



ALINE KOZLAKOWSKI

**ANÁLISE MOLECULAR DE *Pseudomonas cichorii*
ATRAVÉS DE REP-PCR E TESTE DE
PATOGENICIDADE EM MUDAS DE CAFEEIRO E
ALFACE**

**LAVRAS-MG
2022**

ALINE KOZLAKOWSKI

**ANÁLISE MOLECULAR DE *Pseudomonas cichorii* ATRAVÉS DE REP-PCR E
TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE CAFEIEIRO E ALFACE**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador
Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

ALINE KOZLAKOWSKI

**ANÁLISE MOLECULAR DE *Pseudomonas cichorii* ATRAVÉS DE REP-PCR E
TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE CAFEIRO E ALFACE**

**MOLECULAR ANALYSIS OF *Pseudomonas cichorii* THROUGH REP-
PCR AND PATHOGENICITY TEST IN COFFEE AND LETTUCE SEEDLINGS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para a obtenção do título de Bacharel.

Aprovado em ___ de ___ de 2022.

BANCA
BANCA
BANCA

DEPARTAMENTO
DEPARTAMENTO
DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador
Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, minha irmã e minha família, pela amizade, paciência e apoio.

Ao professor Ricardo Magela de Souza pela orientação e a Sarah da Silva Costa Guimarães pela coorientação, ensinamentos e auxílios.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e oportunidades proporcionadas durante a graduação. Ao CNPq, por conceder a bolsa de iniciação científica.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de plantas: Rafael, Tarcísio, Sarah, Ana e Vitória, pela amizade, companheirismo e ensinamentos nos trabalhos.

A técnica Ana Maria, por todo o aprendizado, auxílios, apoio e amizade.

Ao técnico Sílvio, pelo fornecimento das mudas utilizadas no trabalho e ensinamentos.

A Deila, pelos conselhos e auxílio estatístico em todo experimento.

Aos amigos, pelo suporte, conselhos e por me acompanharem durante essa caminhada.

RESUMO

Pseudomonas cichorii (Pc), agente causal do crestamento bacteriano do cafeeiro (*Coffea sp.*), é importante economicamente devido à sua ampla gama de plantas hospedeiras, como o cafeeiro, a alface (*Lactuca sativa* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), entre outros. Em alface de cultivo hidropônico pode-se observar sintomas como o escurecimento da região do colo, seguido de podridão e morte da planta. No cafeeiro os sintomas aparecem geralmente nas folhas mais velhas, apresentando lesões necróticas, de coloração negra e formato irregular. Contudo, a escassez de conhecimento sobre a variabilidade e a ecologia das populações deste patógeno dificultam a seleção efetiva de cultivares resistentes. Portanto, este estudo teve como objetivos: identificar isolados de Pc oriundos de cafeeiro e alface com sintomas de crestamento bacteriano, provenientes de diferentes municípios de Minas Gerais, por meio de *primers* específicos; avaliar a diversidade genética de *P. cichorii* utilizando rep-PCR; realizar testes de inoculação cruzada para confirmar a especificidade de hospedeiros, verificar a incidência da doença nos diferentes hospedeiros, o tempo de incubação e a curva de progresso da doença para o cafeeiro. Foram obtidos três isolados de cafeeiro e 10 de alface, todos identificados como *P. cichorii* utilizando *primers* específicos. Os 13 isolados obtidos juntamente com o isolado referência Pc CFBP 2101 foram inoculados em mudas de cafeeiro e alface. Os resultados dos perfis genéticos obtidos de BOX e ERIC-PCR permitiram verificar padrões de bandas diferentes para os isolados obtidos dos dois hospedeiros e para o isolado referência Pc CFBP 2101, indicando haver variabilidade intraespecífica. Todos os isolados de *P. cichorii*, independentemente do hospedeiro de origem, causaram doença em mudas de cafeeiro e alface, demonstrando que não há especificidade de hospedeiro. As médias de incidência foram próximas, entretanto, o tempo de incubação médio diferiu para cada hospedeiro. As curvas de progresso da doença no cafeeiro atingiram médias diferentes pelo Teste de Tuckey, de acordo com o isolado utilizado. Os resultados deste estudo fornecem informações úteis sobre a diversidade genética de *P. cichorii* para os programas de melhoramento visando à seleção de germoplasmas resistentes.

Palavras-chave: BOX-PCR, ERIC-PCR, *Primer* específico, variabilidade genética.

ABSTRACT

Pseudomonas cichorii (Pc), the causal agent of bacterial blight in coffee, is economically important due to its wide range of hosts, such as coffee, lettuce, pepper, tomato, among others. In hydroponic cultivation lettuce, symptoms of the collar region can be observed, followed by rot and plant death. In coffee, symptoms usually appear on older leaves, presenting necrotic lesions, with black identification and irregular shape. However, the effectiveness of this variety and the effectiveness of the resistant cultivar variety. Therefore, this study aimed to: identify isolates from coffee and lettuce with symptoms of bacterial blight, originating from different cities in Minas Gerais, through specific primers, to evaluate the genetic diversity of *P.cichorii* using rep-PCR; perform cross-inoculation tests to confirm host specificity, verify the possibility of in the different hosts, the incubation time and a curvature of the disease progression for the coffee tree. There were three isolates from coffee and 10 from lettuce, all identified as *P. cichorii* using specific primers. The 13 isolates obtained with the reference Pc2101 were inoculated in coffee and lettuce seedlings. The results of the genetic profiles obtained from BOX and ERIC-PCR will allow to verify the patterns of different bands for isolates obtained from the two isolated hosts and for the reference Pc CFBP 2010, indicating intraspecific variability. All *P. cichorii* isolates, regardless of the host of origin, caused the disease in coffee and lettuce seedlings, demonstrating that there is no host specificity. The incubation averages were close, however, the average incubation time differed for each host. The curves of different disease progression in coffee agree means by Tuckey's Test, with the isolate used. The results of this study provide useful information about the genetic diversity of *P. cichorii* breeding programs to protect the selection of germplasm.

Keywords: BOX-PCR, ERIC-PCR, Specific primer, genetic variability.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise de PCR em gel de agarose.	23
Figura 2 – Análise do produto da PCR em gel de agarose, utilizando os primers correspondentes à região ERIC.	24
Figura 3 - Análise do produto PCR em gel de agarose, utilizando o primer correspondente à região BOX.	24
Figura 4 – Análise do produto PCR em gel de agarose, utilizando os primers correspondentes à região REP.	25
Figura 5 – Dendrograma gerado a partir das bandas de ERIC-PCR.	26
Figura 6 - Dendrograma gerado a partir das bandas de BOX-PCR.....	27
Figura 7 - Dendrograma gerado a partir da combinação dos dados ERIC-BOX.	28
Figura 8 - Folha de alface e folhas de cafeeiro com os respectivos sintomas do crestamento bacteriano.....	29
Figura 9 - Análise de PCR em gel de agarose para material coletado no cafeeiro.....	29
Figura 10 - Análise de PCR em gel de agarose para material coletado da alface.	30
Figura 11 – Incidência dos isolados para as culturas: cafeeiro e alface. Experimento 1.31	
Figura 12 – Incidência dos isolados para as culturas: cafeeiro e alface. Experimento 2.31	
Figura 13 – Período de incubação dos isolados para cada cultura: cafeeiro e alface. Experimento 1.	33
Figura 14 – Período de incubação dos isolados para cada cultura: cafeeiro e alface. Experimento 2.	33
Figura 15 – Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliado em mudas de cafeeiro. Experimento 1.....	34
Figura 16 – Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliado em mudas de cafeeiro. Experimento 2.....	35
Figura 17 – Área Abaixo da Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliados em mudas de cafeeiro. Experimento 1.	36
Figura 18 – Área Abaixo da Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliados em mudas de cafeeiro. Experimento 2.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Pseudomonas cichorii</i> obtidos de plantas de alface e cafeeiro de municípios de Minas Gerais no período de 2012 a 2019.	17
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 O cafeeiro.....	12
2.2 A alface	12
2.3 Crestamento bacteriano	13
2.3.1 Etiologia e sintomatologia	14
2.3.2 Epidemiologia	14
2.4 rep-PCR.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local de realização da pesquisa	16
3.2 Origem dos isolados.....	16
3.3 Preparo e multiplicação bacteriana para a extração do DNA	17
3.4 Extração do DNA genômico dos isolados de <i>P. cichorii</i>	18
3.5 Identificação dos isolados utilizando <i>primers</i> específicos.....	18
3.6 Análise da diversidade genética de <i>P. cichorri</i> por meio rep-PCR	18
3.7 Inoculação cruzada dos isolados de <i>P. cichorii</i> em mudas de café e alface	20
3.8 Avaliação da incidência e período de incubação.....	21
3.9 Avaliação da curva de progresso da doença no cafeeiro.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERENCIAL	38

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é umas das práticas essenciais para o agronegócio do Brasil, com enorme relevância na perspectiva econômica e social nas regiões onde estão instaladas (MATIELLO, 2020). Atualmente, o Brasil se encontra no primeiro lugar no ranking de produção e exportação de café no mundo, além de ser destacar também, como sendo um dos maiores consumidores do produto (CONAB, 2021).

Já a alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais produzida no país. Devido a possibilidade de sucessivos cultivos no decorrer do mesmo ano, o hábito consolidado do consumo alimentar pela população e pela crescente demanda de produção, faz com que essa cultura seja bastante importante para a sociedade e para a economia (SALA; COSTA, 2016).

Tanto a cultura do café quanto da alface pode ser acometida por diversos problemas fitossanitários. Alguns desses problemas são ocasionados por agentes patógenos ou infecciosos, assim como pelas condições ambientais adversas e pelo manejo impróprio da cultura (KIMATI et al., 2017).

Fitopatógenos como vírus, bactérias, fungos e nematoides podem causar diversas doenças nestas culturas, sendo bastante prejudiciais por causarem importantes danos. Sendo assim, medidas eficazes de controle devem ser adotadas, como métodos genéticos, químicos e culturais (PITTA, 2015).

Um dos agentes patogênicos que frequentemente afetam a cultura do café e da alface é a bactéria *Pseudomonas cichorii* (Swingle (1925) Stapp (1928)), agente causal do crestamento bacteriano. Esta bacteriose é importante economicamente por ocorrer em todo o mundo e devido a sua ampla gama de plantas hospedeiras, como alface, inhame (*Dioscorea spp.*), taioba (*Xanthosoma sagittifolium*), entre outras (COTTYN et al., 2009, ROMEIRO et al., 1988). No Brasil, essa bactéria está associada a mais de 45 espécies botânicas diferentes (PARRA et al., 2019).

