



**DANIEL DA SILVA GOMES GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE  
*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, EM FOLHAS DE CAFEIEIRO,  
24h APÓS A INOCULAÇÃO**

**LAVRAS - MG  
2022**

**DANIEL DA SILVA GOMES GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudomonas syringae* pv.  
*garcae*, EM FOLHAS DE CAFEIEIRO, 24H APÓS A INOCULAÇÃO**

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

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

Orientador

Mestre Júlia Marques Oliveira

Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2022**

**DANIEL DA SILVA GOMES GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, EM FOLHAS DE CAFEEIRO, 24h APÓS A INOCULAÇÃO**

**CHARACTERIZATION OF THE INFECTIOUS PROCESS OF *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, IN COFFEE LEAVES, 24h AFTER INOCULATION**

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

APRESENTADO em 5 de Setembro de 2022

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Ms. Júlia Marques Oliveira UFLA

Ms. Mario Roberto Nogueira Colares UFLA

**LAVRAS - MG  
2022**

*Aos meus pais,  
Nicéia de Fátima da Silva Guimarães e Marcio Gomes Guimarães;  
aos demais familiares, por estarem comigo em todo o período da minha graduação; a  
família República Vira Copos por todo o apoio durante esses anos na Universidade Federal  
de Lavras.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTO**

À Deus, por ter me proporcionado resiliência e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados.

À minha família, que me apoiou e sempre acreditou em meu potencial e me deu suporte para que eu conseguisse me dedicar à realização do curso.

Aos meus amigos de infância, que mesmo com a distância se mostraram presentes e fiéis, depositando suas forças em mim.

Aos professores, por todos os conselhos, ensinamentos, que me proporcionaram conhecimento e discernimento para o ingresso no mercado de trabalho.

Aos Núcleos de Estudos NEFIT (Núcleo de Estudos em Fitopatologia) e NECANA (Núcleo de Estudos em Cana-de-Açúcar), por me proporcionarem o crescimento extraclasse necessário para uma boa formação e os amigos que conheci que levo até hoje comigo.

À família Vira Copos, por cinco anos esteve presente nos momentos mais felizes e mais difíceis os quais passei.

Ao Pedro Rodolfo, conhecido carinhosamente pelos amigos como Luiza, que do céu está acompanhando nossa trajetória aqui na Terra. Um dia nos reencontraremos.

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

A mancha aureolada do cafeeiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg), pode provocar perdas de até 70% em viveiros e campos estabelecidos em regiões sujeitas a ventos fortes, temperaturas amenas, chuvas frequentes e bem distribuídas. Essa bacteriose possui rápida disseminação e alta capacidade de destruição e conhecer o seu processo de disseminação pode auxiliar na compreensão do seu ciclo patógeno/hospedeiro. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é caracterizar os processos infecciosos em folhas de mudas de *Coffea arabica* a partir de 24 horas após a inoculação da *P. syringae* pv. *garcae*. Foram usadas mudas de *C. arabica* da variedade Catuaí Vermelho IAC 99, sendo estas com cinco pares de folhas, as quais foram inoculadas com isolado de referência presente na coleção de culturas bacterianas do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), o *P. syringae* pv. *garcae* souche patotype. A coleta do material biológico foi realizada nos pontos marcados na inoculação da Psg decorridos 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Concluiu-se, portanto, que o período de 24 horas após a inoculação indicou maior agrupamento de células bacterianas, demonstrando maior gradiente de distribuição e penetração para diferentes locais do tecido celular da planta. Nos períodos de 72 e 96 horas, o agrupamento de células bacterianas foi menor, indicando sua penetração direcionada para os parênquimas paliçádicos.

**Palavras-chave:** Bactéria. *Coffea arabica*. Doenças. Patógeno. Severidade.

## ABSTRACT

The golden spot on the coffee tree, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg), can cause losses of up to 70% in nurseries and fields established in regions subject to strong winds, mild temperatures, frequent and well distributed rains. This bacteriosis has fast spread and high destruction capacity and knowing its spread process can help to understand its pathogen/host cycle. Therefore, the objective of this work is to characterize the infectious processes in leaves of *Coffea arabica* seedlings from 24 hours after inoculation of *P. syringae* pv. *garcae* (Psg). Seedlings of *Coffea arabica* variety Catuaí Vermelho IAC 99 were used, with five pairs of leaves, which were inoculated with a reference isolate present in the collection of bacterial cultures of the Department of Phytopathology (DFP) of the Federal University of Lavras (UFLA), the *P. syringae* pv. *garcae* souche pathotype. The collection of biological material was carried out at the marked points where Psg inoculation occurred 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation. It was concluded, therefore, that the period of 24 hours after inoculation indicated a greater grouping of bacterial cells, demonstrating a greater distribution and penetration gradient for different locations in the plant cell tissue. In the periods of 72 and 96 hours, the grouping of bacterial cells was smaller, indicating their penetration towards the palisade parenchyma.

