) utilizando a análise de trilha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 425-430, 1998.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRÍCIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 38, 2012. (Suplement).
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striaefaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.
- BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Estabelecimento de metodologia para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 301, 2003.
- BELAN, L. L. et al. Influência da luz e período de molhamento foliar em diferentes métodos de inoculação artificial de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA: CBFito Sustentável, 46., 2013, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: SBF, 2013. p. 255-255.
- BERGER, R. D. Measuring disease intensity. In: TENG, P.S.; KRUPA, S.V. (Ed.). **Crop loss assessment**. St. Paul: University Minnesota, 1980. p. 28-31.

BLANCHETTE, R. A. Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 6, p. 725-730, 1984.

BOWEN, P.; MENZIES, J.; EHRET, D. Soluble silicon spray inhibit powdery mildew development on grape leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, v. 117, p. 906-912, 1992.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986. 332 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 200 p.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.

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

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

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, p. 27-35, 1998.

CHA, J. S.; COOKSEY, D. A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 88, p. 8915–8919, 1991.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. Doctoral Dissertation (PhD Thesis) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2012**. Disponível em: <<http://conab.gov.br>> Acesso em: 1 mar. 2014.

CORRÊA, F. M.; CARVALHO, A. O.; CARMO, M. G. F. Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, p. 71-75, 2008.

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

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

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

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

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

DURBIN, R. D. Bacterial phytotoxins: mechanisms of action. **Experientia**, v. 47, n. 8, p. 776-783, 1991.

ECHLIN, P. Biological X-ray microanalysis: the past, present practices, and future prospects. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 7, p. 211-219, 2001.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PATHOLOGY ORGANIZATION. **Phytosanitary procedure: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens***, Paris, 1994. p. 329-331. (Bulletin 24).

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1994.

FREY, B. Botanical X-ray microanalysis in cryoscanning electron microscopy. In: KUO, J. (Ed.). **Electron microscopy: methods and protocols**. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana, 2007. p. 529-541. (Methods in Molecular Biology, 369).

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

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184-200, 2 v.

GOLDSTEIN, J. I. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. New York: Plenum, 1992.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 1992. 341 p.

GUGGIARI, M. et al. Experimental calcium-oxalate crystal production and dissolution by selected wood-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 6, p. 803-809, 2011.

GUTHRIE, J. W. Factors influencing halo blight transmission from externally contaminated *Phaseolus vulgaris* seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 2, p. 371-372, 1970.

HORSFALL, J. C.; BARRAT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, p. 665, 1945.

HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. Pathometry: the measurement of plant disease. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Ed.). **Plant disease: an advanced treatise – how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. v. 2, p. 119-136.

HWANG, M. S. H. et al. Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. **African Journal of Agricultural Research**, 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.

JESUS JUNIOR, W. C. J. et al. Controle químico da mancha aureolada do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 61, 2002. (Suplemento).

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

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

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

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

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 44, n. 1, p. 301-307, 1954.

KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: RUDOLDH, K. et al. *Pseudomonas syringae and related pathogens*. Netherlands: Springer, 1997. p. 538-541.

KRANZ, J. Measuring plant disease. In: Kranz, J.; Rotem, J. (Ed.) **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1988. p. 35-50.

LEITE, B.; ANDERSEN, P. C. Localized accumulation of silicon (Si) in grape leaves affected by Pierce’s disease. **Microscopy Microanalysis**, v. 15, 2009. (Supplement, 2).

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

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

MACIEL, K. W. et al. Detecção de *Pseudomonas viridiflava* em sementes importadas de couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 36, n. 1, p. 83-84, 2010.

MARINGONI, C. M.; CAMARA, R.C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture médium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 451-455, 2006.

MARSCHNER, H. **The mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 2012.

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

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

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

MORAES, S. A. et al. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2., 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1974. p. 183.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 5. ed. London: Mac Milan, 1979. 839 p.

NOVO, M. et al. Sulphur accumulation after *Verticillium dahliae* infection of two pepper cultivars differing in degree of resistance. **Plant Pathology**, v. 56, n. 6, p. 998-1004, 2007.

NUTTER Jr., F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computeraided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.

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

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

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 4, p. 355-356, 1990.

PARASHAR, R. D.; LEBEN, C. Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lot. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 1075-1077, 1972.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effect of fungicides, antibiotics, and acibenzolar-S-methyl over cercosporiosis and bacterial halo blight in coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 147, 2002. (Suplemento).

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, p. 29-39, 2008.

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

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

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 185-188, 2004.

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. (Org.). **Semiologia do cafeeiro**. 1. ed. Lavras: UFLA, 2010, v. , p. 67-106.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: MACHADO, A. K. F. M. et al. (Org.). **Avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. 1. ed. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, 2012, v. 1, p. 259-282.

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

RIO, M. C. S. et al. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 4, p. 363-370, 2008.

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

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

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

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

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

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S. MOURA, A. B.; MONTEIRO, A. J. A. A bioassay for detection and quantification of *Xanthomonas campestris* in sunflower seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v. 20, p. 94-99, 1998.

SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. St. Paul: APS, 1989.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogen bacterias**. 3rd ed. Saint Paul: APS, 2001. 373 p.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and others leguminosae. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 1064-1066, 1967.

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

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

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

SILVA, A. M. S. et al. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas*

campestris pv. *vesicatoria* e efeitos sobre as sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 587-593, 2002.

SILVA, D. A. G. et al. Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 50-58, 2013.

SILVA, F. C. et al. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 39, n. 1, p. 45-50, 2013.

SUGIMOTO, T. et al. Field application of calcium to reduce *Phytophthora* stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 812-819, 2010.

SUGIMOTO, T. et al. The effect of potassium nitrate on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybeans, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 6, p. 379-389, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719 p.

TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. de C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 3, p. 290-293, 2007.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution online**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 1997. v. 2, 1132 p.

WILLIAMS, B. et al. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. **Plos pathogens**, v. 7, n. 6, p. 1002-1007, 2011.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV/Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. Cap. 3, p. 120-122.

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

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

SEGUNDA PARTE

Artigos submetidos ou aceitos para publicação em periódicos.

ARTIGO 1 - Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves

Artigo aceito para publicação no periódico “**Journal of Phytopathology**” em 15 de abril de 2014. Preparado em concordância com as normas do periódico.

Leônidas Leoni Belan¹; Edson Ampélio Pozza¹; Marcelo Loran de Oliveira Freitas¹; Ricardo Magela de Souza¹, Waldir Cintra de Jesus Junior²; Júlia Marques Oliveira¹

¹Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, Lavras, MG, 37200-000, Brazil

²Federal University of São Carlos, Center for Natural Sciences, Buri, SP, 13290000, Brazil

Corresponding Author: Edson Ampélio Pozza, Department of Plant Pathology, Laboratory of epidemiology and plant disease management, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

E-mail: edsonpozza@gmail.com

ABSTRACT – Due to the lack of a standardized visual method for assessing bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in coffee leaves, a diagrammatic scale was developed and validated to quantify the disease. Leaves were collected in crop fields and nursery with different intensity of symptoms and the true severity was determined electronically. Based on the frequency distribution of severity values and according to the Weber-Fechner's law of visual stimulus, the minimum and maximum limits and the intermediate levels in the scale were determined. Validation was performed by ten evaluators who estimated the severity of 50 leaves with different intensity of symptoms. One evaluation was performed without diagrammatic scale and two evaluations with the scale at seven day intervals. The accuracy, precision, repeatability, and reproducibility of the estimates was evaluated. The scale had nine levels: 0 (0%), 1 (0.1 to 0.99%), 2 (1 to 2%), 3 (2.01 to 4%), 4 (4.01 to 8%), 5 (8.01 to 16%), 6 (16.01 to 25%), 7 (25.01 to 45%), and 8 (≥ 45.1 %). Using the scale, the evaluators were able to improve accuracy, precision, reproducibility, and repeatability of estimates, compared to evaluators without scale. The scale was appropriate to visual estimation of severity of bacterial blight in coffee leaves.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, pathometry, *Coffea arabica*

INTRODUCTION

Among bacterial diseases of coffee (*Coffea arabica* L.), bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al. 1956) Young, Dye & Wilkie 1978 has been causing epidemics with high rates of progress in recent years. The Brazilian coffee industry has been worrying with this disease, mainly in producing areas in the states of Parana, São Paulo and Minas Gerais, because the disease progress is very fast. In the South, Triângulo Mineiro and Alto Parnaíba regions of Minas Gerais (Mohan, 1976; Sera et al. 2004; Patrício et al. 2010; Zoccoli et al. 2011; Rodrigues et al. 2013) the disease has occurred with high intensity in nurseries, young crops, established plants, and recently pruned crops, especially in high-altitude and constant wind areas. Besides Brazil, there are reports of the disease in Kenya (Ramos and Shavdia 1976), Ethiopia (Korobko and Wondimagegne 1997), Uganda, and China (Chen 2002).

The disease was first described in Brazil in the city of Garça, state of São Paulo (Amaral et al. 1956), occurring in leaves, branches, and coffee beans. In leaves, the symptoms consist of dark-brown irregular patches surrounded by a ring, with different yellow hues, characteristic of the disease. The symptoms in leaves are the same in the nursery and the field. However, in some leaves the yellow ring may not be found in circular lesions. Instead, an area soaked with chlorosis or having different shades of green can be seen around the necrosis region (Zambolim et al. 2005; Pozza et al. 2010; Rodrigues et al. 2013).

Although bacterial blight of coffee was reported 57 years ago (Amaral et al. 1956) and can cause crop damage, there are only few

epidemiological studies on the disease. These studies require standardized methods to assess the severity of disease, which should be simple and quick to use in different conditions as well as accurate, precise, and reproducible (Berger 1980). Diagrammatic scales have been an important method to measure accurately and reliably the severity of disease (Bergamin Filho and Amorim 1996; Martins et al. 2004). Diagrammatic scales are sets of illustrations of plants or plant organs with symptoms representing a range of severity of disease (Bergamin Filho and Amorim 1996).

Some descriptive scales have been used to assess the severity of bacterial blight, such as the ones by Costa and Silva (1960), Sera et al. (2004), Ito et al. (2008), and Zoccoli et al. (2011). These scales were used to evaluate the intensity of disease in seedlings in both nursery and field; however, the amount of injuries and percentage of diseased leaves were considered instead of the amount of diseased leaf area (DLA). Moreover, scales were not validated. Jesus Junior et al. (2002) and Patrício et al. (2008) showed the difficulty of testing pesticides and products to manage the disease without scales of DLA. As there was no diagrammatic scale to quantify the severity, these authors evaluated the effectiveness of treatments using the descriptive scale proposed by Horsfall and Barratt (1945) and counted the number of lesions per seedling, respectively. Thus, Patrício et al. (2008) emphasized that a scale developed and validated to estimate the percentage of DLA (severity) should be used in future studies.

Some important aspects must be considered when elaborated a diagrammatic scale: the upper limit of the scale must correspond to the

maximum intensity of disease; the true intensity of disease and its scale representation must be accurate; and the scale subdivisions must comply with the limitations of human visual acuity defined by the Weber-Fechner stimulus-response law. According to this law, visual acuity is proportional to the logarithm of stimulus intensity (Horsfall and Barratt 1945; Horsfall and Cowling 1978). Furthermore, levels of accuracy, precision, and reproducibility must be analyzed to verify the quality of the estimates afforded by the diagrammatic scale (Campbell and Madden 1990; Kranz et al. 1988, Nutter Junior and Schultz 1995; Nutter Junior et al. 1993). Accuracy is represented by the degree of proximity of a mean estimate and reality, precision refers to repeatability or variation associated with an estimate, regardless of the mean value, and reproducibility assessments of disease indicates no change in estimates when the same sample is evaluated for disease another reviewer (Campbell and Madden 1990; Nutter et al. 1991; Nutter Junior and Schultz 1995).

Considering the lack of standardized methods to quantify diseased leaf area or severity of bacterial blight in coffee leaves, we developed and validated a diagrammatic scale to quantify disease severity.

MATERIAL AND METHODS

Developing the diagrammatic scale

To elaborate the scale, 118 leaves were collected from coffee trees with different severity levels, naturally infected by *P. syringae* pv. *garcae*

in nursery and field crops of different cultivars. Bacterial test was performed to confirm the etiology of disease, and the etiologic agent was isolated in medium 523 Kado and Heskett (1970) to confirm bacterial identity. Leaves with lesions were photographed in white background with digital camera. True disease severity (percentage of diseased leaf area) was determined with Assess[®] software (American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA). The yellow halo around the lesions was disregarded for quantification of disease severity, and the area of necrotic tissue was considered as diseased leaf area (DLA).

According to the minimum and maximum levels found, was investigated the frequency distribution of the data. The intervals of higher concentrations of leaves with the same percentage of DLA was considerate to proposal the levels of scale. The diagrammatic scale was created based on the Weber-Fechner's visual acuity law (Horsfall and Barratt 1945; Nutter Junior and Schultz 1995) and on intervals of higher frequency class. After establishing the severity intervals to be represented, and according to the shape and distribution of lesions, we used real images of leaves with bacterial blight lesions to elaboration the scale.

Validation of the diagrammatic scale

Fifty pictures of coffee leaves with symptoms of the disease were used to representing all scale levels for validation. These images were randomly inserted into individual slides for viewing in Microsoft[®] PowerPoint[®] 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)

and presented to ten evaluators with no experience in quantification of plant diseases, in three assessments.