No Brasil, a variabilidade genética de isolados de *P. cichorii* foi analisada por Destéfano et al. (2003). Trinta e cinco isolados obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas foram investigados por meio da amplificação da região 16S-23S do rDNA e posterior digestão com enzimas de restrição *Afa I*, *Dde I* e *Taq I*. Observou-se que linhagens isoladas de diferentes regiões geográficas e diferentes hospedeiros apresentaram perfis idênticos, enquanto linhagens isoladas de mesmo hospedeiro e mesma região geográfica apresentaram perfis diferentes. Embora todos os isolados

pertençam ao gênero *Pseudomonas*, os valores de similaridade das regiões espaçadas entre determinados isolados, por serem baixos, mostram que mais estudos são necessários para elucidar os resultados alcançados.

O diagnóstico do cretamento bacteriano e a identificação de *P. cichorii* eram tradicionalmente realizados por meio do isolamento, cultivo e testes bioquímicos padrão além dos postulados de Koch para confirmação da patogenicidade. Entretanto, a identificação de bactérias baseada somente em caracteres fenotípicos pode levar a erros. A utilização de *primers* específicos para *P. cichorii* é uma tecnologia sensível, confiável para a rápida detecção e correta identificação de isolados desta espécie possibilitando uma adequada tomada de decisão no gerenciamento de doenças (COTTYN et al., 2011).

O método chamado de REP-PCR é conhecido como a “impressão digital” de um genoma. É uma técnica fundamentada na amplificação do DNA, considerada como uma técnica excepcionalmente rápida, reprodutível, bastante discriminatória e confiável (LOUWS et al, 2016; VERSALOVICK, 2014). Essa técnica utiliza *primers* de DNA complementares com os de ocorrência natural, bastantes conservados, com sequencias repetidas de DNA e presente em múltiplas copias do genoma em quase todas as bactérias Gram positivas (LUPSKI; WEINSTOCK, 2012). As identidades genômicas que são criadas pela técnica de REP-PCR possibilita a diferenciação em nível de cepa, espécies e subespécies (RADEMAKER; DE BRUJIN, 2013).

No Brasil, a escassez de conhecimento sobre a variabilidade e ecologia das populações de *P. cichorii*, dificulta a seleção efetiva de cultivares resistentes. Deste modo, objetivou-se com este trabalho identificar e diferenciar isolados de *P. cichorii* patogênicos a cafeeiros e alface, provenientes de diferentes municípios de Minas Gerais, por meio da técnica de rep-PCR e através de inoculação cruzada confirmar a especificidade de hospedeiros, o período de incubação e a severidade da doença para o cafeeiro e para a alface.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea sp.*), pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, o qual reúne diversas espécies. Segundo Bridson e Verdcourt (1988) e Bridson (1994), o cafeeiro é classificado em dois gêneros: o *Psilanthus* Hook e *Coffea* L., onde se distinguem, principalmente, nas características identificadas em suas estruturas florais.

As espécies *Coffea arabica*, café Arábica, e *Coffea canephora*, café Robusta ou Conilon são as principais produzidas no Brasil, sendo muito importantes economicamente para o mercado interno e externo. Atualmente, quando consideradas as duas variedades, tem-se um total de 2,23 milhões de hectares destinados a cafeicultura e a produção estimada para 2022 de 55,7 milhões de sacas de 60 quilos (CONAB, 2022).

Contudo, o potencial de produção da cultura pode ser afetado por fatores externos, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças, que comprometem a produtividade da cultura e causam perdas significativas (OESTREICH-JANZEN, 2010). As doenças limitantes para produção podem ser causadas por vírus, fungos, bactérias e nematóides.

As pragas e doenças podem afetar diversas partes da planta do cafeeiro, como folhas, caule, raízes, galhos, brotações novas, flores e frutos, causando vários problemas, como tombamento de mudas, mal pegamento de floradas, enfraquecimento das plantas, perda de qualidade dos frutos, desfolhamento, perda de peso, entre outros. (MALAVOLTA, 2010).

Com relação as doenças bacterianas, cinco são descritas para a cultura: *Xylella fastidiosa* (PARADELA FILHO et al., 1995) causadora da atrofia dos ramos do café; *Burkholderia andropogonis* (RODRIGUES NETO et al., 1981), agente causal da mancha escura bacteriana; *Pseudomonas syringae pv. garcae* (AMARAL et al., 1956; ROBBS et al., 1974), causadora da mancha aureolada; *Pseudomonas syringae pv. tabaci* (RODRIGUES NETO et al., 2006; DESTÉFANO et al., 2010) causadora da mancha foliar bacteriana; e a *Pseudomonas cichorii* ((Swingle (1925) Stapp (1928)), agente causal do crestamento bacteriano.

2.2 A alface

A alface (*Lactuca sativa* L.), pertence à família Asteraceae, gênero *Lactuca*, é originária do leste Mediterrâneo em regiões de clima temperado, sendo introduzida no

Brasil pelos portugueses no século XVI. A cultura é a hortaliça folhosa mais importante no Brasil, possuindo relevância social e econômica. Considerada uma das hortaliças mais consumidas no mundo, sendo a mais popular entre as folhosas existentes e a mais cultivada em todas as regiões geográficas (YURI et al., 2017).

A alface apresenta aspectos morfológicos de porte herbáceo como folhas interpostas presas a um caule brevemente curto. Por causa de algumas manipulações genéticas, as folhas podem apresentar características crespas ou lisas, soltas ou formando uma cabeça, com coloração que varia do verde-escuro para o verde-amarelo indo até diferentes tons roxeados (SALA; COSTA, 2012).

Por ter alta produtividade, ter um ciclo curto e ser possível seu cultivo durante o ano todo, essa cultura é bastante atrativa para os agricultores, sendo cultivada tanto em grandes cidades metropolitanas, usando vários sistemas de produção como hortas de cultivo hidropônicas em estufas e em campo aberto (SALA; COSTA, 2016).

Assim como o cafeeiro, a alface está sujeita a ocorrência de várias doenças em todos os modelos de produção, sofrendo grandes perdas devido ao ataque de fungos, bactérias e vírus. As principais doenças de origem bacteriana que afetam a cultura da alface são: Podridão-mole causada pela *Pectobacterium spp.* ou *Dickeya spp.* = *Erwinia spp.* (Jones)(Waldee); Mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis pv. vitians* (Brown (1918) Dye (1978)) (VAUTERIN et al. 1995); Mancha-cerosa causada pela *Pseudomonas cichorii* (Swingle (1925) Stapp (1928)); Queima-lateral-das-folhas causadas por *Pseudomonas marginalis pv. marginalis* (Brown (1918), Stevens (1925)). (COLARICCIO; CHAVES, 2017).

2.3 Crestamento bacteriano

O crestamento bacteriano ou mancha cerosa, nome popular mais conhecido para a alface, é uma doença causada pela bactéria *Pseudomonas cichorii*, pertencente ao grupo das *Pseudomonas* fluorescentes. Se trata de um patógeno de enorme importância, pois possui ampla gama de hospedeiros. No Brasil, essa bactéria já foi identificada em mais de 45 diferentes espécies botânicas. (SAHIN; MULLER; 2017).

A bactéria *Pseudomonas cichorii* foi observada no cafeeiro pela primeira vez no Brasil por Robbs et al. (1974), ocorrendo em viveiro e campo no Estado de Minas Gerais e, posteriormente, em viveiro, no Estado de São Paulo, principalmente na estação chuvosa, entre os meses de dezembro e janeiro (ALMEIDA et al., 2012).

Os sintomas do cretamento bacteriano, geralmente, são apresentados por manchas irregulares no interior do limbo foliar, de coloração marrom escuro, apresentando formas relativamente triangulares, avançando a partir dos bordos. Quando sob condições de alta umidade, as folhas mais recentes também são atacadas. Quando existe coalescência de lesões, os bordos queimam, ficando com uma cor escura e o tecido fica podre e flácido (SILVA; LIMA NETO, 2017).

Normalmente, esses sintomas são confundidos com os associados aos fenômenos climáticos, em especial as geadas. O principal motivo para o aparecimento da doença é a umidade. Quando as culturas estão em condições de baixa umidade, a queima das folhas é menor, contudo, ficam encarquilhadas e enferrujadas (SILVA et al., 2018).

2.3.1 Etiologia e sintomatologia

Pseudomonas cichorii é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, em formato de bastonete, com um tufo de flagelos polares. As colônias são de coloração creme e produtoras de pigmento fluorescente em meio King B. Nos testes LOPAT apresentam resultados positivos para oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo e negativos para a produção de Levana, Arginina dihidrolase e podridão em discos de batata.

Apresenta resultados negativos para hidrólise de gelatina, nucleação de gelo e acúmulo de poli (β -hidroxibutirato) (PHB). Utilizam manitol, 2-ketogluconato, meso-tartarato, D(-) aspartato e não utilizam eritritol, adonitol, lactose, benzoato, geraniol, celobiose, sorbitol, sacarose, D(-)-tartarato, D-arabinose, L-ramnose e trealose (LELLIOTT et al., 1966; RODRIGUES NETO et al., 1981, YOUNG; TRIGGS, 1994; SCHAAD et al., 2001).

No cafeeiro os sintomas são observados geralmente nas folhas mais velhas, apresentando lesões necróticas, de coloração negra e formato irregular. Não é comum o halo amarelo ao redor das lesões, mas sim um aspecto de encharcamento (ROBBS et al., 1974; KIMURA et al., 1976). Em alface, por exemplo, os quais se manifestam nas folhas internas na forma de pequenas manchas necróticas marrom-escuras brilhantes e firmes, não amolecidas (LOPES et al. 2010).

2.3.2 Epidemiologia

A bactéria *P. cichorii* sobrevive no solo, em particular nos campos infectados por restos culturais. Sua disseminação acontece através de respingos de águas e por chuvas acompanhada por ventos (ALMEIDA et al. 2012).

As fontes de inóculo são os solos contaminados, a presença de hospedeiros alternativos e os restos culturais infectados. Essa bactéria é disseminada através da água e invade a planta por meios de aberturas naturais, no período em que as folhas se encontram úmidas. Alguns ferimentos também, como os causados por insetos, podem servir como porta de entrada para a bactéria (FELIX et al., 2014).

Além do café e da alface, *P. cichorii* já foi identificada causando sintomas de manchas nas folhas de chicória (*Cichorium endivia*) que inclusive, foi através dessa planta hospedeira que se deu o nome para esta espécie (MALAVOLTA et al., 2018).

2.4 rep-PCR

O método chamado de rep-PCR (*repetitive-sequence-based-PCR*), é o efeito da amplificação de DNA usando *primers* que complementam a regiões conservadas e repetitivas de DNA, que geralmente se encontram em múltiplas cópias do genoma presente na maioria das bactérias (BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994; MAHUKA et al., 2006).

