



ARIANE DE SOUZA ALVARENGA

Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre

LAVRAS–MG

2023

ARIANE DE SOUZA ALVARENGA

Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao 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.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2023

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

Alvarenga, Ariane Souza de.

Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* deisolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre / Ariane Souza de Alvarenga. - 2023.
51 p. : il.

Orientador(a): Ricardo Mageela de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Controle químico. 2. Café. 3. Café Mancha aureolada. I. de Souza, Ricardo Mageela. II. Título.

ARIANE DE SOUZA ALVARENGA

Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao 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 19 de Janeiro de 2023

Dr. Mario Lúcio Vilela de Resende - UFLA

Dra. Melina Korres Raimundi - Faculdade Arnaldo

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2023

A Deus, por todas as bênçãos

OFEREÇO

À minha Família
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos e por renovar a minha fé para seguir firme na caminhada durante todos estes anos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade de concluir o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza pela orientação, por sua amizade, por todos os ensinamentos e por acreditar em mim.

Professora Antonia dos Reis Figueira, registro aqui a “Mulher” com tantos significados importantes e, que representam muito na minha vida, minha eterna, *gratidão*, por tudo!

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e Prof^a Dra. Melina Korres Raimundi, meus reconhecimentos.

Aos meus pais, José Paulo e Maria Angélica Alvarenga, irmãos e seus familiares, por me incentivarem durante minha vida e sempre estarem presentes nos momentos mais importantes.

Aos meus amigos de trabalho, da Secretaria Integrada Esal Ufla, obrigada por todo apoio e incentivo recebido de vocês.

A minha eterna gratidão aos funcionários e colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFLA, especialmente à Ana Maria dos Santos, por todo carinho durante o desenvolvimento da pesquisa.

À querida amiga Rosy e aos amigos Fernando Gilioli e Guilherme Foschetti Gontijo, amizade incondicional e consideração.

Aos meus amigos Felipe, Indiara, Enrique, Gabrielle, Thamires, Nevenka, Cláudia, Tarcísio, Rafael, Bárbara, Arianna, Júlio, Lara, Thalyta, Gabriela, Gabriella, Nathalia, Peterson, Viviane, Luisa, Larissa, Matheus, David, Ananda, Carla, Janaína, Yohana... e amigos de fé “amigo é coisa para se guardar; debaixo de sete chaves; dentro do coração”.....

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

Neste estudo foram testados isolados de *Pseudomonas syringae* coletados em lavouras de café, com sintomas de manchas foliares, para determinar a sensibilidade a diferentes concentrações de cobre. Os experimentos foram realizados *in vitro* utilizando-se 17 isolados e 3 repetições. Neste experimento, suspensões de cada isolado, com a concentração ajustada em espectrofotômetro para $1,1 \times 10^9$ ufc/ml, foram semeados em placas de Petri, contendo meios de cultura MMCC com as seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,4 e 0,6 mM ($\text{Cu}(\text{OH})_2$). Em seguida, foram escolhidos 3 isolados que apresentaram alta, intermediária e baixa sensibilidade ao cobre, para o experimento *in vivo*. Foram utilizadas a cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, suscetível à mancha aureolada, previamente pulverizadas com 2,5 ml/L de óleo mineral e 7,10g/L de hidróxido de cobre. Foram 7 tratamentos, representados pela inoculação com os 3 isolados selecionados anteriormente, em plantas pulverizadas e não pulverizadas com hidróxido de cobre e o controle sem inoculação e pulverizadas com hidróxido de cobre e 12 plantas por parcela. As inoculações foram feitas na câmara de crescimento vegetal do Laboratório de Epidemiologia do DFP/UFLA, à temperatura de 25° C, sob alta umidade, onde as plantas permaneceram até o final da avaliação. Os isolados UFLA 06, UFLA 112, UFLA 113, UFLA 114, UFLA 148, UFLA 507 foram considerados resistentes ao cobre, pois foi observado o crescimento *in vitro* de colônias em todas as concentrações testadas. Os isolados UFLA 21, UFLA 48, UFLA 138-1, UFLA 144 e UFLA 896 apresentaram crescimento apenas nas concentrações até 0,4 mM de ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), sendo considerados intermediários. Os isolados UFLA 79, UFLA 98, UFLA 126, UFLA Guapé e UFLA 129, este de *P. syringae* pv. *tabaci*, apresentaram crescimento apenas nas concentrações até 0,25 mM de CuSO_4 sendo considerados sensíveis ao cobre, bem como o isolado UFLA57 com crescimento até 0,15 mM de ($\text{Cu}(\text{OH})_2$). Com o resultados, foram selecionados, aleatoriamente, para os testes *in vivo* na cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 os isolados UFLA 148, como resistente ao cobre, UFLA 129, resistência intermediária, e UFLA 57 como sensível. Na avaliação da incidência e severidade da doença houve diferenças significativas entre isolados e para a aplicação de cobre. As plantas inoculadas com o isolado UFLA 148 e sem aplicação de cobre apresentaram a maior severidade da doença (AACPD), em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si. Analisando-se os resultados não se encontrou relação entre a sensibilidade dos isolados ao cobre *in vitro* e *in vivo*, pois a aplicação do hidróxido de cobre causou a redução da doença pelo isolado UFLA 148, o mais resistente ao cobre nos testes *in vitro*.

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

ABSTRACT

In this study, isolates of *Pseudomonas syringae* collected from coffee plantations, with symptoms of leaf spots, were tested to determine sensitivity to different concentrations of copper. The experiments were carried out *in vitro* using 17 isolates and 3 replications. In this experiment, suspensions of each isolate, with the concentration adjusted on a spectrophotometer to 1.1×10^9 cfu/ml, were sown in Petri dishes, containing MMCC culture media with the following concentrations: 0; 0.05; 0.10; 0.15; 0.25; 0.4 and 0.6 mM (Cu (OH)₂). Next, 3 isolates that showed high, intermediate and low sensitivity to copper were chosen for the *in vivo* experiment. The Catuaí Vermelho IAC 99 cultivar, susceptible to halo spot, was used, previously sprayed with 2.5 ml/L of mineral oil and 7.10g/L of copper hydroxide. There were 7 treatments, represented by inoculation with the 3 previously selected isolates, on plants sprayed and not sprayed with copper hydroxide and the control without inoculation and sprayed with copper hydroxide and 12 plants per plot. The inoculations were carried out in the plant growth chamber of the DFP/UFLA Epidemiology Laboratory, at a temperature of 25° C, under high humidity, where the plants remained until the end of the evaluation. The isolates UFLA 06, UFLA 112, UFLA 113, UFLA 114, UFLA 148, UFLA 507 were considered resistant to copper, as *in vitro* colony growth was observed at all concentrations tested. Isolates UFLA 21, UFLA 48, UFLA 138-1, UFLA 144 and UFLA 896 showed growth only at concentrations up to 0.4 mM of (Cu (OH)₂), being considered intermediate. The isolates UFLA 79, UFLA 98, UFLA 126, UFLA Guapé and UFLA 129, this one from *P. syringae* pv. *tabaci*, showed growth only at concentrations up to 0.25 mM of CuSO₄, being considered sensitive to copper, as well as the isolate UFLA57 with growth up to 0.15 mM of (Cu (OH)₂).

With the results, isolates UFLA 148 were randomly selected for *in vivo* tests on the Catuaí Vermelho IAC 99 cultivar, as resistant to copper, UFLA 129, as intermediate resistance, and UFLA 57 as sensitive. When evaluating the incidence and severity of the disease, there were significant differences between isolates and the application of copper. Plants inoculated with the UFLA 148 isolate and without copper application showed the highest severity of the disease (AACPD), in relation to the other treatments, which did not differ from each other. Analyzing the results, no relationship was found between the sensitivity of the isolates to copper *in vitro* and *in vivo*, as the application of copper hydroxide caused a reduction in the disease caused by the UFLA 148 isolate, the most resistant to copper in *in vitro* tests.

Keywords: Bacteria. Chemical control. Coffee. Halo stain.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A mancha aureolada do cafeeiro	12
2.2.1 Identificação da doença.....	13
2.2.2 O patógeno.....	13
2.2.3 Desenvolvimento da doença.....	14
2.2.4 Determinante da doença.....	15
2.2.5 Controle e ação estratégica da doença.....	15
2.2.6 Outras doenças bacterianas em cafeeiro.....	15
2.2.7 Resistência de isolados bacterianos a cobre.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Procedência dos isolados bacterianos.....	19
3.2 Sensibilidade in vitro de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre em meio MMCC.....	20
3.2.1 Meio de cultura e produtos utilizados.....	20
3.2.2 Preparo das suspensões bacterianas.....	20
3.2.3 Inoculação e avaliação.....	21
3.3 Sensibilidade in vitro de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre por exposição direta	21
3.3.1 Meio de cultura e produto utilizado.....	21
Preparo das suspensões bacterianas.....	22
3.3.3 Inoculação e avaliação.....	22
3.4 Sensibilidade in vivo de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> em plantas de cafeeiro previamente pulverizadas com óleo mineral e hidróxido de cobre.....	22
3.4.1 Avaliação da incidência e severidade da doença.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Sensibilidade in vitro de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre em meio MMCC.....	27
4.2 Sensibilidade in vitro de isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> ao cobre por exposição direta.....	28
4.3 Incidência e severidade da mancha aureolada em cafeeiro pulverizados e não pulverizados com hidróxido de sódio e inoculados com os isolados de <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	29
5 CONCLUSÃO.....	33
6 REFERÊNCIAS.....	34
7 ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

O café é uma bebida consumida em todo o mundo, independentemente das condições financeiras da população. Entretanto, a procura por cafés com qualidade tem criado expectativas no mercado atual. É no cuidado do cultivo, na importante fase de maturação e no beneficiamento dos grãos que está a qualidade da bebida, em que a composição química chega ao máximo da qualidade e nos concede saborear uma bebida inigualável (LOPES, 2000; BORÉM, 2008; ISQUIERDO, 2011).

