



JAQUELINE KIYOMI YAMADA

**RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas*
syringae pv. *garcae* A COBRE**

LAVRAS – MG

2014

JAQUELINE KIYOMI YAMADA

**RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* A
COBRE**

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

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

Coorientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS – MG

2014

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

Yamada, Jaqueline Kiyomi.

Resistência de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao
cobre / Jaqueline Kiyomi Yamada. – Lavras : UFLA, 2014.
49 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Ricardo Magela de Souza.
Bibliografia.

1. Fitopatologia. 2. Controle químico. 3. Cafeeiro. 4. Mancha
aureolada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.953

JAQUELINE KIYOMI YAMADA

**RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* A
COBRE**

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

APROVADA em 30 de julho de 2014.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Dr. César Elias Botelho EPAMIG

Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Aos meus pais, Jorge e Helena, exemplos de vida e determinação que me deram todo o apoio e incentivo para que hoje eu concluísse este trabalho, tornando-me Mestre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar em todas as decisões da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de parte deste trabalho

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

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

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

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

Ao pesquisador da EPAMIG, Dr. César Elias Botelho, pelas sugestões e pela participação na banca examinadora.

Ao professor José da Cruz Machado, por disponibilizar a câmara de crescimento para conduzir meus experimentos.

Ao professor Edson Pozza, por disponibilizar equipamentos para os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Virologia e da Fisiologia do Parasitismo, pelos conselhos, sugestões e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Ana Maria, Flávia, Gustavo, Daniel, Melina, Thiago, Luciana, Kharenn e Ana Flávia pela amizade, colaboração nos trabalhos e pelo ótimo acolhimento.

Aos amigos, Liliana, Arinaldo, Aline, pela amizade e por proporcionarem-nos ótimos momentos.

A minha amiga Brenda, pela ótima convivência, apoio, conselhos e amizade.

À minha mãe, Helena, meu pai Jorge e minha irmã Michelle, pelo carinho, incentivo, apoio e compreensão durante o mestrado.

À minha família, pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado Filipe, pelo amor, compreensão, incentivo, paciência e por tudo que ele fez para amenizar a distância e contribuir para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial Adriana, pela ótima convivência e amizade.

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

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Foram estudados diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro, quanto a resistência a cobre. Nos estudos *in vitro* foram utilizadas duas metodologias. Na metodologia 1 foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura MMCC com diferentes concentrações de cobre: 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 e 0,3 mM de CuSO_4 . Foram preparadas suspensões bacterianas dos 51 isolados testados e ajustadas em espectrofotômetro para a concentração de $1,1 \times 10^9$ ufc/ml. Foram realizadas três repetições de cada tratamento para cada isolado. Na metodologia 2, foi avaliada a resistência dos isolados por contato direto com a solução de cobre nas diferentes concentrações 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM CuSO_4 . A suspensão bacteriana de cada isolado, contendo $1,1 \times 10^9$ ufc/ml, foi colocada, em microtubos de 1,5 ml de volume, com a solução de cobre. Após uma hora, uma alíquota foi depositada e espalhada em placas de Petri com meio King B. Usando-se a metodologia 1 apenas oito isolados sobreviveram à concentração de 0,3 mM, os demais cresceram até 0,25 mM. Usando-se a metodologia 2 três isolados cresceram apenas na concentração 0 mM e 5 isolados na concentração 0,15mM, a maioria apresentou resistência entre 0,05 e 0,1 mM. A partir desses resultados, foram escolhidos dois isolados para serem testados em mudas de café. Os isolados UFLA 150, como resistente, e UFLA 103, como sensível. As mudas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C sob alta umidade. Foram utilizados as cultivares Catuaí e Mundo Novo, três tratamentos, hidróxido de cobre, óxido cuproso e água, e três repetições. As pulverizações dos produtos foram realizadas 2 horas antes das inoculações das suspensões bacterianas de cada isolado na concentração $5,1 \times 10^9$ ufc/ml, nos dias 04 e 17 de julho de 2014. Os primeiros sintomas foram observados no dia 15 de julho para ambas cultivares. Embora o isolado 151 tenha se apresentado como mais agressivo nas plantas sem aplicação de cobre, ele apresentou sensibilidade ao óxido cuproso. O isolado 103 apresentou maior sensibilidade aos dois produtos cúpricos. Foram desenhados primers para a detecção do gene *copA*, responsável pela complexação de cobre em *Pseudomonas syringae*. Os primers foram desenhados a partir das seqüências do gene depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLAST, e todos os isolados estudados apresentaram um fragmento de 900 pb amplificado.

Palavras-chave: Bactéria. Controle químico. Cafeeiro. Mancha aureolada.

ABSTRACT

It was studied different isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, causal agent of bacterial blight of coffee, as resistance to copper. *In vitro* studies two methods were used. In one method Petri dishes containing culture medium MMCC with different copper concentrations were used: 0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25 and 0.3 mM CuSO₄. Bacterial suspensions of 51 isolates tested adjusted in a spectrophotometer for concentration of 1.1×10^9 cfu/ml were prepared. Three replicates of each treatment were made for each isolate. In Method 2, the resistance of the isolated by direct contact with the copper solution at different concentrations was evaluated 0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25 mM CuSO₄. A bacterial suspension of each isolate, containing 1.1×10^9 cfu/ml was placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes with copper solution. After one hour, an aliquot was deposited and spread on Petri plates with King B medium. Using the methodology one only eight strains survived at 0.3 mM concentration, the other increased to 0.25 mM. Using the methodology 2 three isolates grew only in the concentration 0 mM and 5 isolates in 0.15 mM concentration, the majority showed resistance between 0.05 and 0.1 mM. From these results, four isolates were chosen to be tested in coffee seedlings. The UFLA 151 was resistant, and UFLA 103 was sensitive. Seedlings were maintained in growth at 25 ° C under high humidity chamber. Catuaí and Mundo Novo cultivars, three treatments, copper hydroxide, cuprous oxide and water, and three replicates were used. The spraying of the products were performed 2 hours before inoculation of bacterial suspensions of each isolate at a concentration 5.1×10^9 cfu/ml on days 04 and 17 July 2014.'s First symptoms were observed on July 15 for both cultivars. Although isolate UFLA 151 has been presented as more aggressive in plants without application of copper, it showed sensitivity to copper oxide. Isolate UFLA 103 showed greater sensitivity to both cupric products. Primers were designed to detect the *copA* gene responsible for complexation of copper in *Pseudomonas syringae*. Primers were designed from gene sequences deposited in GenBank, using the BLAST program, and all isolates showed a fragment of 900 bp amplified.

Keywords: Bacterial blight. Chemical control. Coffee. Cupric. Resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	A mancha aureolada do cafeeiro.....	12
2.2	Resistência de isolados bacterianos a cobre	16
2.3	Genes de resistência ao cobre	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Procedência dos Isolados bacterianos.....	20
3.2	Metodologia 1: Sensibilidade de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre em meio MMCC	21
3.2.1	Meio de cultura e produtos utilizados.....	22
3.2.2	Preparo das suspensões bacterianas	22
3.2.3	Inoculação e avaliação.....	23
3.3	Metodologia 2: Sensibilidade de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> expostos à solução de sulfato de cobre	23
3.3.1	Meio de cultura e produto utilizado.....	23
3.3.2	Preparo das suspensões bacterianas	23
3.3.3	Inoculação e avaliação.....	24
3.4	Aplicação de cúpricos em mudas de café inoculadas com isolados resistentes e sensíveis de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	24
3.5	Detecção do gene de resistência a cobre, <i>copA</i> , em <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>garcae</i>	26
3.5.1	Extração do DNA plasmidial.....	27
3.5.2	Amplificação dos genes <i>copA</i>	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao sulfato de cobre	29
4.1.1	Metodologia 1: Sensibilidade de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre em meio MMCC	29
4.1.2	Metodologia 2: Sensibilidade de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> expostos à solução de sulfato de cobre	29
4.2	Aplicação de cúpricos em mudas de café inoculadas com isolados resistentes e sensíveis de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	32
4.3	Detecção do gene <i>copA</i>	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro, pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea*, apresenta dentre as espécies mais cultivadas a *Coffea arabica* e *C. canephora*. No Brasil, a produção de *C. arabica* representa 75% do total, cerca de 37 milhões de sacas. O maior exportador mundial de café é o Brasil, seguido por Vietnã, Indonésia, e Colômbia (ICO, 2014). O Estado de Minas Gerais é o maior produtor com 54% de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014), seguido de Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Bahia. A cafeicultura brasileira se destaca pelo seu volume de produção, participação no PIB e geração de emprego e renda para o país (TEIXEIRA, 2002).