In the first assessment the evaluators scored leaves without using the scale. After seven days, the same evaluators performed the second assessment using the scale. To assess the repeatability of estimates with the scale, seven days after the first evaluation we made a new sequence of the same leaves, and the same evaluators made a second visual estimation.

The accuracy and precision of each evaluator were determined by simple linear regression. True severity was obtained electronically as an independent variable, and severity was assessed by the evaluators as dependent variable.

The accuracy of estimates of each evaluator and group of evaluators was determined by t-test applied to the intercept of linear regression (β_0) to verify the hypothesis $H_0: \beta_0 = 0$, and to the slope of the line (β_1) to test the hypothesis $H_0: \beta_1 = 1$ at 5% probability level ($p = 0.05$). Intercept values significantly different from 0 (zero) indicates overestimation (> 0) or underestimation (< 0) of true severity at low severity levels, whereas values of slope of the line that deviate significantly from 1 indicate systematic overestimation (> 1) or underestimation (< 1) of true severity in all disease intensities (Nutter Junior and Schultz 1995).

The accuracy of estimates was determined by the coefficient of determination (R^2), the variance of absolute errors (estimated severity minus true severity), and by the estimate repeatability determined by regression analysis in the second evaluation in relation to the first

evaluation of the same sample, i.e. the same set of random leaves (Nutter Junior et al.1993).

Reproducibility of estimates was assessed by analyzing R^2 values from linear regressions between severity values of the same sampling unit, estimated by different evaluators matched in pairs (Kranz 1988; Campbell and Madden 1990; Nutter Junior and Schultz 1995).

Data were tabulated using Microsoft[®] Excel[®] 2010 software, and statistical analyzes were performed using SAS[®] v9.3 program (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Diagrammatic scale

The minimum and maximum values of bacterial blight severity found in coffee leaf samples were 0.2% and 45.1%, respectively. However, 90% of leaves had severity lower than 24% (Table 1).

Table 1. Frequency distribution at unit intervals of severity values (%) of bacterial blight (*Pseudomonas syringae pv garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*)

Interval (severity %)	Frequency	Percentage (%)	Cumulative frequency	Cumulative percentage (%)
0-1	7	5.88	7	5.88
1-2	13	10.92	20	16.81
2-3	10	8.4	30	25.21
3-4	9	7.56	39	32.77
4-5	12	10.08	51	42.86
5-6	8	6.72	59	49.58
6-7	5	4.2	64	53.78
7-8	4	3.36	68	57.14
8-9	3	2.52	71	59.66
9-10	6	5.04	77	64.71
10-11	5	4.2	82	68.91
11-12	1	0.84	83	69.75
12-13	3	2.52	86	72.27
13-14	2	1.68	88	73.95
14-15	5	4.2	93	78.15
15-16	0	0	93	78.15
16-17	2	1.68	95	79.83
17-18	2	1.68	97	81.51
18-19	4	3.36	101	84.87
19-20	1	0.84	102	85.71
20-21	3	2.52	105	88.24
21-22	0	0	105	88.24
22-23	1	0.84	106	89.08
23-24	1	0.84	107	89.92
> 24	11	10.08	118	100

As in 90% of cases disease severity was less than 25%, the scale was developed with nine levels (Figure 1) with seven of them distributed in the range 0 (zero) and 25% of diseased leaf area (DLA). The Weber-Fechner's law was used to represent the higher frequency intervals (Table 1). The lower and upper limits of severity represented in the scale were 0 (zero) and 45.1%, respectively. Images of leaves with severity value higher than 45.1% were not included in the scale because we found no leaves with disease severity above this value.

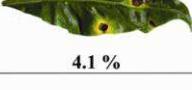
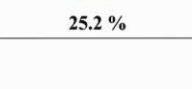
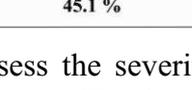
Level 0 (0.0 %)	 0.0 %	 0.0 %	 0.0 %
Level 1 (0.1 - 0.99 %)	 0.4 %	 0.6 %	 1.0 %
Level 2 (1.0 - 2.0 %)	 1.2 %	 1.7 %	 1.9 %
Level 3 (2.01 - 4.0 %)	 2.1 %	 2.6 %	 3.6 %
Level 4 (4.01 - 8.0 %)	 4.1 %	 5.9 %	 7.8 %
Level 5 (8.01 - 16.0 %)	 8.4 %	 10.0 %	 14.2 %
Level 6 (16.01 - 25.0 %)	 16.6 %	 22.9 %	 24.1 %
Level 7 (25.01 - 45.0 %)	 25.2 %	 35.0 %	 43.4 %
Level 8 (≥ 45.1 %)		 45.1 %	

Figure 1. Diagrammatic scale to assess the severity of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv *garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*). Numbers represent the percentage of diseased leaf area, disregarding the yellow halo.

Scale validation

According to the conjoint analysis, evaluation with scale provided higher accuracy and precision than evaluation without scale (Table 2).

Table 2. Intercept (β_0), slope of the line (β_1) and coefficient of determination (R^2) of linear regression equations relating visual estimates of severity of bacterial blight (*Pseudomonas syringae pv garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*) conducted by evaluators with and without the diagrammatic scale, with true severity values determined electronically

Evaluators	Coefficients								
	Without scale			With scale					
	β_0	β_1	R^{2**}	1 st evaluation			2 nd evaluation		
β_0				β_1	R^{2**}	β_0	β_1	R^{2**}	
A	3.79*	1.01 ^{ns}	0.86	-0.29 ^{ns}	0.66 ^{ns}	0.91	-0.84 ^{ns}	0.64 ^{ns}	0.86
B	1.51*	0.99 ^{ns}	0.89	0.99 ^{ns}	0.84 ^{ns}	0.86	0.46 ^{ns}	0.88 ^{ns}	0.93
C	1.73*	1.16*	0.92	-0.53 ^{ns}	0.96 ^{ns}	0.95	0.39 ^{ns}	1.09 ^{ns}	0.88
D	3.89*	0.97 ^{ns}	0.82	0.03 ^{ns}	0.68 ^{ns}	0.84	-0.67 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.74
E	6.25*	1.54*	0.90	-0.95*	0.96 ^{ns}	0.96	-0.90 ^{ns}	1.18*	0.90
F	2.54*	1.20*	0.89	0.86 ^{ns}	0.73 ^{ns}	0.88	-1.08 ^{ns}	1.16 ^{ns}	0.89
G	5.86*	1.27*	0.84	0.09 ^{ns}	0.79 ^{ns}	0.90	0.59 ^{ns}	0.83 ^{ns}	0.93
H	0.70 ^{ns}	1.20*	0.93	0.95 ^{ns}	0.75 ^{ns}	0.88	-0.09 ^{ns}	1.09 ^{ns}	0.85
I	2.17*	1.06 ^{ns}	0.92	0.18 ^{ns}	0.67 ^{ns}	0.88	0.79 ^{ns}	0.80 ^{ns}	0.84
J	3.02*	1.39*	0.93	-0.79 ^{ns}	1.14*	0.89	-0.74 ^{ns}	0.94 ^{ns}	0.95

*ns represents situations where the null hypothesis ($\beta_0 = 0$ or $\beta_1 = 1$) was respectively rejected and not rejected by t-test ($P = 0.05$); ** represents significant situations with 5% probability for t-test ($P < 0.05$).

There was generalized overestimation of disease severity by all evaluators in the assessments without scale. Both hypotheses $\beta_0 = 0$ and $\beta_1 = 1$ of the linear regression equation between true and estimated severity were rejected for five evaluators (C, E, F, G, and J), while one of the two hypotheses was rejected for the others (Table 2), thus indicating overestimation of disease severity.

When using the scale, the evaluators were more accurate in assessing disease severity (Table 2). In the first assessment with scale 80% of evaluators had intercept and regression slope equal to 0 and 1, respectively. In the second assessment only one evaluator (E) had regression slope different from 1.

When the evaluators used no scale, disease was overestimated by 17.9%. However, evaluators using the scale began to underestimate the disease by 18.2% in the first assessment. Underestimation of disease severity was reduced to 7.9% when the scale was used for the second time (Table 2), which demonstrates the importance of evaluation training.

Overestimation of disease severity by evaluators without the scale was higher in leaves with lower disease severity, which in the case of bacterial blight represents over 90% of cases (Table 1). Analyzing the values of intercept of regression equation, was found that the evaluators on average overestimated the disease in 314% in leaves with less severity. When using the scale, the evaluators began to underestimate the disease only 7.75% on average of the two assessments (Table 2).

All evaluators showed good precision independently of using the scale. However, on average 60% of evaluators using the scale presented R^2 value higher or equal to the initial evaluation without scale, i.e. they

were equal or more accurate (Table 2). Nevertheless, there was a reduction in the absolute errors and lower amplitude values with the scale (Figure 2). In fact, the minimum and maximum values for residuals of all evaluators without the scale were -16.44 and 32.06, respectively, while range reduced to -20.95 and 20.01 on the average of the two assessments with the scale. Smaller biases of estimates of severity with scale occurred on leaves with true severity values less than 24% (Figure 2), corresponding to 90% of leaves.

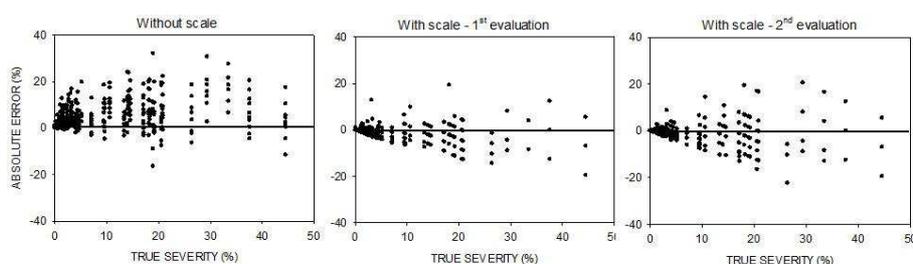


Figure 2. Distribution of residuals (estimated severity - true severity) of estimates of bacterial blight (*Pseudomonas syringae pv garcae*) in coffee leaves assessed with and without the diagrammatic scale in two evaluations.

Increase in precision could also be confirmed by the repeatability of estimates. The evaluators showed good repeatability in estimating the severity of bacterial blight in coffee leaves using the scale, since the average amount of variation in the first assessment compared to the second one was 83.2% (Table 3). In both evaluations, the slope of the line value was significantly different from 1 for only two evaluators (E and H) thus indicating precision of estimates for 80% of evaluators.

Table 3. Intercept (β_0), slope of the line (β_1) and coefficient of determination (R^2) of linear regression equations relating the second estimate with the first estimate of severity of bacterial blight (*Pseudomonas syringae pv garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*) performed by the same evaluator with the diagrammatic scale

Evaluators	Coefficients		
	β_0	β_1	R^{2**}
A	-0.32 ^{ns}	0.92 ^{ns}	0.87
B	0.73 ^{ns}	0.91 ^{ns}	0.82
C	1.45 ^{ns}	1.09 ^{ns}	0.85
D	-0.15 ^{ns}	0.79 ^{ns}	0.73
E	0.72 ^{ns}	1.18*	0.86
F	-1.18 ^{ns}	1.44 ^{ns}	0.82
G	1.03 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.90
H	-0.12 ^{ns}	1.29*	0.77
I	1.02 ^{ns}	1.13 ^{ns}	0.84
J	0.78 ^{ns}	0.74 ^{ns}	0.86

*ns represents situations where the null hypothesis ($\beta_0 = 0$ or $\beta_1 = 1$) was respectively rejected and not rejected by t-test ($P = 0.05$); ** represents significant situations with 5% probability for t-test ($P < 0.05$).

In addition to accuracy and precision, the diagrammatic scale has reproducibility. Without the scale, R^2 values of estimate regressions between pairs of evaluators were 0.76 to 0.94%, averaging 0.86% (Table 4). With the scale, R^2 values were 0.73 to 0.94% and 0.68 to 0.91% respectively in the first and second assessment, and were ≥ 0.75 in 89% of combination of evaluators.

Table 4. Coefficient of determination (R^2) of linear regression equations relating the visual estimates of severity of bacterial blight (*Pseudomonas syringae pv garcae*) in coffee leaves (*Coffea arabica*) between evaluators matched in pairs, with and without the diagrammatic scale at the first and second evaluations

Without scale									
Evaluators	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	0.82	0.85	0.83	0.82	0.89	0.80	0.84	0.85	0.85
B		0.91	0.82	0.89	0.83	0.82	0.94	0.84	0.90
C			0.83	0.86	0.90	0.87	0.92	0.88	0.89
D				0.83	0.86	0.76	0.84	0.81	0.79
E					0.81	0.82	0.93	0.87	0.90
F						0.82	0.86	0.86	0.87
G							0.83	0.84	0.83
H								0.92	0.92
I									0.90
With scale – 1st evaluation									
Evaluators	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	0.83	0.87	0.80	0.88	0.81	0.91	0.86	0.89	0.83
B		0.83	0.75	0.88	0.82	0.85	0.84	0.86	0.74
C			0.83	0.94	0.85	0.89	0.84	0.87	0.88
D				0.88	0.87	0.81	0.74	0.80	0.79
E					0.88	0.89	0.86	0.88	0.85
F						0.86	0.90	0.85	0.75
G							0.87	0.92	0.85
H								0.87	0.73
I									0.78

Continued...