No Brasil, dentre a diversidade do gênero *Coffea* L. (*Rubiaceae*), as espécies *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre, conhecidas como arábica e conilon/robusta, são as de maior consumo. O Estado de Minas Gerais é o principal produtor de café do país, com 34.65 milhões de sacas, o que corresponde a aproximadamente 55% da produção nacional (CONAB, 2018, 2020, USDA, 2021b, VIEIRA, 2017).

A cafeicultura é sem dúvida, a principal atividade agrícola do país. Entretanto, vários fatores, como o clima, a nutrição, a ocorrência de doenças e pragas, podem influenciar ocasionando queda na produção e redução dos rendimentos (RODRIGUES et al., 2013). Entre esses fatores as doenças se destacam, como a mancha aureolada, de origem bacteriana (PATRÍCIO et al., 2008). As folhas com os sintomas da mancha aureolada tem redução da taxa fotossintética e conseqüentemente menor energia disponibilizada. Os sintomas da doença podem ocorrer também em flores, frutos novos e ramos do cafeeiro (RODRIGUES et al., 2013).

Considerando-se o custo-benefício para os produtores, recomenda-se o uso de cultivares de café resistentes e mais adaptadas às regiões com climas específicos para o plantio. Para a mancha aureolada, mesmo que tenham sido identificadas variedades com resistência, a maioria das cultivares plantadas apresentam suscetibilidade à doença. Nesta situação, recomendam-se outras medidas de controle, como usar mudas livres da bactéria, evitando-se mudas contaminadas produzidas em áreas infestadas, e utilizar fungicidas cúpricos (ZOCCOLI, TAKATSU; UESUGI, 2011; RODRIGUES, 2013). Sabe-se que entre os problemas com o uso de cúpricos estão surgimento de populações do patógeno com resistência aos produtos. Portanto, é necessário ter informações sobre a dosagem a ser usada para o controle efetivo da mancha aureolada.

Neste trabalho, foram testados 17 isolados de *Pseudomonas syringae*, coletados em diversas lavouras de Minas Gerais, quanto ao crescimento *in vitro* sob diferentes doses de $(\text{Cu}(\text{OH})_2)$. Em seguida, 3 isolados selecionados como resistente, parcialmente resistente e sensível ao $(\text{Cu}(\text{OH})_2)$, foram utilizados para os testes *in vivo*, empregando-se plantas de café cultivar

Catuaí Vermelho IAC 99 e tratamento com óleo mineral e hidróxido de cobre, com o objetivo de investigar a eficácia do controle da mancha aureolada em plantas de café infectadas com isolados com diferentes níveis de resistência aos cúpricos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mancha areolada do cafeeiro

A mancha aureolada do cafeeiro (*Bacterial halo blight*), causada por *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*, (Psg), Amaral, Teixeira e Pinheiro, (1956); Young, Dye & Wilkie, (1978), foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1955, no Estado de São Paulo, na cidade de Garça. Posteriormente a sua ocorrência foi relatada nos Estados de Minas Gerais e Paraná (KIMURA et al., 1976; MOHAN et al., 1976). Há relatos de ocorrência também em outros países, como na República do Quênia (KAIRU, 1997; RAMOS; SHAVDIA, 1976), Etiópia (KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 1997), Uganda e China (CHEN, 2002). Atualmente, a mancha aureolada do cafeeiro está amplamente disseminada nas principais regiões produtoras de *Coffea arabica* do Brasil e sua incidência tem crescido em regiões onde *Coffea canephora* está sendo cultivada, espécie que responde por 25% da produção de café do país (RODRIGUES et al., 2020). A mancha aureolada está deixando os agricultores preocupados com a dificuldade de controle/manejo da bactéria, e com os prejuízos causados à produção nas lavouras (RODRIGUES et al, 2013), principalmente regiões montanhosas, de altitude elevada, com fortes ventos que atingem as plantas, contribuindo para o aumento da incidência da doença (ZOCCOLI et al., (2011).

Segundo Almeida et al., (2012), a doença no campo começa em lavouras com cafezais reformados com podas, sujeitos a ventos, ou após longos períodos de chuvas ou também em cafezais em formação de 3 a 4 anos de idade e, por este motivo, considerando esta fase de crescimento, as plantas devem estar em pleno vigor com adubação equilibrada, evitando-se as deficiências nutricionais. Os sintomas característicos da doença são lesões foliares necróticas irregulares, de coloração marrom escuro, circundadas por halo amarelado que podem unir e formar grandes áreas necrosadas.

Em estudos relacionados à resistência de cafeeiros ao patógeno Oliveira e Romeiro (1991), observaram que as folhas mais jovens são suscetíveis a *P. syringae* pv. *garcae*, enquanto que as folhas mais velhas apresentam maior resistência à infecção e também maior atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em extratos provenientes de folhas velhas inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*, as quais inibiram o crescimento da bactéria nos bioensaios conduzidos por difusão em gel.

A ocorrência da mancha aureolada pode diminuir nos cafezais em períodos com menor

chuva devido a menores condições favoráveis para a dispersão, penetração e desenvolvimento da bactéria. O manejo da mancha aureolada requer medidas preventivas, que visam impedir a entrada da doença nas lavouras e dificultar o aumento da bactéria nas áreas em que foram detectadas (MACIEL et al., 2012). As mudas livres da bactéria, vindas de viveiros registrados, e a manutenção das plantas em equilíbrio nutricional são medidas importantes para preservar as lavouras de café. Para o controle da doença recomenda-se a poda das mudas ao terceiro par de folhas seguido de pulverizações com cúpricos, como estabelecido pelas certificadoras, e a retirada dos restos vegetais da lavoura a fim de diminuir a fonte da doença (RODRIGUES et al., 2012).

2.2.1 Identificação da doença

A mancha aureolada do cafeeiro foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1955, na cidade de Garça, Estado de São Paulo, Amaral, Teixeira e Pinheiro., (1956). Durante 17 anos a mancha aureolada não apresentou registros de importância na produção do café e após este período alguns casos isolados foram registrados (MOHAN, 1976). Em algumas regiões, como o Alto Paranaíba, Estado de Minas Gerais, os primeiros relatos foram no município de São Gotardo, em 1980, causando a seca nos ramos (VALE; ZAMBOLIM,1997). Em 2010, foi relatada como uma doença de importância na economia cafeeira, pois, tornou-se fator decisivo para a produção de mudas e lavouras de café. Determinadas regiões foram prejudicadas com a baixa produção, afetando assim o comércio de grãos. A mancha aureolada foi registrada também em viveiros de café nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, na Regiões Sul, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (SERA et al., 2004; ZOCCOLI et al., 2011; BELAN, 2014; YAMADA, 2014).

2.2.2 O patógeno

Pseudomonas syringae pv. *garcae* pertence ao filo Proteobactéria, classe *Gamma Proteobactéria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonadaceae* (AGRIOS, 2005; MOORE et al., 2006; FERREIRA; SALGADO, 1995; KING; WARD; RANEY, 1954). É uma bactéria Gram negativa, aeróbia estrita, apresenta células em formato de bastonetes retos ou levemente curvos, com medidas que variam de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e 1,5 a 4,0 µm de comprimento e se locomove através de um ou vários flagelos polares. Quando cultivada em meio

de cultura King B, os isolados produzem pouca quantidade de pigmento fluorescente e, em meios de cultura como batata dextrose ágar (BDA) e ágar nutriente (NA), podem produzir um pigmento marrom, denominado melanina (BARTA; WILLIS, 2005). Alguns dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* provenientes do Quênia produzem pigmento amarelo fluorescente em meio KB (KAIRU, 1997).

Pseudomonas syringae pv. *garcae* enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (levana + oxidase + podridão em batata + arginina + hipersensibilidade em fumo) é positiva para levana e induz hipersensibilidade em fumo; é negativa para oxidase, podridão em discos de batata e arginina di-hidrolase. Hidrolisa gelatina e não acumula poli- β -hidroxi-butilato (PHB). Utiliza ramnose, trealose, eritritol, D-sorbitol, D-manitol, celobiose, sacarose, inositol, D-quinato, manitol, L-ascorbato, meso-inositol, D-xylose e triacetina e não utiliza adonitol, trigonelina, lactose, L(+) tartarato, D(-)tartarato, DL-lactato, DL-homoserina, α -lecitina, linolenato, L-malato, L-histidina (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981; BRADBURY, 1986; SCHAAD et al., 2001; BARTA; WILLIS, 2005).