**Keywords:** Bacteria. *Coffea arabica*. Diseases. Pathogen. Severity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Microscópio Eletrônico de Varredura, situado no Laboratório de Microscopia no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA..... 16
- Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; A - Imagem em 5000x em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 24 horas após a inoculação (HAI); B - Imagem em 3000x depressões epidérmicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 24 horas após a inoculação (HAI)..... 17
- Figura 3 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 2500x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 48 horas após a inoculação (HAI). ..... 18
- Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 72 horas após a inoculação (HAI). ..... 19
- Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. A - indicando egresso da bactéria à superfície foliar (*Coffea arabica*) 96 horas após a inoculação (HAI); B - 120 horas após a inoculação (HAI) indicando egresso da bactéria à superfície foliar em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*). ..... 19
- Figura 6 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) de plantas utilizadas como testemunhas. .... 20

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
2.1	Importância econômica do cafeeiro.....	11
2.2	Mancha aureolada no cafeeiro.....	11
2.3	Mecanismos de infecção .....	12
2.4	Epidemiologia .....	12
2.5	Microscopia de varredura.....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1	Inoculação da <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> .....	15
3.2	Coleta do material biológico para análise .....	16
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é importante para a economia brasileira. A produção estimada para 2022 é de aproximadamente 55,7 milhões de sacas beneficiadas em 2,24 milhões de hectares de área plantada, sendo o Brasil o maior produtor mundial (CONAB, 2021). O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro, seguido do Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e Mato Grosso (CONAB, 2021). Além disso, conforme dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2020), o Brasil representa o maior exportador mundial de café, visto que, em 2020, o valor exportado foi de US\$ 4,172 bilhões, o que representou 1,95% das exportações deste país, e 30% das exportações mundiais. Em comparação com ano 2000, o crescimento das exportações brasileiras de café foi de 179%, que neste ano eram de US\$ 1,56 bilhões.

Entretanto, diversos fatores podem limitar a produtividade da cultura, e para combater é necessário conhecê-los. Plantas daninhas, pragas, condições climáticas e doenças, como a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), pode causar perdas de até 50% na produção (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010) e a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie) sua importância vem aumentando ao longo dos anos.

A mancha areolada, acomete tecidos novos, mudas de viveiros e lavouras recém-implantadas, causando sintomas nas folhas e frutos, seca de ramos, diminuindo a produtividade da cultura (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; RODRIGUES et al., 2015). Com a mecanização do sistema de colheita a incidência da doença aumentou em lavouras já estabelecidas. Mesmo em tecidos lignificados ocorre a infecção, em razão de ferimentos causados por esse maquinário, abrindo portas de entradas e introduzindo a doença nos tecidos do cafeeiro (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

Além disso, essa bacteriose possui rápida disseminação e alta capacidade de destruição (BELAN, 2014). Devido à falta de conhecimento e estudos sobre a doença as principais variedades empregadas são suscetíveis à *P. syringae* pv. *garcae* (SERA, 2001). O manejo desta, é feito principalmente utilizando fungicidas cúpricos, cuja principal característica é de proteger a planta (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

Conhecer como a bactéria penetra pode contribuir para compreender o ciclo de relações patógeno/hospedeiro, propor estratégias mais eficazes de manejo à doença, além de identificar vias de penetração preferidas (estômatos, feridas e/ou bordas do limbo foliar) e propor estratégias eficientes de inoculação em ensaios experimentais.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é caracterizar os processos infecciosos em folhas de mudas de *Coffea arabica* a partir de 24 horas após a inoculação da *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância econômica do cafeeiro

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor da bebida no mundo. O café é o quinto produto na pauta de exportação e a produção ocupa uma área de aproximadamente 2,24 milhões de hectares com cerca de 300 mil produtores, em 15 estados e o distrito federal (MAPA, 2022).

Atualmente, o café é relevante fonte de receita para centenas de municípios, além de ser um importante setor na criação de postos de trabalho na agricultura brasileira. O expressivo desempenho da exportação e do consumo interno confere sustentabilidade econômica ao produtor e sua atividade (MAPA, 2022).

