



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RICARDO MARCELO GONÇALVES

**ESTUDOS ETIOLÓGICOS DA MANCHA BRANCA DO  
MILHO E IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS  
ALTERNATIVOS DE *Pantoea ananatis***

---

Londrina  
2012

RICARDO MARCELO GONÇALVES

**ESTUDOS ETIOLÓGICOS DA MANCHA BRANCA DO  
MILHO E IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS  
ALTERNATIVOS DE *Pantoea ananatis***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, da  
Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Doretto  
Paccola-Meirelles.

Co-orientador: Dr. José Edson Fontes  
Figueiredo.

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central  
da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

G635e Gonçalves, Ricardo Marcelo.

Estudos etiológicos da mancha branca do milho e identificação de hospedeiros alternativos de *Pantoea ananatis* / Ricardo Marcelo Gonçalves. – Londrina, 2012.  
86 f. : il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles.

Coorientador: José Edson Fontes Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Milho – Doenças e pragas – Teses. 2. Bactérias fitopatogênicas – Teses. 3. Plantas hospedeiras – Teses. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Figueiredo, José Edson Fontes. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

RICARDO MARCELO GONÇALVES

**ESTUDOS ETIOLÓGICOS DA MANCHA BRANCA DO  
MILHO E IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS  
ALTERNATIVOS DE *Pantoea ananatis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Rui Pereira Leite Junior  
IAPAR – Londrina -PR

---

Prof Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
UEL - Londrina -PR

---

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-  
Meirelles  
UEL - Londrina -PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar discernimento, companhia de pessoas especiais e força nesta jornada para alcançar meus objetivos.

Em especial, à minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Luzia Doretto Paccola-Meirelles, pela confiança, conhecimentos transmitidos, dedicação e oportunidades oferecidas.

Ao co-orientador pesquisador da EMBRAPA Milho e Sorgo, Dr. José Edson Fontes Figueiredo, pela acolhida na empresa, amizade, conhecimentos e resultados alcançados na área de biologia molecular.

Ao pesquisador do Instituto Agrônomo do Paraná, Dr. Rui Pereira Leite Junior, pelos conhecimentos, espaço físico, reagentes e equipamentos cedidos para realização desse trabalho.

Ao Programa de Mestrado em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Aos professores do curso de mestrado que muito contribuíram com esta formação.

À minha esposa Taísa Grasiela Gomes Liduenha Gonçalves que sempre esteve ao meu lado incentivando e se abdicando em muitos momentos decisivos desse trabalho.

Ao Professor da Universidade Federal de Minas Gerais, Dr. Evanguedes Kalapothakis, pelo tempo e equipamento cedido para realização da maioria dos sequenciamentos genéticos.

Ao pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Walter Fernandes Meirelles, que me orientou nas vezes que precisei estar na empresa e por ter possibilitado um trabalho a partir da sua observação.

Às professoras da UEL, Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Balbi Peña e Dr<sup>a</sup> Elisete Pains Rodrigues, por aceitarem participar da banca examinadora da Qualificação, contribuindo com correções e sugestões.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Milho e Sorgo, Dr. Ivanildo Evódio Marriel e ao Dr. Jurandir Magalhães, por cederem o uso do equipamento termociclador quando necessário.

À Dr<sup>a</sup> Áurea Valadares Folgueras Flatschart pela amizade, sugestões para solucionar dúvidas, companheirismo e ajuda no laboratório.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Milho e Sorgo, Dr. Rodrigo Vêras da Costa, Dr. Luciano Viana Cota e Dr<sup>a</sup> Dagma Dionísia da Silva, por suporte técnico para condução de experimentos em casa de vegetação.

Aos bolsistas de iniciação científica da UEL, Eliseu dos Santos Pedro e Vitor de Arruda Moreira, pelo apoio na realização dos experimentos.

À bolsista da Embrapa Milho e Sorgo, Fabiana Rocha Pedro que diariamente me acompanhou no laboratório de Bioquímica Molecular.

Ao técnico do laboratório do CCB, UEL, Sr. Ideval Azarias de Souza, pela amizade e apoio constante na elaboração dos experimentos.

À doutoranda Luciana Meneguim e à Técnica do Iapar, Vanessa Hitomi Sugahara, pelos auxílios com extrações de DNA e sequenciamento genético.

Ao técnico da Embrapa Soja, Orismar, que sempre me acompanhou nas coletas de amostras à campo.

Ao técnico de laboratório da Embrapa Sete Lagoas, Sr. Clóvis, que me ajudou durante este período.

Aos bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo, Fabrício Lanza, Douglas e Talita, e ao funcionário Dênio, que ajudaram, deram sugestões e pela amizade formada.

Aos estudantes Ubiana, Fernanda e Carlos que ajudaram na parte molecular do trabalho na Embrapa Sete Lagoas.

Aos meus Pais, Irmã e Avó Bina que sempre me incentivaram a lutar pelos sonhos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo investimento na pesquisa.

À Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) pelo auxílio financeiro durante o período em que estive em Sete Lagoas/MG.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos.**

GONÇALVES, Ricardo Marcelo. **Estudos etiológicos da mancha branca do milho e identificação de hospedeiros alternativos de *Pantoea ananatis***. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A doença mancha branca do milho (MBM) é alvo de divergências com relação à sua etiologia. Alguns autores descrevem o fungo *Phaeospharia maydis* (forma anamórfica *Phyllosticta* sp, sinonímia *Phoma* sp.) como agente etiológico da doença, outros a bactéria *Pantoea ananatis* e ainda há autores que relatam a existência de diferentes agentes causais da doença, como *Phyllosticta* sp., o *Phoma sorghina* e a *Sporormiella* sp., e que dependendo do local, um ou outro fungo poderia ser o agente causal da doença. Desta forma, um dos objetivos deste trabalho foi determinar a etiologia da doença e avaliar a possibilidade de duas espécies de gramíneas do gênero *Digitaria* serem hospedeiros alternativos de *P. ananatis*. Plantas de milho híbrido HS200 cultivadas em casa de vegetação (CV) foram inoculadas com *P. ananatis* 45 dias após a semeadura. Sintomas típicos da doença MBM foram observados 10 dias após a inoculação. As plantas permaneceram na CV até as lesões evoluírem para o estágio necrótico quando procedeu-se a coleta das folhas contendo as lesões. Também foram coletadas à campo, folhas contendo lesões necróticas resultantes de infecção natural. Muitas das lesões necróticas, tanto aquelas obtidas por infecção natural, como aquelas obtidas por inoculação em CV apresentaram estruturas fúngicas em seu interior. As folhas foram lavadas e segmentos foliares apresentando lesões com estruturas fúngicas foram acondicionados em câmara úmida. Os fungos foram isolados, purificados e a técnica da PCR foi usada para amplificar o espaço interno transcrito (ITS) do rDNA. Os amplicons foram sequenciados e a identificação dos isolados foi realizada pelo grau de similaridade das sequências com àquelas depositadas no GenBank. Os fungos isolados tanto de lesões necróticas obtidas pela inoculação de *P. ananatis* em CV como aquelas coletadas à campo foram identificados como pertencentes às espécies *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria ricini*, *Fusarium equiseti*, *Gibberella moniliformis* (*Fusarium moniliforme*), *Curvularia* sp., *Phoma* sp. (sinonímia de várias espécies de *Phyllosticta* sp.) e *Phoma sorghina*. Para fornecer maior subsídio com relação à etiologia da MBM, também foi realizado o monitoramento das lesões em diferentes estádios de desenvolvimento. Para tanto, lesões de MBM obtidas por meio de infecção natural foram coletadas a campo, classificadas em quatro estádios diferentes de desenvolvimento, de acordo com o progresso da lesão, e o DNA total extraído de um *pool* de lesões para cada estágio. Após extração, o DNA foi amplificado por PCR com *primers* específicos para *P. ananatis* (ANAF/ANAR) e *primers* universais para fungos (ITS). *P. ananatis* foi identificada em todos os estádios de desenvolvimento das lesões, enquanto que fungos foram detectados somente nos tecidos necróticos das lesões. Os experimentos comprovaram que a bactéria *P. ananatis* é o agente causal da MBM, e que os fungos instalam-se nas lesões preestabelecidas pela bactéria. A ocorrência de hospedeiros alternativos de *P. ananatis* foi analisada por meio de inoculações cruzadas realizadas em casa de vegetação entre os isolados: WT-2 (*P. ananatis* controle positivo, isolado da MBM);

Pa2DH (isolado obtido de lesões de MBM, o qual foi inoculado e reisolado a partir de lesões de *Digitaria horizontalis*) e Pa1DI (isolado de *Digitaria insularis*). A partir dos sintomas obtidos, os reisolados foram empregados em sucessivas inoculações. Sintomas da doença foram observados em casa de vegetação 10 e 30 dias após as inoculações em plantas de *Digitaria* spp e milho, respectivamente. A bactéria foi reisolada após os testes de patogenicidade e todos os reisolados foram identificados como *P. ananatis* por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e dos amplicons com os *primers* específicos ANAF/ANAR.

**Palavras-chave:** *Phoma* sp.. *Digitaria* sp.. Hospedeiros alternativos. Monitoramento das lesões.

GONÇALVES, Ricardo Marcelo. **Etiological studies of maize white spot and identify alternative hosts for *Pantoea ananatis***. 2012. 86 f. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

The maize white spot (MWS) disease is largely studied due to the divergence related to its etiology. Some researchers describe the fungus *Phaeospharia maydis* (anamorphic form of *Phyllosticta* sp., synonymy *Phoma* sp.) as the causal agent, and some the bacteria *Pantoea ananatis* and yet another researchers who report the existence of different causative agents of disease, *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* and *Sporormiella* sp., that depending on location, either fungus could be the causal agent of disease. By this mean one of the goals of this work was to confirm the etiology of MWS. Another goal of this work was to evaluate the possibility of two grass species from *Digitaria* genus to be optional hosts for *P. ananatis*. Hybrid maize plants HS200 were grown in a greenhouse and inoculated with *P. ananatis* 45 days after planting. Characteristic symptoms were observed 10 days after the inoculation. The plants were held at the greenhouse until the injuries have developed to the necrotic stage, when the leaves with the injuries were collected. Leaves were also collected at field condition, containing necrotic injuries, caused by natural infection. Many of the necrotic injuries, no matter if obtained by natural infection or by the inoculation at the green house, have shown fungi structures in its interior. The leaves were washed and sections showing injuries with central fungi structures were packed into a moist chamber. The fungi were then isolates, purified and the PCR technique was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) of rDNA. The amplicons were sequenced and the identification of the fungi isolates was performed by the similarity degree of the sequencies with those deposited at GenBank. The fungi isolates, both from the necrotic injuries acquired by the inoculation of *P. ananatis* in greenhouse and those collected at field conditions were identified as belonging to the species *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria ricini*, *Fusarium equiseti*, *Gibberella moniliformis* (*Fusarium moniliforme*), *Curvularia* sp., *Phoma* sp (synonymy of many species of *Phyllosticta* sp.) and *Phoma sorghina*. To provide more subsidy related to the etiology of MWS, also the monitoring of the injuries in diferente degrees of development. For this, injuries of MWS were obtained at field condition by natural infection, classified in four different development stages, according to the injury development, and the total DNA was extracted from an injury pool for each stage. After the extraction, the DNA was amplified by a PCR with specific primers for *P. ananatis* (ANAF/ANAR) and the universal primers for fungi (ITS). *P. ananatis* is present in every stage of the injury development, when the fungi were detected after the injury tissue becomes necrotic. So these experiments proved to be the bacterium *P. ananatis* the causal agent of MWS, and fungi install itself in the injures pre-established by the *P. ananatis* bacteria. The incidence of optional hosts for *P. ananatis* was analised through crossed inoculations, taken in a greenhouse between the isolates: WT-2 (*P. ananatis* positive control, isolated from MWS), Pa2DH (isolate taken from MWS injuries, which was inoculated and reisolated from *Digitaria horizontalis* injuries) and Pa1DI (isolated from *Digitaria insularis*). From the gotten symptoms, the reisolate were used in subsequent inoculations. Disease symptoms

were observed in greenhouse condition between 10 and 30 days after inoculation in *Digitaria* and maize plants, respectively. The bacteria was reisolated after pathogenicity tests and all of the reisolated were identified as *P. ananatis* by partial sequencing of gene 16S rDNA and from the amplicons with specific primes ANAF/ANAR.

**Key-words:** *Phoma* sp.. *Digitaria* sp.. Optional hosts. Injuries monitoring.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Lesões típicas da doença mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento. A: Lesão no estágio inicial de desenvolvimento, que se destaca por apresentar coloração verde mais escuro em relação à cor do limbo foliar, também conhecido por estágio anasarca. B: Lesão em estágio necrótico, que com o progresso da doença adquire a coloração palha, se destacando na folha como manchas brancas .....24
- Figura 2** – Cultura do isolado WT-2 de *P. ananatis*, após 48h de incubação à 28 °C em meio de cultura Agar Nutriente, sendo possível visualizar colônias isoladas típicas desta espécie bacteriana. ....29
- Figura 3** – Imagens de géis de agarose a 1% para visualização do produto de PCR de 32 isolados fúngicos, com os *primers* ITS1/ITS4. Alíquotas de 3 µL de DNA amplificado foram aplicados no gel. M – Marcador molecular de 1 Kb plus DNA ladder, Invitrogen, EUA) .....40
- Figura 4** – Sintomas da doença mancha branca do milho classificados de acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001). A: Lesões no estágio 1 de desenvolvimento, as lesões anasarcas. B: Lesões no estágio 2, lesões acinzentadas. C: Lesões no estágio 3, tecido necrótico de coloração palha, sem estruturas fúngicas. D: Lesões no estágio 4, tecido necrótico, de coloração palha, com estruturas fúngicas no centro das lesões. E: Tecido assintomático, controle negativo .....49
- Figura 5** – Gel de agarose a 1 % para diagnóstico da qualidade e quantidade de DNA extraído a partir dos diferentes estádios de desenvolvimento das lesões de mancha branca do milho segundo o protocolo de Wilson (1997). Todos os diferentes estádios das lesões mancha branca do milho estão em duplicata. 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estrutura fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. As

diluições da solução de DNA aplicado no gel segue sempre a ordem de puro (sem diluição), diluição 10X e diluição 50X.....52

**Figura 6** – Gel de agarose a 1 % com produto da PCR com os *primers* ANAF/ANAR específicos para *P. ananatis*, utilizando DNA extraído de lesões da mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento. 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado WT-2 de *P. ananatis*). De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos .....53

**Figura 7** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR do DNA total extraído dos diferentes estádios de desenvolvimento das lesões da mancha branca do milho com os *primers* ITS1/ITS4, universais para fungos. M: marcador molecular de 1 Kb plus DNA ladder Invitrogen, EUA; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); -: controle negativo da reação de PCR; 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis no centro da lesão) e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos; M': marcador molecular 1Kb da AMRESCO, EUA.....54

**Figura 8** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR do DNA amplificado com os *primers* universais fúngicos (ITS1/ITS4) o qual foi extraído de lesões da mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento, porém sem que estas tenham passado pelo processo de desinfecção. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da

reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos..... 56

**Figura 9** – Folhas de gramíneas do gênero *Digitaria* naturalmente infectadas, mostrando lesões semelhantes às da mancha branca do milho. (A: *Digitaria horizontalis* e B: *Digitaria insularis*, coletadas na área experimental da Embrapa-Soja, Londrina, PR, Brasil) ..... 62

**Figura 10** – Lesões causadas pela inoculação de *P. ananatis* em diferentes gramíneas em casa de vegetação. Em cada foto, no canto superior direito, é mostrado a lesão em detalhe e setas amarelas destacam as lesões nas folhas. A: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela inoculação do isolado PA2DH; B: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela linhagem WT-2; C: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela reinoculação do isolado PA2DH; D e E: Lesões causadas pela inoculação do isolado PA1DI em *D. horizontalis*; F: Lesões em folha de milho HS200, causadas pelo isolado PA2DH de *D. horizontalis*; G: Lesões no milho HS200 causadas pelo isolado PA1DI de *D. insularis*; H: Lesões no milho HS200 causadas pela linhagem WT-2; I: Lesões no milho HS200 causadas pelo isolado PA1DI de *D. insularis*, mostrando no detalhe a lesão em estágio inicial de desenvolvimento, chamada anasarca; J: Lesões em *D. insularis* causadas pela inoculação da linhagem WT-2; L: Controle negativo de *D. horizontalis*; M: Lesões em *D. insularis* causadas pela inoculação do isolado PA1DI do milho; N: Controle negativo de *D. insularis*; O: Controle negativo do milho HS200 ..... 68

**Figura 11** – Identificação dos isolados bacterianos por PCR utilizando os primers específicos para *P. ananatis* (ANAF/ANAR). (1) WT-2

isolado de lesões de campo em *Zea mays*; (2) WT-2 reisolado de lesões de *Zea mays* obtidas em casa de vegetação; (3) WT-2 reisolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (4) Pa1DI isolado de lesões de campo em *D. insularis*; (5) Pa1DI reisolado de lesões produzidas em *Zea mays* em casa de vegetação; (6) Pa1DI reisolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (7) Pa2DH isolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (8) Pa2DH reisolado de lesões em *Zea mays* obtidas em casa de vegetação; (M) Marcador molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen, EUA)..... 69

**Figura 12** –Gel de agarose a 1 % para diagnóstico da qualidade do DNA extraído nos diferentes estádios de desenvolvimento da mancha branca do milho com o protocolo modificado de Murray e Thompson (1980). Na figura,  $\lambda$ : lambda de 50 ng/ $\mu$ L de DNA; 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesão acinzentada; 3: lesão necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesão necrótica com estrutura fúngica no centro e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos ..... 84