Existem três principais grupos de elementos repetitivos, abrangendo as sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) composto por 35 – 40 pb, a ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) que apresenta 124 – 127 pb e BOX, composta por 3 subunidades: a box A com 54 pb, box B com 43 pb e box C com 50 pb, contudo, apenas a box A é bastante conservada em bactérias (STERN et al., 1984; HULTON et al., 1991; MARTIN et al., 1992; KOEUTH et al., 1995).

A técnica de rep-PCR é uma variação da PCR e foi desenvolvida com base na observação da ocorrência de sequências repetitivas conservadas chamadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos de 154 pb que atuam como sítios de iniciação para PCR, denominados elementos BOX (LOUWS et al., 1999).

A análise de rep-PCR dessas sequências repetitivas, a qual engloba os protocolos REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, geram diferentes *fingerprints* genômicos, e tem sido utilizada para diferenciação de isolados em estudos sobre a diversidade genética de espécies de bactérias fitopatogênicas, com a finalidade de diferenciar patovares e isolados dentro de uma mesma espécie, sendo possível estudar a variabilidade genética entre eles (VANEECHOUTTE, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização da pesquisa

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de plantas e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Minas Gerais.

3.2 Origem dos isolados

Foram recebidas plantas de alface com sintomas do crestamento bacteriano, trazidas por diferentes produtores e municípios de Minas Gerais. Para o isolamento foi realizado inicialmente o teste de exsudação em gotas, para confirmação da presença da bactéria. A seguir procedeu-se a desinfestação superficial do tecido, maceração, plaqueamento por meio de estrias paralelas em meio King B (KING; RANEY; WARD, 1954) e MB1 (523 Kado e Heskett, 1970) (ROMEIRO, 2001) e em seguida as placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Após a obtenção de colônias isoladas com características típicas do patógeno em placas de Petri, foi realizada a repicagem da bactéria para tubos contendo meio MB1 sólido inclinado, seguido de incubação a 28 °C por 48 horas.

Das plantas de alface foram obtidos 10 isolados. Foram também usados neste trabalho o isolado referência de *Pseudomonas cichorii* CFBP 2101 proveniente da “Collection Français de Bactéries Phytopathogènes” e os isolados UFLA135, UFLA 136 e UFLA 146 obtidos de cafeeiro pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1) (RAIMUNDI, 2017) (RAIMUNDI, et al., 2021).

Tabela 1 – Isolados de *Pseudomonas cichorii* obtidos de plantas de alface e cafeeiro de municípios de Minas Gerais no período de 2012 a 2019.

Isolados	Origem	Propriedade	Hospedeiro
CFBP 2101 ⁽¹⁾	Sri Lanka	–	<i>Cichorium endívia</i>
UFLA 135	Patrocínio-MG	–	<i>Coffea arabica</i>
UFLA 136	Lavras-MG	–	<i>Coffea arabica</i>
UFLA 146	Lavras-MG	–	<i>Coffea arabica</i>
3P01	Três Pontas-MG	–	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
3P02	Três Pontas-MG	–	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
3P04	Três Pontas-MG	–	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DU01	Boa Esperança-MG	Eduardo Nogueira	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DU02	Boa Esperança-MG	Eduardo Nogueira	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DU04	Boa Esperança-MG	Eduardo Nogueira	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DO1 01	Boa Esperança-MG	Douglas Spineli	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DO1 02	Boa Esperança-MG	Douglas Spineli	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DO1 03	Boa Esperança-MG	Douglas Spineli	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider
DO2 01	Boa Esperança-MG	Douglas Spineli	<i>Lactuca sativa</i> Laurel/Raider

⁽¹⁾ CFBP 2101- Collection Français de Bactéries Phytopathogènes

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

3.3 Preparo e multiplicação bacteriana para a extração do DNA

Os isolados preservados em água mineral, à temperatura ambiente, foram recuperados e transferidos para placas contendo meio King B, pelo método de estrias paralelas para obtenção de colônias isoladas. Depois de incubação a 28 °C por 48 h, colônias isoladas de *P. cichorii* foram passadas para tubos contendo o meio MB1 líquido e submetidas à extração do DNA.

3.4 Extração do DNA genômico dos isolados de *P. cichorii*

Para a extração do DNA total do genoma bacteriano foi utilizado o protocolo de Ausubel et al. (1992) modificado. Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas, de cada isolado cultivado sob agitação por 12 h a 24 °C em meio MB1 líquido, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 40 segundos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 567µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA), 30 µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Cem µL de NaCl 5 M foram adicionados aos tubos, seguindo-se de agitação em vórtex. Novamente, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguido de agitação manual e incubação em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, à temperatura ambiente, foram adicionados 780 µL de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, seguindo-se de agitação em vórtex e centrifugação a 10.000 rpm por 7 minutos a 4 °C. Após esse processo, a fase superior foi transferida para um novo tubo, medindo-se o volume. Nessa etapa, foram adicionados 300 µL de álcool isopropílico, misturando-se gentilmente. Novamente foi realizada centrifugação a 10.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com 1mL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 7 minutos e posterior descarte do etanol 70%. Após a secagem o pellet foi ressuspensionado em 60 µL de TE e armazenado a -20 °C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop TM Spectrophotometer ND-100 (Nano DropTechnologiesTM).

3.5 Identificação dos isolados utilizando *primers* específicos

Os isolados obtidos foram submetidos ao teste molecular para confirmação da identidade, através do par de *primers* PscHrc662F (5' AGGCTTTATGGAAACCCTGACG-3') e PscHrc751R (5'-ACAATCACCGCCACGATCAG-3'), descritos originalmente para a detecção de *P. cichorii* por PCR em tempo real (COTTYN et al., 2011). Em seguida, foram preservados para composição da Coleção de Bactérias do Departamento de Fitopatologia da UFPA.

3.6 Análise da diversidade genética de *P. cichorii* por meio rep-PCR

Os *primers* ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGG-TGAGCG-3') (OPGENORTH et al., 1996), foram utilizados na amplificação do genoma de *P. cichorii*. A reação foi realizada em volume de 50 µL,

contendo 10,0 µL de Buffer 5X; 3,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 2,5 µL de cada primer; 28,75 µL de água ultrapura autoclavada, 0,25 µL de Go Taq®Flexi DNA Polymerase (Promega) e 2,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 AxigenMaxigene, com as seguintes etapas de amplificação descritas por Opgenorth et al. (1996): desnaturação inicial a 95 °C, por 6 minutos; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 65 °C, por 8 minutos, com um ciclo final de extensão a 68 °C, por 16 minutos.

Para a técnica de BOX-PCR foi utilizado o *primer* correspondente à região BOX, BOXAIR (5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI JÚNIOR, 1991; LOWS et al., 1994). O protocolo de amplificação utilizado foi de acordo com Lows et al. (1994), com algumas modificações. A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µL de dNTPsmix (10 mM); 0,5 µL do primer; 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 2 µL de DNA (10ng/µL) e 18 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 AxigenMaxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C, por 5 min, com um ciclo final de extensão a 72°C, por 5 min.

Para a técnica de REP-PCR foram utilizados os *primers* correspondentes à região REP, REPIR-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP-2I(5'-ICGICTTATGIGGCCTAC-3') (LOWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996). O protocolo de amplificação foi utilizado de acordo com Lows et al. (1994), com algumas modificações. A reação foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de dNTPsmix (10 mM); 2 µL de cada *primer*; 0,5 µL de enzima Taq DNA polimerase (GoTaq®), 2 µL de DNA (10ng/µL) e 12,5 µL de água livre de nucleasse. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 AxigenMaxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C, por 6 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 1 min, anelamento por 1 min a 40°C e extensão a 65°C, por 1 min, com um ciclo final de extensão a 65°C, por 16 min.

Todos os produtos amplificados da rep-PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®) com marcador Ladder 100 pb (Ludwig). Fundamentado na amplificação positiva do DNA dos isolados de *P. cichorii* utilizando-se os *primers* ERIC, BOX e REP, foi feita a análise e

comparação de todas as bandas amplificadas dos isolados de *P. cichorii* provenientes de diferentes hospedeiros e verificado a existência de variabilidade genética entre eles.

A partir das diferentes regiões amplificadas foram obtidos dendrogramas de similaridade, gerados utilizando-se do coeficiente Jaccard, através do software PAST vers 2.17 (HAMMER et al., 2001).

3.7 Inoculação cruzada dos isolados de *P. cichorii* em mudas de café e alface

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio King B em placas de 90 mm de diâmetro, incubados a 28°C por 48 horas e, a seguir, foi preparada a suspensão bacteriana. O isolado referência de *P. cichorii* CFBP 2101 e os isolados obtidos dos dois diferentes hospedeiros (Tabela 1) foram inoculados em mudas de cafeeiro sadias, cultivar Catuaí vermelho IAC-99, contendo 8 pares de folhas verdadeiras, e mudas de alface americana variedade Santa Celeste, com 30 dias.

O método de inoculação utilizado foi pulverização da suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) estéril, na concentração ajustada para ($A_{600} = 0,4$) (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990). Cada isolado foi inoculado em quatro plantas de cada espécie testada, sendo um experimento composto por 15 tratamentos, totalizando em 60 mudas de cada hospedeiro. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas testemunhas inoculadas apenas com solução salina (NaCl a 0,85%). As mudas de cafeeiro foram mantidas em câmara úmida por 48 horas e as mudas de alface por 24 horas antes e após a inoculação, ambas à temperatura de 23 ° C e umidade relativa superior a 70%. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo realizados duas repetições. Após o surgimento dos sintomas foram feitos reisolamentos e a comparação das colônias obtidas com as colônias originais, a fim de se completar os postulados de Koch.

Na análise dos resultados da inoculação cruzada, folhas de ambas as culturas que apresentaram sintomas da doença foram coletadas para a extração de DNA, seguindo o protocolo modificado de Leslie et al., 2006. Amostras de folhas lesionadas foram obtidas de todos os isolados, em ambas as culturas e macerado em nitrogênio líquido, acrescido de 100 mg de PVP. O material foi transferido para tubo de microcentrífuga (1,5mL), onde foram adicionados 700µL de tampão CTAB 2% e 7µL de B-mercaptoetanol (0,2%). Após homogeneização em vórtex, as amostras permaneceram em banho-maria (65 °C) por 10 min, agitadas novamente em vórtex e retornaram ao banho-maria por mais 20 min. Em sequência, 3µL de RNase foi adicionado para incubação (37 °C por 15 min). Após este

período, 700µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1) foram adicionados e agitou-se em vórtex (1 min) e centrifugou-se (10 min a 13.000 rpm). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Na etapa seguinte, acrescentou-se volume igual de isopropanol e 10% do volume de acetato de sódio 3M, colocou-se em repouso por 20 min em -20 °C. Depois, centrifugou-se em seguida (13.000 rpm por 10 min), descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 500µL de etanol 70%. Outra etapa de centrifugação foi realizada (13.000 rpm por 5 min), o sobrenadante foi novamente descartado e secou-se o pellet da mesma forma. Ao final, adicionou-se 50µL de água ultrapura ou TE 1x e as amostras permaneceram overnight a 4° C, a fim de ressuspender o DNA aos poucos. Posteriormente, testes bioquímicos foram realizados para comprovar a identidade deste material.