As principais causas das perdas na produção de café são: condições climáticas adversas; deficiências nutricionais; pragas e doenças. Dentre as doenças importantes do cafeeiro, destacam-se as de origem fúngica, como a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a mancha de olho pardo (*Cescospora coffeicola*), a mancha-de-phoma (*Phoma sp.*), e a antracnose (*Colletotrichum coffeanum*), as causadas por nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* e as de origem bacteriana, como a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), o crestamento bacteriano (*Pseudomonas cichorii*), a atrofia dos ramos do cafeeiro (*Xylella fastidiosa*), a mancha foliar bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) e a mancha escura (*Bukholderia andropogonis*).

A mancha aureolada tem causado prejuízos na produção de café, principalmente nas regiões de topografia acidentada e altitudes elevadas. Esses locais apresentam condições de alta umidade e ventos frios, que favorecem o progresso da doença. Além disso, há dificuldade no uso de maquinários, tanto para tratamentos culturais quanto para aplicações de produtos químicos no controle da doença, devido à topografia acidentada encontrada na maioria das lavouras. A doença pode causar altas perdas na produtividade quando incide em lavouras sob

condições favoráveis em maior frequência, (PATRÍCIO et al., 2008). Outro problema é a diagnose da mancha aureolada feita por meio dos sintomas, pois estes se assemelham aos de outras doenças do cafeeiro, como a mancha-de-phoma e o crestamento bacteriano (MATIELLO; ALMEIDA, 2013).

Os produtos químicos registrados para o controle da mancha aureolada são poucos, apenas o hidróxido de cobre e a casugamicina (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2013). Portanto, o produtor fica restrito em opções para o controle da doença e acaba fazendo o uso intensivo e constante desses produtos, o que pode levar à seleção de isolados resistentes a doses cada vez mais elevadas de cobre e antibiótico. Na literatura, há relatos de variabilidade quanto à resistência a cobre e antibióticos em isolados bacterianos fitopatogênicos coletados em locais onde ocorre o uso frequente de cúpricos e antibióticos (MARQUES, 2007; CARZOLLA et al., 2002; SPOTTS; CEVANTES, 1995).

Visando a verificar a resistência ao cobre em isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* objetivou-se: selecionar isolados resistentes e sensíveis *in vitro*; verificar o efeito de produtos comerciais à base de cobre em mudas de café inoculadas com isolados de *P. syringae* pv. *garcae* resistentes e sensíveis ao cobre; detectar a presença de genes de resistência ao cobre em isolados de *P. syringae* pv. *garcae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mancha aureolada do cafeeiro

A mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; YOUNG; TRIGGS, 1994) (Psg) foi descrita, no Brasil, pela primeira vez, na cidade de Garça, no estado de São Paulo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). No Brasil, a doença ocorre nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, em especial nas regiões Sul, Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba (ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Afeta folhas, ramos, brotos e frutos novos, sendo problema em mudas de viveiro e em campo.

Os sintomas causados pela bactéria são caracterizados pela mancha de coloração pardo-escura com centro necrótico, envolvida por um halo amarelado (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). A penetração da bactéria nos tecidos vegetais ocorre na presença de água por aberturas naturais ou por ferimentos. Esses ferimentos podem ser causados por insetos, atrito entre folhas e ramos da planta, maquinários e outras doenças (KIMATI et al., 2005). Cultivares de cafeeiros com arquitetura ereta apresentam maior incidência da doença, em razão da exposição das folhas mais novas ao vento, formando ferimentos por onde a bactéria penetra (SERA et al., 2004).

Pseudomonas syringae pv. *garcae* é uma bactéria Gram negativa, suas células apresentam formato de bastonetes retos ou levemente curvados e podem ter de um a sete flagelos polares. Kairu (1997a) comparou isolados dessa espécie oriundos do Brasil e do Quênia, por meio de testes bioquímicos e de patogenicidade. Os isolados diferiram quanto à pigmentação fluorescente em meio King B (KB) e à produção de melanina em meio nutriente ágar (NA) e

batata dextrose ágar (BDA) (BARTA; WILLIS, 2005). Tais evidências sugerem que há variabilidade genética entre os isolados do Brasil e do Quênia.

A maioria dos isolados de *Psg* produz tabtoxina, porém, alguns podem não a produzir (BARTA; WILLIS, 2005). Nos testes LOPAT, a bactéria apresenta resultados positivos para Levana e hipersensibilidade em fumo e negativo para oxidase, podridão em discos de batata e arginina dihidrolase. Apresenta resultado positivo para a hidrólise da gelatina e hidrólise da esculina. Produz ácido, a partir de ramnose, trealose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, celobiose, sacarose, inositol, D-quinato e não produz, a partir de adonitol, trigoneline, L(+)-tartarato, D(-)-tartarato, L-lactato (RODRIGUES NETO et al., 1981; WILKIE; DYE,1973; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; MARQUES et al., 2008).

Pseudomonas syringae pv. *garcae* afeta tecidos novos, em geral mudas, plantas novas, brotações e frutos no estágio de chumbinho. As condições favoráveis para a doença são temperaturas amenas associadas à alta umidade. O vento e a chuva colaboram para a disseminação da bactéria. Segundo Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011), em regiões de altitudes elevadas e áreas de topografia acidentada, a doença ocorre com maior severidade e com mais frequência durante o ano. Esses locais estão expostos a ventos fortes e temperaturas mais baixas com maior índice de chuvas. Diferente de regiões mais planas de altitudes abaixo de 950 m.

Em viveiros, a irrigação por aspersão das mudas favorece a disseminação da bactéria, que é levada de uma lesão para as folhas saudias pelos respingos de água. Recomenda-se diminuir os períodos de irrigação e eliminar as mudas com sintomas iniciais da mancha aureolada. É importante a escolha do local de instalação do viveiro, que deve estar protegido de ventos frios (GODOY et al., 1997).

Há evidências de que mudas aparentemente saudáveis podem ser veículo de disseminação da doença para áreas isentas da mesma, pois a detecção de *Psg* em folhas assintomáticas foi descrita por Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011). A bactéria pode sobreviver como epífita na face inferior das folhas do cafeeiro e também em restos culturais, servindo de inóculo para as próximas infecções, quando as condições forem de alta umidade, temperaturas amenas e ventos com presença de chuva Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011).

Os prejuízos causados pela mancha aureolada na produção de café estão relacionados ao tecido afetado na planta. Quando a colonização da bactéria ocorre nas folhas, resulta na redução da fotossíntese e na energia para os processos fisiológicos da planta. Os prejuízos são maiores quando a doença afeta as flores e os frutos, pois estão diretamente relacionados com a produção (RODRIGUES et al., 2013).

Como medidas preventivas, deve-se escolher locais de plantio que não favoreçam o desenvolvimento da bactéria; adquirir mudas de viveiros onde não há casos da mancha aureolada, para evitar a contaminação de áreas isentas do patógeno; áreas de lavouras recém-plantadas sujeitas ao vento devem estar protegidas por quebra-ventos com o plantio de espécies vegetais, como milho e eucalipto, principalmente nos primeiros anos, após a implantação do cafezal; ao realizar qualquer tipo de poda, devem-se observar as condições climáticas, realizando o manejo em condições não favoráveis, e aplicar fungicida à base de cobre, logo após a realização da poda (ZOCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011; RODRIGUES et al., 2013).

O uso de cultivares resistentes é a melhor alternativa em termos de custo e benefício para o produtor. A escolha das cultivares é importante, pois além da resistência contra a doença, deve apresentar também as características agrônomicas necessárias para uma boa produção (RODRIGUES et al., 2013). Ito et al. (2008) identificaram fontes de resistência a *Psg* em cultivares de café

arábica. A cultivar Catucaí IPR 102 apresentou resistência completa e as cultivares IPR 103, IPR 104, IPR 108 e IPR 59 apresentaram resistência parcial. A IPR 102 também mostrou ser parcialmente resistente à ferrugem do café, além de ter alta produtividade, boa qualidade de bebida e tamanho de copa médio.