**Figura 13** –Gel de agarose a 1 % com o produto de PCR com DNA extraído dos diferentes estádios de desenvolvimento da mancha branca do milho, amplificados com os *primers* ITS1/ITS4. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesões acinzentada; 3: lesões necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesões necrótica com estrutura fúngica no centro; 5: tecido foliar assintomático e 6: DNA do isolado WT-2 (*P. ananatis*). De 1' a 6' representa repetição dos respectivos tratamentos ..... 85

**Figura 14** –Gel de agarose a 1 % com produto de PCR do DNA extraído dos diferentes estádios das lesões mancha branca do milho,

amplificado com os *primers* específicos para *P. ananatis* (ANAF/ANAR). M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado WT-2 de *P. ananatis*); 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesões acinzentada; 3: lesões necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesões necrótica com estrutura fúngica no centro; 5: tecido foliar assintomático e 6: DNA do isolado WT-2 (*P. ananatis*). De 1' a 6' representa repetição dos respectivos tratamentos .....85

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO (ZEA MAYS, L.) .....	20
2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO .....	21
2.2.1 Características Gerais da Doença Mancha Branca do Milho.....	21
2.2.2 Sintomatologia .....	23
2.2.3 Etiologia .....	24
2.2.4 Epidemiologia .....	26
2.2.5 Controle da Doença Mancha Branca do Milho .....	27
2.3 PANTOEA ANANATIS .....	28
2.4 O GÊNERO DIGITARIA SPP. E RELAÇÃO COM P. ANANATIS .....	29
<b>3 ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ASSOCIADOS A LESÕES NECRÓTICAS DA MANCHA BRANCA DO MILHO</b> .....	31
3.1 RESUMO E ABSTRACT .....	32
3.2 INTRODUÇÃO .....	34
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.3.1 Inoculação de P. Ananatis em Casa De Vegetação.....	36
3.3.2 Isolamento dos Fungos Observados na Região Central de Lesões Necróticas da Mancha Branca do Milho .....	36
3.3.3 Extração de DNA Fúngico, Amplificação por PCR e Sequenciamento.....	37
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>4 ARTIGO B: MONITORAMENTO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DA MANCHA BRANCA DO MILHO</b> .....	45
4.1 RESUMO E ABSTRACT .....	46
4.2 INTRODUÇÃO .....	47

4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>5 ARTIGO C: DIGITARIA HORIZONTALIS E DIGITARIA INSULARIS HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO</b> .....	<b>59</b>
5.1 RESUMO E ABSTRACT .....	60
5.2 INTRODUÇÃO .....	61
5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	63
5.3.1 Isolamento de <i>P. Ananatis</i> a Partir de Lesões Foliares de Milho e <i>D. insularis</i> .....	63
5.3.2 Preparo das Plantas de <i>D. Horizontalis</i> , <i>D. Insularis</i> e Milho.....	63
5.3.3 Teste de Patogenicidade em Casa de Vegetação de Isolados de <i>P. Ananatis</i> em Plantas de <i>Digitaria</i> spp. e em Plantas de Milho.....	64
5.3.4 Extração de DNA, PCR, Purificação e Sequenciamento dos Isolados de <i>P. ananatis</i> Após as Inoculações Cruzadas.....	65
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
5.4.1 Teste de Patogenicidade em Casa de Vegetação de Isolados de <i>P. Ananatis</i> em Plantas de <i>Digitaria</i> spp. e em Plantas de Milho.....	67
5.4.2 Identificação Molecular dos Isolados Bacterianos Após as Inoculações Cruzadas entre Milho e Espécies de <i>Digitaria</i> spp .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>
ANEXO A – Teste do protocolo de extração de DNA total direto da lesão MBM.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), superado apenas pelos Estados Unidos e China. Em quantidade, o milho é a terceira *commodity* mais produzida no país (FAO, 2009). Em levantamento comparando as safras 2008/2009, e projeções para 2019/2020, as exportações de milho deverão ter um aumento de 80,3%. Isso só será possível se houver aumento em produtividade (MAPA/AGE, 2010).

O estado do Paraná é o maior produtor de milho do país, com uma produção na safra 2009/10 de 13,4 milhões de toneladas, com produtividade média de 7680 Kg/ha em uma área plantada de 894 mil hectares na primeira safra e 4850 Kg/ha em uma área plantada de 1356 mil hectares na segunda safra. Na safra 2009/10, o Paraná foi seguido em produção pelos estados do Mato Grosso, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Goiás (CONAB, 2011).

Um dos fatores que vem contribuindo com a redução da produtividade da cultura são as doenças, merecendo destaque a mancha branca do milho (MBM). Esta doença encontra-se distribuída em quase todas as regiões brasileiras produtoras deste grão. Em cultivares suscetíveis, a doença apresenta alto potencial de redução da produtividade e em condições de chuvas frequentes e bem distribuídas, pode ocorrer com maior severidade. A MBM apresenta correlação linear significativa com peso de grãos, indicando que a mesma afeta drasticamente a produtividade (SAWAZAKI et al., 1997). Levantamento realizado por Casela, Ferreira e Pinto (2006) mostrou que as perdas provocadas pela MBM podem superar 60% da produção.

As primeiras observações da doença no Brasil foram relatadas na década de 80. O ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (forma imperfeita *Phyllosticta* sp.) foi descrito inicialmente como sendo o agente etiológico da doença (FANTIN, 1994). Em 2001, Paccola-Meirelles et al. descreveram a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da doença MBM, posteriormente Amaral et al. (2004) descreveram o fungo *Phoma sorghina* como sendo o provável agente etiológico. No ano seguinte, Amaral et al. (2005) descreveram a existência de diferentes agentes causais da doença, *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp., e que dependendo do local, um ou outro fungo poderia ser o agente etiológico.

Estudos recentes, realizados no México (PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009), na Argentina (ALIPPI; LÓPEZ, 2010) e na Polônia (KRAWCZYK et al., 2010) empregando testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares identificaram a bactéria *P. ananatis* como agente causal de lesões foliares de MBM.

Além de infectar plantas de milho, *P. ananatis* já foi identificada em outras culturas de importância e também em plantas daninhas. Gitaitis et al. (2002) utilizaram a técnica da PCR com *primers* específicos (PanITS1/EC5) para identificar a presença da bactéria *P. ananatis* na forma epifítica em 25 plantas daninhas, todas assintomáticas. Os autores concluíram que estas espécies de plantas seriam prováveis fontes de inóculos de *P. ananatis* para plantios de cebola nos EUA, onde esta bactéria foi descrita como agente causal da podridão central da cebola. Esses autores também identificaram a bactéria epifiticamente nas culturas de feijão caupi e soja (GITAITIS et al., 2002).

No ano de 2004, o pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo/Sete Lagoas, MG, Brasil, Walter F. Meirelles, observou sintomas similares à MBM em *Digitaria horizontalis*, uma gramínea presente nas entrelinhas do plantio experimental de milho na região de Londrina, PR (comunicação pessoal). A partir das lesões presentes nessa gramínea foi isolada uma bactéria com coloração e morfologia semelhante a *P. ananatis* (ROCHA; PACCOLA-MEIRELLES, 2008). Testes bioquímicos e o sequenciamento da região intergênica dos genes ribossomais 16S/23S permitiram identificar a bactéria como sendo *P. ananatis* (ROCHA et al., 2010). A espécie *D. horizontalis* é considerada uma das plantas daninhas mais comuns nas lavouras de milho, quando em sucessão com o próprio milho safrinha ou outras culturas em plantio direto (PASQUALETTO et al., 2001), mostrando-se predominante em campos experimentais de milho como em Sete Lagoas, MG (OLIVEIRA et al., 2001). No gênero *Digitaria* estão incluídas aproximadamente 300 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (CANTO-DOROW, 2001).

Assim, o presente trabalho teve por objetivos:

- 1) Confirmar a etiologia da doença, por meio de técnicas de identificação molecular, defendendo a hipótese de que os fungos observados nas lesões da MBM se instalam em lesões preestabelecidas pela bactéria *P. ananatis*;

- 2) Avaliar a possibilidade de espécies do gênero *Digitaria* serem hospedeiros alternativos para a bactéria *P. ananatis*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO (*ZEA MAYS*, L.)

A importância econômica da cultura do milho deve-se, principalmente, à grande versatilidade dos subprodutos originados para a alimentação humana. Em algumas regiões brasileiras, como o semi-árido nordestino, o milho é usado como exclusiva fonte energética na alimentação humana. O milho pode ser destinado para as indústrias de xarope de glucose, corantes caramelo, maltodextrinas, amidos alimentícios, amidos industriais, dextrinas, pré-gelatinizados e adesivos. Porém, a maior demanda no país, cerca de 70 a 80% da produção, destina-se à suplementação da dieta animal, principalmente de aves e suínos (DUARTE et al., 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, superado apenas pelos Estados Unidos e China. Em quantidade, o milho é a terceira *commodity* mais produzida no país (FAO, 2009), com aproximadamente 51,2 milhões de toneladas produzidas em 2009 (FAO, 2009). O estado do Paraná é o maior produtor de milho do país, com uma produção na safra 2009/10 de 13,4 milhões de toneladas, produtividade média de 7680 Kg/ha, em uma área plantada de 894 mil hectares na primeira safra e 4850 Kg/ha em uma área plantada de 1356 mil hectares na segunda safra. Na safra 2009/10, o Paraná foi seguido em produção pelos estados do Mato Grosso, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Goiás (CONAB, 2011).

As projeções de produção de milho no Brasil indicam um aumento de 12,7 milhões de toneladas quando se compara a safra 2010/11 com 2020/21. Em 2020/2021, as estimativas indicam uma produção de 65,5 milhões de toneladas e um consumo de 56 milhões de toneladas. Cerca de 86% da produção de milho será destinada ao mercado interno para atender o consumo humano, bem como para fabricação de ração animal, principalmente para aves e suínos (MAPA/AGE, 2011).

Projeção comparando a safra 2008/2009 com 2019/2020 no Brasil indica que as exportações terão um aumento de 80,3%, e como a tendência é aumentar ainda mais a demanda externa, isso será possível se houver aumento em produtividade, visto que a produção de milho está projetada para crescer 2,67% ao ano, enquanto a área plantada apenas 0,3% (MAPA/AGE, 2010).

Um dos fatores que contribuem com a redução da produtividade do milho são as doenças. A importância de cada doença é relativa, pois o número de incidência de cada uma está condicionado a vários fatores, como escolha do cultivar, condições climáticas que variam de ano a ano, a região em que será cultivado, entre outros. As principais doenças foliares que acometem a milhocultura são a cercosporiose, ferrugem polissora, ferrugem comum, ferrugem tropical ou ferrugem branca, helmintosporiose, mancha de diplodia e a mancha branca do milho (COSTA; CASELA; COTA, 2009).

## 2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO

### 2.2.1 Características Gerais da Doença Mancha Branca do Milho

A doença MBM está presente na América do Norte, Central e do Sul, Ásia e África (RANE; PAYAK; RENFRO, 1966; CARSON, 1999). No Brasil é considerada uma das doenças foliares mais importantes para a cultura do milho, devido a ampla distribuição no território nacional, estando presente em quase todas as regiões em que se pratica a milhocultura (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). A doença era mais frequente em plantas de milho no final de ciclo, porém tem incidido em plantas mais jovens, podendo levá-las à seca prematura (BALMER; PEREIRA, 1987; FANTIN, 1994). Levantamento realizado por Fernandes e Oliveira (1997) mostrou que as perdas provocadas pela doença MBM podem atingir 60% da produção, quando incide em cultivares suscetíveis e sob condições climáticas que favoreçam a doença. A redução de produtividade em plantas com MBM está relacionada com a redução de fotossíntese decorrente da área foliar lesionada. Esta redução na atividade fotossintética pode ser causada pela redução na interceptação da radiação (IR) (necrose causada pelo ação do patógeno), e/ou minimização da eficiência de uso da radiação (EUR) interceptada no tecido verde remanescente (alteração da relação de solutos entre as células do milho, alteração na difusão de CO<sub>2</sub> na folha, etc.) (JOHNSON, 1987). Em MBM, ambos efeitos ocorrem (IR e EUR), sendo que folhas com valores de severidade de 10-20% podem apresentar redução de 40% na taxa líquida fotossintética, resultando em queda na produção de grãos (GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001).

A condição climática ideal para favorecimento da doença MBM é alta

umidade relativa do ar associada à temperatura moderada (FANTIN, 1994), mais precisamente, temperaturas noturnas em torno de 14 °C com umidade relativa do ar maior ou igual a 70% (FERNANDES; SANS, 1994). Essas condições coincidem com várias regiões produtoras de milho no Brasil, principalmente em plantios tardios de milho (a partir de outubro até maio), sendo observado o aumento da severidade da doença com o avançar das épocas de semeadura e um decréscimo nas últimas épocas (GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 1999). Estudo desenvolvido por Pegoraro et al. (2001) confirma a hipótese de que semeaduras tardias na região Sul do país também aumentaram a severidade da doença MBM, sendo que o mês de setembro apresentou menor severidade e maior produtividade de grãos, evidenciando que há uma relação linear significativa entre rendimento de grãos e severidade. De acordo com Sawasaki et al. (1997), sob condições de chuvas frequentes e bem distribuídas, o patógeno pode provocar maior severidade da doença e afetar drasticamente a produtividade. Pesquisa desenvolvida por Rolim et al. (2007), mostraram que as condições ideais para favorecer o desenvolvimento da doença no campo, a partir da data de semeadura são, acúmulos de temperatura de aproximadamente 2.900 °C, concomitantemente a um acúmulo de chuva ao redor de 350 mm, para qualquer tipo de genótipo de milho.

A expressão da doença MBM é variável dependendo do genótipo da planta de milho (SAWASAKI et al., 1997; CARSON, 1999; PEGORARO et al., 2002; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002). Os efeitos de aditividade são de maior importância na herança do caráter resistência à MBM (efeitos de dominância e epistasia também têm participação), visto que são de extrema relevância no melhoramento genético de plantas, pois apenas os efeitos aditivos são herdáveis (PEGORARO et al., 2002). Estudos sobre a reação da resistência à MBM indicam tratar-se de herança genética quantitativa, prevalecendo a alta herdabilidade e os efeitos gênicos aditivos, sobre os efeitos de dominância (CARSON, 2001; PEGORARO et al., 2002, LOPES et al., 2007). Trabalhos envolvendo mapeamento de QTLs (*quantitative trait loci* ou locos gênicos que afetam um caráter quantitativo) de reação de resistência à MBM, foram realizados com o propósito de fornecer dados mais precisos e informativos (LOPES, 2003; CARSON; STUBER; SENIOR, 2005). O predomínio de poucos QTLs, alta herdabilidade e ação gênica aditiva com relação a resistência à MBM, evidenciam que os métodos de seleção de progênies e melhoramento de populações podem ser empregados com níveis altos de seleção,

pressupondo que os ganhos genéticos também sejam elevados. Métodos genealógicos e de retrocruzamentos podem ser eficientes na obtenção de linhagens resistentes (SILVA, 2002).

Além do clima e genótipo de milho utilizado, deficiências no manejo da cultura pode predispor a planta ao ataque de patógenos (BEDENDO, 1995). Com relação à adubação, doses elevadas de fósforo (113 Kg/ha de  $P_2O_5$ ) não promoveram o aumento da incidência da doença MBM, em qualquer que seja o estágio de desenvolvimento da planta (FIDELIS et al., 2007). Em contrapartida, o aumento da dose de adubação nitrogenada pode propiciar aumento drástico da severidade (PARENTONI et al., 1996). Com sulfato de amônia, pode haver aumento da severidade da doença em cultivar suscetível com semeadura tardia de 38% (0 Kg/ha de nitrogênio) para 73% (240 Kg/ha de nitrogênio), em solos do tipo terra roxa estruturada eutrófica (textura argilosa/muito argilosa) ou latossolo vermelho-amarelo (textura arenosa) (COSTA, 2001). Contudo, plantas com doses de adubações diferentes de formulados a base de N-P-K (nitrogênio, fósforo e potássio), não apresentaram diferença quanto a severidade da doença (PEGORARO et al., 2001; SOUZA; DUARTE, 2002).

*P. ananatis* já foi relatada como agente causal de lesões foliares em outras plantas como sorgo (*Sorghum bicolor*) (COTA et al., 2010), em eucalipto (*Eucalyptus* spp) (COUTINHO et al., 2002), *Sorghum sudanense* (AZAD; HOLMES; COOKSEY, 2000), cebola (*Allium cepa*) (GITAITIS; GAY, 1997), na bainha da folha do arroz (*Oryza sativa*) (COTHER et al., 2004).

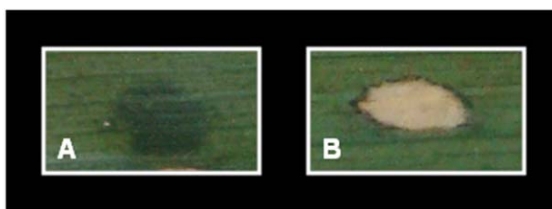
### 2.2.2 Sintomatologia

No início da década de 1980, os sintomas da MBM foram descritos como manchas foliares de cor verde pálida ou cloróticas, as quais se tornam esbranquiçadas e com aspecto seco e margens de coloração marrom. As lesões normalmente apresentam formato oblongo e irregular, medindo entre 0,3 a 2,0 cm. Em lesões mais velhas é possível visualizar pseudotécios e picnídios no interior das lesões (FANTIN, 1994). Os sintomas geralmente surgem nas folhas inferiores da planta, progredindo rapidamente em direção ao ápice, sendo mais severos após o estágio de pendramento (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997).