2.2.3 Desenvolvimento da doença

A mancha aureolada começa quando a bactéria *P. syringae* pv. *garcae* alcança a parte vegetativa da planta, geralmente por meio da água, seja água de chuva ou irrigação. A penetração ocorre por aberturas naturais ou ferimentos, feitos por equipamentos mecânicos, lesões nas folhas e ramos deixadas pelo bicho mineiro, pela mancha de olho pardo, mancha de *Phoma* e de *Ascochyta*, tanto no campo quanto em viveiros de café (RAIMUNDI et al., 2021; ZAMBOLIM, 2013). A mancha aureolada apresenta maior severidade em folhas e brotações novas que favorecem a penetração do patógeno, menor severidade nas folhas adultas e, considerando também a presença de compostos de defesa que condiciona maior resistência (OLIVEIRA e ROMEIRO, 1990). Nas folhas mais velhas são observadas manchas de coloração pardo-escuro, formato irregular, envolvidas por um grande halo amarelo. A área necrosada normalmente se rompe, permanecendo um furo no centro da mancha. Na época do florescimento ou de frutos novos verificam-se necroses nos restos de flores e folhas. Em viveiros, a doença causa queima das folhas e necrose dos tecidos jovens, enquanto nas lavouras provoca desfolha e seca dos ramos laterais (ZAMBOLIM, 2018).

Os sintomas causados pela bactéria são lesões irregulares, com aparência encharcada nas bordas, de coloração marrom-escuro a negra, que em seguida aumentam de tamanho e podem ou

não desenvolver halos amarelos ao redor das lesões, podendo unir-se para formar grandes áreas necrosadas e causar a deformação e o rompimento do limbo foliar. As lesões ocorrem nas bordas das folhas, provavelmente pelo acúmulo da água (POZZA et al. 2010; RODRIGUES et al., 2013; BELAN et al. 2014).

2.2.4 Determinantes da doença

A doença pode ocorrer nas plantas de café em períodos variados, de acordo com a região e as condições climáticas. Chuvas intensas, temperaturas amenas, utilização de tratos culturais mecânicos ou lavouras situadas em maiores altitudes, desprotegidas da ação do vento, favorecem a ocorrência da doença (ZAMBOLIM, 2018; POZZA et al., 2010). Nos períodos onde as chuvas são mínimas ocorre diminuição da incidência da doença, por falta de água (RODRIGUES et al., 2013; ZAMBOLIM, 2013). A disseminação da doença pode ocorrer de várias formas, como pela ação de respingos de chuvas, chuvas finas ou de granizo, que causam ferimentos que funcionam como portas de entrada para a bactéria. As faces das plantas não expostas à claridade ou à luz solar permanecem por períodos mais longos com as folhas umidas, o que favorece a infecção. A bactéria pode ficar na face inferior da folha ou mesmo em solos infestados até surgirem condições ideais para novas contaminações.

2.2.5 Controle e ação estratégica da doença

Pseudomonas syringae pv. *garcae* faz parte de um grupo distinto de bactérias de fácil disseminação e, portanto, deve-se adotar medidas preventivas, para impedir a sua entrada nas lavouras de café. Para controlar a mancha aureolada recomenda-se mudas isentas da bactéria produzidas em viveiros certificados, acompanhamento técnico com a programação para a dubação das lavouras novas ou recém-podadas de café. O plantio de quebra-ventos diminui a disseminação da mancha aureolada, bem como, o uso do hipoclorito de sódio para a desinfetação dos equipamentos de uso direto nas lavouras de café, como as colheitadeiras, ajudam no controle da doença (RODRIGUES et al., 2013).

O controle químico da mancha aureolada nem sempre é eficaz (RODRIGUES et al., 2013). Entretanto, muitos produtores utilizam quinzenalmente produtos ativos, como o antibiótico cloridrato de casugamicina (300 ml/100L água), intercalado com pulverizações com oxicloreto de cobre (0,3%), com o objetivo de impedir a proliferação de novas linhagens resistentes

(PARADELA et al., 2000). Segundo Patrício et al., (2008), o controle da mancha aureolada com casugamicina ou oxiclureto de cobre deve ter início antes do período das chuvas, diminuindo a entrada da bactéria nas lavouras de café.

2.2.6 Outras doenças bacterianas em cafeeiro

Outras doenças bacterianas foram descritas em lavouras de café com os sintomas característicos de manchas foliares, tanto em viveiros quanto nas lavouras. O crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas cichorii*, foi observada pela 1ª vez no Brasil por (ROBBS et al., 1974) em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais e, posteriormente, em viveiro no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2012). A mancha bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, foi observada em viveiros de café no Estado de São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010), e em lavouras nos Estados do Paraná (RODRIGUES et al., 2017) e Minas Gerais (RAIMUNDI et al., 2021). A mancha escura bacteriana, causada por *Burkholderia andropogonis*, foi relatada em 1979, em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí amarelo (RODRIGUES NETO et al., 1981). É importante a correta diagnose da doença, para se saber qual das bactérias do cafeeiro está ocorrendo, uma vez que os sintomas podem confundir o diagnóstico final.

Os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* nem sempre produzem tabtoxina ou então produzem em quantidades menores, não prejudiciais. A toxina não é um fator de patogenicidade, mas favorece o aumento da virulência dos isolados que a produzem, devido a produção do halo amarelado, ou clorose, nos tecidos da planta (LYDON; PATTERSON, 2001; BARTA; WILLIS, 2005; HWANG et al., 2005).

2.2.7 Resistência de isolados bacterianos ao cobre

Em 1882, foi produzida a calda bordalesa, o primeiro fungicida à base de cobre. O seu inventor foi Pierre Marie-Alexis Millardet, então professor da Universidade de Bordeaux na França, região que deu nome a calda (MIZUBUTI; MAFFIA, 2013; LEAL et al, 2019). Ainda no século XIX, na Nova Zelândia, o controle da requeima da batata (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), foi realizado com a aplicação da calda bordalesa. Esse fato levou também à comprovação do cobre como micronutriente essencial para o crescimento das plantas, pois o elemento proporcionou incremento no rendimento da batata após a aplicação da calda bordalesa,

mesmo quando não havia a doença no campo (EVANS; SOLBERG; HUBER, 2007).

O uso da calda bordalesa como fungicida estimulou o rápido desenvolvimento de outros cúpricos (PRINTZ, 2016). Em virtude disso, houve grandes avanços na agricultura do século XX, em especial na proteção de plantas, e desde então, a calda bordalesa é reconhecida como uma das descobertas mais valiosas para a agricultura (STRAYER-SCHERER et al., 2018). O cobre é utilizado até os dias atuais e desempenha importante papel para o desenvolvimento de programas fitossanitários.

O cobre é um metal de transição e micronutriente essencial às plantas, por participar de vários processos fisiológicos como a fotossíntese, respiração, distribuição de carboidrato, redução e fixação de nitrogênio (EVANS; SOLBERG; HUBER, 2007; YRUELA, 2009; CARVALHO; GUIMARÃES; BASTOS et al., 2010; BROADLEY et al., 2012). No solo, a disponibilidade do cobre é maior quando o pH é inferior a 5,0, em razão da sua forma iônica.

O cobre na forma Cu_2^+ ao ser aplicado sobre as plantas é imediatamente absorvido. No interior das células o cobre forma complexos com enzimas de grupos sulfidríla, hidroxila, amino ou carboxila, interferindo em inúmeras reações enzimáticas, e também desnaturam proteínas e bloqueiam as atividades respiratórias, daí seu efeito multissítio (MONTAG; SCHREIBER; SCHÖNHERR, 2006; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

Como consequência de suas propriedades, o cobre pode ser tóxico, caso a sua concentração esteja acima dos níveis adequados (MALAVOLTA et al., 1997). Devido a isso, o seu excesso em concentrações acima de 30 mg.kg⁻¹ ou deficiência, abaixo de 3 mg.kg⁻¹ podem induzir diversas alterações nas plantas, como distúrbios no metabolismo, deficiência de outros nutrientes, clorose e necrose do tecido foliar, inibição do crescimento e até mesmo a morte (FERNANDES; HENRIQUES, 1991; KOPSELL, 2007; CARVALHO; GUIMARÃES; BASTOS et al., 2010). Portanto, é importante manter os teores de cobre das plantas em faixas adequadas, pois o transporte de elétrons na fotossíntese é alterado em ambas as condições, com deficiência ou excesso de cobre (YRUELA, 2005; MALAVOLTA, 2006).