O controle químico é recomendado quando há o aparecimento dos primeiros sintomas da mancha aureolada. Em regiões que apresentam condições favoráveis para ocorrência da doença e se já se constatou a presença dela na área, recomenda-se a aplicação de produtos cúpricos antes da constatação dos sintomas. Recomendam-se duas aplicações de fungicidas cúpricos (0,3%) no intervalo de duas semanas, que podem ser associadas a antibióticos. Patrício et al. (2008) observaram redução da incidência e da taxa de progresso da bacteriose, ao utilizar cloridrato de casugamicina ou oxiclureto de cobre em mudas de café em casa-de-vegetação. Mas o controle químico para mancha aureolada não foi eficiente comparado ao uso de fungicidas para controlar cercosporiose. Os produtos registrados no MAPA para o controle da mancha aureolada do cafeeiro são três cúpricos, tendo como ingrediente ativo o hidróxido de cobre, e um antibiótico, a casugamicina. Existem outras fontes de cobre utilizadas na cultura do café para o controle de doenças fúngicas, o oxiclureto de cobre, o sulfato de cobre e óxido cuproso que podem ser utilizados junto com o mancozeb (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2013). Assim, o controle da mancha aureolada pode ser influenciado por essas outras fontes de cobre.

Os primeiros trabalhos realizados com produtos cúpricos e antibióticos demonstraram a eficiência do controle da bacteriose. Mohan e Cardoso (1977), no Estado do Paraná, utilizaram diferentes combinações de antibióticos e formulações cúpricas em plantas de café já adultas. Verificaram que Agrimicina 100 (Sulfato de estreptomicina 15% + terramicina 1,5% - 2 g i.a./l de produto) apresentou melhor resultado no controle da mancha aureolada, especialmente

quando aplicado junto com um cúprico. Kairu et al. (1997a) demonstraram no Quênia que quatro formulações de cobre, Kocide 101 (hidróxido de cobre), Perenox (óxido cuproso), oxiclreto de cobre e calda bordalesa, em duas lavouras diferentes durante 2 anos, foram eficazes no controle da mancha aureolada. Entretanto, essa eficiência foi reduzida com o passar dos anos, em decorrência das poucas opções de ingredientes ativos e a alta frequência das aplicações.

2.2 Resistência de isolados bacterianos a cobre

O uso intensivo de produtos químicos à base de cobre leva a uma pressão seletiva de isolados resistentes a doses cada vez mais altas. Marques (2007) observaram que isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) coletados na região do Vale do São Francisco apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre. Essa variabilidade pode ter ocorrido por meio da introdução de estirpes já resistentes, vinda de material propagativo infectado proveniente da Índia, pois Chand, Patil e Kishum (1991) observaram nos isolados de Xcv alta resistência ao cobre naquele país. O mesmo fato foi verificado por Carzola et al. (2002), em que a dispersão de isolados de *P. syringae* resistentes ao cobre ocorreu por meio de mudas de manga compradas de um mesmo viveiro.

No trabalho de Kairu (1997b), isolados de Psg sensíveis e resistentes a cobre foram encontrados em parcelas com plantas de café não pulverizadas, sugerindo que os isolados resistentes a cobre foram introduzidos por mudas de café. A troca de material propagativo entre diferentes áreas é fator importante no aumento da disseminação de isolados resistentes (MARQUES, 2007).

Após o tratamento com os produtos cúpricos, Kairu (1997b), verificou que a população dos isolados, identificados, anteriormente, como resistentes e sensíveis, foi reduzida após aplicações de hidróxido de cobre. Mas apenas a

população dos isolados sensíveis foi reduzida pela calda bordalesa, indicando que para esse produto existe resistência.

A transferência conjugativa pode ser um meio das bactérias se tornarem resistentes a cobre e antibióticos, pois elas são capazes de trocar material genético entre si, gerando variabilidade por recombinação genética. Essa transferência pode acontecer entre plasmídeos ou entre partes de cromossomos bacterianos (ROMEIRO, 1995).

A variabilidade de isolados bacterianos quanto a resistência ao cobre foi observada em diversas espécies como Xcv na cultura da videira (MARQUES, 2007), *P. syringae* pv. *syringae* nas culturas da manga e da pera (CARZOLLA et al., 2002; SPOTTS; CERVANTES, 1995), em *X. axonopodis* pv. *citri* (MENEGUIM et al., 2007), em *X. campestris* pv. *campestris* na cultura da couve chinesa (LUGO et al., 2013), e em *Erwinia psidii* em eucalipto (REZENDE; MIRANDA FILHO; UESUGI, 2005).

Quezado-Duval et al. (2003) verificaram diferenças quanto à sensibilidade ao sulfato de cobre e ao sulfato de estreptomicina entre isolados de *Xanthomonas* spp. associados à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial, entretanto nenhum isolado foi resistente à oxitetraciclina.

2.3 Genes de resistência ao cobre

A resistência ao cobre está associada a um plasmídeo que carrega genes responsáveis pela capacidade da bactéria sobreviver na presença de concentrações de cobre. Os plasmídeos são fitas circulares de DNA que carregam genes codificadores de determinantes de virulência e aptidão ecológica, envolvidos na adaptação a nichos específicos. Eles são facilmente adquiridos por transferência horizontal (FERREIRA, 2003).

Cooksey (1990) evidenciou a existência de um plasmídeo de 47 kb em todos os isolados de *P. syringae* pv. *tomato* resistentes ao cobre. Esse plasmídeo foi usado para a transformação de um isolado suscetível ao cobre em um resistente por eletroporação, confirmando a relação do plasmídeo com a resistência ao cobre. O plasmídeo foi denominado pPT23D, contendo quatro ORFs de 4,5 kb, chamadas de *copA*, *copB*, *copC*, *copD*, posicionadas em sequência, uma atrás da outra, e um promotor induzido por cobre localizado antes de *copA* (GUTIERREZ-BARRANQUERO et al., 2013). Estudos de resistência ao cobre em isolados de *P. syringae* em mudas de manga, mostraram que apenas os isolados resistentes apresentaram determinantes genéticos do plasmídeo homólogos ao *copABCD* (CARZOLA et al., 2002). Isolados resistentes ao cobre de outras espécies também foram descritos, apresentando operon *cop* homólogo (GUTIERREZ-BARRANQUERO et al., 2013).

Os genes *copABCD* codificam proteínas que estão relacionadas ao movimento de cobre entre as membranas da célula bacteriana. As proteínas CopA e CopC de *P. syringae* pv. *tomato* se localizam no espaço periplasmático, enquanto que as CopD e CopB na membrana externa (COOKSEY, 1990). Ocorre um armazenamento do cobre em excesso no espaço periplasmático. Essa estratégia bacteriana é considerada uma proteção da célula contra o efeito tóxico do cobre. Estudos feitos nas proteínas CopA e CopB, verificaram que são ricas em metionina e histidina, sendo esses aminoácidos os que apresentam forte atração pelo íon de cobre (SILVER; PHUNG, 1996).

Gutierrez-Barranquero et al. (2013) descreveram a organização genética do plasmídeo de resistência ao cobre, contendo outros genes relacionados, como *copG* e *cusCBA* em *Pseudomonas syringae*. A transformação de um isolado suscetível ao cobre com os genes *copG* e *cusCBA* conferiu resistência, comprovando que esses genes têm relação com resistência ao cobre.

Existe uma homologia dos genes *copABCD* entre espécies bacterianas do mesmo gênero. Marques (2007), testaram primers desenhados, *copAR* e *copAL*, a partir do gene *copA* de *X campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *citri* em isolados de *X. campestris* pv. *viticola* e verificaram a existência do gene *copA* em todos os isolados. A análise filogenética evidenciou uma distância maior de *X. campestris* pv. *viticola* em relação a *X campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae* e uma proximidade com *X. axonopodis* pv. *citri*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência dos Isolados bacterianos

Para o estudo de tolerância *in vitro* ao cobre, foram utilizados isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* obtidos da coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. Esses isolados foram obtidos de amostras de plantas de café coletadas em campo, no Estado de Minas Gerais, com sintomas de mancha aureolada, amostras de café enviadas à Clínica Fitossanitária do DFP/UFLA, bem como o isolado tipo obtido da Coleção Bacteriológica da França (French Collection of Plant associated bacteria – CFBP), CFBP1634 (Tabela 1).