Segundo Paccola-Meirelles et al. (2001), lesões jovens da MBM,

apresentam coloração verde escuro, com aspecto de encharcamento (Figura 1A). Posteriormente, as lesões tornam-se necróticas de coloração palha (Figura 1B), podendo ocorrer coalescência das lesões. Os sintomas podem apresentar-se com diferentes severidades conforme o genótipo do milho (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

**Figura 1** – Lesões típicas da doença mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento. A: Lesão no estágio inicial de desenvolvimento, que se destaca por apresentar coloração verde mais escuro em relação à cor do limbo foliar, também conhecido por estágio anasarca. B: Lesão em estágio necrótico, que com o progresso da doença adquire a coloração palha, se destacando na folha como manchas brancas.



Paccola-Meirelles et al. (2001) classificaram as lesões da MBM em quatro estádios diferentes de acordo com seu desenvolvimento:

- Estádio I: manchas esverdeadas do tipo anasarca;
- Estádio II: manchas acinzentadas;
- Estádio III: manchas necróticas de cor palha sem estruturas reprodutivas fúngicas visíveis;
- Estádio IV: manchas necróticas de cor palha contendo estruturas reprodutivas fúngicas no centro.

### 2.2.3 Etiologia

A etiologia desta doença ainda é muito controversa na comunidade científica. A doença foi relatada com ampla distribuição no território nacional e descrita no Brasil desde 1982. Fantin (1994) a identificou como sendo a doença mancha foliar de *Phaeosphaeria*, descrita na Índia por Rane, Payak e Renfro (1966), tendo como agente causal o ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (HENNING, 1902) Rane, Payak e Renfro (1966), sinônimos *Sphaerulina maydis* (HENNING, 1902) e *Leptosphaeria zae-maydis* (SACCAS, 1951), forma imperfeita *Phyllosticta* sp.

Posteriormente, a forma anamórfica para *P. maydis* foi descrita como *Phoma maydis* por Carson (1999). *Phoma* sp. e *Phyllosticta* sp. são considerados similares e com frequência tratados como sinônimos (BARNETT; HUNTER, 1998).

Em trabalhos posteriores, Paccola-Meirelles et al. (2001) isolaram de lesões anasarcas, em uma frequência de 63%, uma bactéria gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, de crescimento mucoso a qual foi identificada como *Pantoea ananatis* (sinônimo *Erwinia ananas*). Esta bactéria foi inoculada em folhas de milho em casa de vegetação, e os sintomas foram semelhantes aos observados a campo. Os autores confirmaram os postulados de Koch e a doença passou a se chamar mancha branca do milho em substituição a mancha foliar de *Phaeosphaeria*.

Inicialmente, a bactéria isolada por Paccola-Meirelles et al. (2001) foi classificada como pertencente ao gênero *Erwinia* (PEROMBELON, 1992) e identificada como *Erwinia ananas*. A espécie *E. ananas* foi transferida para o gênero *Pantoea* (SERRANO, 1928), com o nome de *Pantoea ananas* por Mergaert; Verdonck e Kersters (1993). Trüper e De'Clari (1997) a renomearam para *Pantoea ananatis*.

Em 2004, o fungo *Phoma sorghina* foi isolado de lesões necróticas coletadas no campo por Amaral et al. (2004), em uma frequência de 70%. Assim os autores descreveram o fungo *P. sorghina* como agente causal da doença.

Posteriormente, Amaral et al. (2005) relataram a existência de diferentes agentes causais da doença, a *Phyllosticta* sp., a *Phoma sorghina* e a *Sporormiella* sp., e que dependendo do local, um ou outro agente poderia ser o agente etiológico. Nesse trabalho, os autores pesquisaram a interferência do local, analisando lesões originárias de Goiás e Rio Grande do Sul e concluíram que *P. sorghina* e *Phoma* sp. ocorrem em todos os ambientes, mas *Sporormiella* e *Phyllosticta* sp. estão restritos aos estados de Goiás e Rio Grande do Sul, respectivamente. Desse modo, as condições ambientais podem influenciar a predominância de um ou outro agente causal específico.

As estruturas fúngicas, picnídios e pseudotécios, presentes no centro das lesões foram atribuídas como sendo as formas anamórficas e teleomórficas do fungo *Phaeosphaeria maydis* (FANTIN, 1994). No entanto, estas estruturas foram analisadas e descritas por Cervelatti et al. (2002) como pertencentes a fungos de espécies diferentes e não aos estados anamórficos e

teleomórficos de um mesmo agente. Os picnídios eram pertencentes à *Phoma tropica*, um fungo oportunista que geralmente incide em lesões preestabelecidas por outros agentes.

Paccola-Meirelles et al. (2002) avaliaram a reação de diferentes genótipos de milho quando inoculados com a bactéria *P. ananatis* em casa de vegetação. Os sintomas foram similares aos sintomas observados no campo, reforçando a hipótese de que o agente causal da doença é a bactéria *P. ananatis*.

Bomfeti et al. (2008) utilizando técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão observaram grande número de células bacterianas ocupando os espaços intercelulares de lesões de MBM. Estruturas fúngicas não foram visualizadas em lesões jovens. Os *primers* para os genes 16S rRNA e *rpoβ* de bactérias e oligonucleotídeos universais ITS1/ITS4 para amplificar a região intergênica dos genes ribossomais 18S e 28S de fungos, foram empregados por estes autores em reações de PCR para localizar, tanto a bactéria, quanto os fungos, nos diferentes estádios das lesões da MBM. No estágio de anasarca, observou-se amplificação de DNA somente com os *primers* bacterianos. A amplificação da região ITS4 ocorreu somente em lesões em estádios avançados de desenvolvimento, quando o tecido já se apresentava necrosado. Esses resultados reforçaram a hipótese de que as lesões de MBM são causadas pela bactéria e que fungos oportunistas podem colonizá-las posteriormente.

Em milho, estudos recentes, realizados no México (PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009), na Argentina (ALIPPI; LÓPEZ, 2010) e na Polônia (KRAWCZYK et al., 2010), empregando testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares demonstraram que a bactéria *P. ananatis* é o agente causal de lesões foliares.

#### 2.2.4 Epidemiologia

A doença MBM encontra-se distribuída em quase todo território nacional. *P. ananatis* foi identificada causando infecções tanto em plantas monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Também já foi reportada com diferentes comportamentos, como epifítica ou endofítica, patogênica ou simbiote e como saprofítica (COUTINHO; VENTER, 2009).

A bactéria foi identificada causando a podridão do centro de cebola

(GITAITIS; GAY, 1997). Segundo Gitaitis et al. (2003), para a mesma doença da cebola, *P. ananatis* pode ser transmitida pelo inseto trips do tabaco *Frankliniella fusca*, com uma frequência de 52% das plantas inoculadas com o vetor. Para a mesma doença, o patógeno também pode naturalmente infestar e ser transmitida por sementes de cebola (WALCOTT et al., 2002).

Gitaitis et al. (2002) utilizaram a técnica de PCR com *primers* específicos (PanITS1/EC5) para identificar a bactéria *P. ananatis* na forma epifítica em 25 plantas daninhas assintomáticas. Os autores descreveram essas plantas daninhas como prováveis fontes de inóculos para os plantios de cebola nos EUA. Esses autores também identificaram a bactéria *P. ananatis* como sendo epifítica nas culturas de feijão caupi e soja.

Rijavec et al. (2007), após desinfestação superficial de grãos de milho e posterior germinação sob condições assépticas, isolaram *P. ananatis*, cuja identidade foi confirmada por sequenciamento de DNA utilizando os *primers* universais U986/L1401 para identificação de bactérias. Após reisolamento da bactéria a partir de grãos colhidos em duas semeaduras consecutivas, foi sugerido que, no milho, pode ocorrer uma provável transmissão vertical endofítica da bactéria *P. ananatis*.

#### 2.2.5 Controle da Doença Mancha Branca do Milho

A forma mais eficiente para controle da doença MBM tem sido feita utilizando cultivares resistentes (PEREIRA; CAMARGO; CAMARGO, 2005). Em alguns casos, quando o uso de cultivares suscetíveis se torna necessário, como em campos experimentais de melhoramento genético, ou a utilização de variedades por pequenos agricultores que produzem suas próprias sementes para a próxima safra, a adoção de medidas de manejo integrado pode contribuir significativamente para a redução da incidência da doença ou até mesmo para garantir maior estabilidade de cultivares resistentes, uma vez que a pressão de inóculo será menor. Dentre as medidas de manejo podemos destacar o plantio em época adequada (para não coincidir o período crítico da produção com as condições climáticas que melhor favorecem o surgimento a doença), adoção de sementes com qualidade, rotação com culturas não suscetíveis, manejo adequado da lavoura (adubação, população de plantas adequadas, controle de pragas e plantas daninhas, que além de

competirem com a cultura, podem ser hospedeiros alternativos para os patógenos) (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

### 2.3 PANTOEA ANANATIS

*Pantoea ananatis* é uma bactéria gram-negativa, não esporulante, com respiração do tipo anaeróbia facultativa e quando cultivada em meio de cultura, apresenta colônias convexas de coloração amarelo brilhante, com bordos regulares (Figura 2). O crescimento da bactéria pode adquirir aspecto mucoso quando em meio de cultura devido a formação de uma camada de exopolissacarídeo (EPS). Em estudo realizado por Morohoshi, Oseki e Ikeda (2011), os autores avaliaram o isolado SK-1 e mutantes de *P. ananatis*, agente causal da podridão central de cebola, e inferiram que a produção de EPS é devido a acil-homoserine-lactona quando cultivados em meio de cultura acrescidos de glucose, frutose e sucrose, porém a produção de EPS não está relacionada com a patogenicidade da bactéria na cultura da cebola.

Nas condições climáticas do Brasil, onde prevalecem clima tropical e subtropical, a maioria das plantas não toleram o congelamento da água nos espaços intercelulares do tecido vegetal, que promove o rompimento e extravasamento do conteúdo celular e morte da célula. *P. ananatis* apresenta a capacidade de produzir cristais de gelo em temperaturas que normalmente não poderiam ser formados (WYSMIERSKI; ESCANFERLA; PACCOLA-MEIRELES, 2005). Esta propriedade pode ajudar a esclarecer o progresso do sintoma de MBM, desde lesões anasarcas com aspecto de encharcadas até o tecido vegetal necrótico com coloração palha. Esse fenômeno recebe o nome de *ice nucleation* ou nucleação de gelo (INA) (LINDOW; ARNY; UPPER, 1978). Esta propriedade já foi relatada em *Pseudomonas* (MAKI et al., 1974), *Xanthomonas* (KIM et al., 1987) e *Pantoea (Erwinia)* (LINDOW; ARNY; UPPER, 1978), a qual pode estar relacionada com a virulência de bactérias fitopatogênicas. A atividade *ice nucleation* em *Erwinia herbicola* é influenciada pelo tipo de meio de cultivo, mostrando-se ativa em meio de cultura Agar Nutriente suplementado com 2,5% de glicerol ou glucose, sendo que a quantidade de sintoma é maior quando aumentou-se o tempo de congelamento das plantas (acima de 6h) após as pulverizações com a suspensão bacteriana (LINDOW; ARNY; UPPER, 1978). O complexo agregado lipoglicoproteína gene de gelo está localizado na

membrana bacteriana e resíduos de açúcares, como manose, aumentam estes agregados, que são estruturas mais eficientes na nucleação de gelo (KOZLOFF; TURNER; ARELLANO, 1991).

Outra propriedade que *P. ananatis* isolada da MBM possui, é o mecanismo de *quorum-sensing* (POMINI; PACCOLA-MEIRELLES; MARSAIOLI, 2007), um mecanismo de comunicação célula-célula que é dependente da densidade populacional celular (KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). Em *P. ananatis*, a molécula sinalizadora da *quorum-sensing* é a acil-homoserine-lactona (MOROHOSHI et al., 2007). Esta mesma substância sinalizadora produzida por *Pantoea stewartii*, agente causal da murcha do milho doce, controla a expressão de exopolissacarídeo que protege a célula bacteriana contra mecanismos de defesa da planta e obstrui a circulação de fluídos no tecido vegetal, podendo levar a planta à morte (BODMAN; FARRAND, 1995).

*P. ananatis* já foi descrita em culturas como abacaxi, melão doce, melão, arroz, cebola, sorgo sudanense, eucalipto e tomate (SERRANO, 1928; WELLS et al., 1987; BRUTON et al., 1991; WATANABE; KAWAKITA; SATO, 1996; GITAITIS; GAY, 1997; AZAD; HOLMES; COOKSEY, 2000; COUTINHO; PREISIG, 2002; STALL; ALEXANDER; HALL, 1969).

**Figura 2** – Cultura do isolado WT-2 de *P. ananatis*, após 48h de incubação à 28 °C em meio de cultura Agar Nutriente, sendo possível visualizar colônias isoladas típicas desta espécie bacteriana.



#### 2.4 O GÊNERO DIGITARIA SPP. E RELAÇÃO COM *P. ANANATIS*

O gênero *Digitaria* pertence à família Poaceae (antiga Gramineae), subfamília Panicoideae, tribo Paniceae. No gênero *Digitaria* estão incluídas aproximadamente 300 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de

ambos os hemisférios (CANTO-DOROW, 2001). O Brasil é o país das Américas com maior número de espécies de gramínea do gênero *Digitaria*, totalizando 26 espécies. O número de espécies de *Digitaria* nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste são equivalentes, apresentando uma redução significativa na região Norte. Nessas regiões, as espécies habitam áreas abertas, sendo comum encontrá-las em locais modificados (CANTO-DOROW; LONGHI-WAGNER, 2001).

No ano de 2004 o pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo/Sete Lagoas, MG, Brasil, Walter F. Meirelles, observou sintomas similares à MBM em *Digitaria horizontalis*, gramínea presente nas entrelinhas de plantios experimentais de milho na região de Londrina, PR (comunicação pessoal). A partir das lesões presentes nessa gramínea uma bactéria de coloração e morfologia semelhantes a *P. ananatis* (ROCHA; PACCOLA-MEIRELLES, 2008) foi isolada. Testes bioquímicos e o sequenciamento da região intergênica 16S/23S permitiram identificar a bactéria como sendo *P. ananatis* (ROCHA et al., 2010). A gramínea *D. horizontalis* é considerada uma das plantas daninhas mais comuns nas lavouras de milho quando em sucessão com o próprio milho safrinha ou outras culturas em plantio direto (PASQUALETTO et al., 2001), mostrando-se predominante em campos experimentais de milho como em Sete Lagoas, MG (OLIVEIRA et al., 2001).

**3 ARTIGO A****IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ASSOCIADOS A LESÕES  
NECRÓTICAS DA MANCHA BRANCA DO MILHO**

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ASSOCIADOS A LESÕES NECRÓTICAS DA MANCHA BRANCA DO MILHO

### 3.1 RESUMO E ABSTRACT

#### Resumo

A doença mancha branca do milho (MBM) é caracterizada por lesões necróticas nos tecidos foliares de milho sendo responsável por perdas de até 60% nas lavouras. Os sintomas tem início com a formação de lesões anasarcas que posteriormente tornam-se necróticas de coloração palha, podendo apresentar na região central, estruturas reprodutivas fúngicas, como picnídios ou pseudotécios. As primeiras observações da doença no Brasil datam da década de 80, porém sua etiologia ainda tem sido questionada. O ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (forma imperfeita *Phyllosticta* sp. sinónimoia *Phoma* sp.) foi descrito inicialmente como sendo o agente etiológico da doença. Posteriormente, este agente foi questionado por outros autores que descreveram a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da doença. Outro grupo atribuiu a existência de diferentes agentes fúngicos responsáveis pelos sintomas, a *Phyllosticta* sp., o *Phoma sorghina* e a *Sporormiella* sp. que, dependendo do local, um ou outro agente poderia iniciar o processo infeccioso. Nossa hipótese é a de que a bactéria *P. ananatis* é o agente causal da doença e que diferentes espécies fúngicas podem se instalar em lesões preestabelecidas pela bactéria, levando ao desenvolvimento das estruturas fúngicas observadas no centro das lesões necróticas da MBM. Assim, para confirmar esta hipótese, fungos isolados de lesões necróticas da MBM, obtidas tanto em condições naturais de infecção como induzidas por *P. ananatis* em casa de vegetação, foram identificados molecularmente. Folhas de plantas de milho híbrido HS200, cultivados em casa de vegetação (CV), foram inoculadas com *P. ananatis*, 45 dias após a semeadura. Sintomas típicos da doença MBM foram observados 10 dias após as inoculações e evoluíram para o estágio necrótico com o surgimento de estruturas reprodutivas fúngicas (picnídios e pseudotécios) no centro das lesões. Folhas sintomáticas resultante de infestação natural, portadoras de lesões necróticas contendo estruturas reprodutivas fúngicas, foram também coletadas, em campos experimentais da UEL e da Embrapa Soja, Londrina, PR. Os fungos foram isolados, purificados e a técnica da PCR foi usada para amplificar o espaço interno transcrito (ITS) do rDNA. Os amplicons resultantes foram sequenciados e a identificação dos isolados fúngicos foi realizada através do grau de similaridade das sequências aqui obtidas com àquelas depositadas no GenBank. Os fungos isolados tanto de lesões necróticas obtidas pela inoculação de *P. ananatis* em casa de vegetação, como daquelas coletadas à campo, foram identificados como pertencentes às espécies *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria ricini*, *Fusarium equiseti*, *Gibberella moniliformis* (*Fusarium moniliforme*), *Curvularia* sp., *Phoma* sp. (sinónimoia de várias espécies de *Phyllosticta* sp.) e *Phoma sorghina*. Esses resultados confirmam ser a *P. ananatis* o agente etiológico da doença, e indicam que as diferentes espécies fúngicas presentes em lesões necróticas, colonizam as lesões preestabelecidas pela bactéria, apresentando portanto, um comportamento oportunista.