... continuance

With scale – 2 nd evaluation									
Evaluators	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	0.86	0.88	0.84	0.84	0.78	0.81	0.90	0.87	0.88
B		0.85	0.76	0.87	0.88	0.87	0.88	0.88	0.89
C			0.84	0.87	0.74	0.84	0.79	0.80	0.89
D				0.83	0.70	0.68	0.81	0.73	0.75
E					0.78	0.87	0.81	0.80	0.86
F						0.83	0.83	0.79	0.87
G							0.81	0.83	0.91
H								0.86	0.86
I									0.80

DISCUSSION

Scale levels were defined according to the frequency distribution of number of leaves with a given diseased leaf area, up to the maximum severity value found (45.1%). Scale intermediate levels were determined based on the higher frequency ranges of values of disease severity in leaves, combined with an exponential increase in severity levels. Analysis of frequency distribution of severity values to determine scale intervals hasn't been used for the elaboration of diagrammatic scales. Andrade et al. (2005) conducted an analysis of frequency distribution of severity values when developing a diagrammatic scale to assess severity of leaf spot of Eucalyptus (*Quambalaria eucalypti*), however the authors did not use this information to define scale intermediate values. Oliveira et al.

(2001) used percentage intervals following the Weber-Fechner law with values 0, 3-6, 6-12, and 12-25% of severity of brown eye spot (*Cercospora coffeicola*) in coffee leaves. This scale was validated but did not show all levels of disease, besides presenting wide ranges. Diagrammatic scales should follow the Weber-Fechner law (logarithmic increases), however without necessarily using the same intervals chosen by Horsfall and Barratt (1945), due to the characteristics of each pathosystem. Symmetry of severity intervals by 50% has not been adopted due to lack of severity values of bacterial blight equal or close to 100%, in addition human visual acuity does not allow distinguishing severity values above 50% (Campbell and Madden 1990).

Absence of leaves with severity higher than 45% was an important feature of the disease due to host-pathogen interactions. As symptoms develop, diseased leaf area expands and covers, in some cases, approximately 50% of the leaf. Large areas of necrotic tissue result in premature leaf fall, which helps explain the lower amount of leaves with severity > 25%, as well as the absence of severity values > 45%.

The scale was built with digital images where the necrotic area was measured by electronic systems in more than 100 leaves. Thus, it was possible to develop a diagrammatic scale representing the true symptoms, i.e. evaluators could view the real percentage of diseased leaf area (DLA) in higher frequency intervals. If lower scale levels represented higher severity ranges, most leaves would be concentrated in the first two or three scale classes, which could reduce the difference between treatments. Ithiru et al. (2013) used the descriptive scale proposed by Ito et al. (2008) with intervals of more than 15% severity to assess the severity of bacterial

blight in 13 genotypes of coffee plants. In that case, a scale with lower severity intervals could help the evaluators by providing better distinction between genotypes regarding resistance to disease.

As in this study, some existing assessments with diagrammatic scales obtained greater accuracy and precision of estimates of disease severity in other pathosystems (Diaz et al. 2001; Tovar-Soto et al. 2002; Martins et al. 2004; Gomes et al. 2004; Spósito et al. 2004; Michereff et al. 2000, 2006; Andrade et al. 2005; Salgado et al. 2009; Santos et al. 2010; Custódio et al. 2011; Capucho et al. 2011; Menge et al. 2013). However, like most methods of quantifying disease severity, the use of diagrammatic scales is prone to subjectivity (Michereff et al. 2006). Without using the scale, there was systematic bias in all levels of disease severity with a tendency of overestimation. In most studies of diagrammatic scale validation without scale the evaluators, particularly plant pathologists, tend to overestimate the severity of disease (Newton and Hachett 1994; Parker et al. 1995; Diaz et al. 2001; Spósito et al. 2004; Martins et al. 2004; Michereff et al. 2006; Salgado et al. 2009; Santos et al. 2010; Custódio et al. 2011; Capucho et al. 2011; Menge et al. 2013). In some cases, underestimation of severity levels of disease has also occurred (MICHEREFF et al. 2000; GOMES et al. 2004). According to Amorim (1995), the evaluator's ability in visually quantifying severity of disease depends on factors such as training, experience, and individual perception, which can explain different outcomes in response to different forms of visual stimulation caused by the symptoms of disease. An alternative to reduce subjectivity is training evaluators on the use of scales (Nutter Junior and Schultz 1995).

Overestimation of severity by evaluators without using the scale was due to visual stimulus caused by the yellow halo around the injury and the tendency to overestimate the disease. In this study, the yellow halo was not considered in the quantification of the injured area for two reasons. Firstly, the necrotic area varies in the leaves, which allows for grouping leaves into classes in ascending order, i.e. it is possible to elaborate a scale with different levels of diseased leaf area which represent increase in disease severity. Secondly, different shades of yellow and green leaf tissue around the lesions hinder the evaluator to visually define the boundary between healthy tissue and halo. This can increase subjectivity of evaluation, so as to provide even greater overestimation. In addition, nutritional deficiencies can cause a chlorosis similar to the yellow halo and further confuse the evaluator. Martins et al. (2004) found that the largest deviations occurred at the stages of disease with frequent yellow halos, which can confuse the evaluator. In fact, besides being influenced by stimuli and psychological responses the quality of estimates can also be affected by factors such as complexity of sampling units, size, shape, color, and number of lesions (Kranz 1988).

Bacterial blight of coffee is characterized by a higher percentage of leaves with severity less than 24%, which led to lower accuracy of the evaluators for this severity range (0-24%) without scale. However, this deficiency was corrected after using the scale, thus confirming the importance of the elaboration of the intervals and scale levels based on the frequency distribution of severity values.

The coefficients of linear regression equation show that the evaluators were more accurate than precise when using the scale. Values

of coefficients of determination were higher than 80% for all evaluators even without the scale; however, values increased with the scale. According to Vale et al. (2004), precision refers to repeatability of values related to the sample with the lowest possible variation among them, i.e. to perform various assessments, precise evaluators follow a pattern of minimum deviation between estimated value and true severity. In this study, evaluators were accurate with and without the scale, although all of them showed systematic deviations of overestimation of disease without using the scale. With the scale, these constant errors were eliminated as the evaluators became more accurate. Systematic errors continued, although at a lower intensity compared to the assessments without scale. Evaluator accuracy was higher in the second evaluation, with better results after scale training. In this case, if possible deviations cannot be corrected in training, they can be compensated by calibration equations for each evaluator, as performed by Shaw and Royle (1989) when assessing *Septoria tritici* blotch of wheat.

In fact, there was a reduction of absolute errors using the scale. On average between the two assessments 94% of absolute errors were between -10.0 and +10.0, i.e. within an acceptable range according to criteria adopted by training programs in the quantification of diseases, such as Distrain (Tomerlin and Howell 1988) and Disease.Pro Program (Nutter Junior and Worawitlikit 1989). Without using the scale, 82% of residuals were outside this range. As noted by Michereff et al. (2006), the presence of some level of absolute error in the measurements using the diagrammatic scale for quantification of disease may be compensated by the speed and standardization of evaluations.

Reduction of absolute errors can also be explained by the representation of higher frequency ranges of severity values in the scale. The seven levels distributed between 0-25% of severity allowed the evaluators higher accuracy, i.e. lower amplitude of errors. Despite the greater range of errors for true severity values higher than 25%, these accounted for only 10% of coffee leaves sampled in field crops and nurseries.

As precision concerns the repeatability associated with an estimate (Vale et al. 2004), the scale for bacterial blight of coffee allowed for measurement repeatability. Only two evaluators showed slope of the line significantly different from 1, which can be explained by evaluator E's overestimation of severity in the second evaluation with the scale. Evaluator H also reduced underestimation in the second assessment with the scale, i.e. ceased to underestimate the severity in 25% and went to overestimate it in 9%, although within acceptable limits ($P < 0.05$). However, the slope of the line values are significantly equal to 0 in both cases, i.e. evaluators with the scale did not overestimate (> 0) or underestimate (< 0) true severity to low levels of disease intensity (Nutter Junior and Schultz, 1995). Repeatability of assessments is also associated with evaluator training, which leads to error minimization. This was proved by the higher accuracy and precision of the evaluators in the second assessment with the scale, when compared to both the first assessment with the scale and the evaluation without the scale.

Reproducibility of estimates between evaluators was also used to assess the scale precision for bacterial blight of coffee. According to Nutter and Schultz (1995), different evaluators using the same scale and

assessing the same experimental unit should estimate the same severity values. Similarity between these assessments is verified by linear regressions between the severity values estimated by evaluators in matched pairs. In this case, R^2 values were lower with the scale than in the initial evaluation without scale. However, values were ≥ 0.75 in 88.9% of combinations of evaluators, similar to results found in validation of diagrammatic scales in other pathosystems (Tovar - Soto et al. 2002; Gomes et al. 2004; Martins et al. 2004). Although the evaluators showed higher R^2 values without the scale, i.e. formed a homogeneous group regarding precision, they were not accurate. The diagrammatic scale allowed for maintaining group accuracy, thus providing reproducibility of evaluations.

As the scale was developed based on leaves collected in field crops and nursery, it represents the reality of disease occurrence. Therefore, it can be used in the evaluation of disease in both adult plants and seedlings, without differences in symptoms.

CONCLUSIONS

A diagrammatic scale was developed to assess the severity of bacterial blight of coffee based on ranges of frequency distribution of severity values.

The diagrammatic scale provides better levels of accuracy, precision, and reproducibility of the evaluations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for granting a scholarship to the first author; the National Institute of Science and Technology of Coffee (INCT-Café); and the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for contributing to the research. To the students, of the Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras - UFLA in helping to validate the diagrammatic scale.

REFERENCES

- Amaral JF, Teixeira C, Pinheiro ED. (1956) A bacterium causing halo blight of coffee. *Arq. Inst. Biol.* 23:151-155.
- Amorim L. (1995) Avaliação de doenças. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L. (Eds.) *Manual de fitopatologia* 3. ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres, pp. 647-671.
- Andrade GCG, Alfenas AC, Mafia RG, Maffia LA, Gonçalves RC. (2005) Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatol. bras.* 30:504- 509.
- Bergamin Filho A, Amorim L. (1996) *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo, SP, Brazil, Agronômica Ceres.
- Berger RD. (1980) Measuring disease intensity. In: Teng PS, Krupa SV. (Ed.) *Crop loss assessment*. St. Paul: University Minnesota, pp.28-31.

- Campbell CL, Madden LV. (1990). Introduction to plant disease epidemiology. New York, NY, USA, John Wiley.
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Vaz GRO. (2011) Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. Plant Pathology 60:1144–1150.
- Chen Z. (2002) Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries. Lisboa, Portugal, Universidade Técnica de Lisboa, PhD Thesis.
- Costa AS, Silva D.M. (1960) A Mancha aureolada do cafeeiro. Bragantia 19:62-68.
- Custódio AAP, Pozza EA, Guimarães SS, Koshikumo ESM, Hoyos JMA, Souza PE. (2011) Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. Cienc. agrotec. 35:1067-1076.
- Diaz CG, Bassanezi RB, Filho AB. (2001) Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. Summa phytopathol. 27:35-39.
- Gomes AMA, Michereff SJ, Mariano RLR. (2004) Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. Summa phytopathol. 30:38-42.
- Horsfall JC, Barrat RW. (1945) An improved grading system for measuring plant diseases. Phytopathology, 35:665.

- Ithiru JM, Gichuru EK, Gitonga PN, Cheserek JJ, Gichimu BM. (2013) Methods for early evaluation for resistance to bacterial blight of coffee. *African Journal of Agricultural Research* 8:2450-2454.
- Ito DS, Sera T, Sera GH, Del Grossi L, Kanayama FS. (2008) Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8:99-103.
- Jesus Junior WC, Zambolim L, Silva HS, VALE FXR, SILVA C. (2002) Controle químico da mancha aureolada do cafeeiro. *Fitopatol Bras* 27:61-61.
- Kado CI, Heskett MG. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- Korobko A, Wondimagegne E. (1997) Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: Rudoldh K, Burr TJ, Mansfield JW, Stead D, Vivian A, Von Kietzele J. *Pseudomonas syringae and Related Pathogens*. Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 538–541.
- Kranz J. Measuring plant disease. (1988) In: Kranz J, Rotem J. (Ed.) *Experimental techniques in plant disease epidemiology*. Heidelberg, Springer Verlag, pp.35-50.
- Martins MC, Guerzoni RA, Câmara GMS, Mattiazzi P, Lourenço AS, Amorim L. (2004) Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatol. bras.* 29:179–184.
- Menge D, Makobel M, Shomari S, Tiedemann AV. (2013) Development and Validation of a Diagrammatic Scale for Estimation of Cashew

- Blight for Epidemiological Studies. *International Journal of Advanced Research* 1:26-38.
- Michereff SJ, Andrade DEGT, Noronha MA. (2006) Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate leaf smut severity in cowpea. *Summa phytopathol.* 32:51-56.
- Michereff SJ, Maffia LA, Noronha MA. (2000) Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Fitopatol. bras.* 25:612-619.
- Mohan SK. (1976) Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. em cafeeiros. In: IBC/GERCA (ed) Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, MG, Brazil, IBC, p.56.
- Newton AC, Hachett CA. (1994) Subjective components of mildew assessment on spring barley. **Eur. j. plant pathol.** 100:395-412.
- Nutter Junior FW, Gleason ML, Jenco JH, Christians NC. (1993) Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology* 83:806-812.
- Nutter Junior FW, Schultz PM. (1995) Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer aided training programs. *Can. j. plant pathol.* 17:174-184.
- Nutter Junior FW, Worawitlikit O. Disease.Pro: A computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. *Phytopathology* 79:1135. 1989.
- Nutter Junior FW., TENG PS, SHOKES FM. (1991) Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75:1187-1188.