Tabela 1 Procedência dos Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Isolados	Cultivar	Local e data de coleta
UFLA 20;UFLA 22	Mundo Novo IAC 376-4	Nepomuceno (viveiro) jan/12
UFLA 43; UFLA 46; UFLA 52; UFLA 53; UFLA 54; UFLA 58; UFLA 61	Mundo Novo IAC 376-4	Nepomuceno (viveiro) jan/12
UFLA 77; UFLA 78; UFLA 80; UFLA 81; UFLA 82;	Catuaí Vermelho IAC-99	Nepomuceno (viveiro) ago/12
UFLA 84	Catuaí Vermelho IAC-99	Lavras (viveiro) jun/12
UFLA 85; UFLA 86; UFLA 87; UFLA 88; UFLA 89A; UFLA 90; UFLA 91A	Catuaí Vermelho IAC-99	Nepomuceno (viveiro) set/12

“Tabela 1, conclusão”

Isolados	Cultivar	Local e data de coleta
UFLA 97; UFLA 99	Mundo Novo IAC 376-4	Nepomuceno (viveiro) nov/12
UFLA 101; UFLA 102; UFLA 103; UFLA 104; UFLA 105	Catuaí Vermelho IAC-99	Nepomuceno (viveiro) nov/12
UFLA 107	Mundo Novo IAC 376-4	Nepomuceno (viveiro) nov/12
UFLA 112	Catuaí Vermelho IAC-99	Varginha (viveiro) jan/13
UFLA 115; UFLA 116; UFLA 117; UFLA 118; UFLA 119; UFLA 120	Catuaí Vermelho IAC-99	Três Pontas (lavoura) jan/13
UFLA 122; UFLA 123	Catuaí Vermelho IAC-99	Nova Rezende (lavoura) jan/13
UFLA 125	Acaíá	São Sebastião do Paraíso (lavoura) fev/13
UFLA 127; UFLA 130	Catuaí Vermelho IAC-99	Três Pontas (lavoura) jan/13
UFLA 131; UFLA 132; UFLA 133	Mundo Novo IAC 376-4	Patrocínio (lavoura) fev/13
UFLA 138; UFLA 139	Catuaí Vermelho IAC-144	Elói Mendes (lavoura) fev/13
UFLA 149	Catuaí Amarelo IAC- 62	Ijací (lavoura) abr/13
UFLA 150; UFLA 151	Catuaí vermelho/IAC 144	Muzambinho (lavoura) abr/13
UFLA 152; UFLA 153	Mundo Novo IAC 376-4	Santana da vargem (viveiro) mai/13
UFLA 154; UFLA 155	Catuaí 2 SL	Santo Antônio do Amparo (lavoura) mai/13
UFLA 156	Mundo Novo IAC 376-4	Santana da vargem (viveiro) mai/13

3.2 Metodologia 1: Sensibilidade de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* ao cobre em meio MMCC

A metodologia 1 avalia a sensibilidade dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* ao cobre através do cultivo dos mesmos em placas de Petri contendo meio MMCC.

3.2.1 Meio de cultura e produtos utilizados

Para obtenção de colônias bacterianas foi utilizado o meio King's B (20 g de protease peptona, 15 g de glicerina, 1,5 g de K_2PHO_4 , 1,5 g de $MgSO_4$, 18 g de Agar, 1000 ml de água destilada). O meio *Médium Minimal Complexing Copper* MMCC –(1,7 g de casitone, 0,35 g extrato de levedura, 8,5 g de Agar, 2,0 ml de glicerol, 1000 ml de água destilada) (Pohronezny et al., 1992) foi utilizado para os testes de sensibilidade ao cobre por sua baixa capacidade de complexar os íons de cobre.

Como fonte de cobre foi utilizado o sulfato de cobre ($CuSO_4$) VETEC ($CuSO_4$ II P.A. anidro, 95%). Foi preparada uma solução estoque na concentração de $2,5 \times 10^5$ $\mu g/ml$. A seguir, foram adicionadas assepticamente diferentes quantidades da solução estoque ao meio MMCC fundente, antes de vertê-lo em placas de Petri, para que as concentrações finais de cobre fossem 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 e 0,3 mM.

3.2.2 Preparo das suspensões bacterianas

Os isolados preservados em água destilada esterilizada (ADE), à temperatura ambiente, foram recuperados e transferidos para placas contendo meio King's B, por estrias paralelas, a fim de se obter colônias isoladas. Depois de incubadas a 28 °C por 48 h, colônias isoladas de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* foram passadas para tubos, contendo o meio 523 (KADO; HESCKET, 1970). Após 48 h de incubação a 28 °C, foram preparadas suspensões bacterianas, com água destilada estéril, na concentração de $1,1 \times 10^9$ UFC. ml^{-1} , utilizando-se espectrofotômetro a $A_{600} - 0,2$ (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990). Em seguida, as suspensões foram diluídas em série até 10^{-5} (1:100.000) em água destilada estéril.

3.2.3 Inoculação e avaliação

Alíquotas de 50 µl das suspensões bacterianas padronizadas e diluídas a 10^{-5} foram depositadas e espalhadas, com uma alça de Drigalski flambada, sobre o meio MMCC, contendo cobre nas concentrações determinadas anteriormente. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28°C, por 48 h. Para cada isolado, realizaram-se três repetições de cada tratamento.

As avaliações foram realizadas após 72 h de incubação, por meio da análise de presença ou ausência de colônias bacterianas nas placas.

3.3 Metodologia 2: Sensibilidade de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* expostos à solução de sulfato de cobre

A metodologia 2 avalia a sensibilidade dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* por meio da exposição direta ao cobre.

3.3.1 Meio de cultura e produto utilizado

Foi utilizada a metodologia descrita por Marco e Stall (1983). Foram preparadas placas de Petri contendo meio King's B e como fonte de íons de cobre, o CuSO_4 . As soluções de íons de cobre foram preparadas, a partir de uma solução estoque de $2,5 \times 10^5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ com água destilada estéril, nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM.

3.3.2 Preparo das suspensões bacterianas

O preparo das suspensões bacterianas foi feito conforme descrito anteriormente.

3.3.3 Inoculação e avaliação

A partir das suspensões bacterianas preparadas conforme descrito anteriormente, foram retiradas alíquotas de 50 µl da diluição 10^{-5} e adicionadas aos microtubos, contendo 1 ml de cada solução de íons de cobre nas concentrações citadas anteriormente. Após 1 h, alíquotas de 100 µl de cada tratamento foram retiradas e transferidas para placas de Petri, contendo meio King's B (sem adição de cobre subsequente) e espalhas com alça de Drigalski. A sensibilidade foi avaliada a partir de 48 h de incubação, a 28°C, por meio da análise de presença ou ausência de colônias bacterianas nas placas.

3.4 Aplicação de cúpricos em mudas de café inoculadas com isolados resistentes e sensíveis de *P. syringae* pv. *garcae*

Foram selecionados dois isolados de *P. syringae* pv. *garcae*: um sensível e um resistente *in vitro*. Para os tratamentos, utilizaram-se 2 produtos à base de cobre, Big Red (óxido cuproso) e Kocide (hidróxido de cobre). As doses utilizadas foram 5 ml/L e 7,10 g/L, respectivamente (Tabela 2). Para as testemunhas, foi utilizada água de torneira. Ao preparar a calda, adicionou-se o espalhante foliar Assist (BASF) em todos os tratamentos (Tabela 2). O experimento foi montado na câmara de crescimento do laboratório de Patologia de Sementes/DFP/UFLA. Foram utilizadas 36 mudas de café das cultivares Catuaí e 36 da Mundo Novo, ambas suscetíveis à mancha aureolada. A temperatura utilizada na câmara de crescimento foi de 25°C. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 3 tratamentos e 3 repetições.

Tabela 2 Produtos químicos utilizados no controle da mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Produtos	Produtos Comerciais	Dose do produto (g ou ml)/ 100 L H ₂ O
Óleo mineral	Assist®adjuvante – Basf S.A, São Paulo, SP, Brasil	250 ml/100 L H ₂ O
Hidróxido de cobre (Cu(OH) ₂)	Kocide®WDG Bioactive – Du Pont do Brasil S.A., Barueri, SP	711 g/100 L H ₂ O
Óxido Cuproso (Cu ₂ O)	Big Red biofertilizante – Agrichem do Brasil S.A.	500 ml/100 L H ₂ O

A calda de cada produto foi preparada e pulverizada 2 horas antes da inoculação da suspensão bacteriana. As suspensões bacterianas de cada isolado foram preparadas a partir de culturas puras em meio King's B, incubadas por 48 h, a 28 °C. Utilizou-se o espectrofotômetro para calibragem das suspensões, na concentração $5,1 \times 10^9$ ufc/ml ($A_{600} = 0,8$). As inoculações foram realizadas nos dias 04 e 17 de julho de 2014, por pulverização da suspensão bacteriana em mudas de café mantidas, previamente, por 24 h em câmara úmida. O método de inoculação por aspersão foi escolhido por representar a forma mais próxima ao natural possível. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida por todo o período até a última avaliação. As irrigações foram realizadas diariamente, bem como a observação dos sintomas da doença.