**Palavras – chave:** *Pantoea ananatis*. *Phaeosphaeria maydis*. *Phoma* sp.

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED WITH MAIZE WHITE SPOT

### Abstract

The disease maize white spot (MWS) is characterized by necrotic lesions in the maize leaves tissues, being responsible for up to 60% of losses in the fields gross production. The symptoms begin with anasarca injuries that further will turn into beige necrotic injuries, which can show, in its central area, fungi reproductive structures, such as pucnydia or pseudotecius. The first observations of this disease in Brazil are dated of the 80's decade, but its etiology is questioned yet. The ascomycota *Phaeosphaeria maydis* (imperfect form *Phyllosticta* sp., synonymy *Phoma* sp.) has initially been described as the etiologic agent of the disease. Later this agent was put in doubt by another researcher, which described the bacteria *Pantoea ananatis* as its causal agent. Another research group assigned to the existence of different fungi agents to be responsible for the symptoms, the *Phyllosticta* sp., the *Phoma sorghina* and the *Sporormiella* sp., which depending on the place it was found, either could start the infectious process. Our hypothesis is that the bacteria *P. ananatis* is the causal agent of the disease and that different fungi species can install themselves into pre-established injuries caused by the bacteria, leading it to the development of the fungi structures observed in the center of the MWS necrotic injuries. Therefore, to confirm this hypothesis, the necrotic injuries isolated fungi from MWS, both taken from field conditions (or natural infection) and those caused by *P. ananatis* in greenhouse conditions, were identified molecularly. Leaves from the maize hybrid HS200, cultivated in greenhouse, were inoculated with *P. ananatis* 45 days after planting. Typical disease symptoms appeared 10 days after the inoculations and developed to the necrotic stage with the appearance of fungi reproductive structures (pucnydia and pseudotecius) in the middle of the injuries. Symptomatic leaves caused by natural infection, carrier of necrotic injuries containing fungi reproductive structures were also collected at experimental field at UEL and Embrapa Soja, Londrina/PR. The fungi were then isolated the the PCR technique was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) of the rDNA. The resulting amplicons were sequenced and the identification of the fungi isolated was done by the similarity degree of the sequences here obtained with those deposited at GenBank. The isolated fungi from the necrotic injuries, both from the greenhouse inoculation with *P. ananatis* and those obtained at field conditions, were identified as belonging to the following species: *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria ricini*, *Fusarium equiseti*, *Gibberella moniliformis* (*Fusarium moniliforme*), *Curvularia* sp., *Phoma* sp. (many species synonymy of *Phyllosticta* sp.) and *Phoma sorghina*. These results confirm to be *P. ananatis*, the causal agent of the disease, and indicate that different fungal species present in necrotic lesions, colonize lesions pre-established by the bacteria, thus presenting an opportunistic behavior.

**Key – words:** *Pantoea ananatis*. *Phaeosphaeria maydis*. *Phoma* sp.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Uma das mais importantes doenças foliares da cultura do milho, a mancha branca do milho (MBM), caracteriza-se por apresentar ampla distribuição territorial e pela possibilidade de reduções significativas de produtividade. Quando incide em cultivares suscetíveis, as perdas podem ser superiores a 60% (PINTO, 1999; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006). Os sintomas iniciais da doença caracterizam-se por lesões verde-escuro, com aspecto de encharcadas ou aquosas, também conhecidas por anasarcas. Em estádios posteriores de desenvolvimento, as lesões adquirem coloração palha, característica de tecido vegetal necrótico. Nestas lesões é possível verificar a presença de estruturas reprodutivas fúngicas.

As primeiras observações da doença no Brasil datam da década de 80, porém sua etiologia ainda tem sido questionada. Fantin (1994) identificou esta doença como sendo a doença mancha foliar de *Phaeosphaeria*, descrita na Índia por Rane, Payak e Renfro (1966), tendo como agente causal o ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (HENNING, 1902), sinonímia *Sphaerulina maydis* (HENNING, 1902), fase imperfeita *Phyllosticta* sp. Posteriormente a forma anamórfica para *P. maydis* foi descrita como *Phoma maydis* por Carson (1999). As espécies *Phoma* sp. e *Phyllosticta* sp. são consideradas similares e com frequência tratadas como sinônimos (BARNETT; HUNTER, 1998). Em trabalhos posteriores, Paccola-Meirelles et al. (2001), isolaram de lesões anasarcas, em uma frequência de 63%, uma bactéria gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, de crescimento mucoso a qual foi identificada como *Pantoea ananatis* (sinônimo *Erwinia ananas*). Esta bactéria foi inoculada em folhas de milho em casa de vegetação, e os sintomas foram semelhantes aos observados a campo. Os autores confirmaram os postulados de Koch e a doença passou a se chamar mancha branca do milho em substituição a mancha foliar de *Phaeosphaeria*.

Inicialmente, a bactéria isolada por Paccola-Meirelles et al. (2001) foi classificada como pertencente ao gênero *Erwinia* (PEROMBELON, 1992) e identificada como *Erwinia ananas*. A espécie *E. ananas* foi transferida para o gênero *Pantoea*, *Pantoea ananas* (SERRANO, 1928) por Mergaert; Verdonck e Kersters (1993), Trüper e De'Clari (1997) a renomearam para *Pantoea ananatis*.

Em 2004, o fungo *Phoma sorghina* foi isolado de lesões necróticas coletadas a campo por Amaral et al. (2004), em uma frequência de 70%. Estes

autores descreveram o fungo *P. sorghina* como o agente causal da doença. Posteriormente, Amaral et al. (2005) relataram a existência de diferentes agentes causais da doença, *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina*, *Phoma* sp. e *Sporormiella* sp., e que dependendo do local, um ou outro agente poderia ser o responsável pelo desenvolvimento dos sintomas. Neste mesmo trabalho, os autores pesquisaram a interferência do local, analisando lesões coletadas em Goiás e Rio Grande do Sul, inferindo que *P. sorghina* e *Phoma* sp. ocorrem em todos os ambientes, mas *Sporormiella* sp. e *Phyllosticta* sp. estão restritos aos estados de Goiás e Rio Grande do Sul, respectivamente. Assim, condições ambientais poderiam influenciar a predominância de um ou outro agente causal específico.

Paccola Meirelles et al. (2002) obtiveram sintomas da MBM, semelhantes aos de campo, por meio da inoculação da bactéria em seis diferentes linhagens de milho. Bomfeti et al. (2008), por meio de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e técnicas moleculares, detectaram um grande número de células bacterianas ocupando os espaços intercelulares na epiderme foliar de lesões de MBM, sendo que estruturas fúngicas não foram visualizadas em lesões jovens. Com a técnica molecular da PCR, com *primers* universais fúngicos e bacterianos, os autores observaram que há amplificação de DNA para o estágio anasarca da lesão apenas com os *primers* bacterianos, enquanto que com os *primers* fúngicos, amplificações de DNA foram visualizadas nos estádios mais desenvolvidos das lesões, quando o tecido vegetal já se apresenta necrótico.

A patogenicidade de *P. ananatis* em milho também foi relatada em outros países, como África do Sul (GOSZCZYNSKA et al., 2007), México (PÉREZ-Y-TERRÓN et al., 2009), Argentina (ALIPPI; LÓPEZ, 2010) e Polônia (KRAWCZYK et al., 2010).

O papel dos fungos observados no centro das lesões necróticas ainda tem sido questionado. Nossa hipótese é a de que *P. ananatis* é o agente causal da doença e que diferentes espécies fúngicas podem se desenvolver nas lesões pré-estabelecidas pela bactéria. Assim, este trabalho objetivou a identificação molecular dos fungos isolados a partir de lesões necróticas de MBM, obtidas tanto em condições naturais de infecção como em lesões necróticas obtidas pela inoculação de *P. ananatis* em casa de vegetação.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Inoculação de *P. ananatis* em casa de vegetação

Plantas de milho da cultivar HS200 foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de 30 L de capacidade, com 2 plantas por vaso. Com 45 dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de  $10^8$  UFC/mL em meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) do isolado E-19 de *P. ananatis* (ROCHA et al., 2010), obtido de lesões anasarcas da MBM. A inoculação foi por aspersão até o ponto de escorrimento em folhas pré-feridas com esponja. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas. A temperatura da casa de vegetação ficou próxima de 30 °C com umidade relativa do ar em aproximadamente 70%. Como testemunha, as plantas foram pré-feridas e aspergidas apenas com meio de cultura TSB.

#### 3.3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS OBSERVADOS NA REGIÃO CENTRAL DE LESÕES NECRÓTICAS DA MANCHA BRANCA DO MILHO

Lesões da MBM em estágio avançado de desenvolvimento (estádio necrótico), apresentando na região central estruturas reprodutivas fúngicas visíveis (picnídios e pseudotécios), resultantes da inoculação artificial com o isolado E-19, foram coletadas na casa de vegetação e lesões MBM resultantes de infecções naturais, foram coletadas nos campos experimentais da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR e Embrapa Soja em Londrina, PR. No laboratório, as lesões foram lavadas com sabão neutro e permaneceram em câmara úmida por 72 h para estimular o desenvolvimento de estruturas propagativas fúngicas. Sob observação em microscópio estereoscópico, esporos resultantes da exsudação a partir das estruturas reprodutivas como picnídios e pseudotécios foram transferidos para meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Após 15 a 20 dias de incubação a 25 °C, cada isolado foi purificado por repicagem monospórica em meio de cultura BDA e incubado novamente nas mesmas condições descritas. Os isolados fúngicos foram estocados em placas de petri em meio de cultura BDA a 4 °C e repicados a cada 50 dias aproximadamente.

### 3.3.3 Extração de DNA Fúngico, Amplificação por PCR e Sequenciamento

O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo modificado de Guthrie et al. (1992). Resumidamente, 500 mg de micélio seco de cada isolado foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo, e transferido para tubos Falcon de 50 mL contendo 5 mL do tampão de extração (0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M de NaCl; 0,02 M de EDTA; 1,0% SDS; 0,1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol). Cada tubo foi agitado vigorosamente até obter uma suspensão homogênea e mantidos a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, adicionou-se igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) em cada amostra, agitou-se vigorosamente, e foi mantida por 10 min em temperatura ambiente. Restos celulares foram removidos centrifugando-se a 4 °C com 8.000 rpm por 10 min. Alíquotas de 5 mL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos Falcon de 50 mL e adicionou-se igual volume de etanol gelado em cada amostra, e inverteu-se suavemente por várias vezes para precipitar os ácidos nucleicos. Com auxílio de um gancho de vidro, os ácidos nucleicos foram enovelados e removidos, sendo lavados brevemente em etanol 70% e dissolvidos com 0,5 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) contendo 40 mg/mL de RNase H. A qualidade do DNA foi confirmada com espectrofotômetro (DO 260/280) e por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L). A concentração final de DNA foi ajustada para 25 ng/ $\mu$ L.

Aproximadamente 25 ng de DNA de cada isolado foi utilizado para amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) da região ITS do rDNA, utilizando-se os *primers* universais ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE et al., 1990). Os reagentes para amplificação foram ajustados para a concentração final de 25  $\mu$ L (2,5  $\mu$ L de Tampão IB 10X (Phoneutria, Brasil); 1  $\mu$ L de 5 mM de dNTP's, 1  $\mu$ L a 20 mM de cada *primer*, 1  $\mu$ L de 5 U/ $\mu$ L de DNA Taq Polimerase (Phoneutria, Brasil); 1  $\mu$ L de DNA; 17,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O). As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient). As reações permaneceram a 95 °C por 3 min para desnaturação, seguidos de trinta ciclos a 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, com período final de extensão de 10 min a 72 °C. Após a amplificação, aproximadamente 5  $\mu$ L das amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, a 80 volts por 45 minutos, para diagnóstico. O

tampão utilizado para preparo dos géis e na eletroforese foi o TAE 1X (0,004 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA, pH 8,0). Em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL) e visualizados sobre luz ultravioleta e as imagens digitais foram capturadas e armazenadas com câmera digital (Sony cyber-shot DSC-W110). Aproximadamente 20 µL da PCR restante de cada amostra foram purificados de gel de agarose a 0,8% com silica bead DNA gel extraction kit (Fermentas, Canadá). Na reação de sequenciamento, os reagentes foram combinados da seguinte forma, 0,25 µL de BigDye Terminator (versão 3.1, Applied Biosystems, EUA), 1 µL de *primer* (5 mM), 2 µL de tampão de diluição, e q.s.p. 10 µL de água Milli-Q. Foram utilizados 200 ng de DNA purificados. As amostras foram colocadas em termociclador com o seguinte ciclo de programa: 96 °C por 20 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min, totalizando 30 ciclos. Após, o DNA amplificado foi precipitado com 40 µL de isopropanol a 75 %, permanecendo 15 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70 % para limpeza do DNA, centrifugado por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em temperatura ambiente no escuro e ressuspendido em 10 µL de formamida. O DNA foi desnaturado por 5 min à 95 °C e resfriado em gelo até a injeção no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems). Cada isolado teve suas sequências alinhadas e editadas utilizando-se o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Os contigs foram comparados com aqueles depositados no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificação por análise do grau de similaridade entre as sequências, utilizando-se o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

#### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomas típicos da MBM apareceram 10 dias após a inoculação e as plantas foram mantidas na própria casa de vegetação até que as lesões apresentassem o centro necrótico com estruturas reprodutivas fúngicas (picnídios e/ou pseudotécios). Foram obtidos cerca de 70 isolados fúngicos das lesões necróticas resultantes das inoculações com *P. ananatis* em casa de vegetação e de lesões resultantes de infecções naturais a campo. Destes, 32 isolados fúngicos

(Tabela 1), foram identificados por sequenciamento genético a partir do produto de PCR da região ITS (Figura 3). O grau de similaridade das sequências obtidas variou de 98-100%, com relação às sequências depositadas no GenBank. Dos fungos identificados, *Epicoccum nigrum* foi isolado com maior frequência, 68,75%, nos três locais do experimento (campo experimental da UEL, campo experimental da Embrapa Soja e em lesões induzidas por *P. ananatis* em casa de vegetação). Este fungo é um saprófita cosmopolita que habita tanto ambientes naturais como transformados, sendo que já foi isolado do próprio milho e de restos vegetais, solo, animais, frutas e tecidos (FARR; ROSSMAN, 2012). Esse fungo apresenta como sinanamorfo *Phoma epicoccina* (PUNITHALINGAM; TULLOCH; LEACH, 1972).

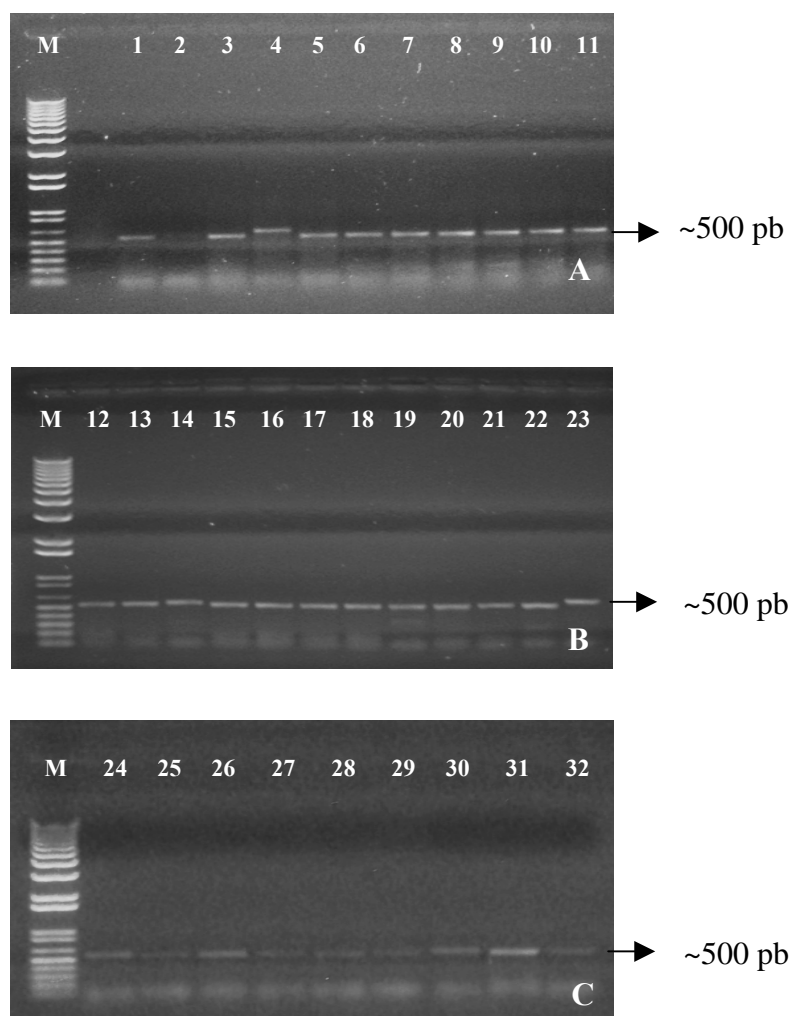
**Tabela 1** – Identificação molecular por sequenciamento genético da região ITS do rDNA de 32 isolados fúngicos obtidos de lesões necróticas de mancha branca do milho.