Diversos produtos à base de cobre são registrados para o controle de doenças de plantas. São formulados e comercializados como óxido cuproso (Cu_2O), hidróxido ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), oxiclureto ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$) e sulfato de cobre (CuSO_4), sendo esse último componente da calda bordalesa juntamente com a cal (CABÚS, et al., 2017; AGROFIT, 2019). Os cúpricos devem ser aplicados no momento adequado para proteger a planta, ou seja, antes da infecção do tecido vegetal. Por efeito do seu modo de ação preventivo, uma barreira química é formada e impede a colonização e germinação dos esporos.

A resistência aos produtos químicos pode ser definida quando um patógeno em sua população se torna resistente a um determinado grupo químico aplicado. A resistência pode nem sempre ser completa, podendo ocorrer apenas uma sensibilidade reduzida (BROADLEY et al., 2012). Para que a resistência se desenvolva, os isolados resistentes já devem estar na população. Em geral, mutações naturais são responsáveis por esses isolados resistentes. Por ser um método eficiente na maioria dos casos, o uso do controle químico nas lavouras ainda é a forma mais utilizada no controle de doenças em plantas. No entanto, o uso dessa prática sem estratégias de controle adequado pode ocasionar a seleção de isolados resistentes aos cúpricos, comprometendo a eficiência do mesmo, e também causar impactos negativos ao meio ambiente. Questões como doses de produtos, quantidade e forma de aplicação, práticas agrícolas, características de solo e relevo da propriedade interferem nessa eficiência por ocasionar o processo de resistência aos produtos químicos utilizados nas lavouras (SPADOTTO; BETTIOL, 1997).

A expressão de resistência em plantas de cafeeiro é possibilitada por características genéticas ou de origem da interação genótipo e ambiente. A resistência a doenças é uma característica desejável devido a redução da necessidade de utilização de controle químico durante o ciclo da cultura, entretanto, dificilmente se consegue selecionar uma cultivar com várias características de interesse agrônomo (CARVALHO et al., 2012; LIMA, 2015). Para manter a eficiência de um produto como o cobre é importante a pulverização planejada e sempre a aplicação preventiva, observando as novas folhas e o momento das podas. O cobre beneficia as plantas através do seu efeito como micronutriente e como tonificante. Esse elemento é essencial às plantas por ser componente de muitas enzimas e proteínas e por estar envolvido em inúmeras rotas metabólicas. Várias enzimas que contêm ou são ativadas pelo cobre, catalisam reações de óxido-redução em diversos processos fisiológicos das plantas (CHOUDHARY et al., 2012; GUO et al., 2010; YRUELA, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência dos isolados bacterianos

Os isolados são provenientes da coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFLA (RAIMUNDI et al., 2021), oriundos de plantas com sintomas de mancha aureolada, coletadas em campos de produção comercial ou de amostras enviadas à Clínica Fitossanitária do DFP/UFLA para diagnose, de diversos municípios do Estado de Minas Gerais (Tabela 1). Foram utilizadas no experimento mudas de cafeeiro da cultivar Catuaí-Vermelho IAC-99.

Tabela1 - Denominação e procedência dos isolados de *Pseudomonas syringae* utilizados

Isolados	Cidade
UFLA: 06; 21; 79; 98	Nepomuceno
UFLA: 48; 114	Três Pontas
UFLA: 113	Vargem Grande
UFLA: 126	Santo Antônio do Amparo
UFLA: 57; 112	Varginha
UFLA: 144	-
UFLA: 148	Ijací
UFLA: 129	São Sebastião do Paraíso
UFLA: 507; 896	-
UFLA: 138-1	Elói Mendes
UFLA: Guapé	Guapé

3.2.Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre em meio MMCC

3.2.1 Meio de cultura e produtos utilizados

Para a multiplicação das colônias bacterianas foi utilizado o meio MMCC (*Médium Minimal Complexing Copper*), composto por 1,7g de casitone, 0,35g de extrato de levedura, 8,5g de Agar e 2,0 ml de glicerol por litro de água destilada (POHRONEZNY et al., 1992). Para testar a sensibilidade dos isolados bacterianos ao cobre, foi utilizada uma solução estoque de hidróxido de cobre (Cu (OH)₂) Kocide ® W D G Bioactive – Du Pont do Brasil S.A. Barueri, SP, 7,10 g do produto/L água, que posteriormente foi diluída no meio de cultura para as seguintes

concentrações finais: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,4 e 0,6 mM (Cu (OH)₂).

3.2.2 Preparo das suspensões bacterianas

Todos os isolados descritos foram preservados em água destilada esterilizada (ADE), à temperatura ambiente, e também em peptona glicerol em freezer a -80° C. Para a recuperação dos isolados foi feita a repicagem em placas de Petri contendo o meio MMCC, pelo método de estrias paralelas, para o crescimento das colônias. Depois de incubadas a 28° C por 48 horas, foram preparadas suspensões bacterianas, com água destilada estéril, na concentração de $1,1 \times 10^9$ ufc ml⁻¹, utilizando-se espectrofotômetro a A₆₀₀ - 0,4 (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990).

3.2.3 Inoculação e avaliação do crescimento *in vitro* dos isolados bacterianos

Neste teste foi utilizado uma placa por tratamento com 3 repetições. A inoculação foi feita empregando-se 50 µl das suspensões bacterianas, diluídas a 10⁻⁵, espalhadas na placa contendo o meio MMCC com e sem hidróxido de cobre, com uma alça de Drigalski flambada. Os tratamentos consistiram de meio contendo o hidróxido de cobre nas concentrações 0, controle; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25, 0,4 e 0,6 mM de hidróxido de cobre. Depois da inoculação, as colônias foram incubadas a 28° C, por 48 horas. As avaliações foram feitas e registradas após 72 horas, por meio da análise da presença ou ausência de colônias bacterianas nas placas.

3.3 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre por exposição direta

3.3.1. Meio de cultura e produto utilizado

Foi utilizado o método descrito por (MARCO e STALL, 1983), preparando-se placas de Petri contendo meio MMCC e como fonte de cobre o Cu (OH)₂ com as mesmas especificações descritas anteriormente. As soluções de cobre foram preparadas, a partir de uma solução estoque de $2,5 \times 10^5$ µg.ml⁻¹ com água destilada estéril, nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25 0,4 e 0,6 mM. Como no experimento anterior, foi utilizada uma placa por tratamento com 3 repetições.

3.3.2. Preparo das suspensões bacterianas

O preparo das suspensões bacterianas foi feito conforme descrito anteriormente.

3.3.3 Inoculação e avaliação

Cinquenta μl da suspensão bacteriana na concentração igual a $1,1 \times 10^9$ ufc ml^{-1} foram diluídas a 10^{-5} e transferidas para cada um dos microtubos contendo as 7 concentrações de cobre diluídos em água estéril, conforme especificado. Após uma hora, foram plaqueadas alíquotas de 50 μl de cada tratamento nas placas contendo meio MMCC (sem adição de cobre subsequente) empregando-se a alça de Drigalski. A reação dos isolados ao cobre foi avaliada após 48 horas de incubação, a 28°C , por meio da análise da presença ou ausência de colônias bacterianas nas placas.

3.4 Sensibilidade *in vivo* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em plantas de cafeeiro previamente pulverizadas com óleo mineral e hidróxido de cobre

O experimento foi montado na câmara de crescimento vegetal do Laboratório de Epidemiologia do DFP/UFLA, à temperatura de 25°C , alta umidade e 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Foram selecionados nos experimentos *in vitro* 2 isolados de *P. syringae* pv. *garcae*, UFLA 148 como resistente ao cobre e UFLA 57 sensível ao cobre, e o isolado UFLA 129 de *P. syringae* pv. *tabaci* com sensibilidade intermediária. Foi utilizada a cultivar Catuaí vermelho IAC 99. O delineamento experimental foi blocos casualizados, empregando-se 12 plantas por parcela e 2 repetições. Os tratamentos foram: inoculação com os 3 isolados em plantas pulverizadas e não pulverizadas e plantas controle pulverizadas e não inoculadas e não pulverizadas e não inoculadas.

Os produtos empregados para pulverização das plantas estão discriminados na tabela 2. A solução de hidróxido de cobre foi preparada na concentração de 7,10 g/litro, acrescida de óleo mineral na concentração de 2,5 ml/litro. A testemunha foi constituída por plantas pulverizadas com essa mesma solução e não inoculada. O produto hidróxido de cobre foi pulverizado 2 horas antes da inoculação. A inoculação da suspensão bacteriana foi feita por pulverização nas plantas de café mantidas por 24 hs antes e 48 horas após a inoculação cobertas com sacos plásticos, para manter a umidade, a 25°C (Figura 1), em câmara de crescimento até a última avaliação. As

irrigações foram realizadas diariamente, bem como a observação dos sintomas da doença.