Foram avaliadas diariamente a severidade da mancha aureolada no primeiro par de folhas emitidas, utilizando a escala de notas de Belan et al. (2014): 0 (0%), 1 (0.1–0.99%), 2 (1–2%), 3(2.01–4%), 4 (4.01–8%), 5 (8.01–

16%), 6 (16.01–25%), 7 (25.01–45%) e 8 ($\geq 45.1\%$). A partir desses valores, foi construída a curva de progresso da doença.

3.5 Detecção do gene de resistência a cobre, *copA*, em *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Para amplificação do gene *copA* (Tabela 3), foi utilizado o par de primers *Cop AF* e *cop AR*.

Tabela 3 Descrição dos primers desenhados com base nas sequências do gene *copA* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* B738

“Primer”	Sequência 5’-> 3’
<i>Cop AF</i>	GTG GTG CCG ACC GTG TGT TC
<i>Cop AR</i>	GAT TGG CAT CGG TGA CAG GCG

A região gênica *copA* da espécie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* B728, que confere resistência ao cobre, foi analisada e comparada a outras sequências depositadas no “GenBank”, utilizando-se os programas BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). O par de primers foi desenhado baseado na região comum, referente ao gene *copA*. Os primers foram confeccionados pela empresa Sigma.

Todos os isolados foram submetidos à extração do DNA plasmidial, pelo protocolo Miniprep.

3.5.1 Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial bacteriano foi extraído conforme o protocolo de extração miniprep. Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas, cultivadas sob agitação por 24h a 28°C em meio líquido 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 ressuscendido em vortex. Foram adicionados 300 µL de Tens Buffer e os tubos agitados em vortex por 5 segundos. Logo, foram acrescentados 150 µL de NaOAc e os tubos agitados em vortex por 5 segundos. Em seguida, centrifugados a 3 minutos por 12.000 rpm. O sobrenadante foi passado para um tubo novo e o pellet descartado. Foram adicionados 5 µL de RNase e os tubos incubados na estufa a 37°C por 30 minutos. Depois foram colocados 200 µL de PCI e agitado em vortex. Os tubos foram levados para a centrífuga para um spin de 5 minutos e transferidos 300 µL do sobrenadante para um novo tubo. Em seguida, foram colocados 900 µL de etanol absoluto gelado e agitado em vortex. Centrifugou-se por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi lavado com 300 µL de etanol 70% e dado um spin por 10 segundos na centrífuga. Descartou-se o sobrenadante e deixou secando na câmara de fluxo. Após os tubos secos, o pellet foi ressuscendido com 30 µL de água ultrapura autoclavada, novamente agitado em vortex e um spin de 10 segundos na centrífuga. Os tubos foram guardados em freezer.

3.5.2 Amplificação dos genes *copA*

As amostras de DNA de todos os isolados bacterianos foram submetidas à amplificação com o par de “primers *copA*” em termociclador PT – 100 (MJ Research, Watertown, Mass), desnaturadas a 95 °C por 2 min, e, posteriormente,

submetidas a 30 ciclos de 95 °C por 45 s; 1 min a 61,5 °C para anelamento do “primer” e 2 min a 72 °C para a extensão, e uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Para a PCR, foram utilizados: tampão da enzima 1 X (20 mM Tris HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos dNTPs; 25 pmol do “primer”; 1,25 µl Go Taq® Flexi DNA polimerase (promega), 5 ng de DNA e água MiliQ para completar o volume final de 25 µl.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 100 pb Ladder (Amresco®).

4 RESULTADOS

4.1 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* ao sulfato de cobre

Os resultados *in vitro* foram apresentados para cada metodologia avaliada.

4.1.1 Metodologia 1: Sensibilidade de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* ao cobre em meio MMCC

Após a contagem do número de colônias de Psg nas placas, nas três repetições, verificou-se que dos 51 isolados utilizados, oito isolados: UFLA 22, UFLA 46, UFLA 82, UFLA 90, UFLA101, UFLA 122, UFLA 131 e UFLA 138, formaram colônias até a concentração 0,3 mM de CuSO₄ em meio MMCC, indicando que tais isolados apresentam maior resistência ao cobre. Os demais isolados toleraram até a concentração máxima de 0,25 mM (Fig. 1).

4.1.2 Metodologia 2: Sensibilidade de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* expostos à solução de sulfato de cobre

Na avaliação do experimento em que houve a exposição direta dos isolados de Psg às soluções de cobre, metodologia 2, foi considerado como crescimento bacteriano a presença ou ausência de colônias em cada placa com meio King B. Para análise dos dados obtidos, a concentração máxima tolerada (CMT), foi a maior concentração de cobre que permitiu o crescimento bacteriano.

Dos 53 isolados testados, quatro :UFLA 115, UFLA 127, UFLA 130 e UFLA 139, não apresentaram crescimento na concentração mínima de 0,05 mM de CuSO_4 , sendo considerados os mais sensíveis (Fig. 2). Os isolados UFLA 58, UFLA 77, UFLA 80, UFLA 104, UFLA 131, UFLA 149, UFLA 150 UFLA 151 foram considerados os mais tolerantes e apresentaram crescimento de colônias até a concentração de 0,15 mM (Fig. 2). Apresentaram tolerância intermediária os isolados UFLA 22, UFLA 52, UFLA 53, UFLA 54, UFLA 81, UFLA 82, UFLA 86, UFLA 89A, UFLA 90, UFLA 91A, UFLA 99, UFLA 116, UFLA 120, UFLA 122, UFLA 125, UFLA 152 e UFLA 154, com crescimento até a concentração de 0,05mM, e os isolados UFLA 20, UFLA 43, UFLA 46, UFLA 61, UFLA 84, UFLA 88, UFLA 97, UFLA 101, UFLA 102, UFLA 103, UFLA 105, UFLA 107, UFLA 112, UFLA 118, UFLA 119, UFLA 123, UFLA 133, UFLA 138, UFLA 153, UFLA 155 e CFBP 1634, com crescimento até 0,01mM (Fig. 2).

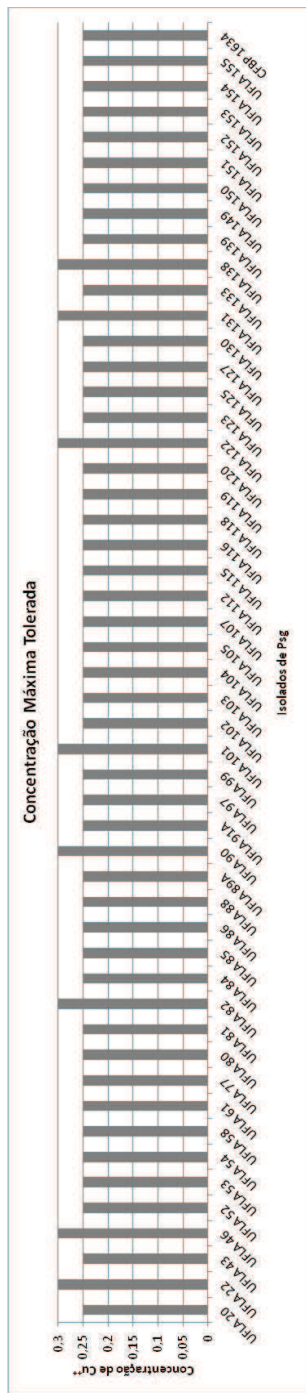


Figura 1 Gráfico representativo da concentração máxima de Cu⁺⁺ tolerada dos isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* testados pela metodologia 1

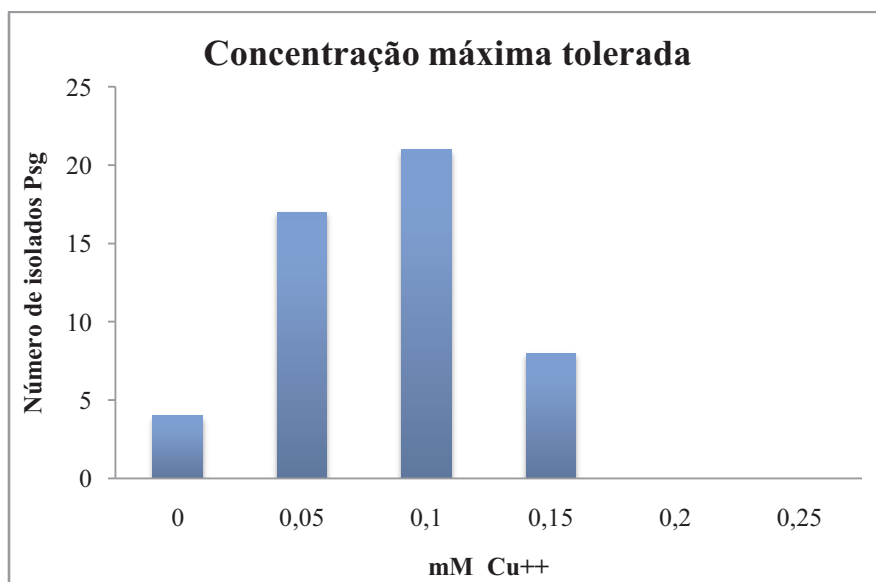


Figura 2 Resistência a cobre em isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, expressa pela concentração máxima tolerada em mM de Cu⁺⁺

Nenhum isolado apresentou crescimento após exposição às concentrações de 0,20 e 0,25 mM (Fig. 2).