### 2.2 Mancha aureolada no cafeeiro

A mancha aureolada do cafeeiro cujo agente etiológico é *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg), pertence a seguinte classificação taxonômica: Filo Proteobactéria, classe Gamma Proteobactéria, ordem Pseudomonadales e família Pseudomonadaceae (MOORE et al., 2006; LELLIOTT et al., 1966) vem preocupando diversos cafeicultores das principais regiões produtoras, como Paraná, São Paulo e Minas Gerais. A Psg é uma bactéria Gram negativa, flagelada, com formato de bastonetes retos ou ligeiramente curvados e com tamanho variando entre de 0,5-1,0 x 1,5-4,0µm (RAIMUNDI, 2017).

Inicialmente era considerada uma doença de menor importância econômica, todavia vem causando prejuízos como perda da área fotossintética e queda prematura de folhas, requeima de ramos e necrose de frutos quando infectados na fase de chumbinho. Os sintomas em folhas, principalmente as mais novas, inicialmente surgem manchas de cor marrom a negra com 1 a 5 mm, encharcadas. As manchas crescem, de forma irregular, sem bordos definidos (POZZA, 2021). Deve-se atentar ao fato de também ter sido relatada a ocorrência em sementes (BELAN et al., 2016).

Além disso, em viveiros, a bacteriose causa desfolha, morte de ponteiros e pode causar a morte de mudas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; RODRIGUES et al., 2015; ZAMBOLIM, 2016).

A bactéria tem como sintoma característico manchas necróticas escuras com halo amarelado no centro da lesão, que causam a perda da área fotossintética, daí o nome da doença,

mancha aureolada (POZZA, 2021). Além disso, os sintomas que se manifestam nos ramos, tanto ortotrópicos como plagiotrópicos causam requeima, de forma descendente. Com o aumento da progressão da doença, as folhas sintomáticas e as assintomáticas presas nos ramos infectados podem vir a cair, conseqüentemente diminuindo a produção por diminuição dos metabólitos que seriam transloucados aos frutos (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

### **2.3 Mecanismos de infecção**

A bactéria causadora da mancha aureolada possui duas fases, sobrevivência e disseminação. A sobrevivência ocorre na época de seca, ficando na parte exterior da planta, principalmente na face abaxial da folha (ROBBS, 1977; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011). Neste período, ocorre a colheita do café, preferencialmente de forma mecanizada, ocorrendo o espalhamento dela entre os cafeeiros e ocasionando portas de entrada ao patógeno nas plantas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

A disseminação da bacteriose ocorre no início das chuvas (ROBBS, 1977) e temperaturas amenas, ventos frios e altitudes elevadas (JANSEN, 2005; ZOCCOLI et al., 2011; ZAMBOLIM, 2016). Dessa forma, ela penetra nas folhas através de ferimentos e aberturas naturais (KIMURA et al., 1976) como estômatos, hidatódios, lenticelas e botões florais, enquanto os ferimentos podem ser causados por ventos, maquinário e chuvas (FREITAS, 2017).

Os espaços intercelulares e intracelulares são utilizados para sua colonização, e os exsudatos celulares como substrato. Sua infecção tem como direção tecidos não colonizados, abandonando os colonizados com sintomas típicos de necrose e halo amarelado causados pela liberação de toxinas (RODRIGUES et al., 2015).

### **2.4 Epidemiologia**

As condições de alta precipitação pluviométrica, temperaturas amenas, injúria mecânica ou lavouras situadas em maiores altitudes, desprotegidas da ação do vento, favorecem a ocorrência da doença (POZZA, 2021; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

A bactéria ao colonizar os espaços intra e intercelulares, utiliza os exsudatos celulares como substrato e migra das áreas colonizadas para áreas não colonizadas abandonando o tecido necrosado, ficando circundado por halo amarelado, devido à bactéria ter liberado toxinas. As células bacterianas presentes nas lesões são disseminadas de folhas para folha ou para plantas vizinhas através da água ou carregadas por vento. Em períodos de menor índice pluviométrico

ocorre diminuição da incidência da bactéria, devido à ausência da água para a disseminação (RODRIGUES et al., 2013).

O patógeno sobrevive principalmente na face abaxial das folhas do cafeeiro sem causar doença, assim como em restos culturais presentes no solo, até o próximo período chuvoso proporcione condições ideais para novas infecções (ZOCCOLI et al., 2011).