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

PRODUTOS	PRODUTOS COMERCIAIS	DOSE DO PRODUTO (GOUML)/100 L H ₂ O
Óleo mineral	Assist ® adjuvante – Basf S.A, São Paulo, SP, Brasil	2,5 ml do produto/L H ₂ O
Hidróxido de Cu(OH) ₂	Kocide ® W D G Bioactive – Du Pont do Brasil S.A. Barueri, SP	7,10 g do produto/L água

Figura 1 - Plantas de café inoculadas e não inoculadas com os isolados bacterianos de *P. syringae* pv. *garcae* em câmara úmida



Fonte: Ariane de Souza Alvarenga

3.4.1 Avaliação da incidência e severidade da doença

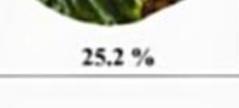
A severidade da mancha aureolada foi avaliada diariamente. Os sintomas foram observados inicialmente a partir do 5º dia, em algumas plantas de café, no primeiro e segundo pares de folhas, empregando-se a escala diagramática de Belan et al., (2014), Tabela 3 - (Figura 2). Os valores obtidos, foram empregados para construir a curva de progresso da doença (SHANER; FINNEY, 1977). Os gráficos abaixo mostram o progresso da doença.

Tabela 3 - Escala de notas para a mancha aureolada do cafeeiro

Nota	Grau de severidade (%)
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%)
8	(≥45.1%)

Fonte: Belan et al., (2014)

Figura 2 - Escala diagramática utilizada para avaliar a incidência e a severidade da mancha aureolada em folhas de cafeeiro.

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 %	

Fonte: Belan et al., (2014)

De posse dos dados referentes a severidade (sem unidades), calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) conforme descrito na equação:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i-1} - T_i)$$

AACPD: área abaixo da curva de progresso da doença;

Y_i: proporção da doença na *i*-ésima observação;

T_i: tempo, em dias, na *i*-ésima observação;

n: número total de observações.

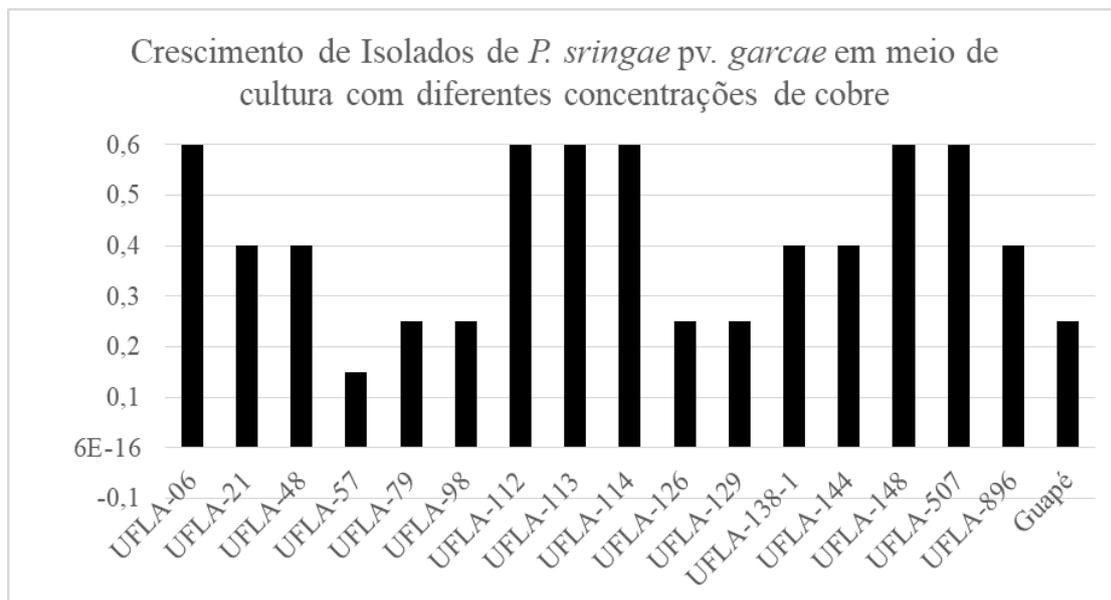
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre em meio MMCC

As reações dos isolados bacterianos às diferentes doses de cobre se encontram representadas na figura 3. Pode-se notar que os isolados apresentaram comportamentos diferentes quando expostos ao meio MMCC contendo $(\text{Cu}(\text{OH})_2)$. Dos 17 isolados testados, 6 foram completamente resistentes a todas as concentrações do produto testadas: UFLA 06, UFLA 112, UFLA 113, UFLA 114, UFLA 148, UFLA 507. Outros 5 isolados também foram resistentes, mas apresentaram crescimento até a concentração 0,4mM: UFLA 21, UFLA 48, UFLA 138-1, UFLA 144 e UFLA 896. As menores resistências foram observadas nos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* UFLA 79, UFLA 98, UFLA 126, UFLA Guapé e de *P. syringae* pv. *tabaci* UFLA 129, capazes de crescer apenas nas concentrações até 0,25mM, bem como o isolado UFLA57 com crescimento apenas até 0,15mM, conforme tabela 3. De acordo com Griffin, Brown e Gambley, (2018), pequenas variações na metodologia, meio de cultura e doses aplicadas, afetam significativamente os resultados de sensibilidade *in vitro* ao cobre. Acredita-se que uma padronização seja importante para as possíveis variáveis utilizadas considerando o meio de cultura, pH e o método de quantificação da população bacteriana. Além disso, os meios mais complexos não são padronizados, o que reduz a reprodutibilidade dos testes (ACAR e GOLDSTEIN, 2004). Este meio MMCC é, portanto, bem adaptado para a realização de testes de crescimento em relação à sensibilidade ao cobre.

Foram encontrados relatos na literatura sobre a complexibilidade do cobre em diferentes meios de cultura. Rezende (2006), testou diferentes meios com cobre, como Kado & Heskett 523 e MMCC, para obter resultados relevantes sobre a resistência dos isolados de *Erwinia psidii*, agente da seca de ponteiros da goiabeira. O mesmo foi verificado por Silva e Lopes (1995), ao testar a sensibilidade de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro, nos meios NA, King B, MMCC e 523.

Figura 3. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* a diferentes concentrações de $(\text{Cu}(\text{OH})_2)$ em meio MMCC



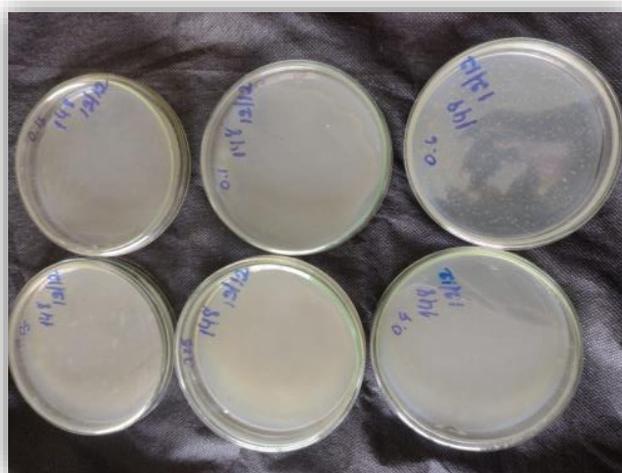
O uso frequente de cúpricos, às vezes até em concentrações inadequadas, empregados ao longo do tempo, tem acarretado a seleção de isolados bacterianos resistentes ao cobre (COOKSEY, 1993; CARZOLA et al., 2002; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO et al., 2013). Alguns autores, trabalhando com resistência a cobre em *P. syringae* pv. *garcae* identificaram genes que poderiam estar ligados à resistência da bactéria ao cobre. Giachino e Waldron (2020), avaliaram os mecanismos empregados por *Salmonella enterica* para escapar da toxicidade ao cobre. Eles observaram que a toxicidade nesta bactéria emprega não apenas a homeostase intracelular mas também reparam o dano causado pelo excesso do produto.

4.2 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre por exposição direta

O crescimento de 17 isolados de *P. syringae* pv. *garcae* expostos diretamente à solução de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ antes de serem colocados em placa de petri com o meio MMCC, foi exatamente igual ao obtido no experimento anterior, ou seja, UFLA 06, UFLA 112, UFLA 113, UFLA 114, UFLA 148, UFLA 507 como resistentes ao cobre, UFLA 21, UFLA 48, UFLA 138-1, UFLA 144 e UFLA 896 com resistencia intermediária e UFLA 79, UFLA 98, UFLA 126, UFLA Guapé, UFLA 129 e UFLA57 como suscetíveis, mostrando que a toxicidade do cobre aos isolados acontece tanto quando estes são expostos ao cobre em solução quanto diluído no meio de cultura, antes ou depois do plaqueamento. Baseado

neste experimento e no anterior, os isolados escolhidos para o experimento *in vivo* com as plantas de café foram: UFLA148 como resistente, UFLA 129 *P. syringae* pv. *tabaci* como isolado de resistência intermediária e UFLA 57 como sensível ao cobre. Considerando as referências, resalta-se a importância de pesquisas para acompanhar os diferentes níveis de sensibilidade ao cobre nos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* em Minas Gerais, identificar alguns mecanismos ligados a essa resistência com a finalidade de estabelecer estratégias de controle a serem adotadas na cultura.