4.2 Aplicação de cúpricos em mudas de café inoculadas com isolados resistentes e sensíveis de *P. syringae* pv. *garcae*

A partir dos resultados obtidos dos experimentos *in vitro*, o isolado UFLA 151 foi escolhido como resistente e o UFLA 103 como sensível ao cobre. O isolado UFLA 151 tolerou 0,15 mM em solução de cobre, 0,25 em meio MMCC. O isolado UFLA 103 tolerou 0,05mM, em solução de cobre e em meio MMCC.

A partir dos gráficos gerados da curva de progresso da doença, pode-se observar que nas mudas de café da cultivar Catuaí, o isolado 151 foi sensível ao óxido cuproso (Big Red), mas não ao hidróxido de cobre (Kocide). E o isolado

103 foi sensível a ambos os produtos cúpricos (Fig. 3). Esse resultado confirma os resultados obtidos *in vitro*, de que o isolado 151 tem uma resistência ao cobre maior que o isolado 103.

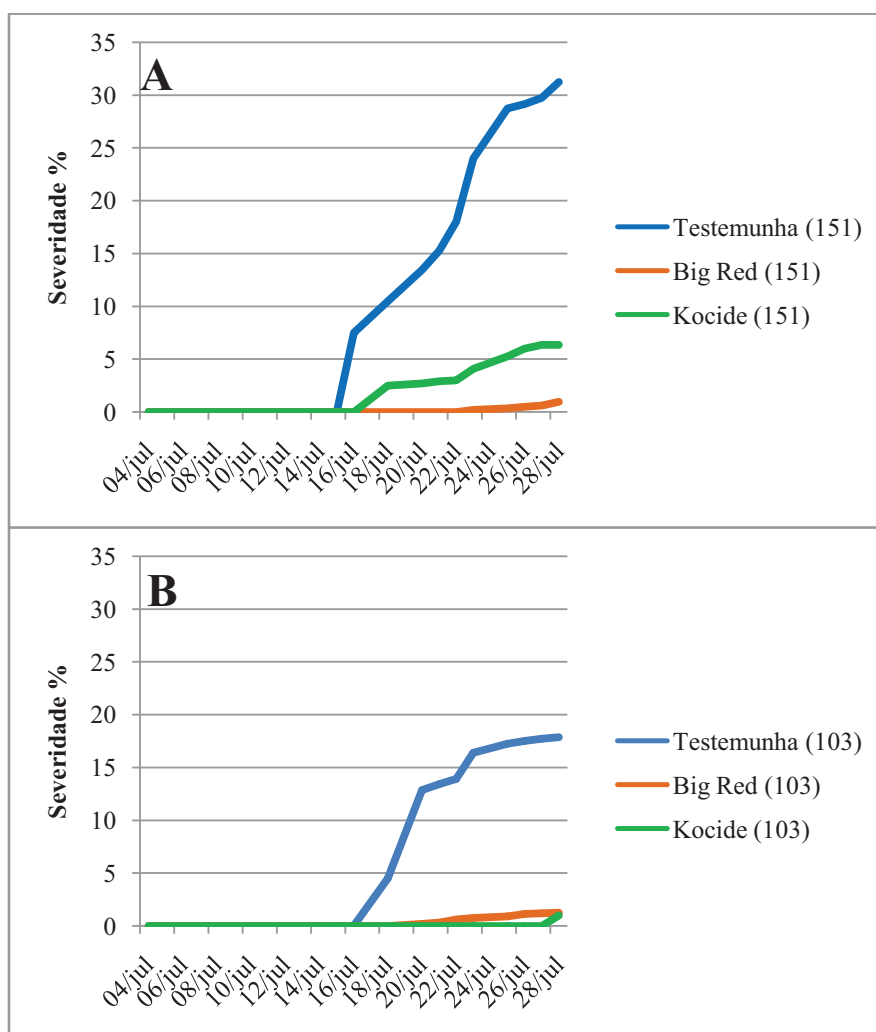


Figura 3 Gráfico de severidade da mancha aureolada na cultivar 'Catuaí' para cada isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (A)151 e (B) 103

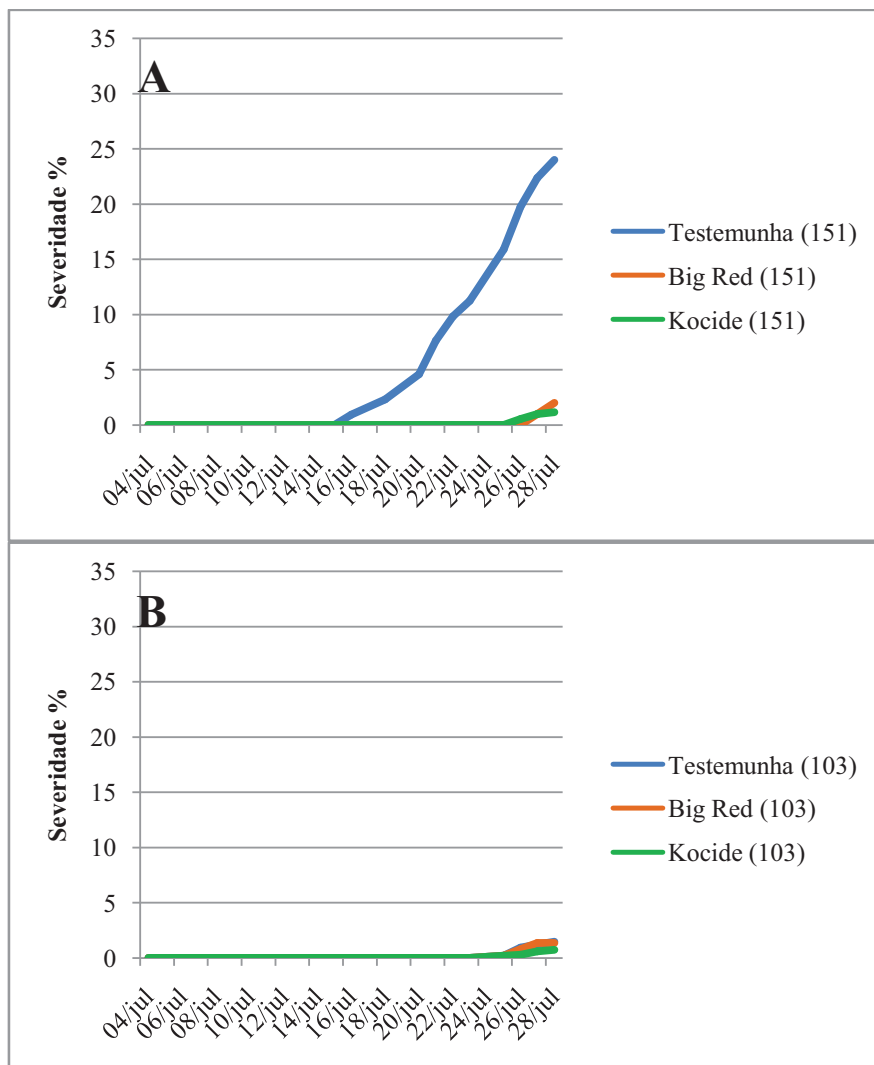


Figura 4 Gráfico de severidade da mancha aureolada na cultivar ‘Mundo Novo’ para cada isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (A)151 e (B)103

Para as mudas de café da cultivar Mundo Novo, ambos os isolados apresentaram sensibilidade ao cobre até o último dia de avaliação. O isolado 151 mostrou-se mais agressivo nas testemunhas, teve um menor período de

incubação em relação ao isolado 103 (Fig. 4). Para uma melhor análise, é necessário um período maior de avaliação. Os dois produtos foram pulverizados 2 horas antes da inoculação dos isolados, portanto funcionaram de forma preventiva.

4.3 Detecção do gene *copA*

Os produtos da PCR amplificados com os primers desenhados a partir da sequência do gene *copA* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* B728, foram observados em gel de agarose 1%. Um fragmento de aproximadamente 900 pb foi observado para todos os isolados de Psg (Fig 5, 6 e 7) quando comparados ao marcador de 100 pb.