A disseminação da bactéria ocorre na planta e de planta para planta devido a ações de respingos de chuvas, chuvas finas e de granizo, causando ferimentos que funcionam como portas de entrada para a bactéria. Do mesmo modo, as faces das plantas não expostas ao sol permanecem durante períodos mais longos com as folhas molhadas, favorecendo o processo de infecção. A doença pode incidir nas plantas de outubro a janeiro e de abril a julho, variando com a região e as condições climáticas (RODRIGUES et al., 2013).

## **2.5 Microscopia de varredura**

Ao avaliar microrganismos e suas ações, se faz necessário a observação das microestruturas presentes. Para observar a ação da *P. syringae* pv. *garcae* e sua entrada no estômato com maior clareza de imagem é recomendado a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

A microscopia eletrônica de varredura se apresenta como a técnica mais adequada para a avaliação deste trabalho, pois permite alcançar aumento muito superior ao da microscopia ótica. Dependendo do material pode atingir até 900 000 vezes. Na microscopia eletrônica a área ou o micro volume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons (MALISKA, 2021).

Segundo Bleicher e Sasaki (2000) na técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) uma imagem ampliada e tridimensional da amostra é obtida a partir da interação de feixe de elétrons com o material, desde que seja não transparente aos elétrons.

Ainda, segundo (MALISKA, 2021) na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

Na fitopatologia o uso do MEV auxilia na observação da morfologia “externa” dos microrganismos, na localização destes em diversos materiais e na análise tridimensional das alterações induzidas por microrganismos nos materiais analisados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Inoculação da *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

Foram usadas mudas de *Coffea arabica* da variedade Catuaí Vermelho IAC 99, cultivadas em câmara de crescimento com temperatura entre 21°C e 25°C, fotoperíodo de 12 horas (luz e escuro), umidade relativa do ar média de 70%. As mudas com cinco pares de folhas foram inoculadas com isolado de referência presente na coleção de culturas bacterianas do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), o *P. syringae* pv. *garcae* souche patotype (CIRM - Plant Associated Bacteria / CIRM - CFBP1634). Estas foram posicionadas horizontalmente sobre a bancada 24 horas antes da inoculação, as quais permaneceram durante todo o decorrer do experimento.

Para preparação do inóculo, foi usado meio de cultura 523 de Kado; Heskett (1970) e incubado em estufa incubadora BOD com temperatura entre 26°C e 30°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, as bactérias foram suspensas em solução salina esterilizada de 0,85% de NaCl e a concentração bacteriana determinada em espectrofotômetro a 600nm (OD600) (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990). A solução de células bacterianas foi diluída em solução salina esterilizada para a concentração de  $1,1 \times 10^9$  UFC/ml, calibrada em espectrofotometria (0,2 de absorbância), conforme metodologia descrita por Oliveira e Romeiro (1990).

A inoculação foi realizada em pontos marcados com desenhos de círculos no limbo foliar do primeiro e segundo par de folhas completamente abertas a partir do ápice. Os estômatos, bordas do limbo foliar e ferimentos artificiais são os principais meios de penetração que foram estudados. Foram marcados de forma aleatória, diversos pontos na superfície abaxial da folha para estudar a penetração via estômato e nas margens do limbo foliar para estudar sua penetração, e depositados 50 µL da suspensão de inóculo em 21 pontos. Para estudar a penetração via ferimentos artificiais, foi usado um conjunto de multiagulhas (10 agulhas) imersos em suspensão de inóculo e utilizado para perfurar as folhas. As testemunhas foram preparadas de mesma forma, todavia utilizando como inóculo solução salina esterilizada de 0,85%.

### 3.2 Coleta do material biológico para análise

A coleta do material biológico foi feita nos pontos marcados na inoculação da Psg decorridos 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação (HAI), utilizando furadeira de discos de 5 mm de diâmetro para obter amostras de tecido foliar nos três sítios de penetração estudado. Outro aspecto relevante são as testemunhas, sendo amostradas após 12 horas após a inoculação.

Os discos coletados foram imersos em solução fixadora Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 CaCl<sub>2</sub> 0.001M), por 24 horas e acondicionado em ependoffs de 1,5mL. Após fixação, as amostras foram imersas por 10 minutos em solução tampão cacodilato de sódio (0,05M) e lavadas três vezes consecutivas. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio (0,05M e pH 7,2) por 1 hora e posteriormente imersas em água destilada por 10 minutos três vezes consecutivas.