3.8 Avaliação da incidência e período de incubação

A partir do dia seguinte à inoculação, avaliações diárias foram feitas para constatar o aparecimento dos primeiros sintomas. As avaliações da incidência da doença foram realizadas utilizando-se o método qualitativo, presença ou ausência de sintomas, sendo observado também, para ambas as culturas, o período de incubação, que é o tempo após inoculação para que apareçam os primeiros sintomas da doença. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e a parcela experimental foi constituída por uma planta. A análise de variância foi em esquema fatorial 2 x 15, sendo, duas espécies (*Coffea spp.* e *Latucca sativa*) e 14 isolados de *Pseudomonas cichorii* e a testemunha. As variáveis significativas no teste F ($P \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o software Sisvar versão 5.1 (FERREIRA; 2011).

3.9 Avaliação da curva de progresso da doença no cafeeiro

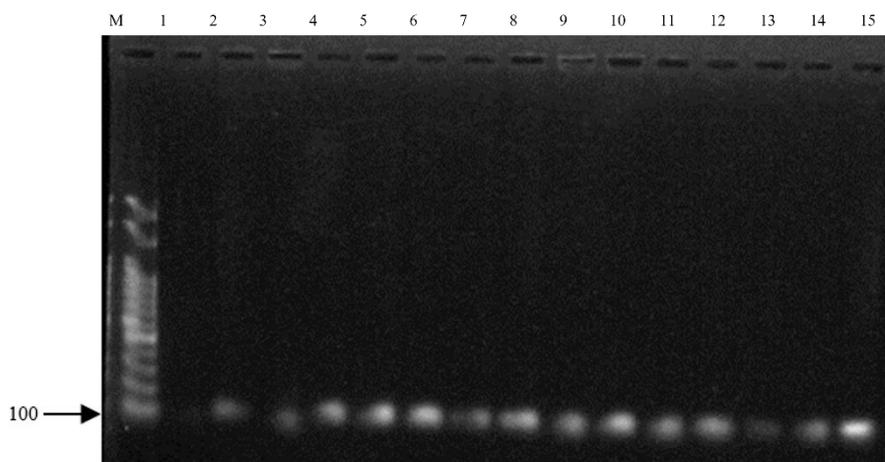
Após confirmados os primeiros sintomas da doença, começaram a ser avaliados por notas os tamanhos das lesões foliares características de *Pseudomonas cichorii*, utilizando-se a escala diagramática proposta por Belan et al. (2014), para comparação deles. Essa avaliação foi feita nas folhas do cafeeiro em um intervalo de 3 dias, a partir da confirmação dos primeiros sintomas, totalizando 10 avaliações. Foram utilizados dois pares de folhas inoculadas para se obter a média da severidade e calcular a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) para cada isolado (SHANER; FINNER, 1997). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC),

com 15 tratamentos, sendo, 14 isolados de *Pseudomonas cichorii* e a testemunha, avaliados em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí IAC 99. As variáveis significativas no teste F ($P \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o software Sisvar versão 5.1 (FERREIRA; 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identidade dos 10 isolados obtidos foi confirmada por meio da utilização dos *primers* específicos PscHrc662F e PscHrc751R descritos por Cottyn et al. (2011), utilizando outros isolados já identificados para a comparação. Todos os isolados apresentaram o produto de amplificação de 90 pb o que permitiu identificá-los como *Pseudomonas cichorii* (Figura 1).

Figura 1 – Análise de PCR em gel de agarose.

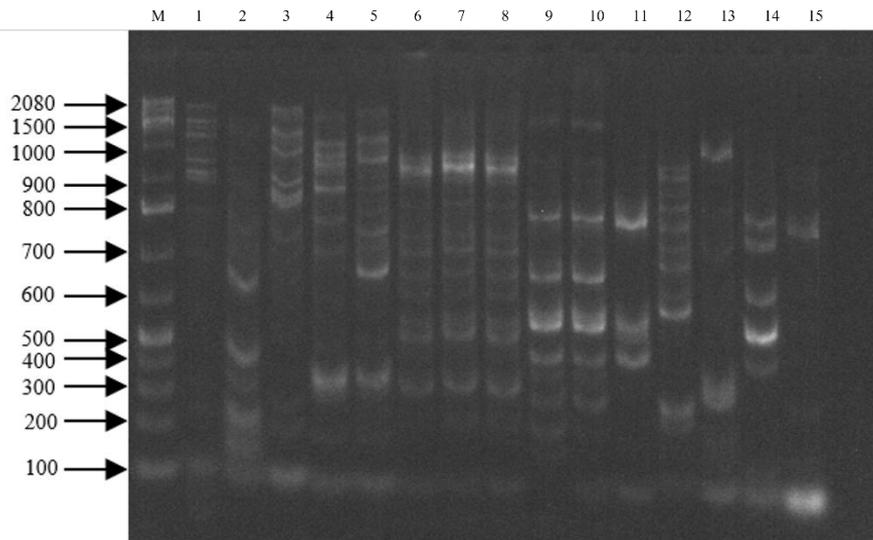


Legenda: Confirmação da identidade dos isolados como *Pseudomonas cichorii* por meio da utilização do par de *primers* específico PscHrc662F e PscHrc751R: (M) Marcador molecular de peso 100pb, (1) controle negativo, (2) Pc CFBP 2101, (3) UFLA135, (4) UFLA 136, (5) UFLA 146, (6) 3P01, (7) 3P02, (8) 3P04, (9) DU01, (10) DU02, (11) DU04, (12) DO101, (13) DO102, (14) DO103, (15) DO201.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

As análises dos padrões de *fingerprinting*, utilizando ERIC-PCR (Figura 2) e BOX-PCR (Figura 3) do isolado referência Pc CFBP 2101, dos três isolados oriundos do cafeeiro e dos 10 isolados de alface, permitiram acessar a diversidade genética de *P. cichorii*. Entretanto, a análise de REP-PCR não apresentou padrões de bandas suficientes e consistentes para a análise de diversidade genética (Figura 4).

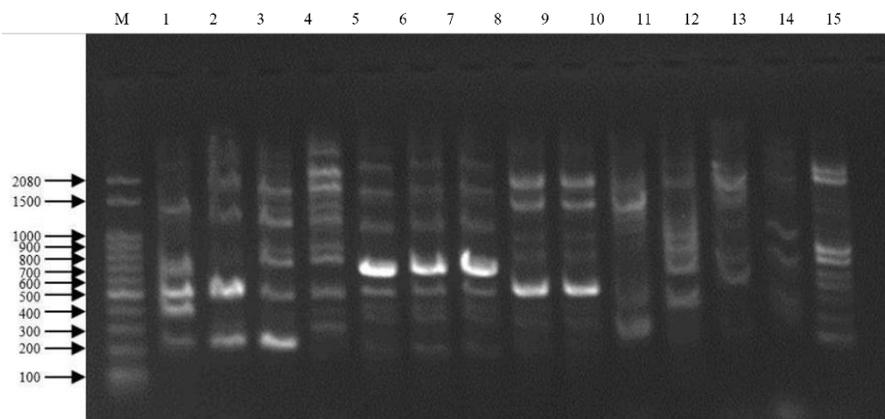
Figura 2 – Análise do produto da PCR em gel de agarose, utilizando os primers correspondentes à região ERIC.



Legenda: Comparando isolados de diferentes hospedeiros e regiões com o isolado referência Pc CFBP 2101 (2). Legenda: (M) Marcador Molecular de peso 100 pb, (1) UFLA 135, (2) Pc CFBP 2101, (3) UFLA 135, (4) UFLA 136, (5) UFLA 146, (6) 3P01, (7) 3P02, (8) 3P04, (9) DU01, (10) DU02, (11) DU04, (12) DO101, (13) DO102, (14) DO103, (15) DO201.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

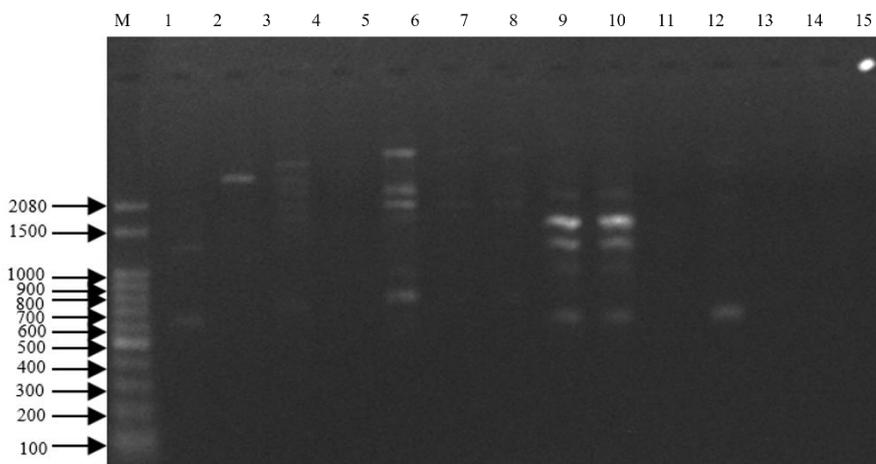
Figura 3 - Análise do produto PCR em gel de agarose, utilizando o primer correspondente à região BOX.



Legenda: Comparando isolados de diferentes hospedeiros e regiões com o isolado referência Pc (1) CFBP 2101. Legenda: (M) Marcador Molecular de peso 100 pb, (1) Pc CFBP 2101, (2) UFLA 135, (3) UFLA 136, (4) UFLA 146, (5) 3P01, (6) 3P02, (7) 3P04, (8) DU01, (9) DU02, (10) DU04, (11) DO101, (12) DO102, (13) DO103, (14) DO201.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 4 – Análise do produto PCR em gel de agarose, utilizando os primers correspondentes à região REP.