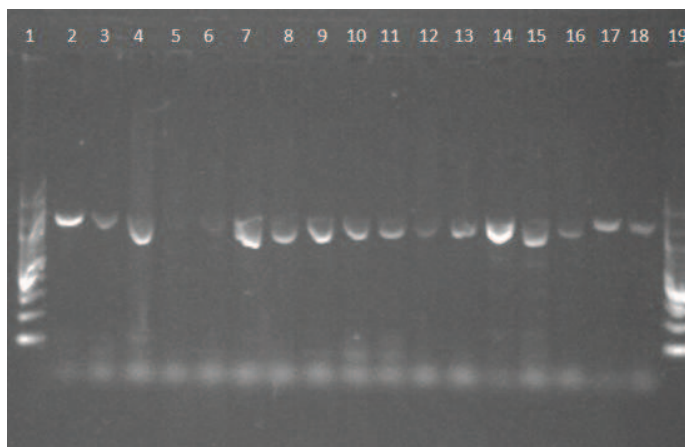


Figura 5 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR obtidos com os primers *copAF* e *copAR*. para os diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Nota: (1) marcador de 100 pb; (2) CFBP1634; (3) UFLA 20; (4) UFLA 22;pv. *garcae* (5) UFLA 43; (6) UFLA 46; (7) UFLA 52; (8) UFLA 53; (9) UFLA 54; (10) UFLA 58; (11) UFLA 61; (12) UFLA 77; (13) UFLA 80; (14) UFLA 82; (15) UFLA 81; (16) UFLA 84; (17) UFLA 86; (18) UFLA 85; (19) marcador de 100 pb

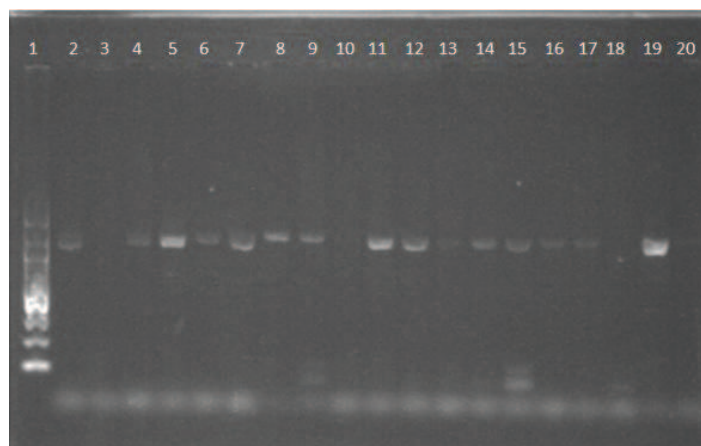


Figura 6 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR obtidos com os primers *copAF* e *copAR* para os diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Nota: (1) marcador de 100 pb; (2) UFLA 119; (3) UFLA 120; (4) UFLA 122; (5) UFLA 123; (6) UFLA 125; (7) UFLA 127; (8) UFLA 130; (9) UFLA 131; (10) UFLA 133; (11) UFLA 138; (12) UFLA 139; (13) UFLA 149; (14) UFLA 150; (15) UFLA 151; (16) UFLA 152; (17) UFLA 153; (18) UFLA 154; (19) UFLA 155; (20) UFLA 156

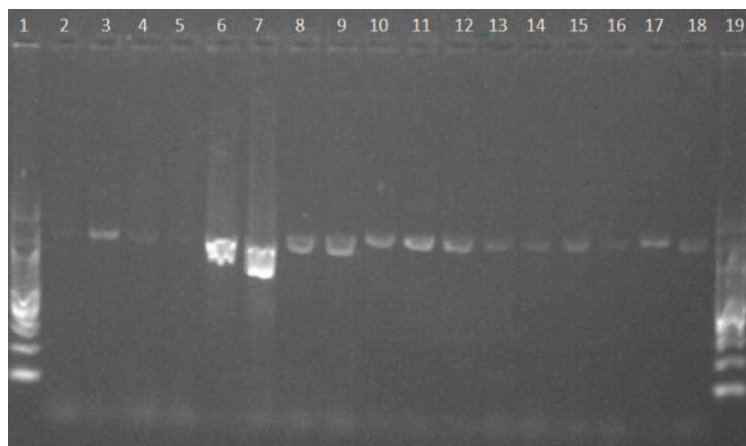


Figura 7 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR obtidos com os primers *copAF* e *copAR* para os diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Nota: (1) marcador de 100 pb; (2) UFLA 88; (3) UFLA 89A; (4) UFLA 90; (5) UFLA 91; (6) UFLA 97; (7) UFLA 99; (8) UFLA 101; (9) UFLA 103; (10) UFLA 104; (11) UFLA 105; (12) UFLA 102; (13) UFLA 107; (14) UFLA 112; (15) UFLA 115; (16) UFLA 117; (17) UFLA 116; (18) UFLA 118; (19) marcador de 100 pb

5 DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* permitiram selecionar pelo menos 8 isolados, cerca de 16%, como resistentes ao cobre, pois apresentaram crescimento em meio MMCC até a concentração 0,3 mM CuSO₄.

Andersen, Menkissoglou e Lindow (1991) verificaram em isolados de *Pseudomonas syringae* obtidos de castanheira e citros, resistência de até 1,12 mM de CuSO₄ em meio CYE. Marques, Uesugi e Ferreira (2009) encontraram resistência 50 µg/ml a cobre em isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, provenientes da região do vale do São Francisco. Resende (2006) verificou tolerância de isolados de *Erwinia psidii* a 400 µg/ml de cobre, e atribuiu essa resistência ao uso consecutivo de produtos cúpricos em pomares de goiaba.

Embora o crescimento nessa concentração tenha sido considerado, para a classificação desses isolados, como resistente ao cobre ela não foi tão alta como as concentrações encontradas nos artigos citados anteriormente. Esse fato pode estar relacionado à menor exposição dos isolados de Psg do estado de Minas Gerais, a produtos cúpricos, visto que a maior ocorrência da mancha aureolada no Estado é mais recente do que o cancro da videira na cultura da uva (MARQUES, 2007) e *Pseudomonas syringae* nas culturas de castanheira e citros, onde as pulverizações de produtos cúpricos foram mais intensas.

Não houve variabilidade quanto à resistência a cobre dos isolados de Psg, nas concentrações estudadas. A concentração máxima tolerada variou entre 0,25 e 0,3 mM em meio MMCC. Zoccoli, Takatsu e Uesugi (2011) também constataram em seis isolados de Psg, coletados na região do triângulo mineiro, resistência *in vitro* à mesma concentração de CuSO₄ (100 ppm). Entretanto, para *Pseudomonas syringae* Andersen, Menkissoglou e Lindow (1991), constataram variação na concentração tolerada entre os isolados (0,08 a 1,12 mM), bem

como para Xcv 50 e 300 ug/ml CuSO_4 (ARAÚJO, 2001) e 0 a 50 ug/ml CuSO_4 (MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009).

Na metodologia usada por Marco e Stall (1983), em que as células bacterianas entram em contato direto com a solução de cobre antes de serem depositadas no meio de cultura, quatro isolados de Psg não apresentaram crescimento. Marques (2006) também verificou esse mesmo número de isolados de Xcv, que não sobreviveram à exposição ao cobre.

Ao se comparar as concentrações máximas toleradas na primeira e segunda metodologia, não foi verificada relação direta, conforme constatado por Andersen, Menkissoglou e Lindow (1991), em que os isolados com crescimento somente em baixas concentrações de cobre em meio CYE, foram altamente sensíveis ao contato direto com a solução de cobre. Como não houve diferença entre a menor e a maior concentração tolerada no meio MMCC, pode-se afirmar que a exposição direta à solução de cobre demonstra maior sensibilidade dos isolados de Psg. Entretanto, recomenda-se que concentrações acima de 03 mM em meio MMCC sejam testadas.

Há relatos na literatura da complexação do cobre com componentes do meio de cultura. Rezende (2006) utilizou dois meios diferentes com cobre, 523 e MMCC, e obteve resultados variáveis para resistência dos isolados. O mesmo foi verificado por Silva e Lopes (1995), ao testar os meios NA, King B, MMCC e 523.