O próximo passo foi desidratar as amostras em soluções de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) e levadas para secar ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em aparelho Balzers CPD 030. Após a desidratação e secagem, quatro discos foliares por tratamento formam arranjados em suportes de alumínio (stubs) utilizando-se fita de carbono, e cobertos com ouro (Blazers SCD 050) para análise em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 (Figura 1) da superfície dos quatro discos.

Figura 1 – Microscópio Eletrônico de Varredura, situado no Laboratório de Microscopia no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

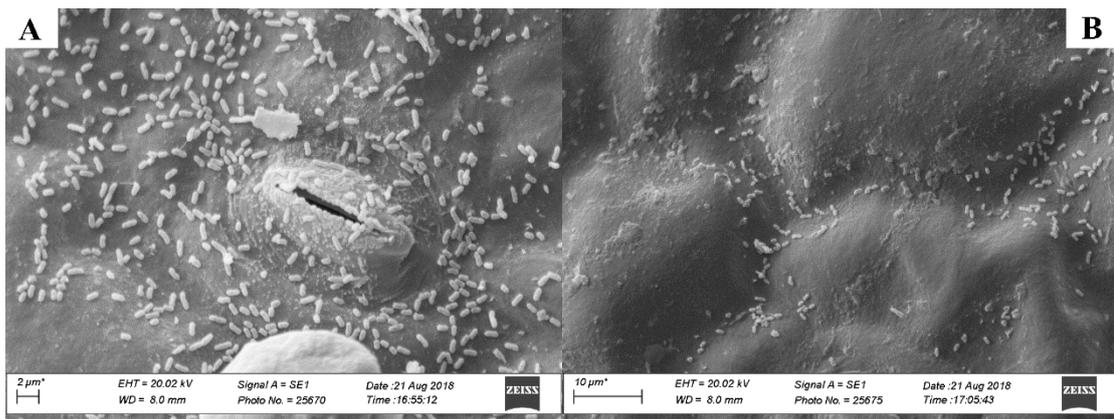


Fonte: Do Autor (2021).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 24 horas após inoculação (HAI) nas folhas das plantas, houve multiplicação de *Psg* e foi possível observar agregados de células bacterianas ao redor de estômatos (Figura 2A), ferimentos e aberturas naturais, com formação de biofilme, importante no estágio de pré-infecção do patógeno. O inóculo inicial de *Psg* acumulou-se em depressões epidérmicas (Figura 2B) e fissuras de camadas de cera, formando um biofilme que favorece o deslocamento para o local de penetração, multiplicação e colonização na superfície durante os estágios iniciais do processo infeccioso em folhas de café (ROMANTSCHUK, 1992; ROMEIRO, 2005; MARCUZZO; DENARDIM 2008; AMORIM; PASCHOLATI 2018).

Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; A - Imagem em 5000x em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 24 horas após a inoculação (HAI); B - Imagem em 3000x depressões epidérmicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 24 horas após a inoculação (HAI).



Fonte: Do Autor (2021).

De acordo com Lichston e Godoy (2006), esse acúmulo das bactérias observado 24 HAI nas depressões epidérmicas poderá estar relacionado à morfologia da cutícula foliar das folhas do cafeeiro, camada de cera e assim favorecendo a retenção do patógeno. Essas depressões epidérmicas também contribuem para acumular nutrientes e água de forma a proporcionar ambiente favorável para a reprodução bacteriana e aumento da sua população ao longo do tempo (MARCELL; BEATTIE, 2002; MONIER; LINDOW, 2004; NETO et al., 2006). Em relação à camada de cera, essa não é degradada para fornecer nutrientes as bactérias (MARCELL; BEATTIE, 2002).

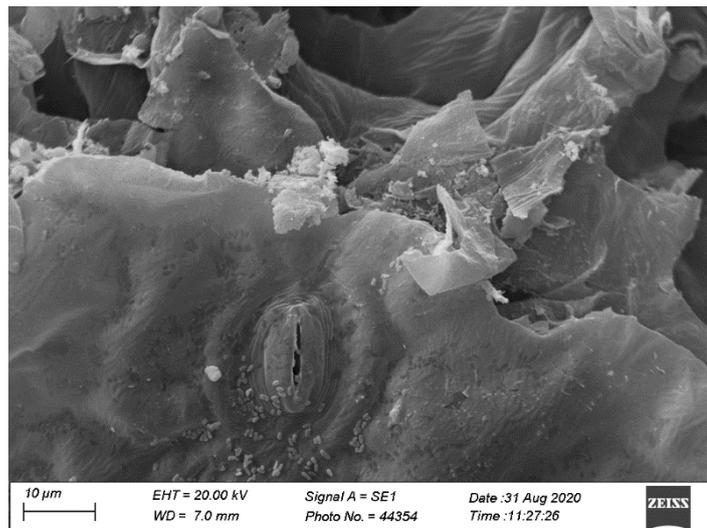
Com a formação morfológica próximo dos sítios de penetração, a presença de exsudatos de substâncias por ferimentos e aberturas naturais favorece o processo infeccioso de bactérias