ESPÉCIE	LOCAL DE ORIGEM DO ISOLADO*	NÚMERO DO ISOLADO
<i>Epicoccum nigrum</i>	UEL **/CV/ Embrapa Soja**	1-2-3-6-7-8-9-10-11-12- 13-15-16-17-18-21-25- 26-27-29-31-32
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	UEL	4
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	UEL	5
<i>Alternaria alternata</i>	CV e UEL	14 e 24
<i>Fusarium equiseti</i>	Embrapa Soja	19
<i>Gibberella moniliformis</i>	Embrapa Soja	20
<i>Phoma sorghina</i>	Embrapa Soja	22
<i>Curvularia</i> sp.	Embrapa Soja	23
<i>Phoma</i> sp.	CV	28
<i>Alternaria ricini</i>	CV	30

\*CV = Casa de Vegetação. Os isolados fúngicos obtidos a partir de lesões preestabelecidas pela bactéria *P. ananatis* em casa de vegetação;

\*\*UEL e Embrapa Soja = Campos experimentais da Universidade Estadual de Londrina e Embrapa Soja, Londrina/PR, respectivamente. Os isolados fúngicos foram obtidos de lesões resultantes de infecções naturais nestes campos experimentais.

**Figura 3** – Imagens de géis de agarose a 1% para visualização do produto de PCR de 32 isolados fúngicos, com os *primers* ITS1/ITS4. Alíquotas de 3 µL de DNA amplificado foram aplicados no gel. M – Marcador molecular de 1 Kb plus DNA ladder, Invitrogen, EUA).



O fungo *Phoma* sp. foi identificado em lesões de MBM, causadas por inoculação natural em campo na Embrapa Soja, Londrina, PR. Amaral et al. (2004) isolaram este fungo em lesões da MBM em uma frequência de 70% das lesões. Os mesmos autores em trabalho posterior (Amaral et al., 2005) descreveram o envolvimento de outras três espécies fúngicas, *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp, com a doença MBM, indicando a ocorrência de um complexo fúngico responsável pelo desenvolvimento dos sintomas, de forma que dependendo do local uma ou outra espécie seria a responsável pelos sintomas. No presente trabalho, *Phoma* sp. também foi identificada em lesões em casa de vegetação, causadas pela inoculação apenas da bactéria *P. ananatis*. Isto reforça a hipótese de

que a bactéria *P. ananatis* é o agente causal da doença e que vários fungos, incluindo espécies de *Phoma*, colonizam lesões preestabelecidas pela bactéria.

*Sporormiella* sp. e *Phaeosphaeria maydis* não foram identificados em nenhum dos locais amostrados. Porém, a forma anamórfica de *P. maydis*, *Phoma* sp., foi encontrada tanto em ambiente natural de infestação, como em lesões causadas apenas pela inoculação de *P. ananatis* em casa de vegetação.

Paccola-Meirelles et al. (1998) caracterizaram 1284 lesões em 30 híbridos superprecoces e 1437 lesões em 49 híbridos precoces quanto a presença de picnídios e de pseudotécios em lesões necróticas da MBM. Nos híbridos superprecoces, em 8,8% das lesões foi observado somente a presença de picnídios, em 7,3% somente pseudotécios e em 2,0% ambas as estruturas. Na maioria das lesões analisadas, 79,3%, não foram detectadas estruturas reprodutivas fúngicas. Resultados semelhantes foram encontrados na caracterização das lesões dos híbridos precoces, onde 14% das lesões apresentaram somente picnídios; 13,6% somente pseudotécios e 4% produziram ambas as estruturas; em 68,5% das lesões não foram observadas estruturas reprodutivas fúngicas. Essa alta frequência de lesões destituídas de estruturas fúngicas, contribuiu para aumentar a possibilidade de não ser o fungo o agente causal da doença. O fungo *P. maydis* foi isolado em baixa frequência e várias outras espécies fúngicas foram isoladas porém não identificadas. A baixa frequência de isolamento de *P. maydis*, 7% das lesões avaliadas, também foi documentada por Amaral et al. (2004) a partir de folhas doentes coletadas no Rio Grande do Sul.

Com isto, os resultados sugerem que as diferentes espécies de fungos identificadas nas lesões necróticas tanto a campo bem como aquelas lesões resultantes da inoculação da bactéria *P. ananatis*, estão associados às lesões, porém comportam-se como oportunistas, sendo a *P. ananatis* a causa inicial para o estabelecimento da doença.

## REFERÊNCIAS

- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, v.94, p. 487, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410, 1990.
- AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, v.53, p. 259, 2004.
- AMARAL, A. L.; DAL SOGLIO, F. K.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* Leaf Spot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, v.8, p. 44-49, 2005.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul: APS Press, 1998, 218 p.
- BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 1-6, 2008.
- CARSON, M. L. Vulnerability of U.S. maize germ plasm to *Phaeosphaeria* leaf spot. **Plant Disease**, v.83, p. 462-464, 1999.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Circular técnica 83).
- FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, v.56, p. 39, 1994.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, Systematic Mycology and Laboratory, ARS, USDA**. Disponível em: < <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- GOSZCZYNSKA, T.; BOTHA, W. J.; VENTER, S. N.; COUTINHO, T. A. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. **Plant Disease**, v.91, p. 711-718, 2007.
- GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers – a system for identifying and differentiating pathotypes of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.82, p. 832-835, 1992.
- HENNINGS, P. V. Fungi S. Paulenses II. Puttermans collect: **Hedwigia**, v.41, p. 295-311, 1902.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, v.92, p. 807-811, 2010.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia Uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. **Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p. 162-173, 1993.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; CERVELATTI, E. P.; MAKI, C. S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; FERREIRA, A. S.; Caracterização morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em híbridos de milho e avaliação da incidência do estágio sexuado e assexuado do patógeno. In: **XXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Recife, 1998, CD-ROM.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananas* isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p. 578-590, 2002.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J. A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. **Australasian Plant Disease Notes**, v.4, p. 96-99, 2009.

PEROMBELON, M. C. M. The genus *Erwinia*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes**. Springer-Verlag. 1992. p. 2899-2921.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak & Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, v.23, p. 1006-1009, 1999.

PUNITHALINGAM, E.; TULLOCH, M.; LEACH, C. M. *Phoma epicoccina* sp. nov. on *Dactylis glomerata*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.59, p. 341-345, 1972.

RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. A *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathology Bulletin**, v.3, p. 8-10, 1966.

ROCHA, K. R.; ANDRADE-NOBREGA, G. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Caracterização comparativa entre isolados de *Pantoea ananatis* oriundos de lesões de capim-colchão com aqueles de lesões de Mancha Branca do Milho. In: **28º Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia, 2010, p. 701-708, CD-ROM.

SERRANO, F. B. Bacterial fruitlet Brown-rot of pineapple in the Philippines. **Philippine Journal of Science**, v.36, p. 271-305, 1928.

TRÜPER, H. G.; DE' CLARI, L. Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 908-909, 1997.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. eds. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Academic Press. New York: 1990. p. 315-322.

**4 ARTIGO B**

**MONITORAMENTO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DA  
MANCHA BRANCA DO MILHO**

## MONITORAMENTO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES DA MANCHA BRANCA DO MILHO

### 4.1 Resumo e Abstract

#### Resumo

Diversas doenças foliares podem acometer o milho, porém uma das mais importantes é a mancha branca do milho (MBM), devido a ampla distribuição no território nacional e perdas que podem chegar a 60% da produção. A doença se estabeleceu no Brasil na década de 80, mas ainda existem controvérsias quanto à sua etiologia. O ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (forma imperfeita *Phyllosticta* sp. sinonímia *Phoma* sp.) foi descrito inicialmente como sendo o agente etiológico da doença. Posteriormente, este agente foi questionado por outros autores que descreveram a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da doença. Outro grupo atribuiu a existência de diferentes agentes fúngicos responsáveis pelos sintomas, como a *Phyllosticta* sp., o *Phoma sorghina* e a *Sporormiella* sp. que, dependendo do local, um ou outro agente poderia iniciar o processo infeccioso. Este trabalho teve por objetivo monitorar, por meio de PCR, os diferentes estádios de desenvolvimento das lesões da MBM a fim de identificar os microrganismos presentes. Lesões foram coletadas a campo, originados por infestação natural, e classificadas em quatro diferentes estádios. Como controle negativo, foi utilizado tecido assintomático da folha de milho. Foi utilizado o protocolo de extração de DNA modificado de Wilson (1997), com as amostras tratadas previamente com polyvinylpyrrolidona. Para a técnica molecular da PCR foram utilizados os *primers* universais fúngicos (ITS1/ITS4) e para a detecção de *P. ananatis*, os *primers* espécie-específicos ANAF/ANAR. O tratamento prévio das amostras com tampão SPC (succinato citrato fosfato, acrescido de ácido ascórbico e polyvinylpyrrolidona), seguidas de extração de DNA pelo protocolo de Wilson (1997), mostrou-se satisfatório com relação a quantidade e qualidade do DNA extraído diretamente das lesões. Constatou-se que a bactéria *P. ananatis* está presente em todos os estádios de desenvolvimento da doença MBM. Após desinfestação superficial das lesões, ampliações com os *primers* universais para fungos foram mais nítidas nos estádios mais avançados da doença, quando o tecido vegetal apresenta-se necrótico. Os amplicons de aproximadamente 500 pb com os *primers* ITS1/ITS4 foram sequenciados e os contigs apresentaram maior similaridade com *Pleosporales* sp. Estes resultados fornecem maiores subsídios para inferir que o agente causal da doença é a bactéria *P. ananatis* e que fungos podem estar presentes nas lesões necróticas preestabelecidas pela bactéria.

**Palavras – chave:** *Pantoea ananatis*. *Phaeosphaeria maydis*. Mancha de *Phaeosphaeria*.

## MONITORING THE LESIONS DEVELOPMENT STAGES OF MAIZE WHITE SPOT

### Abstract

Many leaf diseases can attack maize, but one of the most important is the maize white spot (MWS), due to its large distribution in Brazilian national territory and to the losses, which can achieve up to 60% of the gross production. The disease has established in Brazil in the 80's decade, but yet its etiology is put in doubt. The aschomicetus *Phaeosphaeria maydis* (imperfect form *Phyllosticta* sp. Synonymy *Phoma* sp.) has initially been described as the disease etiological agente. Later this agent was put in doubt by other researchers which described the bacteria *Pantoea ananatis* as its causal agent. Another reserch group attributed to different fungi species to be the causal agent of the disease, the *Phyllosticta* sp., the *Phoma sorghina* and the *Sporormiella* sp., which, depending on the infestation localization within the territory, the disease could be caused by on or another. This research had as goal monitor, using PCR technique, the different stages of development of the MWS disease, to have means to detect microorganisms there present. Injuries have been collected at field conditions, caused by natural infestation, and classified into four different stages. As a negative control, the asymptomatic maize leaf tissue was used. For DNA extraction, the Wilson (1997) modified protocol was used, with the samples previously treated with PVPP. For the molecular technique of PCR, the universal fungi primers ITS1/ITS4 were used, and for *P. ananatis* detection, the ANAF/ANAR primers. The previou treatment of the samples with SPC buffer (succinate phosphate citrate, added with ascorbic acid and PVPP), followed by the DNA extraction by Wilson (1997) protocol, had show satisfactory results for both the quantity and quality of the extracted DNA from the injuries. It was also verified that the *P. ananatis* bacteria is present in every MWS disease development stage. After the injuries were superficially disinfested, the amplification with universal fungi primers were more clear in the most developed stages of the disease, when the tissue is necrotic. The amplicons of nearly 500 pb with the ITS1/ITS4 primers were sequenced and the contigs had show better similarity with *Pleosporales* sp. These results provide better subsidy to infer that the causel agent of the disease it the bacteria *P. ananatis* and that the fungi may appear at the necrotic injuries pre-established by the bacterium.

**Key – words:** *Pantoea ananatis*. *Phaeosphaeria maydis*. *Phaeosphaeria* spot.

### 4.2 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é acometido por diversas doenças que podem incidir em toda parte aérea da planta, como folhas, colmos e espigas. Uma das principais doenças foliares que incidem na cultura é a mancha branca do milho (MBM), doença que apresenta ampla distribuição no território nacional e pode causar perdas superiores a 60% da produção (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997).

Os sintomas iniciais da doença MBM caracterizam-se por lesões foliares oblongas de coloração verde escuro em relação a cor do limbo foliar, com aspecto de encharcadas, também denominadas de anasarcas (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). Com o progresso da doença, as lesões adquirem coloração acinzentada até tornarem-se necróticas de coloração palha. Neste estágio de desenvolvimento, estruturas fúngicas como picnídios e pseudotécios, podem ser visualizados no interior das lesões.

A etiologia dessa doença é controversa entre a comunidade científica. Grupos de pesquisadores defendem a idéia de que diferentes fungos estão envolvidos com a etiologia da doença, como o ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (FANTIN, 1994), *Phoma sorghina* (AMARAL et al., 2004), e até mesmo um complexo fúngico envolvendo *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp. (AMARAL et al., 2005), entre outros. Por outro lado, a bactéria *Pantoea ananatis* também foi descrita como sendo o agente causal da MBM (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

As estruturas reprodutivas fúngicas (picnídios e pseudotécios), presentes no centro das lesões necróticas da MBM, foram atribuídas por Fantin (1994) como sendo as formas anamórficas e teleomórficas do fungo *Phaeosphaeria maydis*. No entanto, estas estruturas foram analisadas e descritas por Cervelatti et al. (2002) como pertencentes a fungos de espécies diferentes e não aos estados anamórficos e teleomórficos de um mesmo agente. Os picnídios foram descritos como pertencentes à *Phoma tropica*, um fungo oportunista que geralmente ocorre em lesões preestabelecidas por outros agentes.

Para fornecer maior subsídio quanto à etiologia da doença MBM, este trabalho teve por objetivo monitorar, por meio da técnica molecular da PCR, os diferentes estádios de desenvolvimento das lesões da MBM a fim de identificar os microrganismos ali presentes.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

**Caracterização das lesões:** as lesões de MBM foram obtidas de amostras coletadas na Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, e na Estação Experimental do IAPAR, Londrina, PR, e classificadas em 4 estádios distintos, de acordo com classificação realizada por Paccola-Meirelles et

al. (2001). O estágio 1 é caracterizado por lesões de coloração verde escuro quando comparado ao limbo foliar que o delimita, também é conhecido por lesão anasarca, pois apresenta o aspecto de encharcamento. No estágio 2, a lesão adquire uma coloração acinzentada, em que já é possível notar os bordos bem delimitados. O estágio 3 é quando o tecido vegetal está necrótico, ou seja, apresentando coloração palha, porém sem estruturas fúngicas no centro da lesão. O estágio 4 é a última etapa de desenvolvimento da doença e o tecido da lesão está necrótico e com estruturas reprodutivas fúngicas como picnídios e pseudotécios ocupando o centro da lesão. Segmentos extraído de tecido assintomático, porém de plantas com a doença, foram utilizados como controle negativo, coletados das mesmas folhas em que foram removidas as lesões (Figura 4).

**Figura 4** – Sintomas da doença mancha branca do milho classificados de acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001). A: Lesões no estágio 1 de desenvolvimento, as lesões anasarcas. B: Lesões no estágio 2, lesões acinzentadas. C: Lesões no estágio 3, tecido necrótico de coloração palha, sem estruturas fúngicas. D: Lesões no estágio 4, tecido necrótico, de coloração palha, com estruturas fúngicas no centro das lesões. E: Tecido assintomático, controle negativo.



Na época de coleta, as plantas estavam no estágio de pendoamento, classificação fenológica Vt (MAGALHÃES; DURÃES, 2010).

**Desinfestação superficial das lesões MBM:** As folhas contendo as lesões da MBM foram coletadas e lavadas com sabão neutro. Após secas, as lesões foram destacadas com auxílio de escalpelo e classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento da doença, como mostra a Figura 4. Para facilitar a diferenciação do estágio 3 do 4 (sem/com estruturas fúngicas, respectivamente), cada lesão foi observada com lupa de bolso que permite aumento de até 100 vezes. Após classificadas, as lesões foram desinfestadas superficialmente seguindo os mesmos procedimentos de Paccola-Meirelles et al. (2001), que consiste em álcool 70% (1 min), cloramina-T a 2% (4 min), álcool 70% (30 seg), seguidas de seis enxágues em água estéril (30 seg cada).

**Extração de DNA total das lesões:** Pesou-se aproximadamente 150 mg de lesões em cada estágio de desenvolvimento. O experimento foi realizado em duplicata. As amostras foram tratadas com 6 mL de tampão de succinato citrato fosfato (SPC) (adicionado de ácido ascórbico 0,1 M e 5 % de polyvinylpolypirrolidona, PVPP). As amostras foram maceradas e filtradas com gaze antes de permanecerem à 0 °C. Após estas etapas, prosseguiu-se com o protocolo para extração de DNA genômico bacteriano proposto por Wilson (1997).