Segundo Andersen, Menkissoglou e Lindow (1991), a forma tóxica do cobre está na formação de íons quando dissociados em solução. Essa alta reatividade facilita os íons de cobre a se ligar a qualquer molécula presente na solução e formar complexos não tóxicos para as células bacterianas. Quando há aumento de CuSO_4 no meio de cultura ocorre o acúmulo de íons livres para reagir (ANDERSEN; MENKISSOGLU; LINDOW, 1991). Provavelmente,

isso explica o fato observado no presente trabalho, da concentração máxima tolerada na metodologia 1 ser superior à tolerada na metodologia 2.

Nos experimentos *in vitro*, não houve uma grande variação quanto à resistência ao cobre. Tal fato pode ter ocorrido, em decorrência da falta da pré-indução ao cobre nos isolados. Gutiérrez-Barranquero et al. (2013) induziram o contato de isolados de *P. syringae* ao cobre, para estudar genes relacionados à resistência a cobre. Andersen, Menkissoglou e Lindow (1991) verificaram que a pré-exposição dos isolados de *P. syringae* à concentração subletal de 0,2 mM de CuSO_4 em meio CYE, induziu à sobrevivência desses isolados a concentrações letais antes da pré-exposição. Segundo os autores, a exposição da bactéria ao cobre em meio de cultura induz as células a expressarem tolerância de até sete vezes o nível de íons de Cu^+ tolerado por células não induzidas.

Os resultados obtidos *in vivo* mostraram que os produtos cúpricos, quando aplicados de forma preventiva, são eficientes. O maior obstáculo que impede que seja eficiente é o fato da planta emitir folhas novas periodicamente. Assim, para controlar a bacteriose, deve ser realizada uma pulverização com cobre a cada emissão de folhas, principalmente quando as condições estiverem favoráveis à ocorrência da bacteriose.

No experimento com mudas de café se propôs usar um isolado mais sensível e um mais resistente, a fim de representar os diferentes níveis de resistência que existem numa população de bactérias no campo. A diversidade dentro da população é grande e o uso intensivo de produtos cúpricos leva à seleção dos indivíduos resistentes e ao aumento da frequência deles na população. Conforme pode ser observado, neste trabalho, a ocorrência de isolados resistentes ao cobre, como o isolado UFLA 151, pode diminuir o período latente e aumentar a ocorrência da mancha aureolada, diminuindo, assim, a eficiência do manejo integrado.

O óxido cuproso mostrou indícios de ter uma capacidade de reduzir a severidade quando comparado ao hidróxido de cobre. Aguiar et. al (2003) ao testarem diferentes fontes de cobre no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em plantas de pimentão, mostraram que os tratamentos que levaram óxido cuproso e óxido cuproso + mancozeb foram eficientes em reduzir a população residente. Demonstrando o potencial dessa fonte de cobre em relação aos outros produtos.

Todos os isolados apresentaram a região referente ao gene *copA* amplificado pelos primers *copAF* e *copAR* da sequência de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* B728, entretanto, nem todos os isolados apresentaram o mesmo nível de resistência *in vitro* e *in vivo*. Marques (2006) observou essa mesma ocorrência do gene *copA* em todos os isolados testados. Foi sugerido que o gene está amplamente difundido entre as populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, mas outros fatores podem estar relacionados à expressão desse gene.

O contato entre diferentes bactérias e populações de Psg de diferentes regiões pode ter disseminado esse fator de resistência, inclusive por meio de mudas de café transportadas de uma região para outra. Esse fato é citado por Marques (2006) e Carzola et al. (2002), em relação à *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira e *Pseudomonas syringae* em mangueira, respectivamente. Outro fator que pode ocorrer é o compartilhamento de material genético, através da transferência horizontal de genes. O que justifica que todos os isolados apresentem esse gene *copA*, pois gera variabilidade genética na população bacteriana.

Apenas um gene foi detectado neste trabalho, mas existem outros genes relacionados à resistência a cobre, como *cusCBA* e o *copG* (GUTIÉRREZ-BARRANQUERO et al., 2013). A família dos genes *copABCD* foi uma das primeiras a serem estudadas, por esses genes estarem sempre juntos. Existem

vários mecanismos para a bactéria complexar as moléculas de cobre. Uma delas é a proteína produzida pelo gene *copA* estar presente na membrana interna da célula (CHA; COOKSEY, 1991).

Para validar os primers desenhados neste trabalho, será realizada, futuramente, a purificação desses produtos da PCR e, em seguida, o sequenciamento. De posse das sequências, será feita a comparação com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank. A partir disso, poderá ser discutida a similaridade dessas sequências com a de outras espécies bacterianas. Caso as sequências obtidas não apresentem correspondências com as sequências do gene *copA*, novos primers deverão ser desenhados, bem como para outros genes relacionados à resistência aos cúpricos.

6 CONCLUSÃO

Os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* apresentaram sensibilidade ao cobre in vitro

O óxido cuproso, quando aplicado de forma preventiva, apresentou maior eficiência no controle da mancha aureolada em mudas de café

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. A. et al. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 44-50, mar.2003.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C. G.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- ANDERSEN, G. L.; MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. **Phytopathology**, Oxford, v. 81, n. 6, p. 648-656, 1991.
- ARAÚJO, J. S. de P. **Perfil epidemiológico e subsídios para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology: volume 1**. New York: Greene Publishing Association, 1992.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.
- BELAN, L. L. et al. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, p. 801–810, Apr. 2014.
- CARZOLA, F. M. et al. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, n. 8, p. 909-916, 2002.

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 of India**, Allahabadd, v. 88, p. 8915-8919, 1991.

CHAND, R.; PATIL, B. P.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 61, n. 3, p.220-222, 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2012**. CONAB, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_20_16_01_51_boletimcafe_dezembro_2012.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2013.

COOKSEY, D. Plasmid-determined copper resistance in *Pseudomonas syringae* from impatiens. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 13-16, Jan. 1990.

FERREIRA, H. B. Organização gênica de procariotos. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p. 322-327.

GODOY, C. V. et al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A. et al. Recruitment and rearrangement of three different genetic determinants into a conjugative plasmid increase copper resistance in *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 3, p. 1028-1033, 2013.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/po.htm>> Acesso em: 29 no. 2014.

INTER KAVA AGRONEGOCIOS. Chuvas trazem prejuízo de R\$ 5 milhões à cafeicultura, devido aparecimento da mancha aureolada. **Clipping Café**, Brasília, 2012. Disponível em: <<http://interkava.com/lermercado.php?cod=726>>. Acesso em: 06 jan. 2012.

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

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

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

KAIRU, G. M. Effect of copper sprays on the epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* on coffee in Kenya. **Coffee Research Foundation**, Kenya, v. 46, p. 600-601, 1997b.

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

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

LUGO, A. J. et al. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, n. 1, p. 61-70, May 2013.

MARCO, G. M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 779-781, July 1983.

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

MARQUES, E. **Variabilidade e Tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis* spp.)**. 2007. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 406-411, 2009.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. Diferenciação no ataque de *Phoma* e *Pseudomonas*. **Clube de Tecnologia Cafeeira**, Varginha, p. 01-05, maio 2013.

MELLO, M. R. F. et al. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 21-83, 2011.

MENEGUIM, L. et al. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 247-252, maio/jun. 2007.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L. Controle químico do cretamento bacteriano em cafeeiros incitado por *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO EM PESQUISA DE CAFÉ, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Epamig, 1977. p. 18-20.

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

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

PSEUDOMONAS GENOME DATABASE. Disponível em: <<http://www.pseudomonas.com>>. Acesso em: 08 set. 2013.

QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas spp.* associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 670-675, nov./dez. 2003.

REZENDE, A. M. de F. A. **Estudo sobre resistência genética e produtos químicos no controle da bacteriose da goiabeira (*Psidium guajava*) causada por *Erwinia psidii***. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

REZENDE, A. M.; MIRANDA FILHO, R. J.; UESUGI, C. H. Sensibilidade de isolados de *Erwinia psidii* a diferentes formulações cúpricas. In: CONGRESSO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2005. v. 30. p. 68-68.

RODRIGUES, L. M. R. et al. Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Boletim Técnico IAC**, Campinas, n. 212, p. 1-30, 2013.

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

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora da UFV, 1995.

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

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

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. *Isolados de Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 85-89, 1995.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 753-789, 1996.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 ago. 2013.

SPOTTS, R. A.; CERVANTES, L. A. Copper, oxytetracycline and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 11, p. 1132-1135, Aug. 1995.

TEIXEIRA, T. D. Política estratégica para a cafeeicultura brasileira. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Palestras...** Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 169-193.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VANNESTE, J. L.; VOYLE, M. D. Genetic basis of copper resistance in New Zealand strains of *Pseudomonas syringae*. **New Zealand Plant Protection**, Elmsford, v. 56, p. 109-112, 2003.

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

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

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.