- Oliveira CA. (2001) Diagrammatic scale to evaluate severity of brown eye spot in coffee trees leaves. In: EMBRAPA Café (ed) Anais of Simpósio Dos Cafés Do Brasil, Vitória, ES, Brazil, EMBRAPA, p.80.
- Parker SR, Shaw MW, Royle DJ. (1995) The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. *Plant Pathology* 43:856-865.
- Patrício FRA, Almeida IMG, Barros BC, Santos AS, Frare PM. (2008) Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. *Annals of Applied Biology* 152:29–39.
- Patrício FRA, Beriam LOS, Rossi A, Moraes A, Almeida IMG. (2010). Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. *Trop. plant pathol.* 35:S119.
- Pozza EA, Carvalho VL, Chalfoun SM. (2010) Sintomas de injúrias causadas por doenças do cafeeiro. In: Guimarães RJ, Mendes ANG, Baliza DP. (Eds). *Semiologia do cafeeiro*. Lavras, Editora UFLA, p. 67-106.
- Ramos AH, Shavdia LD. (1976) A dieback of coffee in Kenya. *Plant Disease Reporter* 60:831-835.
- Rodrigues LMR, Almeida IMG, Patrício FRA, Beriam LOS, Maciel KW, Braghini MT, Guerreiro Filho O. (2013) Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Campinas, SP, Brazil, Instituto Agronômico de Campinas.
- Salgado M, Pozza EA, Lima LM, Pereira RTG, Pfenning LH. (2009) Diagrammatic scale to evaluate severity of phoma leaf blight of coffee trees. *Trop. plant pathol.* 34:422-427.

- Santos WF, Alves MC, Carvalho LG, Rios GFA, Fraga AC. (2010) Elaboration and Validation of a Diagrammatic Scale for Epidemiological Studies of *Cercospora* Leaf Spot of Castor Bean. *J Phytopathol* 158:403–408.
- Sera GH, Sera T, Altéia MZ, Androcioli Filho A, Azevedo JA, Petek MR, Ito DS. (2004) Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agronômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. *Cienc. agrotec.* 28:974- 977.
- Shaw MW, Royle DJ. (1989) Estimation and validation of a function describing the rate at which *Mycosphaerella graminicola* causes yield in winter wheat. *Annals of Applied Biology* 115:425-442.
- Spósito MB, Amorim L, Belasque Junior J, Bassanezi RB, Aquino R. (2004) Elaboration and validation of diagrammatic scale to evaluate black spot severity in citrus fruits. *Fitopatol. bras.* Brasília, 29:81-85.
- Tomerlin JR, Howell TA. (1988) Distrain: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. *Plant Dis* 72:455-459.
- Tovar-Soto A, Hernandez-Martínez M, Cristóbal-Alejo J, Romero HIJOR, Mora-Aguilera G. (2002) Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:103-109.
- Vale FXR, Jesus Junior WC, Liberato JR, Souza CA. (2004) Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L. (Eds.) *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Viçosa, Perfil Editora, pp.90-123.

Zambolim L, Vale FXR, Zambolim EM. (2005) Doenças do Cafeeiro. In: Kimati A, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. Manual de Fitopatologia. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, pp.165-180.

Zoccoli DM, Takatsu A, Uesugi CH. (2011) Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Bragantia* 70:843-849.

ARTIGO 2 - Potencial de disseminação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* por sementes de cafeeiro

Preparada em concordância com as normas do periódico “**Plant disease**”.

(Versão preliminar – submetido)

L. L. Belan, E. A. Pozza, M. L. O. Freitas, M. K. Raimundi, R. M. Souza, J. C. Machado, F. J. F. Mendonça, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CP. 3037, 37200-000, Lavras- MG, Brasil

RESUMO - A mancha aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie 1978) têm causado danos nas principais regiões produtoras de café do Brasil e do mundo, devido à sua capacidade de reduzir a produção, afetando desde mudas no viveiro até cafezais em formação e/ou em produção, além das dificuldades de controle. Em mudas nos viveiros, o adensamento proporciona condições e ambiente favorável para a ocorrência da doenças de plantas, no entanto ainda é desconhecida a origem do inóculo inicial responsável por desencadear a epidemia dessa doença nos viveiros e ainda disseminar o patógeno no campo. Sementes colhidas em junho 2013, no município de Santo Antônio do Amparo, MG, Brasil, provenientes de cafeeiros (*Coffea arabica*), cultivar Catuaí 99, com sintomas de mancha aureolada foram imersas em solução salina estéril e o extrato bruto inoculado via

ferimento com conjunto multi-agulhas em folhas de mudas de cafeeiro Catuaí 99. Houve sintomas de mancha aureolada nas folhas de plantas de cafeeiro inoculadas com o extrato de sementes de plantas sintomáticas. Foram observadas lesões irregulares, inicialmente com aparência de anasarcas ao redor do ponto de inoculação. A área de tecido encharcado aumentou ao longo do tempo e posteriormente desenvolveu halo de cor amarela ao redor das lesões, sintoma característico da doença, e semelhantes aos desenvolvidos por folhas inoculadas com suspensão de inóculo do isolado padrão de referência *P. syringae* pv. *garcae* souche pathotype (CFPB1634) (PSG). Folhas de cafeeiro inoculadas com extrato de sementes de plantas assintomáticas não desenvolveram sintomas. Folhas que reproduziram os sintomas foram submetidas ao teste de exsudação e quatro estirpes do agente etiológico, denominados B1, 9P, 10P e 12P, foram isoladas em meio de cultura King's B (KB). Essas quatro estirpes são gram-negativas e induziram reação de hipersensibilidade quando infiltradas em plantas de tabaco, couve, pimentão e tomateiro. São aerobiontes estritos, reação de oxidase negativa, foram capazes de degradar gelatina e quando semeadas em KB, essas cepas mostraram a mesma fluorescência associada à PSG. Todas as estirpes induziram sintomas de mancha aureolada quando inoculadas em mudas de cafeeiro, semelhante ao isolado PSG. Para a identificação genética dos isolados provenientes das sementes de cafeeiro foi utilizada a técnica de rep-PCR com o *primer* correspondente à região BOX (BOXAIR 5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3', e o isolado PSG foi utilizado como padrão de referência. Houve pareamento entre os produtos da reação de BOX-PCR das quatro estirpes com os produtos da

reação do isolado padrão PSG. Estas características suportam a classificação das estirpes como *P.s. pv. garcae*. Logo, sementes de cafeeiro provenientes de plantas com sintomas de mancha aureolada podem conter inóculo viável de *P. syringae pv. garcae*. Estudos adicionais são necessários e estão sendo desenvolvidos para esclarecer a relação entre quantidade de inóculo de *P. syringae pv. garcae*, sua localização nas sementes de cafeeiro, e os efeitos a partir dessa interação.

Palavras-chaves: Mancha aureolada. Inóculo inicial. Viveiro de mudas. Sanidade de sementes.

INTRODUÇÃO

A mancha aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae pv. garcae* (AMARAL et al., 1956) Young, Dye & Wilkie 1978) têm causado danos nas principais regiões produtoras de café do Brasil e do mundo, devido à sua capacidade de reduzir a produção de forma significativa, afetando desde mudas no viveiro até cafezais em formação e/ou em produção, além das dificuldades inerentes ao seu controle.

Em mudas nos viveiros, o adensamento proporciona condições e ambiente favorável para a ocorrência de doenças de plantas. O contato direto das folhas entre as mudas do hospedeiro suscetível, associado ao excesso de umidade no ambiente favorece a disseminação do patógeno e conseqüentemente a ocorrência de epidemias. Logo, a ocorrência, padrão de distribuição e o progresso da epidemia estão condicionados a origem

do inóculo inicial, que em muitas das vezes pode estar associado às sementes (Romeiro, 2005; Brasil, 2009).

Vários estudos têm fornecido evidências de que as sementes abrigam diversificada flora microbiana, tanto em sua superfície quanto associada aos tecidos internos (Schaad, 1982; Goto, 1992; Bacilio-Jimenez et al., 2001; Silva et al., 2002; Machado et al., 2002; Romeiro, 2005), cuja multiplicação é estimulada no início do processo de germinação (Simon et al., 2001; Nelson, 2004). Em se tratando de fitopatógenos, o inóculo inicial nas sementes pode ser transmitido e infectar as plântulas geradas a partir das sementes e/ou ser transmitido para as plantas no viveiro e no campo. Mesmo externamente às sementes, o inóculo de algumas espécies de bactérias pode provocar infecção de plantas (Guthrie, 1970; Neergaard, 1979; Silva et al., 2002; Corrêa et al., 2008). Silva et al. (2013) verificaram transmissão e infecção de *Xanthomonas vesicatoria*, presente no tegumento de sementes para órgãos recém emitidos em mudas de tomateiro.

A taxa de transmissão de bactérias por sementes é baixa (Schaad, 1989; Carmo et al., 2004), contudo, são eficientes vetores para disseminar esses patógenos (Romeiro, 2005), resultando na introdução precoce do inóculo inicial nas áreas de cultivo (Carmo et al., 1996; Carmo et al., 2004, Romeiro, 2005; Silva et al., 2013). Por exemplo, o transporte de bactérias do complexo *X. vesicatoria* por sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação do patógeno (Vauterin et al., 1995; Carmo et al., 2004; Jones et al., 2004). Logo, a qualidade fitossanitária das sementes é importante estratégia de manejo de doenças.

Diante dos danos e perdas significativas causadas pela mancha aureolada em viveiros de mudas de cafeeiro e o desconhecimento da origem do inóculo inicial bacteriano, o objetivo desse estudo foi verificar se sementes de cafeeiro podem disseminar o inóculo de *P. syringae* pv. *garcae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes

Foram utilizadas sementes provenientes de duas lavouras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) onde havia população de plantas com sintomas da mancha aureolada (*P. syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie). O agente etiológico foi isolado em meio 523 de Kado; Heskett (1970) para comprovar a etiologia da doença, e a partir de padrões bioquímicos e moleculares (rep-PCR) classificado como *P. syringae* (Raimundi, 2013), em ambas as lavouras. As lavouras, denominadas L1 e L2, estão localizadas no município de Santo Antônio do Amparo – MG, respectivamente nas coordenadas geográficas 20°53'23,7" (Sul) e 44°52'56,9" (Oeste), e 20°53'33,9" (Sul) e 44°52'58" (Oeste). Essas lavouras são compostas, respectivamente, por cafeeiros da cultivar Catuaí Amarelo 2SL com quatro anos de idade, e Catuaí vermelho IAC 99 com cinco anos de idade.

Em cada uma das lavouras foram demarcadas plantas sintomáticas e assintomáticas, das quais os frutos maduros foram colhidos manualmente em junho de 2013, descascados mecanicamente e as sementes levadas para secar a sombra até 15% de umidade. Essas foram

acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria (10°C e 50% de umidade relativa) (Silva et al., 2010) por 20 dias antes da instalação dos ensaios. Foram constituídos quatro lotes: Lote 1 – sementes de plantas sintomáticas da lavoura L1, Lote 2 - sementes de plantas assintomáticas da lavoura L1, Lote 3 – sementes de plantas sintomáticas da lavoura L2 e Lote 4 - sementes de plantas assintomáticas da lavoura L2.

Extrato bruto de sementes

De cada um dos lotes foram retiradas quatro sub-amostras de 100 sementes. Essas sementes foram acondicionadas em ‘erlenmeyers’ (250 ml) esterilizados, e imersas em solução salina (0,85% NaCl) estéril (100 mL para cada 100 sementes). Posteriormente foram armazenadas por 18 horas, à temperatura de 4°C. Os extratos foram utilizados para inocular mudas de cafeeiro.

Inoculação do extrato bruto de sementes em mudas de cafeeiro

Foram utilizadas mudas de cafeeiro cultivar Catuaí vermelho IAC 99 com três pares de folhas, e inoculados os dois primeiros pares de folhas completamente desenvolvidas. Foram utilizados conjuntos multiagulhas esterilizados, imersos nos respectivos extratos brutos de sementes no momento na inoculação, e utilizados para realizar dois pontos de inoculação por folha. Foram também inoculadas mudas com solução salina estéril (controle negativo), suspensão de inóculo ($1,1 \times 10^9$ UFC/mL) de *P. syringae* pv. *garcae* souche patothype (CFPB1634) (PSG) e *P. cichorii* souche patothype (CFPB 2101) (PC) como sintomas

padrões, e mantidas testemunhas absolutas não inoculadas. O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento vegetal (23 ± 3 °C, UR > 70% e fotoperíodo de 12 horas de luz), em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, sendo cada unidade experimental composta por três mudas. Foram considerados resultados positivos para as folhas com sintomas visuais de doença semelhantes aos sintomas desenvolvidos por folhas inoculadas com os isolados padrões de referência PSG e PC.