**PCR e sequenciamento fúngico para identificação:** O DNA total extraído dos diferentes estágios da MBM foram submetidos a amplificação com os *primers* universais para fungos do espaço transcrito interno do rDNA (região ITS), ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') e ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (WHITE et al., 1990), com os quais são esperados fragmentos de aproximadamente 500 pb. Para amplificação do DNA de *P. ananatis* foram utilizados os *primers* específicos ANAF/ANAR (FIGUEIREDO E PACCOLA-MEIRELLES, dados em publicação), que resulta em fragmentos com 360 ou 388 pb. Para reação da PCR, os reagentes foram combinados com 2,5 µL de tampão de PCR 10X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl) (Invitrogen), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen), 2,5 µL de dNTP MIX (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (5 mM) e 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 1 µL de DNA e volume final completado com água

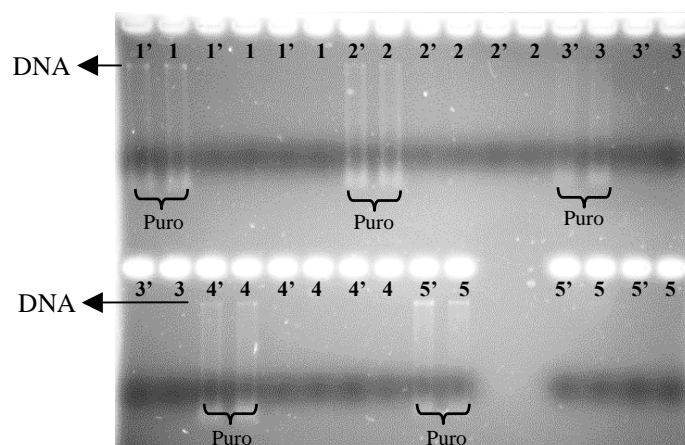
Milli-Q para 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador TX 96 (Amplitherm) com programa ajustado para 3 min a 95 °C, seguido de 29 ciclos de 95 °C por 30 seg, temperatura de anelamento de 50 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg e extensão final de 10 min a 72 °C. O programa de amplificação com os *primers* bacterianos diferiu apenas por utilizar temperatura de anelamento de 58 °C. O controle negativo para a PCR foi realizado com a substituição do DNA por água Milli-Q. Como controle positivo para as reações da PCR foram utilizados DNA de *Colletotrichum gloeosporioides* (isolado I-12 pertencente a coleção de fungos fitopatogênicos do IAPAR) para os *primers* universais fúngicos e DNA de *P. ananatis* (isolado WT-2 da coleção de bactérias fitopatogênicas do laboratório de genética de microrganismos, CCB, UEL) para os *primers* ANAF/ANAR. O DNA amplificado foi analisado por eletroforese horizontal, em gel de agarose ultra pura a 1% em tampão TAE 1X (0,004 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA, pH 8,0) (80 V). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL) e visualizados sob luz ultravioleta; as imagens digitais foram capturadas e armazenadas com sistema de fotodocumentador L.Pix Image (Loccus Biotecnologia). Considerando-se que para detecção dos fungos foram utilizados *primers* universais, a identificação da espécie foi realizada por sequenciamento genético diretamente do produto da PCR. Na reação de sequenciamento, os reagentes foram combinados da seguinte forma, 0,50 µL de BigDye Terminator (versão 3.1, Applied Biosystems, EUA), 2 µL de *primer* (5 mM), 4 µL de tampão de diluição, e q.s.p. 20 µL de água Milli-Q. As amostras foram colocadas em termociclador com o seguinte ciclo de programa: 96 °C por 20 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min, totalizando 30 ciclos. Após, o DNA amplificado foi precipitado com 80 µL de isopropanol a 75 %, permanecendo 15 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70 % para limpeza do DNA, centrifugado por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em temperatura ambiente no escuro e ressuscitado em 10 µL de formamida. O DNA foi desnaturado por 5 min à 95 °C e resfriado em gelo até a injeção no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems). Cada isolado teve suas sequências alinhadas e editadas utilizando-se o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Os contigs foram comparados com aqueles depositados no GenBank (<http://>

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para identificação por análise do grau de similaridade entre as sequencias, utilizando-se o programa BLASTn.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento prévio das amostras de lesões MBM com o tampão de succinato citrato fosfato (SPC) (acrescido de ácido ascórbico 0,1 M e 5 % de polyvinylpolypirrolidona, PVPP), seguido do protocolo de extração de DNA de Wilson (1997), permitiu a obtenção de DNA relativamente íntegro, livre da ação de compostos fenólicos, encontrados em maior quantidade nos estádios mais avançados da lesão, ou seja, quando o tecido vegetal encontra-se necrótico. A qualidade do DNA extraído foi aferida por eletroforese horizontal em gel de agarose, onde também foram avaliadas diluições de 10 e 50 vezes para cada estágio de desenvolvimento das lesões da MBM (Figura 5). Levando-se em consideração a quantidade de material vegetal macerado para cada estágio (150 mg), a extração que não sofreu diluição foi a que apresentou maior quantidade de DNA, sendo estas as amostras utilizadas nas PCR posteriores.

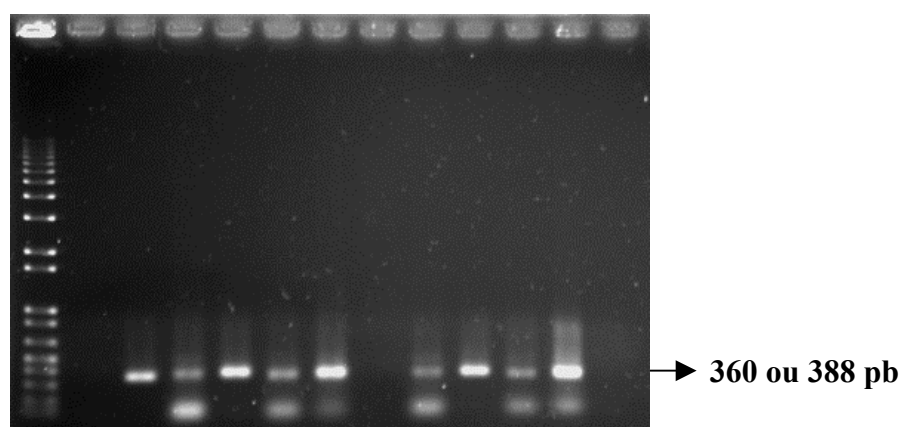
**Figura 5** – Gel de agarose a 1 % para diagnóstico da qualidade e quantidade de DNA extraído a partir dos diferentes estádios de desenvolvimento das lesões de mancha branca do milho segundo o protocolo de Wilson (1997). Todos os diferentes estádios das lesões mancha branca do milho estão em duplicata. 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estrutura fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. As diluições da solução de DNA aplicado no gel segue sempre a ordem de puro (sem diluição), diluição 10X e diluição 50X.



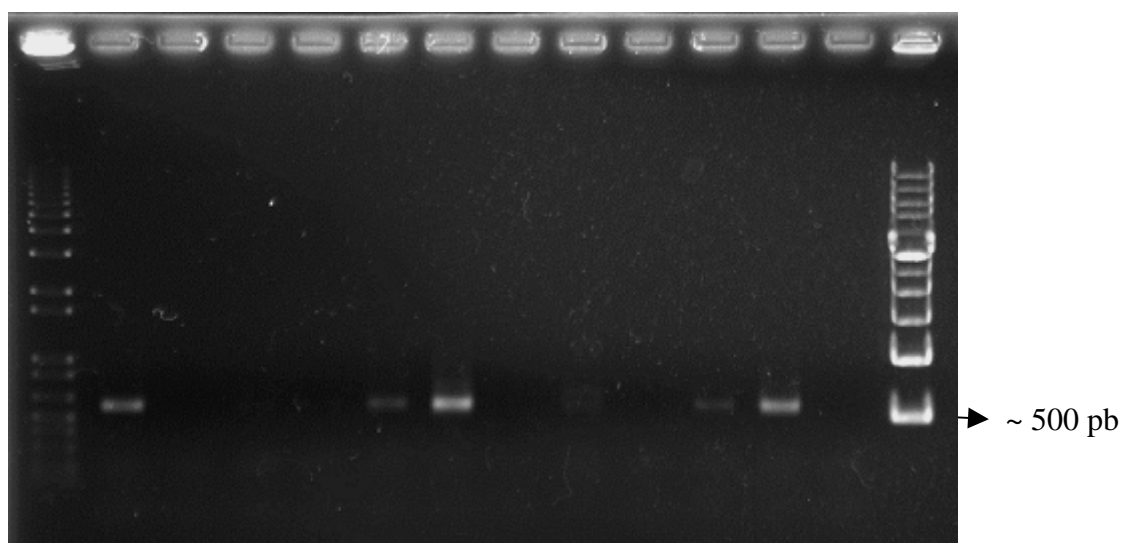
Como mostrado na Figura 6, um fragmento de 360 ou 388 pb referente ao par de *primers* ANAF/ANAR, espécie-específico para a bactéria *P. ananatis*, resultou em amplificação positiva em todos os estádios de lesões da MBM, indicando a presença da bactéria *P. ananatis* no interior das mesmas desde o estágio de anasarca. Por outro lado, os resultados da PCR utilizando os *primers* ITS1/ITS4, universais para fungos (Figura 7), mostraram amplificação positiva somente nos estágios 3 e 4, demonstrando a presença de DNA fúngico nos estádios mais avançados de desenvolvimento das lesões, quando tem início o processo de necrose. Desta forma, os fungos se instalam nas lesões preestabelecidas pela bactéria.

Resultados similares foram obtidos por Bomfeti et al. (2008), porém os autores detectaram a presença de bactéria apenas no estágio anasarca da lesão MBM.

**Figura 6** – Gel de agarose a 1 % com produto da PCR com os *primers* ANAF/ANAR específicos para *P. ananatis*, utilizando DNA extraído de lesões da mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento. 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado WT-2 de *P. ananatis*). De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos.



**Figura 7** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR do DNA total extraído dos diferentes estádios de desenvolvimento das lesões da mancha branca do milho com os *primers* ITS1/ITS4, universais para fungos. M: marcador molecular de 1 Kb plus DNA ladder Invitrogen, EUA; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); -: controle negativo da reação de PCR; 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis no centro da lesão) e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos; M': marcador molecular 1Kb da AMRESCO, EUA.



Na Figura 6 podem ser observadas variações de tamanhos entre os diferentes produtos de amplificação de PCR com os *primers* ANAF/ANAR, espécie-específicos para *P. ananatis* (FIGUEIREDO E PACCOLA-MEIRELLES, dados em publicação). Isto pode ser explicado quando submetemos os *primers* ANAF e ANAR para análise com o programa PrimerBlast, disponível no site [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Os resultados da análise revelam dois fatos importantes. Primeiro, no Filo Proteobactéria, o par de *primers* reconhece uma sequência de DNA específica para *P. ananatis*. Segundo, duas linhagens de *P. ananatis*, cujos genomas já foram completamente sequenciados, apresentam variações no comprimento da sequência reconhecida pelos *primers* ANAF e ANAR. Na linhagem LMG 20103 (DE MAAYER et al., 2010) (código de acesso no NCBI: NC\_013956) a sequência flanqueada pelos *primers* ANAF e ANAR apresenta 360 pb, enquanto na linhagem AJ 13355 (código de acesso no NCBI: AP012032) essa mesma região do DNA apresenta 388 pb. Portanto, os fragmentos resultantes da

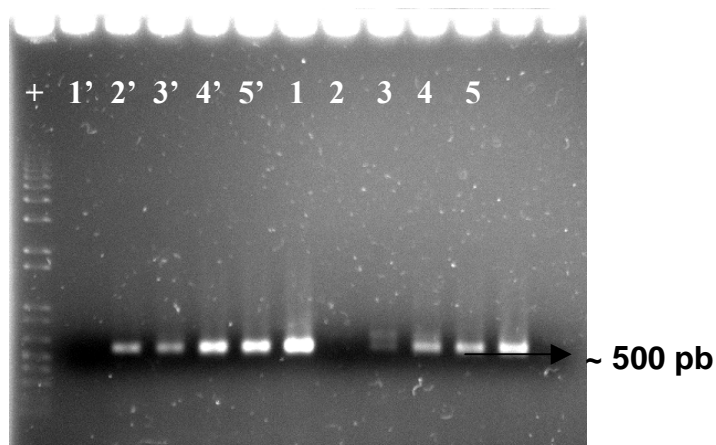
PCR com os *primers* espécie-específicos ANAF/ANAR, podem apresentar 360 pb ou 388 pb. De fato, o sequenciamento de aproximadamente 60 amplicons resultantes da reação de PCR com os *primers* ANAF e ANAR mostrou que, em isolados brasileiros de *P. ananatis*, essa região do DNA apresenta 361 pb e 389 pb (FIGUEIREDO E PACCOLA-MEIRELLES, dados em publicação).

Foi realizado o sequenciamento genético dos amplicons para identificar a espécie fúngica por meio do grau de similaridade com as sequências depositadas no GenBank utilizando o programa Blastn. O sequenciamento genético dos produtos da PCR apresentados na Figura 7, permitiu identificar fungos da ordem *Pleosporales*, com grau de similaridade de 95% com as sequências depositadas no GenBank. Esta ordem abriga uma grande quantidade de espécies de fungos saprófitas, e também alguns endofíticos e epifíticos (ZHANG et al., 2009). O sequenciamento permitiu evidenciar um grau de similaridade oscilando de 87-92% com as espécies *Phoma* sp. e *Phaeosphaeria* sp., ambas pertencentes à ordem *Pleosporales*.

Esses fungos aproveitam as lesões induzidas pela bactéria para se estabelecerem nas mesmas. Uma vez estabelecidos, os fungos se desenvolvem e esporulam, de forma que suas estruturas reprodutivas possam ser visualizadas no centro de lesões necróticas, como já comprovado anteriormente.

Foi realizada nova extração de DNA seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente, porém utilizando as lesões sem que estas tenham sido desinfestadas superficialmente. Nestas análises, como esperado, os resultados com os amplicons espécie-específicos, ANAF/ANAR, foram semelhantes aos anteriores quando se utilizou lesões desinfestadas. Porém a amplificação utilizando os *primers* universais para fungos, o ITS1/ITS4, os resultados foram diferentes (Figura 8). Amplificação de DNA fúngico ocorreu em todos os estádios de desenvolvimento das lesões. Estes resultados demonstram que nos estágios 1 e 2, estes fungos encontram-se superficialmente sobre as lesões estabelecidas pela bactéria de forma que o processo de desinfestação, promoveu a remoção dos mesmos. No entanto em lesões necróticas de estágio 3 e 4, estes fungos já conseguiram penetrar e fixar nas lesões, de forma que, mesmo com o processo de desinfestação superficial, não promove a sua remoção.

**Figura 8** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR do DNA amplificado com os *primers* universais fúngicos (ITS1/ITS4) o qual foi extraído de lesões da mancha branca do milho em diferentes estádios de desenvolvimento, porém sem que estas tenham passado pelo processo de desinfecção. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); 1: Estádio 1 (lesões anasarcas); 2: Estádio 2 (lesões acinzentadas); 3: Estádio 3 (lesões necróticas sem estruturas fúngicas); 4: Estádio 4 (lesões necróticas com estruturas fúngicas visíveis centralmente) e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos.



Similar aos resultados obtidos anteriormente, o sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados permitiu determinar que os fungos presentes nas lesões não desinfestadas também pertencem à ordem *Pleosporales*, com grau de similaridade com *Phoma* e *Phaeosphaeria* oscilando de 87-92%.

Os resultados aqui apresentados permitiram concluir que a bactéria *P. ananatis* encontra-se presente em todos os estádios da lesão da MBM. Fungos, principalmente da ordem *Pleosporales*, podem se instalar em lesões em estádios mais avançados, apresentando neste caso, um comportamento oportunista.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, v.53, p. 259, 2004.
- AMARAL, A. L.; DAL SOGLIO, F. K.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* Leaf Spot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, v.8, p. 44-49, 2005.
- BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p. 1-6, 2008.
- CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p. 30-37, 2002.
- DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; VENTER, S.N.; TOTH, I.K.; BIRCH, P.R.J.; JOUBERT, F.; COUTINHO, T.A. The genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. **Journal of Bacteriology**, v.192, p. 2936-2937, 2010.
- FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, v.56, p. 39, 1994.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais Doenças na Cultura do Milho**. Sete lagoas, MG. Brasil: Embrapa-Circular Técnica 26, 1997, 80p.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; **Cultivo do milho**, 6 ed, versão eletrônica, 2010. Disponível em:  
<[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/ecofisiologia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/ecofisiologia.htm)>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, p. 275-279, 2001.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. eds. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Academic Press. New York: 1990. p. 315-322.
- WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, cap. 2.4.1-2.4.5, 1997.

ZHANG, Y.; SCHOCH, C. L.; FOURNIER, J.; CROUS, P. W.; DE GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J. H. C.; HIRAYAMA, K.; TANAKA, K.; POINTING, S. B.; HYDE, K. D. Multi-locus phylogeny of the Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. **Studies in Mycology**, v.64, p. 85-102, 2009.

**5 ARTIGO C**

**DIGITARIA HORIZONTALIS E DIGITARIA INSULARIS HOSPEDEIROS  
ALTERNATIVOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA MANCHA  
BRANCA DO MILHO**

## DIGITARIA HORIZONTALIS E DIGITARIA INSULARIS HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO

### 5.1 RESUMO E ABSTRACT

#### Resumo

Lesões foliares morfológicamente semelhantes às lesões da mancha branca do milho (MBM) foram observadas a campo nas plantas daninhas *Digitaria horizontalis* e *Digitaria insularis*. Das lesões de *D. insularis* foram isoladas bactérias com características semelhantes ao do agente causal da MBM, *Pantoea ananatis*. Estes isolados foram empregados em inoculações cruzadas com plantas de milho em ambiente controlado. O objetivo deste trabalho foi o de determinar a condição dessas duas espécies de gramíneas como hospedeiros alternativos de *P. ananatis*. Foram utilizados os isolados WT-2 (*P. ananatis* controle positivo); Pa2DH isolado de lesões foliares da MBM e Pa1DI isolado de lesões foliares de *D. insularis*. Os reisolados empregados em sucessivas inoculações permaneceram com as mesmas nomenclaturas. Sintomas da doença foram observados em casa de vegetação dez e trinta dias após as inoculações em plantas de *Digitaria* spp e milho, respectivamente. Os isolados foram identificados por comparação do grau de similaridade das sequências parciais do gene 16S rDNA e dos amplicons com os *primers* espécie-específicos ANAF/ANAR, para *P. ananatis* de milho e sorgo, com as sequências depositadas no GenBank. Os resultados permitiram confirmar que *Digitaria horizontalis* e *Digitaria insularis* são hospedeiros alternativos de *P. ananatis*.