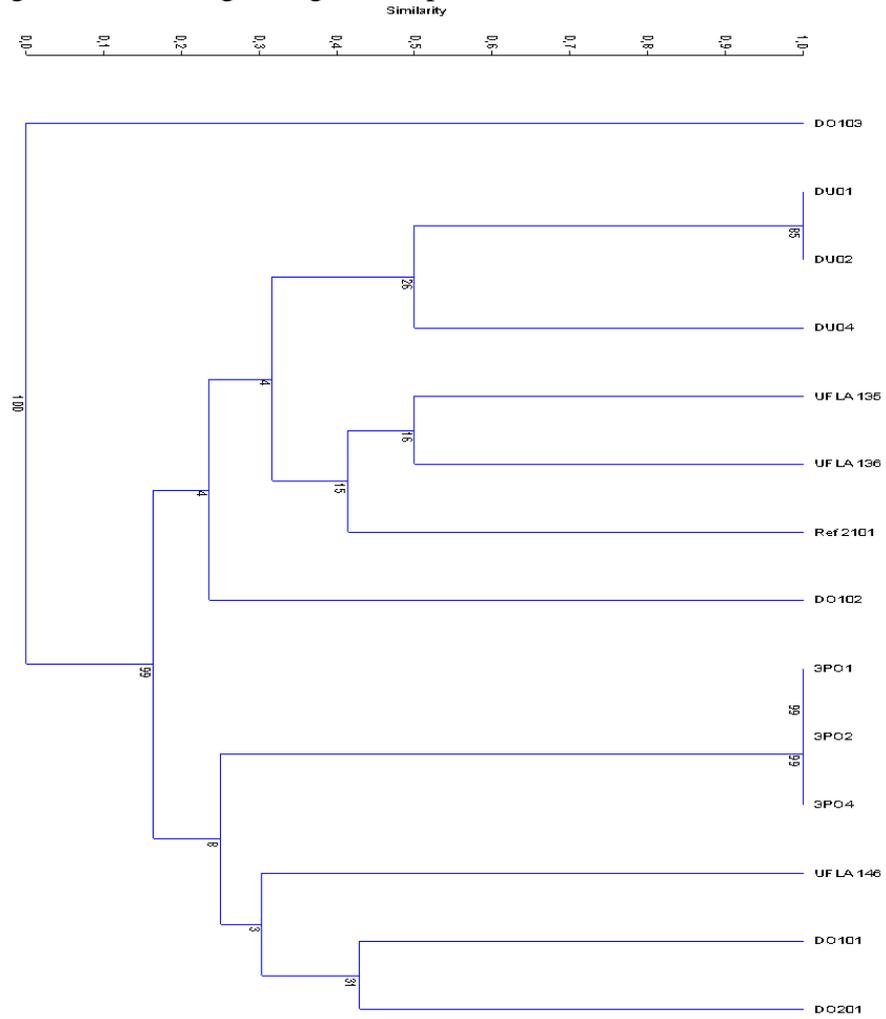


Legenda: Comparando isolados de diferentes hospedeiros e regiões com o isolado referência Pc CFBP 2101 (1). Legenda: (M) Marcador Molecular de peso molecular 100 pb, (1) Pc CFBP 2101, (2) UFLA 135, (3) UFLA 136, (4) UFLA 146, (5) 3P01, (6) 3P02, (7) 3P04, (8) DU01, (9) DU02, (10) DU04, (11) DO101, (12) D0102, (13) DO103, (14) DO201.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Os dendrogramas gerados a partir dos padrões de bandas de ERIC-PCR (Figura 5), BOX-PCR (Figura 6) e dos dados combinados ERIC-BOX (Figura 7) revelaram que *P. cichorri* apresenta variabilidade intraespecífica. O dendrograma dos dados combinados revelou a presença de 10 linhagens genéticas (Figura 7). Os isolados da alface, oriundos da mesma propriedade em Boa Esperança - MG, DU01, DU02 e DU04 apresentaram acima de 60% de similaridade e foram considerados da mesma linhagem genética e geneticamente mais semelhantes ao isolado de referência Pc CFBP 2101. Os isolados 3P01, 3P02 e 3P04, provenientes da alface de Três Pontas-MG, apresentaram 90% de similaridade e compuseram outro haplótipo. As outras oito linhagens genéticas continham apenas um isolado.

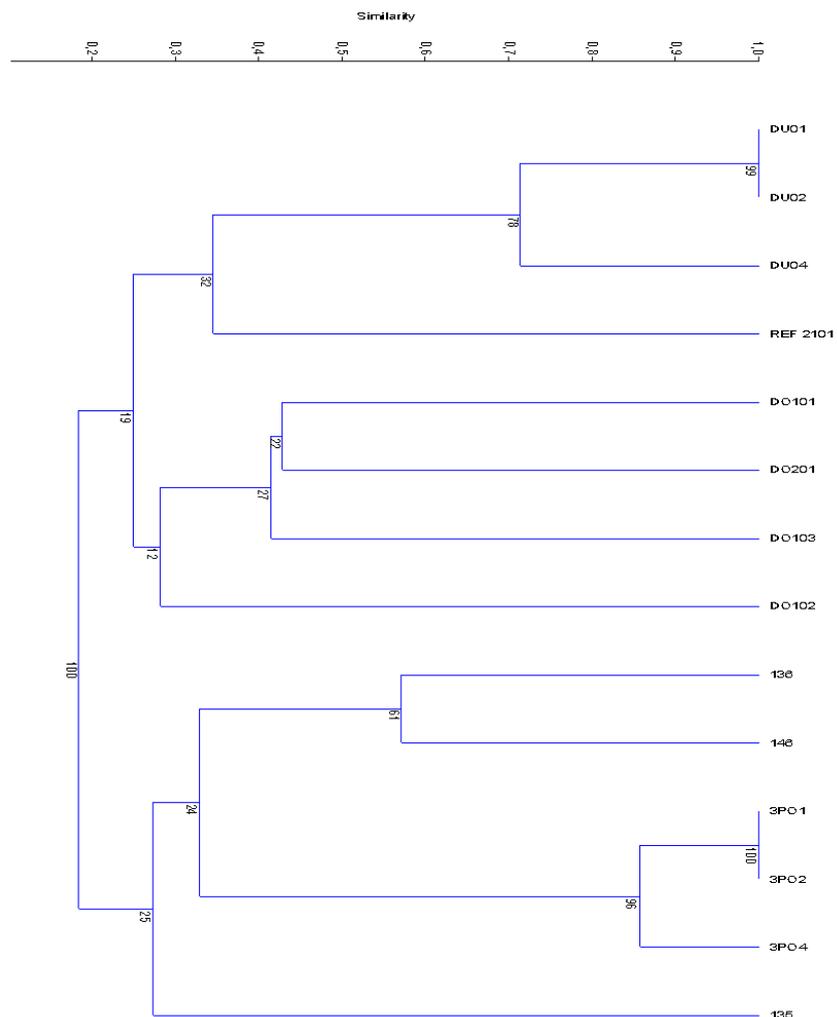
Figura 5 – Dendrograma gerado a partir das bandas de ERIC-PCR.



Legenda: Dendrograma gerado a partir do Coeficiente de Jaccard entre perfis de ERIC-PCR dos isolados de *P. cichorii*. Os valores de *bootstrap*, obtidos de 10000 reamostragens, estão indicados nos nós.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

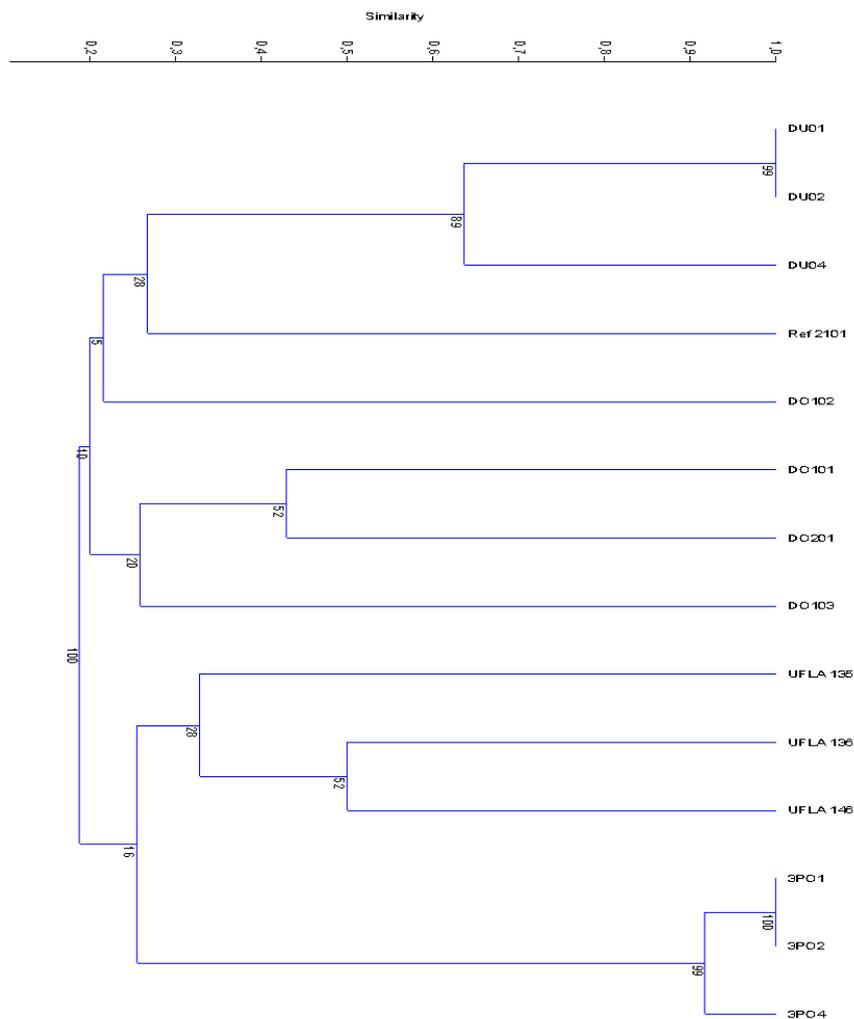
Figura 6 - Dendrograma gerado a partir das bandas de BOX-PCR.



Legenda: Dendrograma gerado a partir do Coeficiente de Jaccard entre perfis de BOX-PCR dos isolados de *Pseudomonas cichorii*. Os valores de *bootstrap*, obtidos de 10000 reamostragens, estão indicados nos nós.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 7 - Dendrograma gerado a partir da combinação dos dados ERIC-BOX.