FIGURA 4 - Crescimento *in vitro* de isolados de *P. syringae* pv. *garcae* em diferentes dosagens de cobre



Fonte: Ariane de Souza Alvarenga

4.3 Incidência e severidade da mancha aureolada em mudas de cafeeiro pulverizadas e não pulverizadas com hidróxido de cobre e inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Utilizando-se a escala de Belan et al., (2014), foi possível avaliar a severidade dos sintomas da doença nos tratamentos. A escala diagramática foi importante na precisão das avaliações da doença e permitiu reduzir o erro.

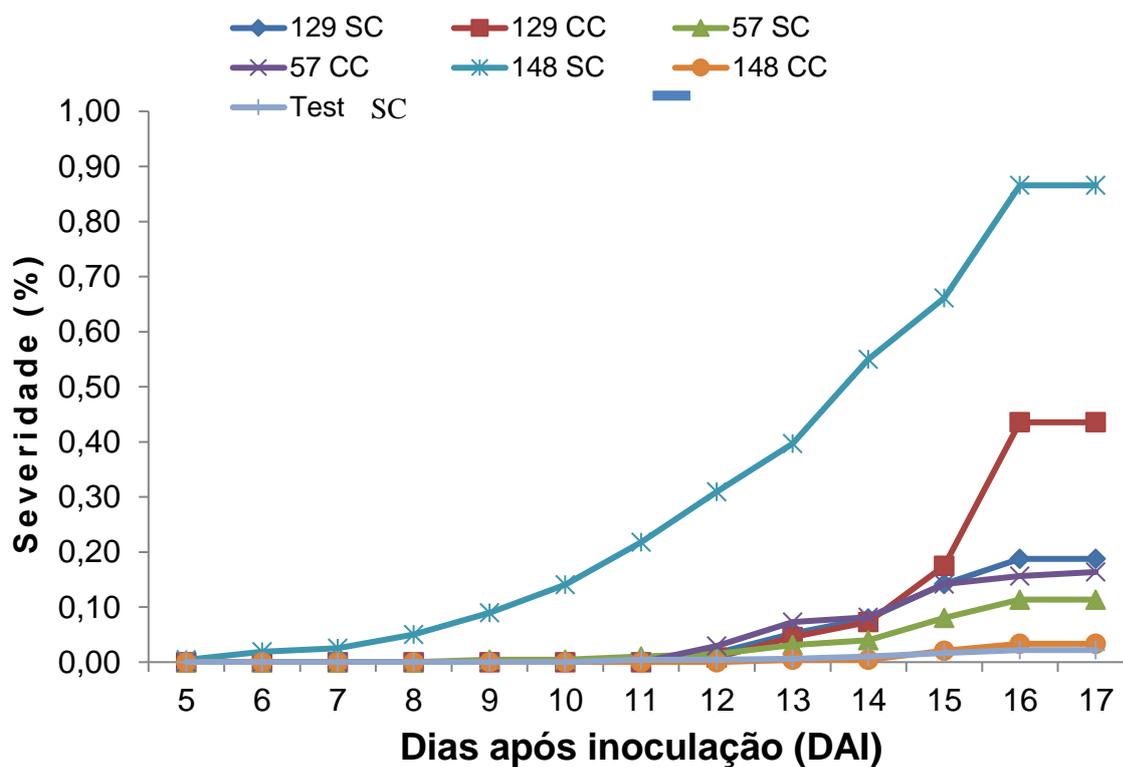
Os primeiros sintomas foram observados a partir de 5º dias após a inoculação, nas plantas inoculadas com o isolado UFLA 148 sem aplicação de cobre, conforme gráfico gerado a partir da curva de progresso da severidade da doença (Figura 5). Até a quinta avaliação, não foram observados sintomas nas plantas inoculadas com os isolados UFLA 57 e UFLA 129 (*P. syringae* pv. *tabaci*), independente da presença ou ausência da aplicação de cobre. Observou-se a ocorrência de sintomas iniciais da doença na testemunha, possivelmente causados pelo contato das plantas adjacentes inoculadas com os isolados bacterianos.

Nos experimentos realizados na câmara de crescimento, houve diferenças significativas entre os isolados e na aplicação de cobre, as plantas inoculadas com o isolado UFLA 148 e sem aplicação de cobre, apresentaram diferenças significativas, com menor período de incubação e maior severidade da doença (AACPD) (Tabela 4), em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si (Figura 5). Este resultado demonstra também a eficácia do cobre na redução da doença causada pelo isolado UFLA 148, mesmo sendo este o mais resistente ao cobre nos testes *in vitro*.

Não houve diferença significativa no controle do progresso da doença causada pelos isolados UFLA 129 (*P. syringae* pv. *tabaci*) e UFLA 57, nas plantas de café pulverizadas e não pulverizadas com hidróxido de cobre, apesar dos isolados serem considerados, respectivamente, moderadamente resistente e sensível ao cobre nos testes *in vitro*.

Yamada (2014) verificou em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí, que o isolado UFLA 151 de *P. syringae* pv. *garcae* considerado resistente *in vitro* ao sulfato de cobre, foi sensível ao óxido cuproso (Big Red), mas não ao hidróxido de cobre (Kocide), e o isolado UFLA 103, considerado sensível *in vitro*, foi também sensível a ambos os produtos cúpricos *in vivo*, confirmando os resultados obtidos *in vitro*, de que o isolado 151 tem maior resistência ao cobre que o isolado 103. No presente experimento esse fato não foi observado, visto que não houve diferença entre os isolados UFLA 129 e UFLA 57 em plantas pulverizadas e não pulverizadas com o cúprico. Os isolados resistentes *in vitro* ao cobre em ambos experimentos, UFLA 148 e UFLA 151, foram mais agressivos nas testemunhas, apresentando menores períodos de incubação e ABCPD em relação aos isolados sensíveis *in vitro* ao cobre UFLA 129, UFLA 57 e UFLA 103. Os resultados obtidos *in vivo* demonstraram que os cúpricos aplicados de forma preventiva reduzem a severidade da doença, mesmo para os isolados considerados mais resistentes.

Figura 5. Severidade da mancha aureolada do cafeeiro na cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 para isolados de *Pseudomonas syringae* com diferentes níveis de sensibilidade *in vitro* ao cobre. CC – com aplicação de hidróxido de cobre. SC - sem aplicação de hidróxido de cobre



Analysis of Variance Table

Response: aacpd

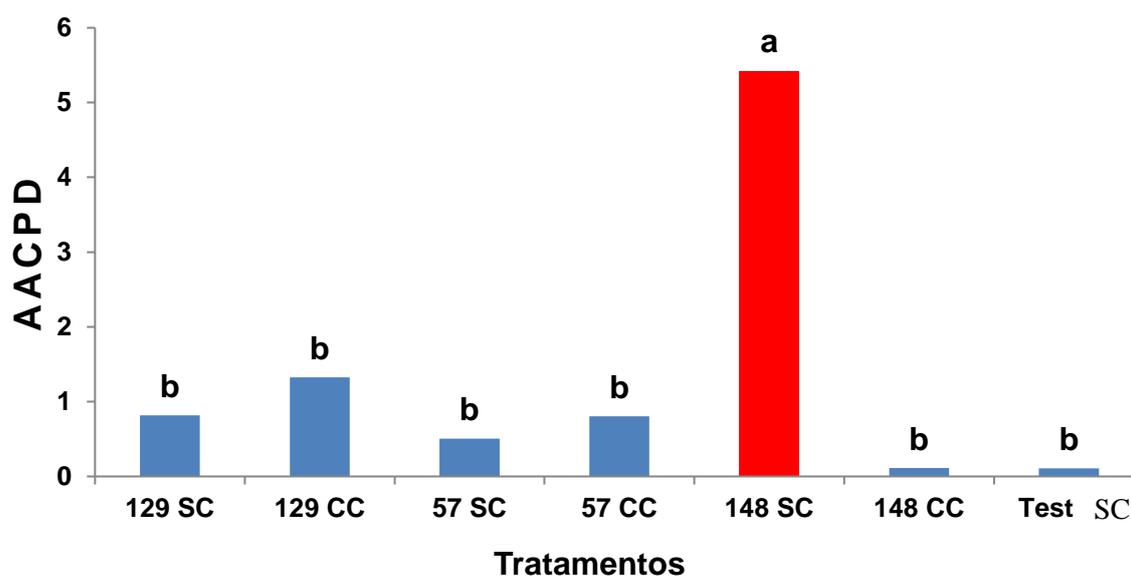
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	6	167.74	27.9562	2.9247	0.01784 *
rep	7	71.23	10.1755	1.0645	0.40276
Residuals	42	401.46	9.5586		

Tabela 4 - Severidade da mancha aureolada do cafeeiro 5 dias após a inoculação de isolados de *Pseudomonas syringae* – confirmado em Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

TRATAMENTO	AACPD	SCOTT KNOT (5%)
UFLA 129 sem cobre	0,815625	b
UFLA 129 com cobre	1,323958333	b
UFLA 57 sem cobre	0,503645833	b
UFLA 57 com cobre	0,803720238	b
UFLA 148 sem cobre	5,424479167	a
UFLA 148 com cobre	0,110416667	b
Testemunha sem cobre	0,10625	b

As análises foram realizadas utilizando-se o software R® (versão 3.6.1) (RDEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

Figura 6. Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro na cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 para isolado de *Pseudomonas syringae* com diferentes níveis de sensibilidade *in vitro* ao cobre. CC – com aplicação de hidróxido de cobre. SC - sem aplicação de hidróxido de cobre



Patrício et al. (2012), relataram que produtos à base de cobre com diferentes concentrações podem reduzir significativamente a severidade da mancha aureolada do cafeeiro. As condições variáveis para a realização dos experimentos, como a utilização de plantas saudáveis, isolados selecionados, temperatura, umidade relativa e tempo de inoculação podem determinar a eficácia dos tratamentos, nas mesmas formulações. Esses fatores podem auxiliar no entendimento das diferenças encontradas neste trabalho.