Isolamento do agente etiológico

Folhas das mudas de cafeeiro que desenvolveram sintomas de mancha aureolada ao longo do tempo foram coletadas e submetidas ao teste de exsudação em gota para confirmar a origem bacteriana da doença. O agente etiológico foi isolado (isolamento direto) em meio 523 de Kado e Heskett (1970) (Maringoni, 2010). Os isolados PSG e PC foram repicados em placas de Petri contendo meio 523 para comparação da morfologia das colônias. As placas foram incubadas a 28°C por 24-48 h, e então se comparou a morfologia das colônias com os isolados padrões de referência. As colônias morfologicamente semelhantes aos isolados PSG ou PC (isolados candidatos) foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio 523, incubadas a 28°C por 24 horas e posteriormente armazenados à temperatura de 4°C.

Reação de hipersensibilidade para comprovação de patogenicidade

Isolados candidatos foram repicados para tubos de ensaio contendo meio 523 e incubados a 28°C por 24 horas. Posteriormente foi preparada suspensão de inóculo de cada isolado utilizando-se solução

salina (0,85% NaCl) esterilizada. As respectivas suspensões de inóculo foram injetadas com seringa hipodérmica esterilizada em folhas de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e couve (*Brassica oleracea* L.). Os isolados PSG (CFPB 1634) e PC (CFPB 2101) foram inoculados como padrões de referência. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura de 25-28 °C. Decorridas 24 horas após a inoculação avaliou-se a ocorrência de sintomas de hipersensibilidade (HR).

Para confirmar a patogenicidade dos isolados, mudas de cafeeiro da cultivar Catuaí vermelho IAC 99 com quatro pares de folhas foram inoculadas com as respectivas suspensões de inóculo de cada isolado candidato. Foram inoculados, via injeção da suspensão de inóculo, os dois primeiros pares de folhas completamente desenvolvidas, sendo realizados dois pontos de inoculação por folha. Foram inoculadas duas mudas para cada um dos isolados.

Folhas das mudas de cafeeiro que reproduziram sintomas de mancha aureolada foram coletadas e submetidas ao teste de exsudação em gota para confirmar a origem bacteriana da doença. O agente etiológico foi re-isolado em meio 523 de Kado e Heskett (1970) (Maringoni, 2010).

Reação de Gram, testes bioquímicos e moleculares para identificação de fitobactérias

Os isolados bacterianos positivos para a reação de HR e patogênicos ao cafeeiro foram caracterizados bioquimicamente de acordo com Lelliott et al. (1966), Wilkie e Dye (1973), Rodrigues Neto et al.

(1981), Schaad et al. (2001) e Maringoni (2010) e também por testes moleculares (Versalovic et al., 1994; de Bruijn, 1992; Koeuth et al., 1995). Os seguintes testes foram utilizados: reação de Gram com base na solubilidade em KOH, anaerobiose, oxidase, liquefação de gelatina e produção de pigmento fluorescente em meio de cultura de King B e rep-PCR com o *primer* correspondente à região BOX. Foram utilizados os isolados *P. syringae* pv. *garcae* souche pathotype (CFPB 1634) e *P. cichorii* souche pathotype (CFPB 2101) como padrões de referência.

I) Reação de Gram

Colônias bacterianas de morfologia e coloração semelhantes à *P. syringae* pv. *garcae* foram submetidas ao teste de Gram, de acordo com metodologia de Ryu (1940). O método consiste em se fazer esfregaço da colônia bacteriana em lâmina de vidro contendo 4-5 gotas de solução de KOH (3,5%), homogeneizando com alça de platina e verificar a formação de um fio gelatinoso entre a alça e a lâmina. O isolado foi considerado Gram-negativo, quando a preparação se tornou viscosa (Ryu, 1940; Powers, 1995).

II) Anaerobiose

Isolados candidatos foram cultivados em meio 523 líquido a 28°C por 24 horas. Posteriormente 100 µL do meio de cultura foram transferidos para placas de petri contendo meio 523 e distribuídos na superfície com auxílio de alça de Drigalski. Uma lamínula de vidro esterilizada foi colocada no centro de cada placa, e armazenadas em

incubadora a 28°C por 24 horas. Isolados bacterianos que não cresceram sob a lamínula foram considerados aeróbios estritos.

III) Teste de oxidase

Isolados candidatos a PSG foram cultivados em meio 523 a 28°C por 24 horas. Tiras de papel de filtro foram umedecidas em solução recém-preparada de tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%). Com auxílio de alça de platina em aro foi transferida uma porção do crescimento bacteriano para o papel umedecido. Considerou-se resultado positivo para o teste, se após 10 segundos o papel apresentou cor roxa, e o resultado foi considerado negativo se, após 60 segundos, o papel continuar na cor branca (Schaad et al., 2001).

IV) Liquefação da gelatina

Foram preparados tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de gelatina (3g de Extrato de carne, 5g de Peptona, 120g de gelatina (sem sabor) e 1000 ml de H₂O destilada) (Maringoni, 2010). Com auxílio de uma alça de platina reta, fez-se a repicagem dos isolados bacterianos perfurando-se a superfície do meio de cultura (3 tubos/isolado). O tratamento testemunha foi constituído por três tubos contendo meio de cultura não inoculado. Os tubos foram incubados a 28°C, e a avaliação realizada aos 21 dias após a inoculação. Antes das avaliações os tubos foram armazenados a 4°C por 30 minutos. Foram consideradas reações positivas para hidrólise da gelatina os isolados em que o meio manteve-se liquefeito após refrigeração (Schaad et al., 2001).

V) Produção de pigmento em meio King B

Esse teste é utilizado para diferenciar as bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. como pertencentes ao grupo fluorescente ou das não fluorescentes (Schaad et al., 2001). O meio apresenta a seguinte composição: 20g de Peptona, 1,5g de K₂HPO₄, 1,5g de MgSO₄, 15 ml de glicerol, 15 g de Agar e 1000 ml de H₂O destilada. Após preparo do meio, foram colocados aproximadamente 10 ml de meio em cada placa de Petri. O inóculo de cada isolado a ser testado foi semeado na forma de estria composta na superfície do meio contido nas placas, com o auxílio de uma alça de repicagem. Em seguida foram levados para incubadora à temperatura de 28°C durante 48 horas. Uma placa contendo meio de cultura King B não inoculado também foi submetida às mesmas condições.

Os isolados que foram capazes de produzir pigmento fluorescente, tornaram o meio com uma coloração esverdeada e fluorescente, quando vistas sob luz ultra-violeta, considerando-se um resultado positivo para o teste. Se o meio não adquiriu estas características o resultado foi tido como negativo. A pigmentação foi comparada com a placa controle.

VI) Testes moleculares - Análise da diversidade genética por BOX-PCR

- Extração do DNA

Para a extração do DNA total do genoma bacteriano utilizou-se o protocolo modificado de Ausubel et al. (1992). Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas, cultivadas sob agitação por 24 h a 28 °C em meio líquido Kado 523 (Kado; Heskett, 1970), de cada isolado foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 567 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 1mM EDTA), 30 µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos parcialmente imersos em água aquecida (37° C) por 1 hora. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, seguindo-se de agitação em vórtex. Novamente foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguindo-se de agitação em vórtex. Os tubos foram incubados parcialmente imersos em água aquecida (65 °C) por 10 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente (25 °C). Foram adicionados 780 µL de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, seguindo-se de agitação manual por 10 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após este processo, a fase superior foi transferida para novo tubo, medindo-se o volume (500 µL). Nesta etapa, adicionou-se 300 µL de álcool isopropílico e misturou-se até o DNA precipitar. Novamente procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e posterior descarte do etanol 70%. O pellet foi ressuscitado em 60 µL de tampão TE e armazenado a -20 °C.

- BOX-PCR

Para a identificação genética dos isolados provenientes das sementes de cafeeiro foi utilizada a técnica de rep-PCR com o *primer*

correspondente à região BOX, (BOXAIR 5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Koeuth et al., 1995). A reação foi realizada com volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 0,5 µL do *primer*; 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 2 µL de DNA e 18 µL de água livre de nuclease.

A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, com as seguintes etapas: Desnaturação inicial na temperatura de 95°C por 2 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C por 5 min com um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X e corados com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL) e os isolados PSG e PC foram utilizados como padrões de referência.

RESULTADOS

Houve sintomas de mancha aureolada nas folhas de plantas de café inoculadas com o extrato de sementes de plantas sintomáticas (Figura 1C), semelhantes aos desenvolvidos por folhas inoculadas com suspensão de inóculo do isolado padrão de referência PSG (CFPB1634) (Figura 1B); enquanto as mudas inoculadas com extrato de sementes de plantas assintomáticas não apresentaram sintomas (Figura 1A). Os sintomas observados nas folhas foram pequenas lesões irregulares,

inicialmente com aparência de anasarcas, ou seja, o tecido apresentava aspecto encharcado ao redor do ponto de inoculação. A área de tecido encharcado aumentou ao longo do tempo e posteriormente desenvolveu halo de coloração amarela ao redor das lesões, sintoma característico da mancha aureolada. Plantas testemunhas inoculadas com solução salina estéril permaneceram sadias e não foram observados sintomas semelhantes ao isolado padrão PC. A origem bacteriana da doença foi confirmada por teste de exsudação em gota e o agente etiológico isolado em meio de cultura. Isolamentos, a partir das folhas inoculadas e sintomáticas, resultaram em colônias morfológicamente semelhantes às do isolado padrão de referência PSG.

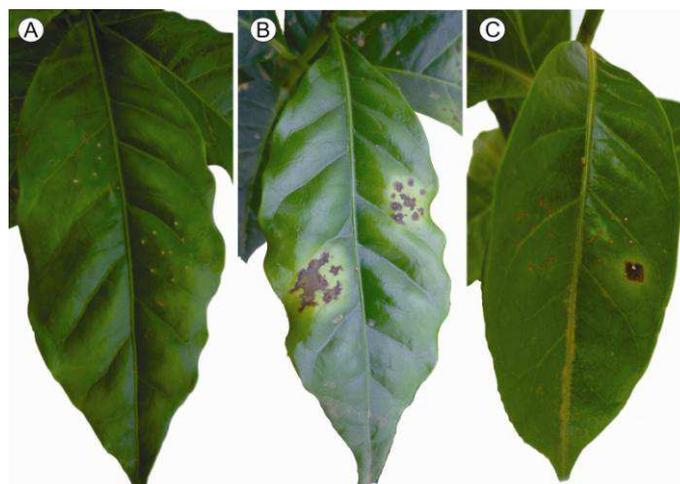


Figura 1. Sintomas em folhas de cafeeiro aos 10 dias após inoculação via multiagulhas com extrato bruto de sementes provenientes de plantas assintomáticas (A); isolado referência *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* souche pathotype (CFPB1634) (B) e extrato bruto de sementes provenientes de plantas com sintomas de mancha aureolada (A).

Devido à semelhança morfológica das colônias bacterianas com o isolado PSG padrão de referência, foram selecionados 13 isolados, candidatos a *P. syringae* pv. *garcae*. As colônias apresentaram coloração branco/creme, com bordos irregulares, achatadas, não viscosas. Ao longo do tempo observou-se no meio de cultura a ocorrência de pigmento marrom ao redor da colônia.

Dentre os 13 isolados selecionados, quatro isolados (B1, 9P, 10P e 12P) foram positivos para a reação de hipersensibilidade. Folhas de plantas de tomateiro, fumo, couve e pimentão desenvolveram reação de hipersensibilidade (HR) após 24 horas da inoculação com suspensão de inóculo dos respectivos isolados, assim como quando inoculadas com os isolados padrões PSG e PC, demonstrando serem fitopatogênicos (Tabela 1). Confirmando a patogenicidade dos isolados B1, 9P, 10P e 12P, apenas as folhas de mudas de cafeeiro inoculadas com as respectivas suspensões de inóculo reproduziram os sintomas de mancha aureolada descritos anteriormente para as plantas inoculadas com o extrato bruto das sementes, assim como os sintomas induzidos pelo isolado PSG padrão de referência (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes bioquímicos e de patogenicidade de isolados bacterianos provenientes de sementes de cafeeiro, e de isolados bacterianos de referência pertencentes ao gênero *Pseudomonas*

Testes*	Isolado					
	PC	PSG	B1	9P	10P	12P
Gram	-	-	-	-	-	-
Aerobiose	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-
Liquefação da gelatina	-	+	+	+	+	+
Produção de pigmento fluorescente	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidade em folhas de fumo	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidade em folhas de tomateiro	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidade em folhas de couve	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidade em folhas de pimentão	+	+	+	+	+	+
Reprodução dos sintomas em folhas de cafeeiro	+	+	+	+	+	+

*Descritos por Lelliott et al. (1966); Wilkie e Dye (1973), Rodrigues Neto et al. (1981), Schaad et al. (2001) e Maringoni (2010); PC e PSG: respectivamente, isolados *Pseudomonas cichorii* souche patothype (CFPB 2101) e *P. syringae* pv. *garcae* souche patothype (CFPB 1634) utilizados como padrões de referência; B1, 9P, 10P e 12P: isolados bacterianos provenientes de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). (+) Reação positiva do teste; (-) reação negativa do teste.

Bioquimicamente, os isolados provenientes de sementes de cafeeiro, assim como os isolados padrões de referência PSG e PC, são Gram negativos, aerobiontes estritos e produzem pigmento fluorescente quando expostos à luz ultravioleta (Tabela 1). Esses isolados (B1, 9P, 10P e 12P) assemelham-se ao isolado padrão PSG quanto à reação de oxidase negativa e capacidade de liquefação da gelatina, no entanto, se diferem do isolado padrão PC (oxidase positiva e incapacidade de liquefação da gelatina) (Tabela 1).