**Palavras – chave:** Zea mays. Bactéria. Mancha de Phaeosphaeria e planta daninha.

## DIGITARIA HORIZONTALIS AND DIGITARIA INSULARIS, ALTERNATIVE HOSTS FOR PANTOEA ANANATIS, THE CAUSAL AGENT OF MAIZE WHITE SPOT DISEASE

#### Abstract

Leaf lesions, similar to maize white spot (MWS) were observed in the weeds *Digitaria horizontalis* and *Digitaria insularis*. Bacterium similar to *Pantoea ananatis*, the causal agente of MWS were, isolated from *D. insularis*. The isolates were used in cross-inoculations in maize plants in greenhouse condiction. The goal of this research was to confirm these two weed species as alternative hosts for *P. ananatis*. The isolates selected for this purpose were: WT-2 (*P. ananatis* positive control); Pa2DH isolated from leaves injuries of maize plants with MWS in the conditions, and Pa1DI, isolated from leaves *D. insularis* with MWS-like injures. The reisolates were used in successive inoculations and symptoms of the disease were observed in greenhouse between 10 to 30 days after the bacterial inoculation of *Digitaria* and maize plants, respectively. The isolates were identified by nucleotide similarity comparison of the partial

sequences of the 16S rDNA gene and the amplicons with the ANAF/ANAR species-specific primers for *P. ananatis*. With the DNA sequences deposited in GenBank. The results showed that *Digitaria horizontalis* and *Digitaria insularis* are alternative hosts for *P. ananatis*.

**Key – words:** Zea mays. Bacteria. Phaeosphaeria spot and weed plant.

## 5.2 INTRODUÇÃO

A doença mancha branca do milho (MBM) encontra-se distribuída em quase todas as regiões produtoras de milho do Brasil. Perdas de produtividade provocadas pela MBM podem ser superiores a 60% em determinadas condições (PINTO, 1999; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006). Em condições favoráveis, a doença causa sérios danos ao processo de enchimento de grãos, levando a seca prematura da planta, com redução do ciclo e quedas acentuadas no tamanho e peso dos grãos.

O agente causal da MBM é a *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) (sinônimo *Erwinia ananas*), é uma bactéria gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, formadora de colônias com crescimento mucoso e de coloração amarelo brilhante quando em meio de cultura. Os sintomas iniciais da MBM caracterizam-se pela formação de lesões foliares verde escuro, com aspecto encharcado do tipo anasarca, tornando-se acinzentadas e posteriormente necróticas de coloração palha (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), podendo ocorrer coalescência de lesões quando em ocorrências mais severas (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006). A bactéria sobrevive epifiticamente sobre as folhas do milho (WYSMIERSKI; REAL; PACCOLA-MEIRELLES, 2006), podendo ocorrer a entrada da bactéria nos tecidos foliares por aberturas naturais como estômatos, ou ainda em decorrência de ferimentos foliares originados pela ação abrasiva das partículas do solo, hábitos alimentares dos insetos e até mesmo o atrito planta-planta provocado pela ação de ventos. Bomfeti et al. (2008) demonstraram por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica a presença da bactéria nos espaços intercelulares do tecido foliar.

*P. ananatis* já foi relatada causando sintomas tanto em plantas monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Culturas como abacaxi, melão doce, melão, arroz, cebola, sorgo sudanense, eucalipto e tomate foram descritas como hospedeiras de *P. ananatis* (SERRANO, 1928; WELLS et al., 1987; BRUTON et al.,

1991; WATANABE; KAWAKITA; SATO, 1996; GITAITIS; GAY, 1997; AZAD; HOLMES; COOKSEY, 2000; COUTINHO et al., 2002; STALL; ALEXANDER; HALL, 1969).

No ano de 2004, o pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Walter F. Meirelles observou, em áreas de plantio de milho na região de Londrina, PR, uma alta incidência de lesões foliares em *D. horizontalis*, uma planta daninha frequentemente encontrada em lavouras de milho (comunicação pessoal). O que chamou a atenção do pesquisador foi a semelhança morfológica dessas lesões foliares com aquelas da MBM (Figura 9A). Esta incidência foi posteriormente observada pelo mesmo pesquisador em Ponta Grossa, PR e em Passo Fundo, RS, porém com intensidade variada (comunicação pessoal). O material foi então coletado e dele isolado uma bactéria com características semelhantes à *P. ananatis*. A partir de então, vários isolados semelhantes à *P. ananatis* tem sido obtidos de lesões foliares de *D. horizontalis* (ROCHA; PACCOLA-MEIRELLES, 2008). Recentemente, folhas de *D. horizontalis* todas com lesões semelhantes às descritas acima, foram coletadas em plantios de milho na região de Campo Mourão, PR (Meirelles, comunicação pessoal). Essas lesões mostraram uma variabilidade morfológica semelhante àquela observada por Paccola-Meirelles et al. (2002), em diferentes genótipos de milho com MBM. A *D. horizontalis* é considerada uma das plantas daninhas mais comuns nas lavouras de milho, quando em sucessão com o próprio milho safrinha ou outras culturas em plantio direto (PASQUALETTO et al., 2001), mostrando-se também predominante nos campos experimentais de milho como em Sete Lagoas, MG, Brasil (OLIVEIRA et al., 2001).

**Figura 9** – Folhas de gramíneas do gênero *Digitaria* naturalmente infectadas, mostrando lesões semelhantes às da mancha branca do milho. (A: *Digitaria horizontalis* e B: *Digitaria insularis*, coletadas na área experimental da Embrapa-Soja, Londrina, PR, Brasil).



Além de *D. horizontalis*, na entrelinha do milho, foram observados sintomas semelhantes em outra gramínea pertencente ao mesmo gênero *Digitaria*, identificada como *D. insularis* (Figura 9B) (GONÇALVES et al., 2011). No gênero *Digitaria* estão incluídas aproximadamente 300 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (CANTO-DOROW, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de *D. horizontalis* e *D. insularis* serem hospedeiros alternativos da bactéria *P. ananatis*, agente causal da mancha branca do milho.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.3.1 Isolamento de *P. Ananatis* a partir de Lesões Foliares de Milho e *D. Insularis*

Folhas naturalmente infectadas por *P. ananatis* na cultivar de milho HS200 e folhas com lesões similares à MBM em *D. insularis* (Figura 9B) foram coletadas na Fazenda Experimental da Embrapa-Soja, Londrina, PR. Na época da coleta, as plantas de milho estavam na fase de enchimento de grãos. As folhas foram lavadas com esponja e sabão neutro e as lesões anasarcas retiradas com auxílio de estilete e desinfestadas superficialmente com álcool etílico 70% (1 min), T-Cloramina 2% (4 min), seguido de três enxágues em água estéril (1 min cada). Retirou-se as extremidades das lesões e segmentos medindo aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>, foram depositadas em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) (15 g/L de caseína enzimática hidrolisada, 5 g/L de peptona de soja, 5 g/L de cloreto de sódio e 15 g/L de agar). Após 24 horas à 28 °C, colônias típicas de *P. ananatis* foram isoladas e purificadas. O isolado proveniente de lesão foliar de milho naturalmente infectada foi denominado Pa2DH e um isolado proveniente de lesão foliar de *D. insularis* naturalmente infectada foi denominado Pa1DI. Ambos foram selecionados para a condução dos experimentos de inoculação cruzada em casa de vegetação (Tabela 2).

#### 5.3.2 Preparo das Plantas de *D. Horizontalis*, *D. Insularis* e Milho

Plantas de *D. horizontalis* e de *D. insularis*, ambas assintomáticas, foram coletadas nas entrelinhas de um plantio de milho em área experimental da

região de Londrina, PR. As folhas foram destacadas e dois colmos enraizados contendo um a dois nós, foram transplantados para vasos de polietileno de 2 L de capacidade em casa de vegetação. Após dois meses do transplante, quando as plantas mostraram-se vigorosas, procederam-se as inoculações. A cultivar de milho HS200 foi semeada em vasos de polietileno de 30 L de capacidade e mantidos em casa de vegetação e logo após a emergência foram realizados desbastes deixando-se apenas duas plantas por vaso.

### 5.3.3 Teste de Patogenicidade em casa de Vegetação de Isolados de *P. Ananatis* em Plantas de *Digitaria* spp. e em Plantas de Milho

Foram realizadas inoculações cruzadas com os isolados de *P. ananatis* de milho, e das espécies de *Digitaria*.

Para as inoculações, ajustou-se as suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC/mL) em meio de cultura líquido de Triptona de Soja (TSB) com os isolados Pa2DH, Pa1DI e a linhagem WT-2. Esta última foi obtida anteriormente por Rocha e Paccola-Meirelles (2008), a partir de lesões anasarcas de MBM, sendo identificada como *P. ananatis* através de testes bioquímicos e por sequenciamento genético. Nestes experimentos, esta linhagem foi utilizada portanto como controle positivo (Tabela 2). Como controle negativo, as folhas foram aspergidas somente com o meio de cultura TSB. Primeiramente, estas suspensões foram aspergidas em casa de vegetação até o ponto de escorrimento sobre as folhas de *D. horizontalis* e *D. insularis*, pré-feridas ligeiramente com gaze em ambas as faces foliares. Cada isolado foi considerado um tratamento distinto, sendo inoculado um vaso por tratamento contendo duas plantas e cada planta uma repetição. De forma semelhante, plantas de milho da cultivar HS200 foram inoculadas com suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC/mL em meio de cultura TSB) dos mesmos isolados, 45 DAS (dias após semeadura). As folhas de milho também foram previamente injuriadas, porém com esponja. Concluído o processo de inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 h.

As avaliações foram realizadas a partir do décimo dia após as inoculações (DAI) e o reisolamento do patógeno foi realizado a partir dessa data. Os reisolados foram purificados, permanecendo com as respectivas nomenclaturas quando inoculados em hospedeiros diferentes.

**Tabela 2** – Relação dos isolados bacterianos com as respectivas sucessões de inoculações em diferentes hospedeiros em casa de vegetação.

Isolado	Hospedeiro de origem <sup>1</sup>	Inoculações sucessivas <sup>2</sup>			Local de origem
		1ª inoculação	2ª inoculação	3ª inoculação	
Pa2DH	<i>Zea mays</i> (HS200)	<i>D. horizontalis</i>	<i>D. insularis</i>	<i>Zea mays</i> (HS 200)	Embrapa-Soja, Londrina, PR, Brasil
Pa1DI	<i>D. insularis</i>	<i>D. horizontalis</i>	<i>Zea mays</i> (HS 200)	<i>D. insularis</i>	Embrapa-Soja, Londrina, PR, Brasil
WT-2 (controle positivo)	<i>Zea mays</i>	<i>D. horizontalis</i>	<i>D. insularis</i>	<i>Zea mays</i> (HS 200)	Warta, PR, Brasil

<sup>1</sup> Isolado de lesões do campo naturalmente infectadas.

<sup>2</sup> Inoculação em casa de vegetação, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

#### 5.3.4 Extração de DNA, PCR, Purificação e Sequenciamento dos Isolados de *P. Ananatis* após as Inoculações Cruzadas

Para identificação dos isolados bacterianos, realizou-se a extração do DNA genômico por fervura. Cada isolado foi cultivado separadamente por 24 h em 5 mL do meio de cultura LB líquido (Luria-Bertani líquido: 1% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 1% de cloreto de sódio em água; pH ajustado para 7,0). Após este período, 1 mL da suspensão bacteriana permaneceu em banho maria a 95 °C por 15 min. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 min e reservados 50 µL do sobrenadante. O DNA foi precipitado com isopropanol a 75% (5:1, v/v), lavado uma vez com álcool 70% e ressuspendido em 25 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 50 mM, com pH ajustado para 8,0). O DNA foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) (MULLIS et al., 1986), utilizando-se os oligonucleotídeos universais para o gene ribossomal 16F27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (LANE, 1991) e 16R1492 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') (TURNER et al., 1999), que amplifica fragmentos com aproximadamente 1500 pb (pares de base) do gene ribossomal 16S rRNA. Também foram utilizados os iniciadores desenhados para amplificação de uma sequência de DNA com aproximadamente 360 ou 388 pb, encontrada unicamente na espécie *P. ananatis* (ANAF/ANAR) (FIGUEIREDO E PACCOLA-MEIRELLES, dados em publicação).

Cada reação da mistura de incubação da PCR continha 20 ng de DNA, tampão IB 10X (15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100) (Phoneutria, Brasil), 2 mM de cada dNTP (Phoneutria, Brasil), 5 mM de cada primer e 5 U/μL *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Brasil) em volume final de 25 μL. Os reagentes foram combinados e mantidos em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) a 95 °C por 3 min. Trinta ciclos foram realizados utilizando os *primers* 16F27 e 16R1492, por aquecimento a 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, e 72 °C por 30 seg, seguido por um período final a 72 °C por 10 min. Com os outros *primers* (ANAF/ANAR) foram utilizadas as mesmas condições, exceto temperatura de anelamento de 58 °C. Após a amplificação, aproximadamente 5 μL das amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, para diagnóstico da qualidade. O tampão utilizado para preparo dos géis e na eletroforese foi o TAE 1X (0,004 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA, pH 8,0) (80 volts). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 μg/μL) e visualizados sobre luz ultravioleta. As imagens digitais foram capturadas e armazenadas com câmera digital (Sony cyber-shot DSC-W110). Os 20 μL da PCR restante de cada amostra foram purificados de gel de agarose a 0,8% com silica bead DNA gel extraction kit (Fermentas, Canadá). Para cada reação de sequenciamento, os reagentes foram combinados da seguinte forma, 0,25 μL de BigDye Terminator (versão 3.1, Applied Biosystems, EUA), 1 μL de *primer* (5 mM), 2 μL de tampão de diluição, e q.s.p. 10 μL de água Milli-Q. Foram utilizados 200 ng de DNA purificados. As amostras foram colocadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) com o seguinte ciclo de programa: 96 °C por 20 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min, totalizando 30 ciclos. Após, o DNA amplificado foi precipitado com 40 μL de isopropanol a 75 %, permanecendo 15 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 μL de etanol 70 % para limpeza do DNA, centrifugado por 20 min, 14.000 RPM à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco a temperatura ambiente no escuro e ressuspendido em 10 μL de formamida. O DNA foi desnaturado por 5 min à 95 °C e resfriado em gelo até a injeção no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems). Cada isolado teve suas sequências de DNA alinhadas e editadas utilizando-se o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Os contigs foram comparados com sequências de DNA depositadas no GenBank utilizando-se o programa BLASTn (<http://>

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para determinar a identidade dos isolados e para estabelecer o grau de similaridade das sequências com os DNAs de outras espécies.

#### 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 5.4.1 Teste de Patogenicidade em casa de Vegetação de Isolados de *P. Ananatis* em Plantas de *Digitaria* spp. e em Plantas de Milho

Em plantas do gênero *Digitaria* spp. os sintomas foram observados 10 DAI e em milho aproximadamente entre 20 e 30 DAI, dependendo do isolado utilizado. Colônias com características culturais morfológicamente semelhante à *P. ananatis* foram reisoladas em todas as inoculações bem sucedidas. O isolado de *P. ananatis* WT-2, obtida de lesões de MBM, foi usada como padrão para comparação morfológica das colônias, auxiliando na seleção dos isolados e dos reisolados. O isolado WT-2 mostrou-se patogênica tanto para *D. horizontalis* como para milho (Figuras 10B e H, respectivamente), mostrando maior severidade quando comparado aos demais isolados. O isolado WT-2 reproduziu sintomas em *D. insularis* similares aos observados em campo (Figura 10J). O isolado Pa2DH, isolado de milho, mostrou-se patogênico à *D. horizontalis* (Figura 10A). Destas lesões reisolou-se a bactéria, que apresentou patogenicidade tanto para a própria *D. horizontalis*, como para o milho (Figuras 10C e F, respectivamente).

**Figura 10 –** Lesões causadas pela inoculação de *P. ananatis* em diferentes gramíneas em casa de vegetação. Em cada foto, no canto superior direito, é mostrado a lesão em detalhe e setas amarelas destacam as lesões nas folhas. A: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela inoculação do isolado PA2DH; B: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela linhagem WT-2; C: Lesões em *D. horizontalis* causadas pela reinoculação do isolado PA2DH; D e E: Lesões causadas pela inoculação do isolado PA1DI em *D. horizontalis*; F: Lesões em folha de milho HS200, causadas pelo isolado PA2DH de *D. horizontalis*; G: Lesões no milho HS200 causadas pelo isolado PA1DI de *D. insularis*; H: Lesões no milho HS200 causadas pela linhagem WT-2; I: Lesões no milho HS200 causadas pelo isolado PA1DI de *D. insularis*, mostrando no detalhe a lesão em estágio inicial de desenvolvimento, chamada anasarca; J: Lesões em *D. insularis* causadas pela inoculação da linhagem WT-2; L: Controle negativo de *D. horizontalis*; M: Lesões em *D. insularis* causadas pela inoculação do isolado PA1DI do milho; N: Controle negativo de *D. insularis*; O: Controle negativo do milho HS200.