Rodrigues (2006), relatou vários mecanismos em que o cobre está inserido no controle das fitobactérias. Considera-se a pulverização preventiva de cúpricos com o objetivo de obter uma densa camada protetora nas folhas e promover a liberação de cobre. Andrei et al., (2020), mencionaram a presença do cobre nas células bacterianas, como cuproenzimas e cuproproteínas, as quais podem manter as quantidades adequadas (homeostase) de cobre no interior das células. Esse fator pode influenciar na ação do cobre sobre os isolados bacterianos e, conseqüentemente, na sua ineficácia ao ser aplicado para o controle das doenças.

Verificou-se a importância do cobre na prevenção das plantas de café paralisando/inibindo o desenvolvimento da doença causada pelo isolado UFLA 148. Vale ressaltar, entretanto, a discrepância observada entre a eficácia do cobre ao inibir o desenvolvimento dos diferentes isolados nos testes *in vitro* e nas plantas em ambiente controlado. É possível apontar, por meio deste resultado, a importância de se realizar trabalhos que abordem a eficácia da ação dos produtos utilizados em diferentes condições.

De acordo com Cooksey, (1990), isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes ao cobre foram encontrados causando mancha bacteriana em tomateiro após pulverização de hidróxido de cobre, o qual não reduziu a severidade da doença.

5 CONCLUSÃO

Nos testes de inibição do crescimento *in vitro*, de *Pseudomonas syringae*, seis isolados foram considerados resistentes ao cobre, cinco isolados intermediários e, seis isolados sensíveis.

Nos testes *in vivo*, na cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, o isolado UFLA 148 sem aplicação de cobre, promoveu a maior severidade da doença (AACPD), em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si

Não foi encontrada relação entre a sensibilidade dos isolados ao cobre *in vitro* e *in vivo*, pois a aplicação do hidróxido de cobre causou a redução da doença pelo isolado UFLA 148, o mais resistente ao cobre nos testes *in vitro*.

6 REFERÊNCIAS

- ACAR, J.F., GOLDSTEIN, F.W., 2004. Disc susceptibility test. In: Lorian, V. (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, New York, pp. 1–51
- AGRIOS, G. M. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p
- AGROFIT. SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Consulta de produtos formulados. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 12 de abril de 2019.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; MALAVOLTA, V. M. A. Colo preto da alface causado por *Pseudomonas cichorii*. **Biológico**, São Paulo, v. 61, n.1, p. 1-4, jan./jun., 1999.
- ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES, L. M. R.; PATRICIO, F. R. A. Crestamento bacteriano das folhas causado por *Pseudomonas cichorii* em mudas de café no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., mês, 2012.
- 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.
- BARTA, T.M.; WILLIS, D.K. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 492-499, 2005.
- BELAN, L.L.; POZZA, E.A.; FREITAS, M.L.O.; SOUZA, R.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; OLIVEIRA, J.M. Diagrammatic Scale for Assessment of Bacterial Blight in Coffee Leaves. **Journal of Phytopathology**, v.162, p.801-810, 2014.
- BENDER, C. L.; ALARCÓN, C. F.; GROSS, D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Stillwater, v. 63, n. 2, p. 266-292, 1999.
- BORÉM, F. M. Processamento do Café. In: BORÉM, F. M. **Pós-colheita do Café**. Lavras: UFLA, 2008. 631 p.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Crestamento bacteriano em calêndula. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 149-152, 2001.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; RODRIGUES NETO, J. Crestamento bacteriano em folhas de meloeiro (*Cucumis melo* L.) causado por *Pseudomonas cichorii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1, p. 103-105, jan./jun., 1998b.
- BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Mandioquinha-salsa, novo hospedeiro de *Pseudomonas cichorii*. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 24, n. 3/4, p. 261-262, 1998a.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Farhan House: CABI, 1986. 332 p.

BROADLEY, M. et al. Function of nutrientes: micronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed). **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Elsevier. 3 ed., p. 206 – 212. London, 2012.

CABÚS, A. et al. Efficacy of reduced copper dosages against *Plasmopara viticola* in organic agriculture. **Crop Protection**, v. 96, p. 103-108, 2017.

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 CAFEIEIRO, 1983. Oeiras. **Resumos...** Lisboa, CIFC/IICT, 1984, p. 417-419.

CARVALHO, J. G.; GUIMARÃES, R. J.; BASTOS, A. R. R. et al. Sintomas de desordens nutricionais injúrias em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitários e fisiológicos**. Lavras: UFLA, p. 29-66, 2010.

CARVALHO, A. M. de; MENDES, A. N. G.; BOTELHO, C. E.; OLIVEIRA, A. C. B. de; REZENDE, J. C. de; REZENDE, R. M. Desempenho agrônômico de cultivares de café resistentes à ferrugem no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p. 481-487, dez. 2012.

CARVALHO, A. M. de; MENDES, A. N. G.; BOTELHO, C. E.; OLIVEIRA, A. C. B. de; REZENDE, J. C. de; REZENDE, R. M. Desempenho agrônômico de cultivares de café resistentes à ferrugem no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Bragantia**, Campinas, p. 4-71, dez. 2012.

CAZORLA FM, ARREBOLA E, SESMA A, Pérez-García A, CODINA JC, MURILLO J, de VICENTE A. 2002. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92: 909 –916.

CDA. COPPER DEVELOPMENT ASSOCIATION INC. **A timeline of copper technologies**. USA, 2020. Disponível em: <<https://www.copper.org/education/history/timeline/timeline.html>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2022.

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

CHOUDHARY, S. P. et al. Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 63, p. 5659-5675, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Bionalidade positiva e clima favorecem produção histórica de café. Café, safra 2019-2020. 2021. Available

in: <<http://www.conab.gov.br/BoletimCafe.pdf>>. Acesso em: 27 de março de 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: café – segundo levantamento. v. 5, n. 2. Brasília. 2018. 70 p.

COOKSEY DA (1990) Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 28:201- 219.

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

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

CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 2001, Vitória. Resumos. Vitória: Embrapa Café. p. 1101-1108, 2001.

CUNHA, R. L. **Controle químico de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) como parte do programa APPCC**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Lavras, Lavras, MG. 2003.

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

EVANS, I.; SOLBERG, E.; HUBER, D. M. Copper and Plant Disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. (Eds.). **Mineral Nutrition and Plant Disease**. USA: The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 177-188, 2007.

FERNANDES, J. C., HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. **Botanical Review**, v. 57, p. 246 – 273, 1991.

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

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and Disease Resistance and Tolerance in Plants. In: J. J. Mortvedt, editor, *Micronutrients in Agriculture*, SSSA Book Ser. 4. SSSA, Madison, WI. p. 329-370. doi:10.2136/sssabookser4.2ed.c10. Gupta, U.C. 1979. Copper in agricultural crops, p. 255-288, 1991.

GUO, X. Y. et al. Toxicity and accumulation of copper and nickel in maize plants cropped on calcareous and acidic field soils. *Plant and Soil*, The Hague, v. 333, p. 365-373, 2010.

GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A., de VICENTE, A., CARRIÓN, V. J., SUNDIN, G. W., & CAZORLA, F. M. (2013). Recruitment and rearrangement of three different genetic

determinants into a conjugative plasmid increase copper resistance in *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 79(3), 1028-1033.

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

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.

ISQUIERDO, E. P. **Cinética de secagem de café natural e suas relações com a qualidade para diferentes temperaturas e umidades relativas do ar**. 2011. 160 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011

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

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

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

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, V.2 Ouro Fino - MG; Ed. Agronômica Ceres, Quinta Edição. 2016, 810 p..

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

KOPSELL, D. E.; KOPSELL, D. A. Copper. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. (eds) Hand book of plant nutrition. Boca Raton, **Taylor and Francis Group**, p. 293–328, 2007.

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 Kienzle, J. ***Pseudomonas syringae* and related pathogens**. Netherlands Springer, 1997. p.538-54.

LA TORRE, A.; IOVINCO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection: current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 57, n. 2, p. 201–236, 2018.