patogênicas de plantas (MADIGAN, 2005; ROMEIRO, 2005). Extravasamento de fluidos celulares devido a ferimentos, além dos estômatos exsudarem compostos orgânicos fotossintetizados, por exemplo, a glicose, favorecem o processo infeccioso.

Tais substâncias mencionadas acima, são nutritivas e assim atraem as fitobactérias, induzindo a movimentação direcionada em direção aos locais de penetração nos tecidos da planta (ROMEIRO, 2005; AGRIOS, 2005).

Após, 48 HAI os agregados observados eram menores quando comparados à 24 HAI (Figura 3). Um gradiente de distribuição a partir de estômatos, feridas e camadas de cera nas margens das folhas e de apêndices epidérmicos e camadas de cera na ponta da folha para o interior do tecido foliar, indica fluxo de deslocamento dos pontos de penetração até o interior do tecido foliar.

Figura 3 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 2500x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de café (Coffea arabica) 48 horas após a inoculação (HAI).

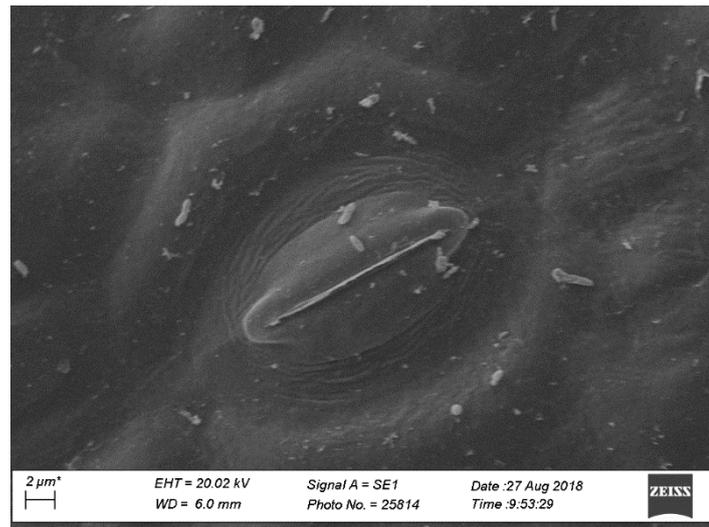


Fonte: Do Autor (2021).

A presença de apêndices epidérmicos com concentração de Psg no ápice das folhas do café com 48 HAI foram observados e são semelhantes a hidatódios. A presença de Psg nessas estruturas justifica o fato de sintomas de mancha aureolada ocorrer com frequência nessa porção das folhas de café em viveiro de mudas e em lavouras (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; RODRIGUES et al., 2013; BELAN et al., 2014; ZAMBOLIM, 2016). Nesse período observado de inoculação ainda é possível ser caracterizado a capacidade de infecção da fitobactéria.

No entanto, após 72 horas após a inoculação (Figura 4), o número de bactérias agrupadas nesses locais diminuiu ao longo do tempo, indicando a penetração nos espaços intercelulares e intracelulares da folha utilizando os exsudados celulares como substrato.

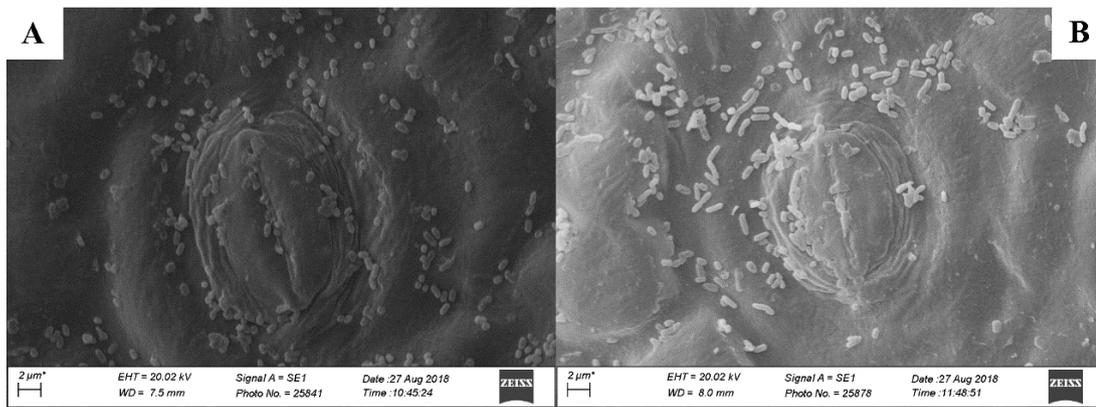
Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) 72 horas após a inoculação (HAI).