Legenda: Dendrograma gerado a partir do Coeficiente de Jaccard entre perfis de BOX e ERIC- PCR dos isolados de *Pseudomonas cichorii*. Os valores de *bootstrap*, obtidos de 10.000 reamostragens, estão indicados nos nós.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

No teste de inoculação cruzada observou-se que todos os isolados, independentemente do hospedeiro, induziram sintomas em mudas de cafeeiro e alface (Figura 8). A etiologia bacteriana foi confirmada através do teste de exsudação em gota a partir de folhas sintomáticas coletadas. As colônias obtidas no reisolamento foram consideradas semelhantes às colônias originais de *P. cichorii* inoculadas nas plantas. A identidade também foi confirmada através dos *primers* específicos PscHrc662F e

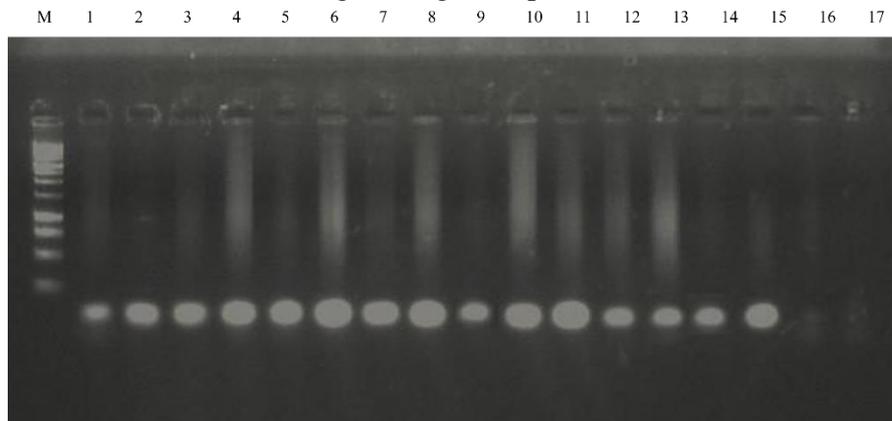
PscHrc751R descritos por Cottyn et al. (2011). Todos os isolados apresentaram o produto de amplificação de 90 pb (Figuras 9 e 10), permitindo classificá-los como *Pseudomonas cichorii*.

Figura 8 - Folha de alface e folhas de cafeeiro com os respectivos sintomas do cretamento bacteriano.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

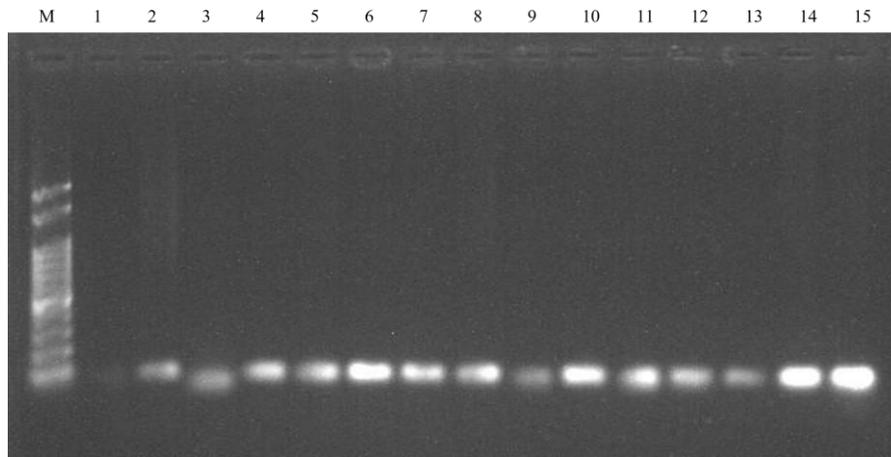
Figura 9 - Análise de PCR em gel de agarose para material coletado no cafeeiro.



Legenda: Confirmação da identidade dos isolados como *Pseudomonas cichorii* por meio da utilização do par de *primers* específico PscHrc662F e PscHrc751R: (M) Marcador molecular de peso 100pb, (1) Pc CFBP 2101, (2) UFLA135, (3) UFLA 136, (4) UFLA 146, (5) 3P01, (6) 3P02, (7) 3P04, (8) DU01, (9) DU02, (10) DU04, (11) DO101, (12) DO102, (13) DO103, (14) DO201, (15) UFLA 145, (16) Testemunha, (17) Controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 10 - Análise de PCR em gel de agarose para material coletado da alface.

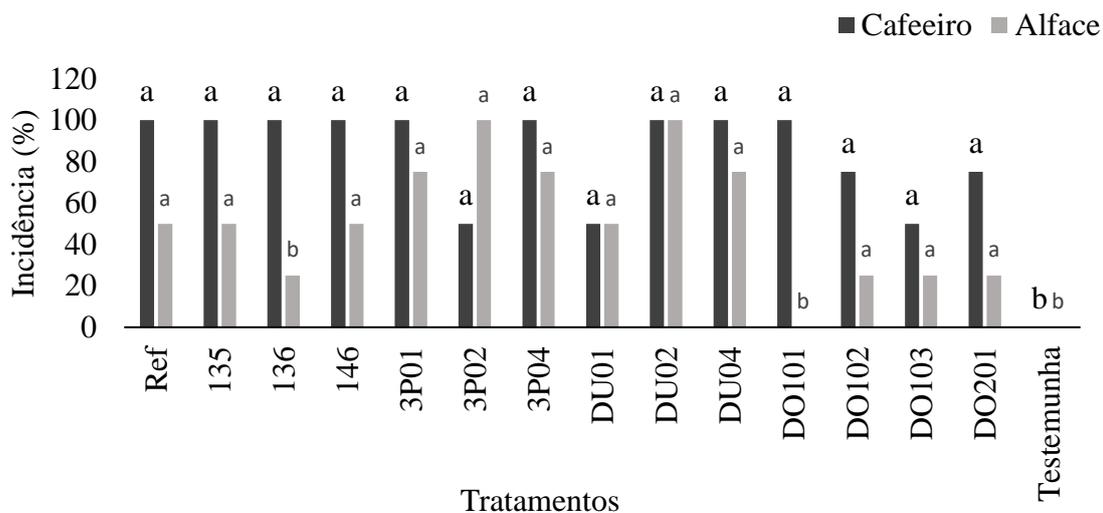


Legenda: Confirmação da identidade dos isolados como *Pseudomonas cichorii* por meio da utilização do par de *primers* específico PscHrc662F e PscHrc751R: (M) Marcador molecular de peso 100pb, (1) Testemunha, (2) Pc CFBP 2101, (3) UFLA135, (4) UFLA 136, (5) UFLA 146, (6) 3P01, (7) 3P02, (8) 3P04, (9) DU01, (10) DU02, (11) DU04, (12) DO101, (13) DO102, (14) DO103, (15) DO201.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Considerando as figuras 11 e 12 abaixo, correspondentes aos experimentos 1 e 2, pode-se avaliar a incidência dos sintomas específicos da *Pseudomonas cichorii* em ambas as culturas. No experimento 1, os isolados 'UFLA 135', 'UFLA 146', '3P01', '3P02', '3P04', 'DU01', 'DU02', 'DU04', 'DO102', 'DO103' e 'DO201' apresentaram resultado semelhante ao isolado referência, sem diferenciação entre as incidências nas culturas do café e alface. No experimento 2, os isolados que não apresentaram diferenciação entre as culturas foram 'UFLA 135', 'UFLA 136', 'UFLA 146', '3P01', '3P02', '3P04', 'DU01', 'DU02', 'DU04', 'DO101', 'DO103' e 'DO201'. Como esperado, não houve incidência no tratamento testemunha. A baixa incidência nos isolados 'DO102' e 'DO103' (< 25%), encontrada na cultura da alface, pode sugerir menor virulência de *Pseudomonas cichorii* nesta cultura em relação à cultura do café. Constatou-se que todos os isolados induziram sintomas pelo menos em um dos experimentos, demonstrando que a incidência dos isolados não é restrita ao hospedeiro de origem. Este resultado confirma a inespecificidade de hospedeiro dos isolados estudados.

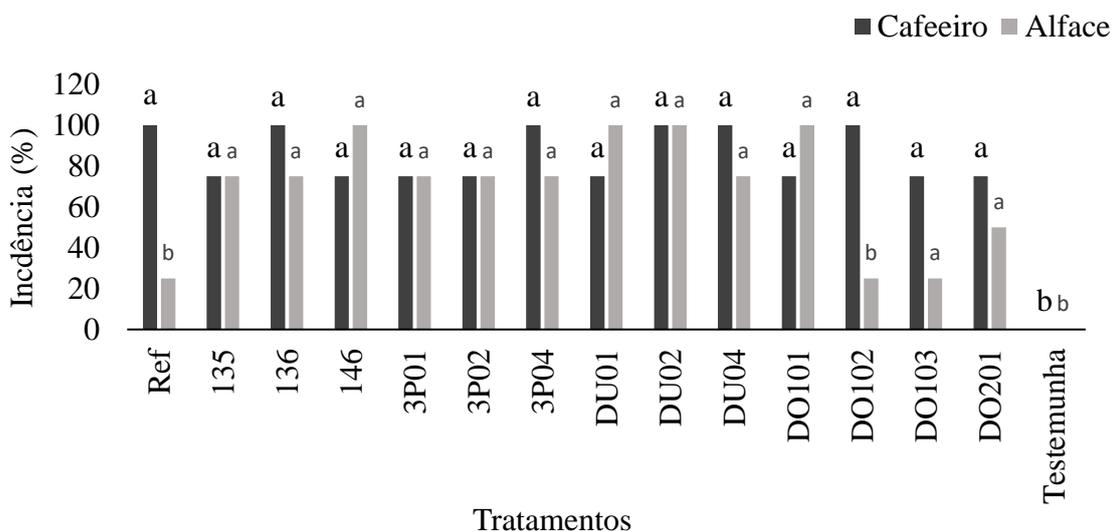
Figura 11 – Incidência dos isolados para as culturas: cafeeiro e alface. Experimento 1.



Legenda: Incidência do crestamento bacteriano em plantas de cafeeiro e alface, inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas cichorii*. Barras seguidas pela mesma letra, no mesmo isolado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 12 – Incidência dos isolados para as culturas: cafeeiro e alface. Experimento 2.