LEAL, F. D. S. et al. Desenvolvimento e criação de novos fungicidas. In: POZZA, E. A. et al. (Eds). **Plant health in tropical agribusiness: the numbers of the giant**. Lavras: UFLA, p. 28 – 49. Novembro, 2019.

LELLIOT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent

plant pathogenic *Pseudomonas*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 470-589, Dec. 1966

LIMA, E. A. DE. **Resistência múltipla de *Coffea canephora* conilon a *meloidogyne spp.*: mecanismos e genes candidatos**. 2015. 170p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 95 p. (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

MACIEL, K.W.; ALMEIDA, I.M.G.; PATRÍCIO, F.R.A.; PIERINI, V.; RODRIGUES, L.M.R.; BERIAM, L.O.S. Caracterização serológica de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da “mancha aureolada” do cafeeiro *Tropical Plant Pathology*, Lavras, v. 37, supl., 2012.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 988, 2008

MAGDALANE, C. M. et al. Photocatalytic activity of binary metal oxide nanocomposites of CeO₂/CdO nanospheres: investigation of optical and antimicrobial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.163, p.77-86, 2016.

MALAVOLTA, E.; VITTI G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações. POTAFOS. Piracicaba. Brasil, p. 329, 1997.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n.2, 2007. (Suplemento).

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

MITCHELL, R. E. Implicações de toxinas na ecologia e evolução de microrganismos patogênicos de plantas: bactérias. **Experientia**, v. 47, p. 791- 803, 1991.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, ed. 1^a, r.5^a, p. 142 – 177, 2013.

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

MOHAN, S.K.; CARDOSO, R.M.L.; PAIVA, M.A. Resistência em germoplasma de *Coffea* ao crestamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, Brasília, v.13, n.1, p.53-64, 1978.

MONTAG, J.; SCHREIBER, L.; SCHÖNHERR, J. An in vitro study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 474 – 481, 2006.

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

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

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.

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

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.

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**. 01 ed. Lavras: Editora UFLA, 2010, p.67-106.

PRINTZ, B. et al. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, art. 601, p. 1 – 7, May 2016.

RAIMUNDI MK, SOUZA RM, FIGUEIRA AR, SILAVA MS, SANTOS ACP, GUIMARÃES SSC (2021). Diagnosis of leaf bacterial diseases of coffee reveals the prevalence of halo blight. *Ciência e Agrotecnologia*, 45:e000121

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

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

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.

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

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

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

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

RODRIGUES, L.M.R.; ALMEIRA, 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***. Boletim técnico IAC, Campinas, n.212, p.1-30, 2013.

RODRIGUESNETO, 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.

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

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

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

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

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology, Saint Paul**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, ago. 1977.

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.

BETTIOL, W.; SPADOTTO, C. A. . Uso de fungicidas e potencial de contaminação ambiental no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n.3/4, p. 195, 1997.

STRAYER-SCHERER, A. et al. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v. 108, p. 196–205, 2018.

TOMAZELA, A. L. et al. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, n.2, p.192-201, 2006.

USDA. Annual Report Coffee Annual Brazil. Brazil. 2020b. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf> > Acesso em: 27 de março de 2021.

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

VIEIRA, H. D., Café rural: noções da cultura. 2nd. ed. Interciência, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2017.

YAMADA, J. K. **Resistência de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* ao cobre**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

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.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145 – 156, 2005.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

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.

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

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

7 ANEXOS

Resumo das avaliações da doença nas plantas de café.

Tabela 5 – Resumo da avaliação da doença nas plantas de café, com o isolado UFLA 148 com e sem hidróxido de cobre.

Tratamento	Repetição	av1	av2	av3	av4	av5	av6	av7	av8	av9	av10	av11	av12	av13
UFLA148 sem cobre	1	0,0000	0,0667	0,1000	0,2000	0,3500	0,6667	1,0500	1,5000	1,8333	2,5667	3,0500	3,9833	3,9833
UFLA148 sem cobre	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0500	0,0833	0,1000	0,1417	0,1917	0,2083	0,2083
UFLA148 sem cobre	3	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,1333	0,1917	0,2917	0,3333	0,4833	0,6083	0,6500	0,8000	0,8000
UFLA148 sem cobre	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,1000	0,1667	0,1667	0,5667	0,5667
UFLA148 sem cobre	5	0,0000	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,0833	0,1000	0,1750	0,3250	0,3417	0,4250	0,4583	0,4583
UFLA148 sem cobre	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,1500	0,1667	0,2417	0,3250	0,3917	0,3917
UFLA148 sem cobre	7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1333	0,2000	0,2333	0,2333
UFLA148 sem cobre	8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0667	0,1000	0,1000	0,1667	0,1667	0,2000	0,2833	0,2833	0,2833

Tratamento	Repetição	av1	av2	av3	av4	av5	av6	av7	av8	av9	av10	av11	av12	av13
UFLA148 com cobre	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,0667
UFLA148 com cobre	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
UFLA148 com cobre	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
UFLA148 com cobre	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
UFLA148 com cobre	5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,1000	0,1000	0,1000
UFLA148 com cobre	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
UFLA148 com cobre	7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
UFLA148 com cobre	8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,1000

Tabela 6 - Resumo da avaliação da doença nas plantas de café, com o isolado, com o isolado UFLA 129 com e sem hidróxido de cobre.

Tratamento	Repetição	av1	av2	av3	av4	av5	av6	av7	av8	av9	av10	av11	av12	av13
UFLA 129 sem cobre	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,1000	0,1000	0,1000
UFLA 129 sem cobre	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,1000	0,1667	0,1667
UFLA 129 sem cobre	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,0833
UFLA 129 sem cobre	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,1000	0,2000	0,2000
UFLA 129 sem cobre	5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,2333	0,2667	0,3833	0,3833
UFLA 129 sem cobre	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0667	0,1000	0,2333	0,2333	0,2333
UFLA 129 sem cobre	7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1333	0,1667	0,1667
UFLA 129 sem cobre	8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0500	0,0500	0,1500	0,1667	0,1667

Tratamento	Repetição	av1	av2	av3	av4	av5	av6	av7	av8	av9	av10	av11	av12	av13
UFLA129 com cobre	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,1000	0,1667	0,2333	0,2333
UFLA129 com cobre	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2333	0,2333
UFLA129 com cobre	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1667	0,2333	0,2333
UFLA129 com cobre	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,1000	0,1667	0,3667	0,3667	0,3667
UFLA129 com cobre	5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1333	0,1500	0,3000	1,2667	1,2667
UFLA129 com cobre	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1333	0,1333
UFLA129 com cobre	7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,1667	0,3000	0,4167	0,4167
UFLA129 com cobre	8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,6000	0,6000

Tabela 7 - Resumo da avaliação da doença nas plantas de café, com o isolado UFLA 57 com e sem hidróxido de cobre.

Tratamento	Repetição	av1	av2	av3	av4	av5	av6	av7	av8	av9	av10	av11	av12	av13
UFLA 57 sem cobre	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333
UFLA 57 sem cobre	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,0833
UFLA 57 sem cobre	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0500	0,0500
UFLA 57 sem cobre	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,1000	0,1500	0,2000	0,2000
UFLA 57 sem cobre	5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,0833
UFLA 57 sem cobre	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0500	0,0500	0,0833	0,0833	0,1417	0,1417	0,1417
UFLA 57 sem cobre	7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,0333	0,0333
UFLA 57 sem cobre	8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0333	0,2167	0,2833	0,2833

Tabela 9 – Média - Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tratamentos	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	média
UFLA 129 sem cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0167	0,0521	0,0792	0,1417	0,1875	0,1875	0,0514
UFLA 129 com cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0083	0,0458	0,0729	0,1750	0,4354	0,4354	0,0902
UFLA57 sem cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0042	0,0104	0,0146	0,0313	0,0396	0,0802	0,1135	0,1135	0,0317
UFLA 57 com cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0292	0,0729	0,0813	0,1417	0,1563	0,1637	0,0496
UFLA 148 sem cobre	0,0042	0,0188	0,0250	0,0500	0,0896	0,1406	0,2177	0,3094	0,3969	0,5500	0,6615	0,8656	0,8656	0,3227
UFLA 148 com cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0042	0,0208	0,0333	0,0333	0,0074
Testemunha sem cobre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0042	0,0063	0,0104	0,0167	0,0219	0,0219	0,0066

Analysis of Variance Table

Response: aacpd

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	6	167.74	27.9562	2.9247	0.01784 *
rep	7	71.23	10.1755	1.0645	0.40276
Residuals	42	401.46	9.5586		

Tabela 9 - Teste de Scott-Knott (p<0,05).

Tabela 10 – Média - Teste de Scott-Knott (p<0,05).

TRATAMENTO	AACPD	SCOTTKNOT (5%)
UFLA 129 sem cobre	0,815625	b
UFLA 129 com cobre	1,323958333	b
UFLA 57 sem cobre	0,503645833	b
UFLA 57 com cobre	0,803720238	b
UFLA 148 sem cobre	5,424479167	a
UFLA 148 com cobre	0,110416667	b
Testemunha sem cobre	0,10625	b