Além das características bioquímicas (Tabela 1), os isolados provenientes das sementes de cafeeiro também apresentaram padrões moleculares iguais ao isolado padrão PSG (Figura 2). Houve pareamento entre os produtos da reação de BOX-PCR desses isolados com os produtos da reação do isolado padrão PSG, diferindo-se do isolado padrão PC (Figura 2). Os isolados foram classificados como da espécie *P. syringae* pv. *garcae* e encontram-se depositados na coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

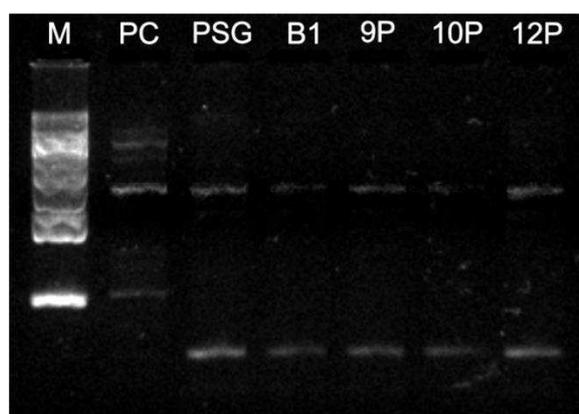


Figura 2. Produtos da reação de BOX-PCR (Reação da polimerase em cadeia) de isolados bacterianos provenientes de sementes de cafeeiro, e de isolados bacterianos de referência pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. PC e PSG: respectivamente, isolados *Pseudomonas cichorii* souche patothype (CFPB 2101) e *P. syringae* pv. *garcae* souche patothype (CFPB 1634) utilizados como padrões de referência; B1, 9P, 10P e 12P: isolados bacterianos provenientes de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.); M: marcador de 1 kb.

DISCUSSÃO

A inoculação em folhas de cafeeiro, do extrato de sementes de plantas infectadas, resultou em sintomas de mancha aureolada, porém esses sintomas não foram observados com a inoculação do extrato das sementes de plantas assintomáticas. Nesse caso não houve contaminação das sementes com inóculo proveniente de fontes externas após a colheita, beneficiamento e armazenamento. Logo, o inóculo bacteriano contido nas sementes tendo sido proveniente das plantas matrizes infectadas de onde foram colhidos os frutos foi responsável por esses sintomas. De forma semelhante, Parachar e Leben (1972) utilizaram sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) aparentemente saudáveis, mas que haviam sido colhidas em lavouras onde o patógeno *P. s. pv. glycinea* estava presente, e verificaram que o patógeno manifestava-se causando doença nas plantas geradas a partir das sementes, quando era exposto às condições ideais de infecção. Dessa forma, sementes mesmo que visualmente não manifestem a presença do patógeno, como ocorreu com as sementes de cafeeiro utilizadas nesse estudo, podem ser efetivas na disseminação de fitobacterioses (Parashar e Leben, 1972; Silva et al., 2002; Romeiro, 2005; Corrêa et al., 2008; Silva et al., 2013).

Por esses resultados, verificou-se que sementes de cafeeiro colhidas de plantas sintomáticas podem disseminar *P. syringae* pv. *garcae*. Sementes em geral constituem meio ideal de sobrevivência e disseminação de fitobactérias, podendo essas permanecerem viáveis, associadas às sementes por períodos variáveis (Schuster e Sayre, 1967, Schaad, 2001; Silva et al., 2002; Corrêa et al., 2008, Romeiro, 2005).

Além disso, podem ser disseminadas, de forma eficiente, a longas distâncias e introduzidas em áreas onde a doença não existe ou ainda servir como fonte de inóculo inicial para epidemias em viveiros e/ou campo (Neergaard, 1979). Os quatro isolados bacterianos (B1, 9P, 10P e 12P) provenientes das sementes e patogênicos ao cafeeiro apresentaram padrões bioquímicos semelhantes ao isolado padrão PSG. Essa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, apresenta crescimento adequado em meio de cultura King B na temperatura de 28°C (King et al., 1954), colônias de coloração branco/creme e bordos irregulares (Lelliott et al., 1966; Rodrigues Neto et al., 1981; Korobko et al., 1997; Moore et al., 2006; Zoccoli et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). *P. syringae* pv. *garcae* enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes, é positiva para hidrolise de gelatina e hipersensibilidade em fumo e negativa para oxidase (Lelliott et al., 1966; Rodrigues Neto et al., 1981; Bradbury, 1986; Schaad et al., 2001; Barta e Willis, 2005; Zoccoli et al., 2011). Os isolados brasileiros produzem em meio King B pouco pigmento fluorescente, mas também pigmento marrom não fluorescente resultante da produção de melanina e difusível em meio de cultura King B, causando o escurecimento do mesmo (Kairu, 1997; Barta e Willis, 2005). Quanto à patogenicidade, diversas espécies do gênero *Coffea* são hospedeiras naturais de *P. syringae* pv. *garcae* (Lelliott et al., 1966).

Em relação à caracterização molecular, os quatro isolados selecionados (B1, 9P, 10P e 12P) apresentaram padrões semelhantes ao isolado referência PSG (CFPB1634). A técnica rep-PCR, utilizada para tal comparação, é internacionalmente reconhecida e aplicada para caracterizar estirpes bacterianas, e consiste na determinação do perfil de

DNA após a amplificação com *primers* (oligonucleotídeos) relacionados a regiões repetitivas e conservados do DNA, em geral no espaço intergênico (Versalovic et al., 1994; de Bruijn, 1992). Nesse estudo foi utilizado primer para a região BOX (Koeuth et al., 1995). Entre as famílias de elementos repetitivos do genoma, a subunidade boxA é conservada em bactérias (Koeuth et al., 1995). Desse modo, Hungria et al. (2008) utilizam e recomendam essa técnica para comparação dos materiais genéticos de coleções bacterianas. Nesse caso, foi possível classificar os isolados bacterianos provenientes das sementes de cafeeiro devido às semelhanças com os padrões bioquímicos e moleculares do isolado souche patotype (CFPB1634), padrão de referência da espécie *P. syringae* pv. *garcae*.

Ressalta-se que estudos adicionais são necessários e estão sendo desenvolvidos para esclarecer a relação entre quantidade de inóculo de *P. syringae* pv. *garcae*, sua localização nas sementes de cafeeiro, e os efeitos a partir dessa interação.

CONCLUSÃO

Sementes de cafeeiro provenientes de plantas com sintomas de mancha aureolada podem conter inóculo viável de *P. syringae* pv. *garcae*.

REFERÊNCIAS

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

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, 1992.

BACILIO-JIMENEZ M; AGUILAR-FLORES S; DEL VALLE MV; PEREZ A; ZEPEDA A; ZENTENO E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 33, p. 167-172, 2001.

BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striaefaciens*, and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 1, p. 492-499, 2005.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: C.A.B. International, 1986. 332p.

BRASIL. Manual de Análise Sanitária de Sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009, 200p.

CARMO, M. G. F.; CORREA, F.M.; CORDEIRO, E. S.; CARVALHO, A. O.; ROSSETTO, C. A. V. Tratamentos de erradicação de

Xanthomonas vesicatoria e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.579-584, 2004.

CARMO, M. G. F.; MAFFIA, L. A.; KIMURA, O.; CARVALHO, A. O. Disseminação da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.85-93, 1996.

CORREIA, F. M.; CARVALHO, A. O.; CARMO, M. G. F. Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.71-75, 2008.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

GOTO M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego, Academic Press. 1992, 341p.

GUTHRIE, J. W. Factors influencing halo blight transmission from externally contaminated *Phaseolus vulgaris* seed. **Phytopathology**, v.60, p.371-372, 1970.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX- PCR. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2008. 12 p.

JONES JB; LACY GH; BOUZAR H; STALL RE; SCHAAD NW. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.755-762, 2004.

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

KAIRU, G. M. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant Pathology**, Berlim, Coffee Research Foundation, P.O. Box 4, Ruiru, Kenya, v.46, p.239–246, 1997.

KING, E. O.; RANEY, M. K.; WARD, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.44, n. 1, p.301-307, 1954.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation supports the mosaic nature of interspersed repetitive BOX elements in bacteria. **Genome Research**, v.5, n. 4, p.408-18, 1995.

KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: RUDOLDH, K.; BURR, T. J.; MANSFIELD, J. W.; STEAD, D.; VIVIAN, A.; VON KIETZELE, J. ***Pseudomonas syringae* and related pathogens**. Netherlands Springer, 1997, p. 538-541.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, v.29, n.3, p.470-489, 1966.

MACHADO, J. C., LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Zurich. International Seed Testing Association. 2002.

MARINGONI, A. C. **Técnicas em fitobacteriologia**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2010, 70p.

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

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. 5.ed. London: Mac Milan, 1979. 839p.

NELSON, E. B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review Phytopathology**, v.42, p.271-309, 2004.

PARASHAR, R.D.; LEBEN, C. Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lot. **Phytopathology**. v.62, p.1075-1077, 1972.

POWERS, E, M. Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeast. **Applied And Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p.3756–3758, 1995.

RAIMUNDI, M. K. Caracterização e identificação de isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras - MG, 79p.

RODRIGUES NETO, J.; FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R.; ROBBS, C. F. *Pseudomonas andropogonis* (SMITH, 1911) STAPP, 1928, agente causal da “mancha escura bacteriana” em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v.48, n. 1-4, p.31-36, 1981.

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

ROMEIRO RS. 2005. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV. 417p.

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

SCHAAD NW; FORSTER RA. Semi-selective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. **Seed Science and Technology**, v.8, p.383-391, 1982.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant Pathogen Bacterias**. 3 ed. Saint Paul APS Press, 2001. 373 p.

SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETLLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. (eds). **Detection of**

bacteria in seed and other planting material. Minneapolis: APS Press.122p.1989.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and others leguminosae. **Phytopathology**, v.57, p.1064-1066, 1967.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. O.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre as sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.587-593, 2002.

SILVA, D. A. G.; CARVALHO, A. O.; PEREIRA, M. B.; OLIVARES, F. L.; CARMO, M. G. F. Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.50-58, 2013.

SILVA, E. M.; REZENDE, J. C.; NOGUEIRA, A. M.; CARVALHO, G. R. In.: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. da. Café Arábica: do plantio à colheita. Lavras: U.R. EPAMIG SM, v.1, 2010. p. 227-282.

SIMON, H. M.; SMITH, K. P.; DODSWORTH, J. A.; GUENTHNER, B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.514-520, 2001.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.472-489, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

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

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

ARTIGO 3 - Microanálise de raios-x como ferramenta para localizar nutrientes em tecidos de folhas de cafeeiro com lesões de doenças foliares.

Preparada em concordância com as normas do periódico

“Microscopy and Microanalysis”.

(Versão preliminar – submetido)

Leônidas Leoni Belan¹, Edson Ampélio Pozza¹; Marcelo Loran de Oliveira Freitas¹; Adélia Aziz Alexandre Pozza²; Mário Sobral de Abreu¹,
Eduardo Alves¹

Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de ciências do solo, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil

RESUMO - Conhecer a constituição e distribuição dos nutrientes nos tecidos vegetais pode esclarecer alguns mecanismos de ataque dos patógenos às plantas, de defesa das plantas contra a infecção; e dessa forma auxiliar nas estratégias de manejo. O objetivo desse estudo foi aplicar a microanálise de raios-X (MAX) para verificar diferenças na distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de folhas de cafeeiro em torno de lesões de doenças foliares. Fragmentos de tecido de folhas em torno das lesões foram desidratados em sílica gel, receberam cobertura de carbono e submetidos à MAX. Foram detectados 34 elementos químicos presentes nos tecidos foliares, no entanto, houve variação nos teores de potássio e cálcio em torno das lesões de doenças. Maior teor de potássio foi encontrado nos tecidos assintomáticos em torno das lesões, decrescendo em direção à zona de transição, e atingindo teor mínimo no tecido sintomático. Maior teor de cálcio foi encontrado nos tecidos sintomáticos, decrescendo em direção aos tecidos da zona de transição, e atingindo teor mínimo no tecido assintomático. Logo, a MAX pode ser utilizada para a análise de composição e distribuição de nutrientes em tecidos vegetais, e associada à nutrição mineral pode auxiliar no entendimento das relações patógeno-hospedeiro e manejo de doenças de plantas.

Palavras-chaves: Microanálise de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, doenças de plantas, nutrição mineral, fitopatologia, composição elementar.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira é uma atividade agrícola de impacto significativo no comércio mundial de commodities. O Brasil tem a maior produção de *Coffea arabica* L., e a segunda maior de *C. canephora* Pierre ex. Froehn (United States Department Of Agriculture, 2014). Porém, vários fatores contribuem para reduzir essa produção. Entre as causas de perdas na lavoura cafeeira destacam-se as doenças causadas por fungos, como a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) a mancha-de-phoma (*Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen,) e a mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) (Acuña et al., 1998; Carvalho; Chalfoun, 1998; Ferreira et al., 2005; Pozza et al, 2010), além daquelas de etiologia bacteriana, como a mancha aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al., 1956) Young, Dye & Wilkie 1978) (Pozza et al, 2010). A necessidade do manejo intensivo de doenças em lavouras cafeeiras tem levado ao aumento no número de pulverizações com defensivos agrícolas, refletindo no custo de produção, além de reduzir a sustentabilidade ambiental.