Fonte: Do Autor (2021).

Em 96 a 120 HAI (Figura 5A e 5B, respectivamente), ocorre aumento do número de células bacterianas próximo aos estômatos, indicando o egresso da Psg para a superfície foliar, iniciando um novo ciclo infeccioso, deixando o tecido necrosado, circundado por halo amarelado, resultado da liberação de toxinas pelo patógeno (RODRIGUES et al., 2013).

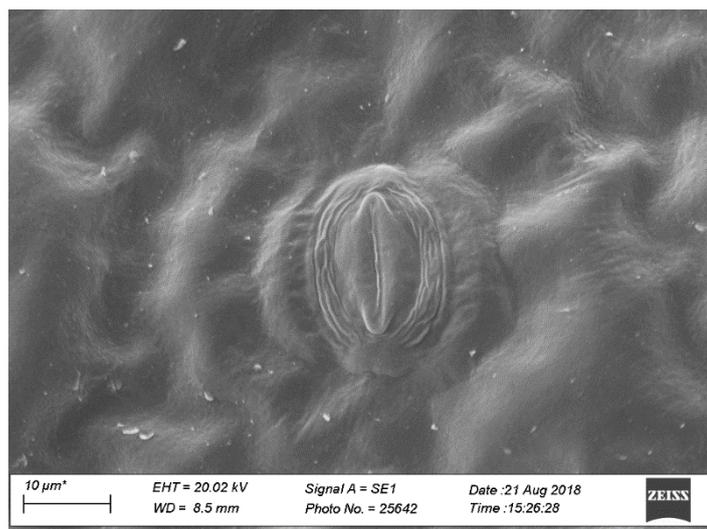
Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. A - indicando egresso da bactéria à superfície foliar (*Coffea arabica*) 96 horas após a inoculação (HAI); B - 120 horas após a inoculação (HAI) indicando egresso da bactéria à superfície foliar em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*).



Fonte: Do Autor (2021).

Durante as etapas observadas do processo infeccioso não houve sintomas da doença nas folhas utilizadas para a inoculação, assim como não foram encontradas bactérias em amostras de folhas de plantas usadas como testemunhas (Figura 6).

Figura 6 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura 5000x de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em torno dos estômatos em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) de plantas utilizadas como testemunhas.



Fonte: Do Autor (2021).

Diante dessa observação em relação à presença de sintomas da doença, Rodrigues et al. (2015) relataram alterações morfológicas em tecidos foliares de cafeeiro infectados por Psg, no entanto, quando as avaliações ocorreram aos 10 dias após a inoculação, quando as folhas apresentavam sintomas necróticos. Autores, relatam em seus estudos não haver, ao longo do tempo, padrão para a ocorrer o surgimento dos sintomas na planta, o qual pode aparecer até aos 21 dias após a inoculação (MONIER; LINDOW, 2004; NETO et al., 2006). Nesse estudo as avaliações realizadas entre 24 e 120 horas após a inoculação proporcionaram melhor entendimento do processo infeccioso de Psg em folhas de cafeeiro.

Em estudo prévio, De Souza et al., (2019) descreveu o processo infeccioso da Psg em 30 minutos, 1, 3, 6, 12 horas após a inoculação. Podemos ponderar a partir deste estudo que nos estádios iniciais, a bactéria multiplica-se e tem fluxo de deslocamento para portas de entrada, utilizando biofilme e a morfologia cuticular e topografia das folhas. Lichston e Godoy (2006) descreveram uma camada descontínua em forma de filme de cera com rupturas ao longo da cutícula em folhas de café (*C. arabica*) no cultivar Catuaí Vermelho, camada a qual poderá favorecer a retenção de células bacterianas.