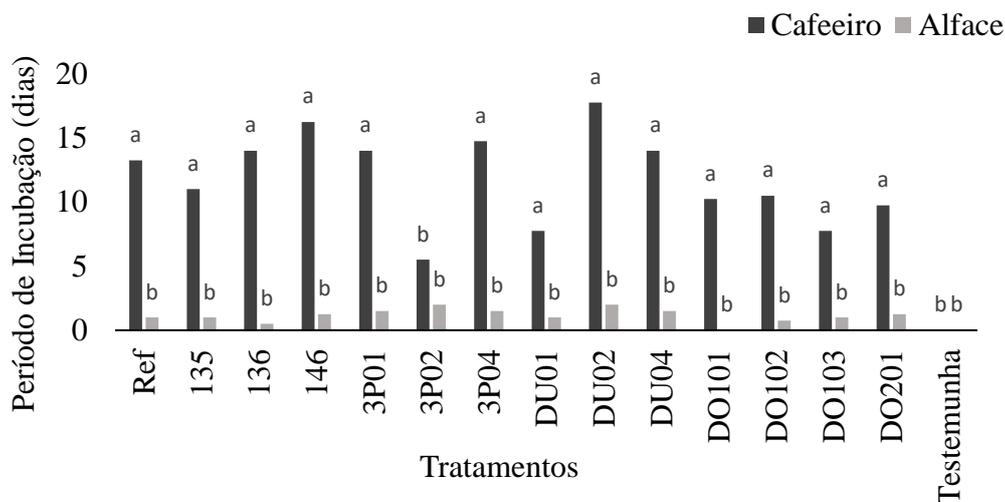


Legenda: Incidência do crestamento bacteriano em plantas de cafeeiro e alface, inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas cichorii*. Barras seguidas pela mesma letra, no mesmo isolado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

O período de incubação é o tempo que o agente infeccioso leva para aumentar em número nas plantas, até surgirem os primeiros sintomas da doença (ROESCH et al., 2005). Nas figuras 13 e 14 observa-se as diferenças ocorridas neste período nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Os resultados, para um mesmo isolado estudado, atingiram médias diferentes pelo teste, com exceção do isolado '3P02' (Experimento 1) e do isolado 'DO101' (Experimento 2), que pelo teste de médias não se diferenciam entre as duas culturas. Analisando comparativamente os dois experimentos, é possível verificar que a diferença de intervalos foi maior entre as culturas do que entre os isolados. Portanto, constata-se que esse período foi característico ao hospedeiro e sua afinidade com o patógeno. Para o cafeeiro o tempo médio de incubação foi em torno de 11 dias, com intervalos que podem chegar até 18 dias e para a alface, o tempo médio é de aproximadamente 1,5 dias, podendo chegar até 5 dias. Esta diferença leva em consideração o ciclo produtivo das culturas, uma vez que o patógeno acomete geralmente folhas mais velhas (SILVA JÚNIOR et al., 2021). Portanto, observa-se em ambos os experimentos (Figuras 13 e 14), que entre os isolados para uma mesma cultura existe uma pequena diferença no período de incubação, mas que pelo teste este intervalo diferiu para cada hospedeiro estudado, representado assim por letras diferentes.

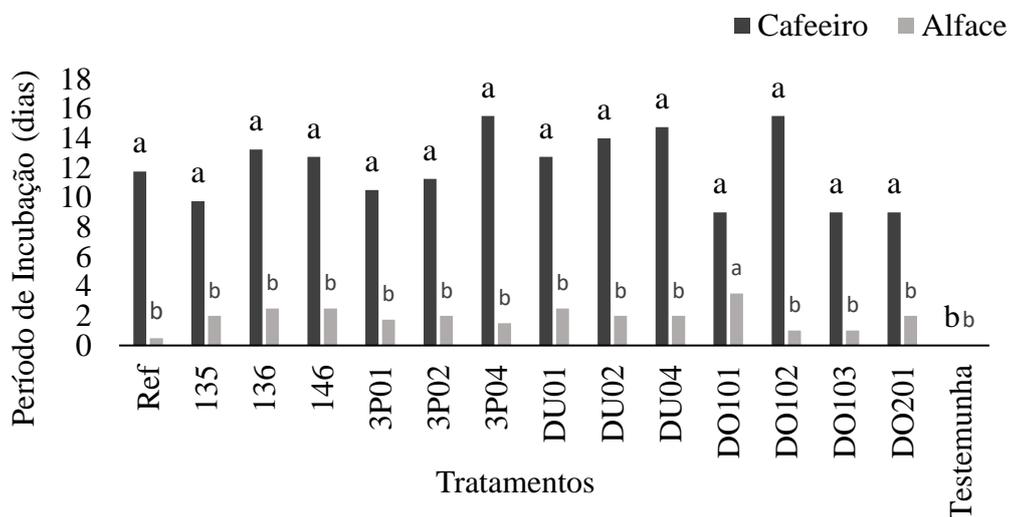
Figura 13 – Período de incubação dos isolados para cada cultura: cafeeiro e alface. Experimento 1.



Legenda: Período de incubação do crestamento bacteriano em plantas de cafeeiro e alface, inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas cichorii*. Barras seguidas pela mesma letra, no mesmo isolado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 14 – Período de incubação dos isolados para cada cultura: cafeeiro e alface. Experimento 2.

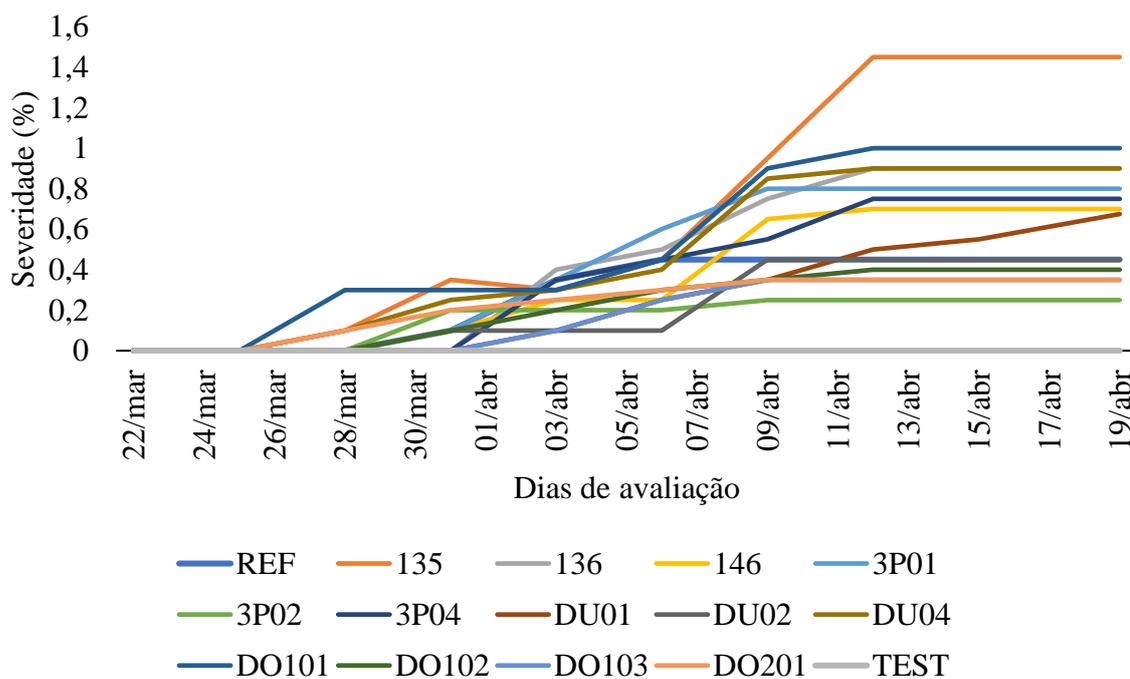


Legenda: Período de incubação do crestamento bacteriano em plantas de cafeeiro e alface, inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas cichorii*. Barras seguidas pela mesma letra, no mesmo isolado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A severidade do crestamento bacteriano em mudas de cafeeiro pode ser observada através de curvas de progresso (Figuras 15 e 16). Pode-se concluir com base nos resultados que o genótipo ‘Catuaí IAC 99’ utilizado neste experimento é suscetível a *Pseudomonas cichorii*. No experimento 1, os sintomas ocorreram já na segunda avaliação para o isolado referência, se mantendo estável entre os dias 28/03 e 6/04. Após esta data, houve um pico entre os dias 6/04 e 9/04, seguido de um platô até o final das avaliações. Em contrapartida, o isolado ‘UFLA 135’ iniciou os sintomas de severidade após 28/03, mas com valores superiores ao isolado referência a partir de 09/04 (Figura 15), o que demonstra alta agressividade deste isolado. No experimento 2, os isolados se mantiveram lineares quanto à severidade até 3/04, quando o isolado ‘Referência’ manifestou altos valores de severidade, até atingir um platô após o dia 15/04.

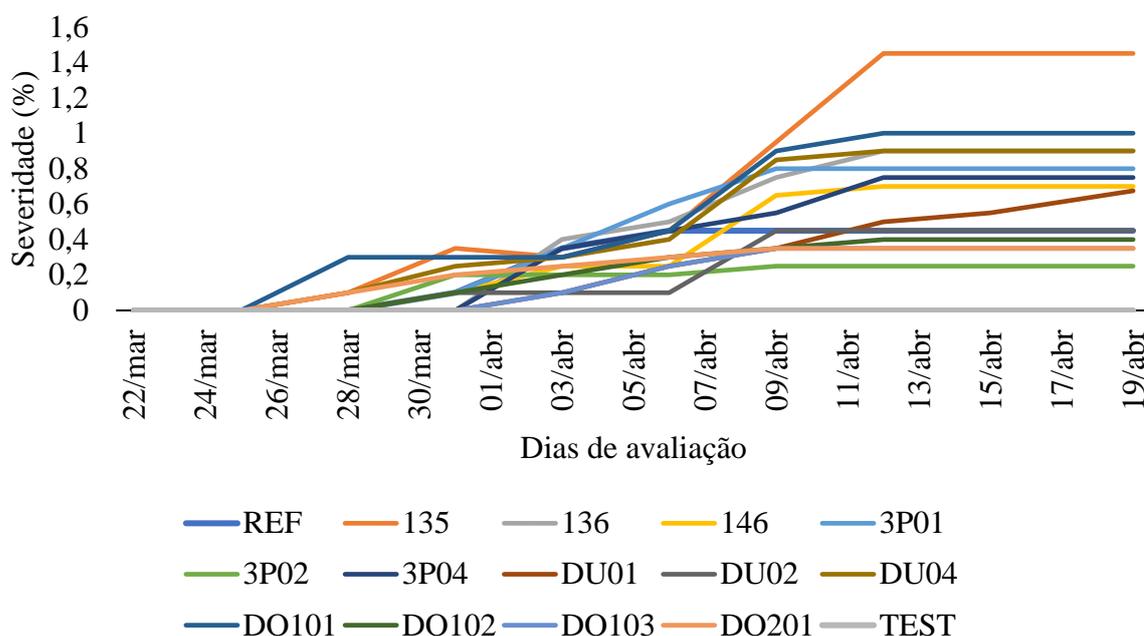
Figura 15 – Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliado em mudas de cafeeiro. Experimento 1.



Legenda: Curva de progresso do crestamento bacteriano em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí IAC 99, inoculadas com diferentes isolados de *P. cichorii*.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 16 – Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliado em mudas de cafeeiro. Experimento 2.



Legenda: Curva de progresso do crestamento bacteriano em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí IAC 99, inoculadas com diferente isolados de *P. cichorii*.