Entre as alternativas disponíveis para reduzir a aplicação de defensivos químicos, pode-se aprimorar o manejo da fertilidade do solo com o objetivo de melhorar o equilíbrio nutricional das plantas. Dessa forma, é favorecida a formação de barreiras de resistência, como a camada de cera na cutícula e a parede celular, as quais se tornam mais espessas e rígidas, dificultando a penetração e colonização de patógenos, além de incrementar outras barreiras de defesa, como as químicas (Pozza

e Pozza, 2012; Taiz e Zieger, 2013). Alguns estudos demonstraram os efeitos de nutrientes em vários patossistemas (Biggs et al., 1997; Biggs, 1999; Bécot et al., 2000; Pozza et al., 2001; Garcia Júnior et al., 2003; Balardin et al., 2006; Pozza et al., 2004; Moraes et al., 2006; Santos et al., 2008; Lima et al., 2010), mas seu modo de transporte ou sua dinâmica inter ou intracelular, principalmente em nível histológico, ainda não foi esclarecida em vários patossistemas. Conhecer a distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de plantas pode auxiliar a entender os mecanismos de infecção e colonização de fitopatógenos, assim como os de defesa de plantas contra a infecção, e dessa forma auxiliar a elaborar estratégias de manejo.

A avaliação do estado nutricional das plantas é realizada com base na composição de minerais nos tecidos vegetais, por meio de análise química foliar (Martinez et al., 2003). Embora esse método forneça o teor de minerais no tecido, não indica a sua localização nos tecidos foliares. A micronanálise de raios-X (MAX) é uma ferramenta capaz de detectar essa localização. A MAX consiste em quantificar raios-X emitidos de uma região da amostra bombardeada por um feixe de elétrons em um microscópio eletrônico. A emissão é específica do número atômico da amostra e, o seu comprimento de onda ou sua energia são utilizados para identificar o elemento mineral emissor da radiação (Dedavid et al., 2007). Essa técnica tem sido utilizada com sucesso para estudar a distribuição dos elementos minerais em diferentes órgãos vegetais (Bowen et al., 1992; Samuels et al., 1991a,b; Lux et al., 2002; Pozza et al., 2004; Moraes et al., 2006; Leite; Andersen, 2009; Freitas, 2014). No cafeeiro, Pozza et al. (2004) empregando a MAX observaram a distribuição de

silício (Si) em folhas provenientes de plantas cultivadas com ou sem a fertilização desse nutriente, porém não estudaram sua distribuição em tecidos infectados por *Cercospora coffeicola*. Além disso, Freitas (2014) caracterizou o padrão de distribuição de nutrientes minerais em folhas de cafeeiro com lesões de mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) e cercosporiose. Já em folhas de videira e pepino, Bowen et al. (1992) e Samuels et al. (1991a,b) observaram via MAX, concentração de Si nos tecidos da epiderme em torno dos patógenos *Uncinula necator* e *Sphaerotheca fuliginea*, restringindo o processo infeccioso.

Para outros ions, Sugimoto et al. (2009, 2010) estudaram a fertilização com nitrato de potássio e fontes de cálcio na redução da podridão radicular em soja (*Phytophthora sojae* (Kauffm. & Gerd.)). Utilizando a análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura (MEV) combinada ao mapeamento dos elementos (MAX) presentes em cortes transversais do caule das plantas, os autores demonstraram acúmulo de potássio e cálcio na região da medula, no xilema, floema e córtex, formando um sítio de inibição à penetração do patógeno. Apesar de detectarem, essa diferença, os autores não estudaram a distribuição e a dinâmica dos nutrientes entre os tecidos saudáveis e com sintomas da doença.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo aplicar a MAX para verificar diferenças na distribuição dos nutrientes nos tecidos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em torno de lesões de doenças foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material biológico para análise

Folhas com lesões de mancha aureolada (*P. syringae* pv. *garcae*), mancha de phoma (*Phoma tarda* (R.B. Stewart) H. Verm) e ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) foram coletadas no terceiro par de folhas em ramos plagiotrópicos de cafeeiros (Martinez et al., 2003) com quatro anos de idade, da cultivar Catucaí Amarelo 2SL. A lavoura está localizada no município de Santo Antônio do Amparo – MG (20°53'23,7"S e 44°52'56,9"O). Todas as lesões foram provenientes de inoculação natural ocorrida em campo. Uma amostra padrão de tecido lesionado foi retirada e utilizada para o teste de exsudação em gota, isolamento e identificação dos agentes etiológicos das doenças.

Fragmentos do limbo foliar com 5 mm de comprimento foram coletados nas bordas das lesões, de forma a conter respectivamente áreas com tecidos assintomáticos, zona de transição apresentando ou não halo de cor amarela, e tecidos sintomáticos. Perfurações feitas com alfinete entomológico nos fragmentos de folhas foram utilizadas para delimitar as regiões dos fragmentos de folhas durante as análises microscópicas. Foram preparados 10 fragmentos de folhas com lesão para cada doença e 10 fragmentos de folhas sadias (assintomáticas).

Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de raios X (MAX)

Os fragmentos de folhas foram aderidos sobre suportes de alumínio “stubs” com o auxílio de fita adesiva de carbono dupla face e

devidamente identificados. Esses espécimes foram mantidos em dessecador contendo sílica gel por 24 horas para desidratação. Posteriormente, foram levados ao aparelho ‘sputtering’ (MED 010) (Balzers, Liechtenstein, Germany) e cobertos com camada de carbono. Posteriormente as amostras foram observadas em MEV (Leo Evo 40 XVP) (Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK), acoplado ao sistema de detecção MAX: EDS-X Flash Detector 5010 (Bruker, Berlin, Germany) e analisado usando o software, ESPIRIT 1.9 (Bruker).

Foram delimitados perfis sobre as amostras representando áreas com tecidos assintomáticos, zona de transição e tecidos sintomáticos. Nesses perfis foi realizado mapeamento qualitativo dos elementos minerais constituintes dos tecidos das amostras. Também foi quantificada a distribuição dos elementos minerais ao longo de uma linha (100 pontos) traçada no perfil. As imagens foram geradas e capturadas digitalmente, nas condições de trabalho de 20 Kv, distância de 8,5 mm, aumento de ± 80 vezes e Kcps variando entre 3 e 4.

Os dados da quantificação dos nutrientes minerais (%) por ponto foram tabulados utilizando-se o software Microsoft[®] Excel[®] 2010. Os nutrientes que apresentaram variação na sua distribuição ao longo do perfil foram selecionados e preparados gráficos de distribuição desses elementos. As imagens foram diagramadas no ‘Software Photopaint[®]’ do pacote ‘Corel Draw 12[®]’ e os gráficos preparados utilizando-se o programa ‘SigmaPlot[®]’, versão 12.0.

Patossistemas		Tecido assintomático	Zona de Transição	Tecido sintomático
Mancha aureolada	Regiões amostradas			
	Mapeamento para K			
	Mapeamento para Ca			
Mancha de phoma	Regiões amostradas			
	Mapeamento para K			
	Mapeamento para Ca			
Ferrugem	Regiões amostradas			
	Mapeamento para K			
	Mapeamento para Ca			

Figura 2. Microanálises de Raios-X (MAX) para mapeamento de potássio (K) e cálcio (Ca) em tecidos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) com lesões de doenças foliares: Mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), mancha de phoma (*Phoma tarda*) e ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

Houve incremento do teor de potássio nos tecidos assintomáticos e redução do mesmo nos tecidos sintomáticos quando comparados aos tecidos de folhas saudáveis (Figura 3). Em todos os patossistemas analisados, áreas dos tecidos foliares assintomáticos, ao redor das lesões, apresentaram maior teor de potássio (%), reduzindo gradativamente até os tecidos sintomáticos (Figura 3). Já a distribuição do cálcio foi inversa à

do potássio em torno das lesões necróticas (mancha aureolada e mancha de phoma), ocorrendo em maior teor (%) nos tecidos necrosados pela doença e decrescendo até os tecidos assintomáticos (Figura 3). Nesses casos, a inversão nos teores de potássio e cálcio ocorreu na região de transição entre o tecido necrosado e o halo amarelo (Figuras 2 e 3). Para o patossistema ferrugem, cujas lesões foliares não apresentavam necrose, não houve inversão nos teores desses elementos entre os tecidos sintomáticos e assintomáticos. Para esse patossistema, o comportamento do potássio foi o mesmo em relação às outras doenças, com maiores teores nos tecidos assintomáticos, reduzindo até a área lesionada.

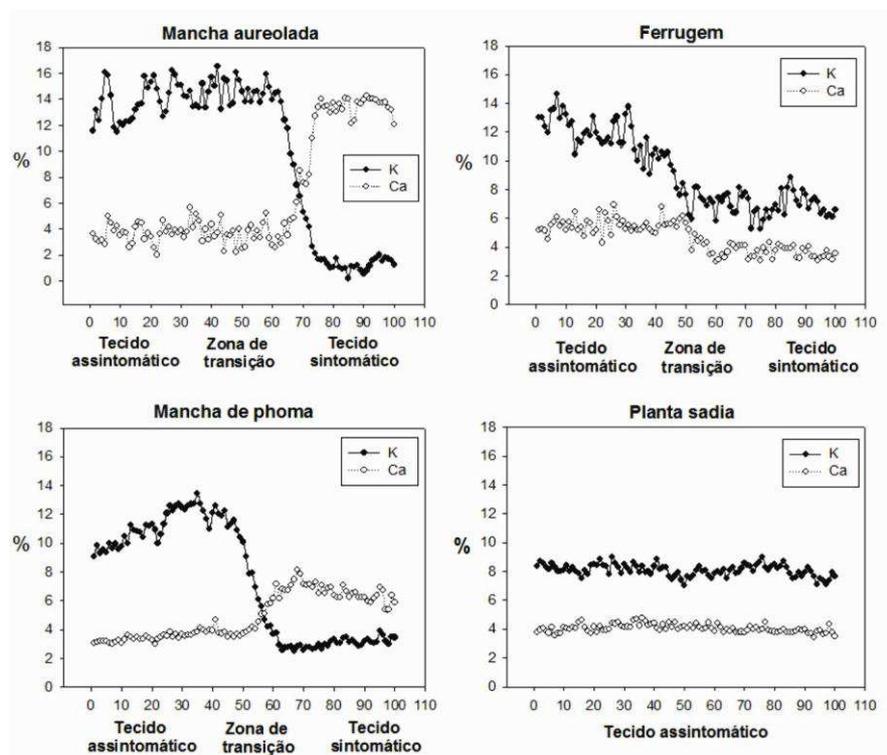


Figura 3. Distribuição dos nutrientes minerais potássio (K) e cálcio (Ca) em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) assintomáticas e com lesões de doenças foliares: Mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), mancha de phoma (*Phoma tarda*) e ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Amostras de folhas de plantas infectadas continham tecidos da região assintomática, zona de transição e tecidos sintomáticos.

DISCUSSÃO

Com a MAX foi possível identificar os elementos minerais na composição dos tecidos, além do gradiente de potássio e cálcio em torno de lesões de diferentes patógenos foliares do cafeeiro. Até então, a técnica

havia sido utilizada em estudos com a cultura do cafeeiro para descrever a distribuição do silício nas folhas de plantas cultivadas em solo com adição desse elemento e seu efeito sobre a redução da cercosporiose (Pozza et al., 2004). A distribuição dos elementos minerais em folhas de cafeeiros durante o estágio fisiológico de transição entre tecido assintomático para o sintomático nesses patossistemas ainda não havia sido estudada. Até então, apenas Freitas (2014) havia caracterizado o padrão de distribuição de nutrientes minerais em torno de lesões foliares de mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) do cafeeiro.

A MAX tem sido aplicada com eficiência em diversas áreas da ciência. Lux et al., 2002 utilizaram MAX para estudar a relação entre acúmulo de silício nos tecidos de raízes e folhas de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) e resistência à seca. Em analogia, a MAX tem proporcionado avanços nos estudos fitopatológicos. Assim como nesse estudo, outros pesquisadores têm utilizado essa técnica para elucidar o efeito de elementos minerais na interação patógeno-hospedeiro e seus efeitos no progresso de doenças de plantas em outros patossistemas (Bowen et al., 1992; Samuels et al., 1991a,b; Pozza et al., 2004; Moraes et al., 2006; Leite; Andersen, 2009; Sugimoto et al., 2009; Freitas, 2014). Pozza et al., 2004 utilizaram a MAX para avaliar quais os possíveis fatores de resistência associados ao silício no controle da cercosporiose do cafeeiro. Esses autores realizaram o mapeamento de silício e verificaram distribuição uniforme do elemento na superfície abaxial das folhas de mudas de cafeeiro fertilizadas com esse elemento, porém não estudaram outros nutrientes e também sua distribuição em tecidos

infectados por *C. coffeicola*. Aplicando essa técnica de forma semelhante, Blanchette (1984), Leite e Andersen (2009) e Freitas (2014) estudaram a composição mineral de amostras de tecidos vegetais infectados por fitopatógenos. Blanchette (1984) realizou MAX para analisar fragmentos de madeira deteriorados por fungos causadores de podridão branca, e detectou acúmulo de manganês em manchas negras nesses fragmentos, além de relação espacial com deslignificação seletiva da madeira. Por sua vez, Leite e Andersen (2009) analisaram as diferenças químicas entre tecido de folhas de videira assintomáticas e aqueles com sintomas típicos da doença de Pierce (*Xylella fastidiosa*), e observaram acúmulo de silício nos tecidos lesionados. Freitas (2014) verificou a existência de gradiente de distribuição de potássio e cálcio em tecidos de cafeeiro localizados em torno de lesões foliares de mancha manteigosa e cercosporiose. Nota-se que até então a MAX havia sido aplicada para avaliar a distribuição de nutrientes a partir de áreas doentes até áreas assintomáticas apenas para dois patossistemas do cafeeiro (Freitas, 2014).