Para isso ocorrer, segundo Romeiro (2005), as condições ambientais e microclimáticas são um dos principais fatores para condicionar o fracasso ou o sucesso do processo infeccioso bacteriano. Tal fato pode ser justificado porque as células bacterianas penetram na planta por aberturas naturais e/ou por ferimentos e necessitam de água livre na superfície da planta para se multiplicar e locomover até o sítio de penetração (ZAMBOLIM, 2016; SOUZA et al. 2016). Diante disso, o molhamento foliar nesse contexto é essencial para o processo de infecção bacteriana em plantas.

## 5 CONCLUSÃO

O período de 24 horas após a inoculação indicou maior agrupamento de células bacterianas, demonstrando maior gradiente de distribuição e penetração para diferentes locais do tecido celular da planta de café.

Um grande gradiente populacional de bactérias foi encontrado próximo aos estômatos, e camadas de cera nas margens das folhas e apêndices epidérmicos, originando um fluxo de deslocamento de penetração para esses locais.

Nos períodos de 48 e 72 horas o agrupamento de células bacterianas foi 13 e 150 vezes menor respectivamente, indicando sua penetração direcionada para os parênquimas paliçádicos.

Após 96 HAI, foi observado o regresso de células bacterianas à superfície foliar, indicando uma reinfecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. n. LC-0222, v. 5, p. 952, Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2005.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, v. 1, 5 ed., p. 46-68, Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres, 2018.
- BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, M. L. O.; RAIMUNDI, M. K.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee seeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 7, p. 1015-1021, Jul. 2016.
- BELAN, L. L. **Detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em sementes, microanálise de raios X e desenvolvimento de escala diagramática para a mancha aureolada do cafeeiro**. 2014. 128 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2014.
- BELAN, L. L. et al. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 11-12, p. 801-810, 2014.
- BLEICHER, L.; SASAKI, J. M.; PAIVA SANTOS, C. O. Development of a graphical interface for the Rietveld refinement program DBWS. **Journal of Applied Crystallography**, v. 33, n. 4, p. 1189-1189, 2000.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**. Safra 2021. Terceiro Levantamento. Brasília, Set. 2021. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab\\_safra\\_2021n1.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra_2021n1.pdf)>. Acesso em 03 de Out. 2021.
- DE SOUZA, J. O. G.; POZZA, E. A.; BELAN, L. L.; FREITAS, M. L. O.; OLIVEIRA, J. M. Initial stages of infectious process of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee leaves. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 338-348, 2019.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Data**. FAOSTAT. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em 05 de Out. 2021.
- FREITAS, M. L. O. **Epidemiologia e controle da mancha aureolada do cafeeiro**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2017.
- JANSEN, A. **Plant protection in coffee: recommendations for the common code for the coffee community initiative**. Germany: GTZ, 2005. 65 p.
- KADO, C. I. et al. Selective media for isolation of agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

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

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

LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. Morphology and epicuticular wax content of coffee leaves after fungicide application. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 919-926, 2006.

MADIGAN, M. M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. E. **Brock biology of microorganisms**. 10 ed. New York: Prentice Hall, 2005. 1104 p.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura**. Florianópolis: LCMAI Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens – UFSC. 2021

MARCELL, L. M.; BEATTIE, G. A. Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 15, n. 12, p. 1236-1244, 2002.

MARCUZZO, L. L.; DENARDIM, N. D. Colonização de bactérias causadoras de doenças foliares. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 169-176, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. MAPA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe>>. Acesso em 15 de Ago. 2022.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 346-355, 2004.

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.

NETO, E. B. S.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; SANTOS, L. A. Penetração e colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, frutos e sementes de melão amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 84-88, 2006.

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

POZZA, E. A. Diagnose e controle de doenças. In: CARVALHO, G. R.; FERREIRA, A. D.; ANDRADE, V. T.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, J. P. F. (Ed.). **Cafeicultura do cerrado**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 349-429, 2021.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injurias causadas por doenças do cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro**. Lavras: Editora da UFLA, p. 67-106, 2010.

RAIMUNDI, M. K. **Identificação bioquímica, molecular e patogenicidade de isolados de *Pseudomonas spp.* provenientes de cafeeiros em Minas Gerais**. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2017.

ROBBS, C. F. **Epiphytic survival of *Pseudomonas garcae* on coffee**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. Proceedings... Angers: INRA, p. 747-748, 1977.

RODRIGUES, L. M. R.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; GUERREIRO, O. Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 256-261, 2015.

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

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual review of phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 225-243, 1992.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.

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

ZAMBOLIM, L. Doenças do Cafeeiro. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**; 5. ed. Ouro Fino – MG: Agronômica Ceres, 2016, 810 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In.: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, n. 3, p. 120-122, 1997.

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