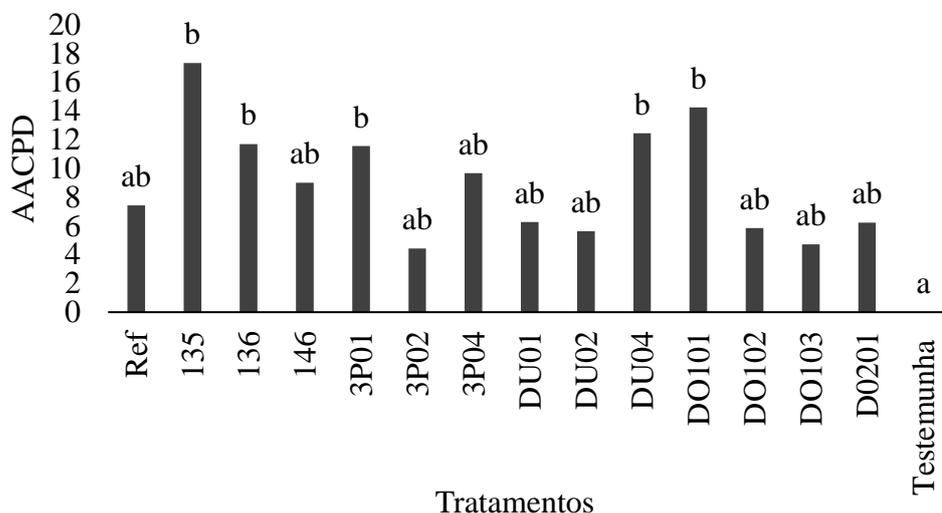
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) é um parâmetro quantitativo muito utilizado em diversos patossistemas na análise do progresso das doenças em plantas, como o crestamento bacteriano (ANACKER, 2013). As figuras 17 e 18 demonstram o progresso da severidade da doença ao longo do tempo, a partir da incidência. No experimento 1 (Figura 17), a diferença de médias encontrada em '3P02' (menor média) para o isolado 'UFLA 135' (maior média) foi de aproximadamente 12,9%. Os isolados 'UFLA 135', 'UFLA 136', '3P01', 'DU04' e DO101' apresentaram as maiores AACPS avaliadas, sendo maiores que o isolado 'Referência', o que sugere maior agressividade em mudas de cafeeiro.

No experimento 2 (Figura 18), houve diferença entre os isolados obtidos para o isolado de referência, sendo este o mais severo. A diferença de médias entre o isolado 'Referência' (maior média) para o isolado 'UFLA 146' (menor média) é de 54,3375%, superior à encontrada no experimento 1. Apresentando, portanto, a maior diferença significativa entre os isolados. Analisando ambos os experimentos, todos os isolados no

período estudado tiveram resultados abaixo de 20% de AACPD, o único isolado que obteve resultados superiores foi o isolado ‘Referência’, no experimento 2.

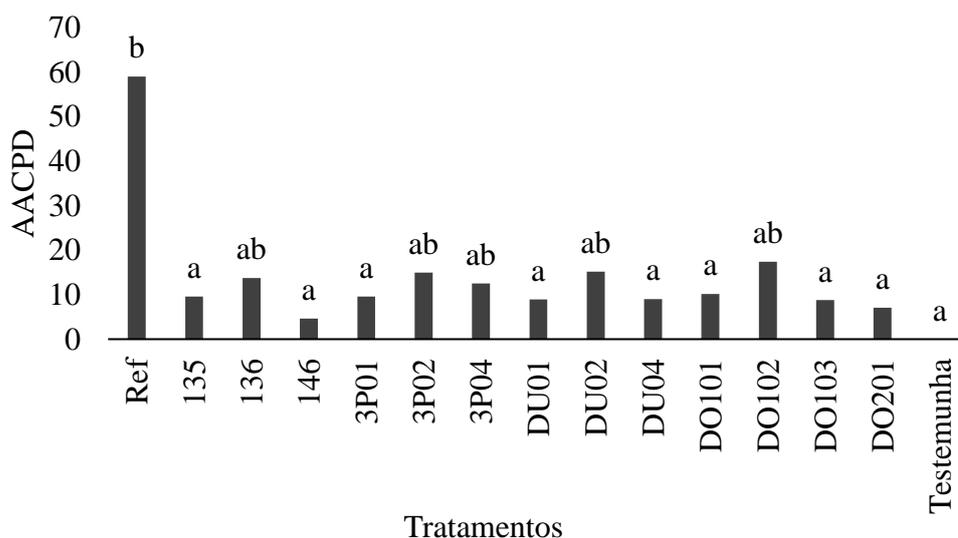
Figura 17 – Área Abaixo da Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliados em mudas de cafeeiro. Experimento 1.



Legenda: Efeito de diferentes isolados de *P. cichorii* na área abaixo da curva de progresso da doença, avaliados em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí IAC99. Barras seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 18 – Área Abaixo da Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano avaliados em mudas de cafeeiro. Experimento 2.



Legenda: Efeito de diferentes isolados de *P. cichorii* na área abaixo da curva de progresso da doença, avaliados em mudas de cafeeiro cultivar Catuaí IAC99. Barras seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas ERIC e BOX permitiram acessar a diversidade genética de *Pseudomonas cichorii*, sendo encontrados pelo menos 10 linhagens genéticas. É plausível concluir que existe uma variabilidade intraespecífica.

A inoculação cruzada de todos os isolados em ambas as culturas, independentemente do hospedeiro de origem, proporcionou a incidência dos sintomas específicos no cafeeiro e na alface, permitindo-se concluir que *Pseudomonas cichorii* não apresenta especificidade de hospedeiro.

O período de incubação da doença atingiu médias diferentes para o cafeeiro e para a alface, revelando a relação patógeno/hospedeiro como o fator determinante neste parâmetro.

A severidade da doença apresentou pequena diferença estatística entre os isolados de cafeeiro e da alface, portanto, conclui-se que a severidade não foi restrita a origem do isolado. Os isolados com as maiores severidades avaliadas, nestes experimentos, são os mais virulentos para o cafeeiro. Contudo, como os resultados não foram similares nos dois experimentos, sendo necessário novas avaliações para confirmação dos resultados.

REFERENCIAL

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.

ALMEIDA, I.M.G.; MACIEL, K.W.; RODRIGUES, L.M.R.; BERIAM, L.O.S. Colo preto em alface hidropônica causado por *Pseudomonas cichorii* no Estado da Bahia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, supl., 2012.

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

ANACKER, Lauren Fonseca. Controle biológico do crestamento bacteriano comum e da antracnose em folhas de feijão pela pulverização de bactérias. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**: volume 1. New York: John Wiley, 1992.

BELAN, LL et al. Escala diagramática para avaliação do crestamento bacteriano em folhas de cafeeiro. **Journal of Phytopathology**, [Berlim], v. 162, n. 12/11, pág. 801-810, dezembro de 2014.

BRIDSON, D. M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v. 49, n. 2, p. 331-342, 1994.

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

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

COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. Boletim técnico: Aspectos fitossanitários da cultura da alface. **Instituto Biológico**, São Paulo, 126 p., Jul. 2017.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira**: Café safra 2020, quinta estimativa. 2021.

CONAB. Safra Brasileira de Café - Boletim Café Janeiro de 2022. Brasília: CONAB, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4473-producao-de-cafe-deve-atingir-55-7-milhoes-de-sacas-na-safra-de-2022>>. Acesso em: 12 de abril de 2022.

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

DESTÉFANO, S.A.L.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J. Genetic diversity analysis of *Pseudomonas cichorii* isolates from Brazil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.78, fasc. 1, 2003.

FELIX, K.C.S.; OLIVEIRA, N.J.; MARIANO, R.L.R.; SOUZA, E.B. Lettuce genotype resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 4, p. 287-291, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, 35, P., 1039–1042, 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, United States, v. 9, n. 4, 2001.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and Other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, vol. 5, p. 825-762, 1991.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KIMATI, H. et al. **Guia de fungicidas agrícolas: recomendações por cultura**. 2 ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 225p., 2017.

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

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, vol. 5, p. 408-418, 1995.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. **Doenças da alface**. 1ª ed. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2010.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J. In.: TORANZOS, G. (Ed.), Nucleic acid amplification methods for the analysis of environmental samples. **Technomic Publ. Co.**, p. 63-94, 2016.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4525- 4529, 2012.

MAHUKA, G. S.; JARA, C.; HENRIQUEZ, M. A. CASTELLANOS, G.; CUASQUER, J. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var.

fuscans by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. **Journal of Phytopathology**, vol. 154, p. 35-44, 2006.

MALAVOLTA, E. Nutrição mineral e adubação do cafeeiro. São Paulo: **AGRONÔMICA CERES LTDA**, 210 p. 2010.

MALAVOLTA JR., V.A.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBB, C.F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, supl. especial, p. 9-88, 2018.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D. A.; BOULNOIS G. J.; CLAVERY J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, vol. 20, p. 3479 – 3483, 1992.

MATIELLO, J.B. et al. Cultura de café no Brasil: manual de recomendações. Rio de Janeiro e Varginha: **MAPA E FUNDAÇÃO PRÓCAFÉ**, 546 p., 2020.

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

OPGENORTH, D. C.; SMART, C. D.; LOUWS, F. J.; BRUIJIN, F. J. de; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic *fingerprints*. **Plant Disease**, Quebec, v.80, p. 868-873, 1996.

PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.

PITTA, G. P. B. Flores e plantas ornamentais para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2015.

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.

RAIMUNDI, M. K. et al. Diagnosis of leaf bacterial diseases of coffee reveals the prevalence of halo blight. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJIN, F. J. **Characterization and classification of microbes by RepPCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis**. 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, 1981.

- RODRIGUES NETO, J. et al. Mancha bacteriana do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 85, 2006
- ROESCH, Luiz Fernando et al. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1201-1204, 2005.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001.
- ROMEIRO, R. S.; SOUZA, RM; MUCHOVEJ, JJ; FRIGO, PJG. Cuneiform Blight - a new bacterial disease of *Tainer spinach*. **Plant Pathology**, v. 37, p. 588-590, 1988.
- SAHIN, F.; MULLER, S.A. Identification of the bacterial leaf spot pathogen of lettuce, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, in Ohio, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. **Plant Disease**, Minnesota, v. 81, n. 12, p. 1443-1446, 2017.
- SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Consquista, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Melhoramento de alface, *In*: NICK, C.; BÓREM, A. **Melhoramento de Hortaliças**, (Eds.) UFV, Viçoca, MG, 464p., 2016.
- SHANER, G. & FINNEY, R. F. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, 67: 1051-1056.
- SILVA, A.M.F.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R.; SILVA, A.J. Tamanho de amostras para quantificação da podridão mole da alface e da couve-chinesa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 90-92, 2018.
- SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Ocorrência de *Pseudomonas cichorii* em tomateiro no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 285-290, 2021.
- SILVA, M.S.C.; LIMA NETO, V.C. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 275-283, 2017.
- STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, vol. 37, p. 1015–1026, 1984.
- VANEECHOUTTE M. 1996. DNA *fingerprinting* techniques for microorganisms. **Mol. Biotechnol.** 6:115–42.
- VAUTERIN et al. 1995. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.472-489.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI JÚNIOR, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to *fingerprinting* of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, Dec. 1991.

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

YURI, JONY E et al. Desempenho agronômico de genótipos de alface americana no Submédio do Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira** [online]. 2017, v. 35, n. 2 [Acessado 15 abril 2022], pp. 292-297. 2022.