Como os dados gerados pela MAX foi possível observar diferenças na distribuição de potássio e cálcio nas folhas com sintomas em relação às saudias, e também respostas diferenciais entre patógenos causadores de lesões necróticas e não necróticas certamente devido à especificidade da relação patógeno-hospedeiro (Marschner, 2012; Taiz & Zieger, 2013). Diante do fato que pode haver interação entre nutrientes durante o processo infeccioso e consequente resposta de defesa do hospedeiro (Marschner, 2012; Pozza e Pozza, 2012; Taiz & Zieger, 2013), ressalta-se a importância de estudos para avaliar a diversidade e as interações entre elementos minerais nos tecidos vegetais.

A maior concentração de potássio nos tecidos assintomáticos em torno das lesões patogênicas em folhas de cafeeiro está relacionada à sua mobilidade. Em alguns patossistemas, durante o processo de infecção e colonização dos tecidos vegetais, fungos e bactérias produzem e liberam enzimas que atuam na degradação da parede celular e aumentam sua permeabilidade, podendo culminar no desenvolvimento de lesões necróticas (Sakai et al., 1982; Durbin, 1991; Swings e Civerolo, 1993; Bender et al., 1999; Agrios, 2005; King et al., 2011; Choi et al., 2013) conforme observado nos patossistemas mancha aureolada e mancha de phoma. Nesse caso, devido à necrose e rompimento de membranas, ou simplesmente o parasitismo, ocorreu migração desse elemento, dos tecidos infectados para áreas saudas ao redor das lesões, quando comparada a folhas saudas. Além disso, o potássio, nas áreas ao redor do tecido necrosado pode estar envolvido em reações de defesa da planta (Amtmann et al., 2008; Taiz e Zeiger, 2013), osmorregulação, síntese de carboidratos e proteínas, ativação de enzimas, transporte de outros nutrientes através de membranas e neutralização de ânions, correlacionando-se com índices de performance fisiológica e crescimento da planta (Epstein e Bloom, 2004; Marschner, 2012),

Já para o cálcio, o comportamento foi inverso ao do potássio, principalmente no caso de patógenos causadores de lesões necróticas (*P. syringae* pv *garcae* e *P. tarda*), ocorrendo maior concentração desse cátion em áreas com sintomas de necrose. Esta resposta está condizente com os resultados observados por Freitas (2014) em lesões necróticas de cercosporiose em folhas de cafeeiro. Esse fato pode ser explicado devido à homeostase ou equilíbrio do cálcio intracelular, modulada durante

respostas de defesa das plantas contra patógenos (Bowler e Fluhr, 2000; White e Broadley, 2003; Taiz e Zeiger, 2013). O cálcio é deslocado para áreas com necrose, devido à reação de defesa da planta, principalmente quando ocorre rompimento de membranas, pois é essencial na formação de barreiras estruturais e/ou químicas (White e Broadley, 2003; Taiz e Zeiger, 2013), manutenção da integridade da membrana plasmática e seletividade do transporte de íons que elas realizam (Epstein e Bloom, 2004), além de regular processos celulares, desde o controle da transcrição e sobrevivência celular até a liberação de sinais químicos ou mensageiro secundário (Epstein e Bloom, 2004; Taiz e Zeiger, 2013). Muitos dos sinais ambientais mediados por íons cálcio têm origem na natureza do estresse, tanto biótico quanto abiótico, dentre os quais estão inclusos os mecanismos de ataque de fitopatógenos (Epstein e Bloom, 2004). Nesses casos, o teor de cálcio citosólico aumenta em resposta ao reconhecimento pela planta de elicitores raça-específicos proveniente do patógeno ou seu mecanismo de ataque (Grant e Mansfield, 1999; Reddy e Reddy, 2002), bem como por reconhecimento de alguns, patógenos não-específicos ou ferimentos (Chandra e Low, 1997; Knight et al., 1991, Chandra e Low, 1997; Zimmermann et al., 1997; Kawano et al., 1998). Quando se encerram as condições de estresse, a concentração de cálcio livre no citoplasma retorna às concentrações normais (Epstein e Bloom, 2004), nesse caso, em teor semelhante ao contido no tecido assintomático.

Essa inversão nos sítios de concentração desses nutrientes minerais, além da atuação nos mecanismos de defesa das plantas, está relacionada à competição entre cátions Ca^{2+} e K^{+} nos tecidos vegetais (Marschner, 2012). Além da ação individual e direta nos processos celulares, o teor de

cálcio nos tecidos vegetais sofre e exerce influência dos demais elementos (Garcia Junior et al., 2003; Pinheiro et al., 2011, Marschner, 2012; Pozza e Pozza, 2012). De acordo com Marschner (2012) a elevação do teor de potássio, pode interferir na translocação e na disponibilidade fisiológica do cálcio e outros cátions, confirmando os resultados desse estudo. Garcia Junior et al. (2003) justificaram a redução da cercosporiose em mudas de cafeeiro à redução do efluxo de íons potássio, sempre em equilíbrio com o cálcio, para favorecer as reações de defesa. Esses resultados, amparados por MAX, conforme demonstrado nesse estudo, justificam a importância do manejo nutricional das plantas como estratégia de manejo integrado de doenças.

Sendo assim, a MAX foi capaz de detectar a diferença entre cátions essenciais em reações de defesa da planta, auxiliando a explicar os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro.

CONCLUSÕES

Foi possível analisar a distribuição dos nutrientes constituintes dos tecidos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) em torno de lesões de doenças foliares.

Existem variações nos teores de potássio e cálcio nos tecidos de folhas de cafeeiro com lesões de mancha aureolada, mancha-de-phoma e ferrugem.

Maior teor de potássio foi encontrado no tecido assintomático ao redor de todos os patossistemas analisados.

Nas doenças com sintomas de necrose dos tecidos, como a mancha aureolada e mancha de phoma, maior teor de cálcio foi encontrado no tecido necrótico, decrescendo em direção aos tecidos da zona de transição, e atingindo menores teores no tecido assintomático.

Para o patossistema ferrugem, doença sem sintoma necrótico, os teores de cálcio não aumentaram na área infectada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEMIG, à CAPES, à FINEP e ao INCT-Café diante do apoio para realizar as pesquisas.

REFERÊNCIAS

Acuña, R. S.; Zambolim, L.; Cruz, C. D.; Vale, F. X. R. (1998). Estudo epidemiológico da ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) utilizando a análise de trilha. *Fitopatologia Brasileira* 23, 425-430.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Patology*, (5). Elsevier Academic Press, USA San Diego.

Amaral, J. F., Teixeira, C. & Pinheiro, E. D. (1956). A bacterium causing halo blight of coffee. *Arq Inst Biol, Sao Paulo* 23, 151-155.

- Amtmann, A., Troufflard, S. & Armengaud, P. (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant* 133, 682–691.
- Balardin, R. S., Dallagnol, L. J., Didoné, H. T. & Navarini, L. (2006). Influência do Fósforo e do Potássio na Severidade da Ferrugem da Soja *Phakopsora pachyrhizi*. *Fitopatol Bras* 31, 462-467.
- Bécot, S., Pajot, E., Corre, D. L., Monot, C. & Silué, D. (2000). Phytogard (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Prot* 19, 417-425.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 266.
- Biggs, A. R., El-Kholi, M. M., El-Neshawy, S. & Nickerson, R. (1997) Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 81, 399-403.
- Biggs, A.R. (1999). Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Dis* 83, 1001-1005.
- Blanchette, R. A. (1984). Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. *Phytopathology* 74, 725-730.
- Bowen, P., Menzies, J. & Ehret, D. (1992). Soluble silicon spray inhibit powdery mildew development on grape leaves. *J Am Soc Hortic Sci* 117, 906-912.

- Bowler, C. & Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends plant sci* 5, 241–246.
- Carvalho, V. L. & Chalfoun, S. M. (1998). *Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro*. Informe Agropecuário 19, 27-35.
- Chandra, S. & Low, P. S. (1997). Measurement of Ca 21 fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem* 272, 28274–28280.
- Choi, J., Kim, K, Jeon, J. & Lee, Y. (2013). Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes. *BMC Genomics* 14, 2-10.
- Dedavid, B. A., Gomes, C. I. & Machado, G. (2007). *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras*. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS.
- Durbin, R. D. (1991). Bacterial phytotoxins: Mechanisms of action. *Experientia* 47.
- Epstein, E. & Bloom, A. (2004). *Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas*. Londrina, PR: editora Planta.
- Ferreira, J. B., Silva, E. H., Fernandes, K. D., Pereira, R. B., Abreu, M. S. & Pereira, I. S. (2005). Efeito de fungicidas no controle da seca de ramos do cafeeiro (*C.arabica* L.) com mancha manteigosa (*Colletotrichum* spp.). *Fitopatol Bras* 30, 111.
- FREITAS, M. L. O. (2014). Etiologia, inoculação e escala diagramática no patossistema *Colletotrichum* spp. X cafeeiro. 2014, 119p. Dissertação

(Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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. *Fitopatol Bras suppl*, 28, 286-291.

Grant, M., Mansfield, J. (1999). Early events in host–pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2, 312–319.

Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K. & Muto, S. (1998). Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* 39, 721–730.

King, B. C., Waxman, K. D., Nenni, N. V., Walker, L. P., Bergstrom, G. C. & Gibson, D. M. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol Biofuels* 4, 4.

Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M. & Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526.

Leite, B. & Andersen, P. C. (2009). Localized accumulation of silicon (Si) in grape leaves affected by Pierce’s disease. *Microsc Microanal (suppl 2)* 15.

Lima, L. M., Pozza, E. A., Torres, H. N., Pozza, A. A. A., Salgado, M. & Pfenning, L. (2010). Relação nitrogênio/potássio com mancha de Phoma

e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. *Trop Plant Pathol* 35.

Lux, A., Luxova, M., Hattori, T., Inanaga, S. & Sugimoto, Y. (2002). Silicification in sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars with different drought tolerance. *Physiol Plant* 115, 87-92.

Marschner, H. (2012). *The mineral nutrition of higher plants*. 2nd Ed. London: Academic Press.

Martinez, H. E. P., Menezes, J. F. S., Souza, R. B., Alvarez V. V. H. & Guimarães, P. T. G. (2003). Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. *Pesqui Agropecu Bras* 38, 703-713.

Moraes, S. R. G., Pozza, E. A., Alves, E., Pozza, A. A. A., Carvalho, J. G., Lima, P. H. & Botelho, A. O. (2006). Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. *Fitopatol Bras* 31, 69-75.

Pinheiro, J. B., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Moreira, A. S. & Alves, M. C. (2011). Severidade da ferrugem da soja em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Ceres* 58, 43-50.

Pozza, A. A. A., Alves, E., Pozza, E. A., Carvalho, J. G. De, Montanari, M., Guimarães, P.T.G. & Santos, D.M. (2004). Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. *Fitopatol Bras* 29, 185-188.

Pozza, E. A.; Carvalho, V. L. & Chalfoun, S. M. (2010). Sintomas de injúrias causadas por doenças do cafeeiro. In: *Semiologia do cafeeiro*,

Guimarães, R. J., Mendes, A. N. G. & Baliza, D. P. (01) pp. 67-106. Lavras, MG: Editora UFLA.

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. *Pesqui agropecu bras* 36, 53-60.

Pozza, E. A. & Pozza, A.A.A. (2012). Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: *Avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário*, Machado, A. K. F. M., Ogoshi, C., Perina, F. J., Silva, G. M. Neto, H. S., Costa, L. S. A. S., Alencar, N. E., Martins, S. J., Terra, W. C. & Zancan, W. L. A. (1) pp. 259-282. São Carlos, SP: Suprema Gráfica e Editora.

Reddy, A. S. N. & Reddy, V. S. (2002). Calcium as a Messenger in stress signal transduction. In: *Handbook of plant and crop physiology*, Pessarakli, M. (2). pp. 697-733. Dekker, New York.

Sakai, R., Mino, Y. & Hosoi, E., (1982). Effect of coronatine on the induction of cell wall degrading enzymes in potato tuber discs. *Ann phytopath* 48, 52-57.

Samuels, A.L., Glass, A.D.M., Ehret, D.L. & Menzies, J.G. (1991a). Distribution of silicon leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). *Can J Bot* 69, 140-146.

Samuels, A.L., Glass, A.D.M., Ehret, D.L. & Menzies, J.G. (1991b). Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. *Plant Cell Environ* 4, 485-492.

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. *Pesqui agropecu bras* 43,783-791.

Sugimoto, T., Watanabe, K., Furiki, M., Walker, D. R., Yoshida, S., Aino, M., & Irie, K. (2009). The effect of potassium nitrate on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybeans, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. *J phytopathol* 157, 379-389.

Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (1993). Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, Swings J. G. & Civerolo E. L. pp. 130. London: Chapman and Hall.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2013) *Fisiologia vegetal*. (5) pp. 719 Porto Alegre: Artmed.

United States Department Of Agriculture. (2014). Production, Supply and Distribution Online. Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

White, P.J. & Broadley, M.R. (2003). Calcium in plants. *Ann bot* (oxford, U. K.) 92, 487-511.

Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. & Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2751–2755.