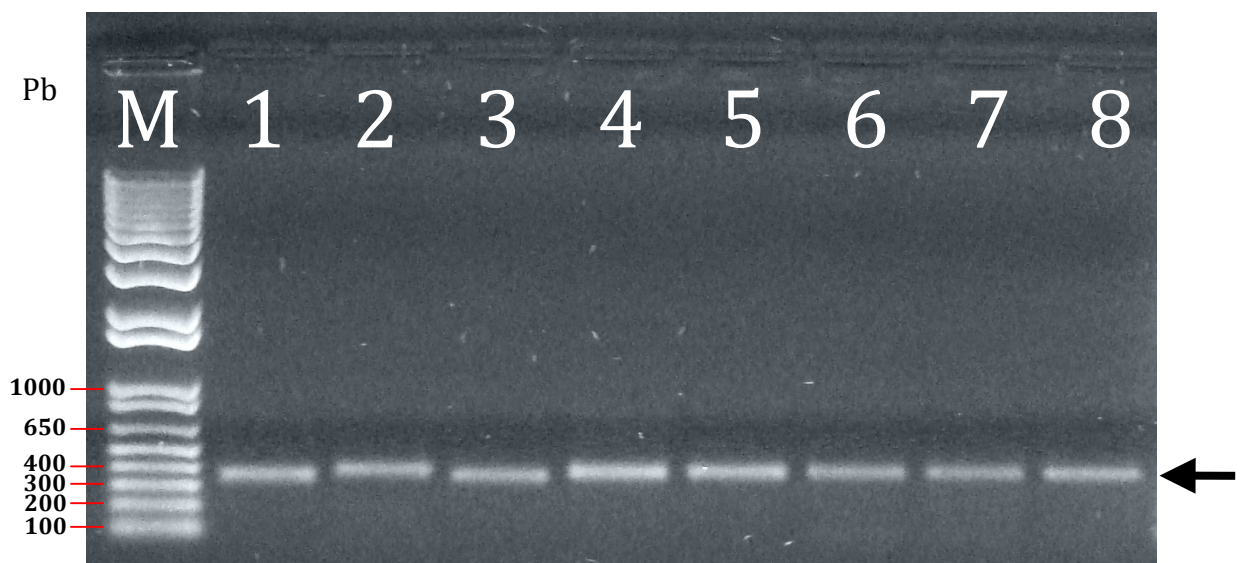


O isolado Pa1DI, apresentou patogenicidade ao milho (Figura 10G e I) e a *D. horizontalis* (Figura 10D e E). A partir dos sintomas reproduzidos no milho com o isolado Pa1DI, a bactéria foi reisolada e inoculada em *Digitaria insularis* (Figura 10M). Os controles negativos que receberam apenas a inoculação com o meio de cultura TSB, não apresentaram nenhum sintoma em *D. horizontalis*, *D. insularis* e no milho (Figuras 10L, N e O, respectivamente).

#### 5.4.2 Identificação Molecular dos Isolados Bacterianos após as Inoculações Cruzadas entre Milho e Espécies de *Digitaria* spp.

O sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rDNA de todos os isolados, bem como o amplicon de 360 ou 388 pb específico para *P. ananatis* (ANAF/ANAR) (Figura 11) confirmaram a identidade dos isolados bacterianos como sendo *P. ananatis*, com grau de similaridade variando de 99-100% com as sequencias depositadas no GenBank.

**Figura 11** – Identificação dos isolados bacterianos por PCR utilizando os *primers* específicos para *P. ananatis* (ANAF/ANAR). (1) WT-2 isolado de lesões de campo em *Zea mays*; (2) WT-2 reisolado de lesões de *Zea mays* obtidas em casa de vegetação; (3) WT-2 reisolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (4) Pa1DI isolado de lesões de campo em *D. insularis*; (5) Pa1DI reisolado de lesões produzidas em *Zea mays* em casa de vegetação; (6) Pa1DI reisolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (7) Pa2DH isolado de lesões de *D. horizontalis* obtidas em casa de vegetação; (8) Pa2DH reisolado de lesões em *Zea mays* obtidas em casa de vegetação; (M) Marcador molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen, EUA).



A doença MBM causada pela bactéria *P. ananatis* pode limitar significativamente a produtividade do milho quando incide em cultivares suscetíveis. Segundo Gitaitis et al. (2002), *P. ananatis* pode sobreviver epifiticamente em plantas daninhas, incluindo *Digitaria sanguinalis*. Nossos resultados demonstram que a mesma bactéria causou lesões similares à MBM em *D. horizontalis* e *D. insularis*, quando inoculadas em casa de vegetação (Figura 10). Verificou-se também que a bactéria, quando reisolada das gramíneas *Digitaria* e inoculadas no milho, produziram sintomas típicos da doença MBM. Portanto, estas plantas daninhas podem contribuir para a sobrevivência da bactéria em áreas de plantio de milho, podendo ser consideradas fonte de inoculo para plantios posteriores.

Os *primers* ANAF/ANAR determinados como específicos para *P. ananatis* de milho e sorgo (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, dados em publicação), mostraram-se eficientes para a identificação dos isolados e dos reisolados obtidos em cada teste de patogenicidade, apresentando uma única cópia, em todo o genoma dessa bactéria e cujo tamanho de 360 ou 388 pb, varia entre isolados diferentes. Além disso, o par de *primers* apresentou excelente anelamento com temperatura de 58 °C, o que possibilitou a obtenção de uma única banda de DNA amplificado, muito específica e nítida para cada isolado de *P. ananatis* (Figura 11).

Como a doença MBM está disseminada em quase todo o território nacional e as gramíneas *D. horizontalis* e *D. insularis* também apresentam ampla distribuição, estas podem ser descritas como hospedeiros alternativos para *P. ananatis*.

## REFERÊNCIAS

- AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, v. 84, p. 973-979, 2000.
- BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 1-6, 2008.
- BRUTON, B. D.; WELLS, J. M.; LESTER, G. E.; PATTERSON, C. L. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a post harvest disease of cantaloupe fruit. **Plant Disease**, v. 75, p. 180-183, 1991.
- CANTO-DOROW, T. C. *Digitaria* Heister ex Haller. In: Canto-Dorow, T. C.; Wanderley, M. G. L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. M. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, 2001. p. 143-150.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (Circular técnica 83), 2006, 14p.
- COUTINHO, T. A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; RIEDEL, K. H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, v. 86, p. 20-25, 2002.
- GITAITIS, R. D.; GAY, J. D. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. **Plant Disease**, v.81, p. 1096, 1997.
- GITAITIS, R.; WALCOTT, R.; CULPEPPER, S.; SANDERS, H.; ZOLOBOWSKA, L.; LANGSTON, D. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Protection**, v. 21, p. 983-989, 2002.
- GONÇALVES, R. M.; PEDRO, E. S.; PEDRO, F. R.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Hospedeiros alternativos para *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho. In: 44° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves, 2011, **Tropical Plant Pathology** (suplemento 36, CR-Rom), p. 972, 2011.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. ( eds.), John Wiley and Sons, New York. 1991. p. 115-175.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.
- OLIVEIRA, M. F.; ALVARENGA, R. C.; OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. C. Efeito da palha e da mistura atrazine e metolachlor no controle de plantas daninhas na cultura do

milho, em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 37-41, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananas* isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, p. 578-590, 2002.

PASQUALETTO, A.; COSTA, L. M.; SILVA, A. A.; SEDIYAMA, C. S. Ocorrência de plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sucessão a culturas de safrinha no sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, p. 133-138, 2001.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak & Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 23, p. 1006-1009, 1999.

ROCHA, K. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Fatores envolvidos na reprodução da doença Mancha Branca do Milho. In: **Anais do III Encontro de Bolsista do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social**, Londrina, PR, 2008, CD-ROM.

SERRANO, F. B. Bacterial fruitlet Brown-rot of pineapple in the Philippines. **Philippine Journal of Science**, v. 36, p. 271-305, 1928.

STALL, R. E.; ALEXANDER, L. J.; HALL, C. B. Effect of tobacco mosaic virus and bacterial infections on occurrence of graywall of tomato [*Erwinia ananas*]. **Florida State Horticultural Society**, v. 81, p. 157-161, 1969.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327-338, 1999.

WATANABE, K.; KAWAKITA, H.; SATO, M. (1996) Epiphytic bacterium, *Erwinia ananas*, commonly isolated from rice plants and brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) in hopperburn patches. **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, p. 459-462, 1996.

WELLS, J. M.; SHENG, W. S.; CEPONIS, M. J.; CHEN, T. A. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology**, v. 77, p. 511-514, 1987.

WYSMIERSKI, P.T.; REAL, K.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Pantoea ananatis*: Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação. In: CONGRESSO NACIONAL DO MILHO E SORGO - II SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO – I SIMPÓSIO SOBRE COLLETROTOTRICHUM GRAMINICOLA, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2006. p. 1-5, 2006.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo fornecer maiores subsídios para confirmação da etiologia da doença mancha branca do milho e identificar hospedeiros alternativos para a bactéria *P. ananatis*. Assim, podemos inferir que:

- Espécies fúngicas, como aquelas pertencentes ao gênero *Phoma*, descrita por alguns autores como provável agente etiológico da doença, foram encontradas em lesões preestabelecidas pela bactéria *P. ananatis*, reforçando a hipótese de que a bactéria é o agente incitante da doença e que diferentes espécies fúngicas podem colonizar o tecido vegetal já necrótico;
- O monitoramento das lesões por meio de técnicas moleculares permitiu confirmar a presença da bactéria *P. ananatis* em todos os estádios de desenvolvimento da lesão, desde o estágio anasarca até o estágio necrótico;
- O monitoramento das lesões de mancha branca do milho por meio de técnicas moleculares possibilitou confirmar a presença de fungos diversos apenas nos estádios em que o tecido vegetal apresenta-se necrótico, permitindo visualizar também que quando presente em lesões em estádios iniciais de desenvolvimento, estão superficialmente no tecido;
- Os resultados permitiram confirmar a bactéria *P. ananatis* como agente causal da doença e fungos podem instalar-se em lesões preestabelecidas pela bactéria, apresentando neste caso, um comportamento oportunista;
- As gramíneas *Digitaria horizontalis* e *Digitaria insularis*, comuns nas entrelinhas da cultura do milho, são hospedeiras alternativas da bactéria *P. ananatis*.

## REFERÊNCIAS

- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, v.94, p. 487, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410, 1990.
- AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, v.53, p. 259, 2004.
- AMARAL, A. L.; DAL SOGLIO, F. K.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* Leaf Spot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, v.8, p. 44-49, 2005.
- AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, v.84, p. 973-979, 2000.
- BALMER, E.; PEREIRA, A. O. P. Doenças de Milho In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. eds. **Melhoramento de Produção de Milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 595-634.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul: APS Press, 1998, 218p.
- BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p.331-342.
- BODMAN, S. B. V.; FARRAND, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. **Journal of Bacteriology**, v.177, p. 5000-5008, 1995
- BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p. 1-6, 2008.
- BRUTON, B. D.; WELLS, J. M.; LESTER, G. E.; PATTERSON, C. L. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a post harvest disease of cantaloupe fruit. **Plant Disease**, v.75, p. 180-183, 1991.
- CANTO-DOROW, T. C. *Digitaria* Heister ex Haller. In: Canto-Dorow, T. C.; Wanderley, M. G. L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. M. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, 2001. p. 143-150.

- CANTO-DOROW, T. S.; LONGHI-WAGNER, H. M. Novidades taxonômicas em *Digitaria* Haller (Poaceae) e novas citações para o gênero no Brasil. **Insula**, v.30, p. 21-34, 2001.
- CARSON, M. L. Vulnerability of U.S. maize germ plasm to *Phaeosphaeria* leaf spot. **Plant Disease**, v.83, p. 462-464, 1999.
- CARSON, M. L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Plant Disease**, v.85, p. 798-800, 2001.
- CARSON, M. L.; STUBER, C. W.; SENIOR, M. L. Quantitative trait loci conditioning resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis*. **Plant Disease**, v.89, p. 571-574, 2005.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Circular técnica 83), 2006, 14p.
- CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p. 30-37, 2002.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2011. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_08\\_25\\_15\\_48\\_24\\_revista\\_agosto\\_2011..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_25_15_48_24_revista_agosto_2011..pdf)> Acesso em: 30 ago. 2011.
- COSTA, F. M. P. **Severidade de *Phaeosphaeria maydis* e rendimento de grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes ambientes e doses de nitrogênio**. 2001, 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Cultivo do milho. In: **Embrapa Milho e Sorgo**, 5.ed., versão eletrônica, set/2009. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_5\\_ed/doencas.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm)> Acesso em: 5 set. 2011.
- COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F.; LANA, U. G. P.; CASELA, C. R. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v.5, p. 120-122, 2010.
- COTHER, E. J.; REINKE, R.; MCKENZIE, C.; LANOISELET, V. M.; NOBLE, D. H. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananatis* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.33, p. 495-503, 2004.
- COUTINHO, T. A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; RIEDEL, K. H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, v.86, p. 20-25, 2002.
- COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.10, p. 325-335, 2009.

DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; VENTER, S.N.; TOTH, I.K.; BIRCH, P.R.J.; JOUBERT, F.; COUTINHO, T.A. The genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. **Journal of Bacteriology**, v.192, p. 2936-2937, 2010.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. **Cultivo do milho: economia da produção**, In: EMBRAPA MILHO E SORGO.. 2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_2ed/economia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/economia.htm)>. Acesso em: 01 jun. 2010.

FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Bio56**, p. 39, 1994.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, Systematic Mycology and Laboratory, ARS, USDA**. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>>. Acessado em: 24 jan. 2012.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais Doenças na Cultura do Milho**. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Circular Técnica 26), 1997, 80p.

FERNANDES, F. T.; SANS, L. M. A. Influência das condições climáticas na ocorrência das lesões foliares por *Phaeosphaeria maydis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20., 1994, Goiânia. **ABMS**. Centro-Oeste; cinturão do milho e do sorgo no Brasil, 1994. p. 136.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; AFFÉRI, F. S.; PELUZIO, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis* sob estresse de fósforo, no Estado do Tocantins. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v.2, p. 177-186, 2007.

GITAITIS, R. D.; GAY, J. D. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananatis* in Georgia. **Plant Disease**, v.81, p. 1096, 1997.

GITAITIS, R. D.; WALCOTT, R. R.; WELLS, M. L.; DIAZ PEREZ, J. C.; SANDERS, F. H. Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. **Plant Disease**, v. 87, p. 675-678, 2003.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R.; CULPEPPER, S.; SANDERS, H.; ZOLOBOWSKA, L.; LANGSTON, D. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Protection**, v.21, p. 983-989, 2002.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Análise temporal e climática do progresso da mancha de *Phaeosphaeria* do milho. In: 32 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p. 288, 1999.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 209-215, 2001.

GONÇALVES, R. M.; PEDRO, E. S.; PEDRO, F. R.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Hospedeiros alternativos para *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho. In: 44° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves, 2011, **Tropical Plant Pathology** (suplemento 36, CR-ROM), p. 972, 2011.

GOSZCZYNSKA, T.; BOTHA, W. J.; VENTER, S. N.; COUTINHO, T. A. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. **Plant Disease**, v.91, p. 711-718, 2007.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers – a system for identifying and differentiating pathotypes of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.82, p. 832-835, 1992.

HENNINGS, P. V. Fungi S. Paulenses II. Puttermans collect: **Hedwigia**, v.41, p. 295-311, 1902.

JOHNSON, K. B. Defoliation, disease, and growth: a reply. **The American Phytopathological Society**, v.77, p. 1495-1497, 1987.

KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4839-4849, 2000.

KIM, H. K.; ORSER, C.; LINDOW, S. E.; SANDS, D. C. *Xanthomonas campestris* pv. *Translucens* strains active in ice nucleation. **Plant Disease**, v.71, p. 994-997, 1987.

KOZLOFF, L. M.; TURNER, M. A.; ARELLANO, F. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 6528-6536, 1991.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, v.92, p. 807-811, 2010.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons, 1991. p. 115-175.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. **Phytopathology**, v.68, p. 523-527, 1978.

LOPES, M. T. G. **Mapeamento de genes de resistência à mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.

LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K. R.; PEREIRA DA SILVA, H.; MATIELLO, R. R.; CAMARGO, L. E. A. Controle genético da resistência à mancha-de-*Phaeosphaeria* em milho. **Ciência Rural**, v.37, p. 605-611, 2007.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; Cultivo do milho, 6 ed, versão eletrônica, 2010. Disponível em:  
<[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/ecofisiologia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/ecofisiologia.htm)>. Acesso em: 24 jan. 2012.

MAKI, L. R.; GALYAN, E. L.; CHANG-CHIEN, M. M.; CALDWELL, D. R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. **Applied Microbiology**, v.28, p. 456-459, 1974.

MAPA/AGE, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**: Projeções do Agronegócio, Brasil 2009/10 a 2019/20, Brasília, 2010. Disponível em:

<[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Proje%C3%A7%C3%B5es%20Agroneg%C3%B3cio%202009-2010%20a%202019-2020.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Proje%C3%A7%C3%B5es%20Agroneg%C3%B3cio%202009-2010%20a%202019-2020.pdf)>  
Acesso em: 31 ago. 2011.

MAPA/AGE, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasil Projeções do Agronegócio 2010/11 a 2020/21, Brasília, 2011. Disponível em:  
<[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOE S%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202\\_0.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOE S%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf)>  
Acesso em: 31 ago. 2011.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia Uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. **Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p. 162-173, 1993.

MOROHOSHI, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, G.; ISHIDA, A.; KATO, N.; IKEDA, T. The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 8333-8338, 2007.

MOROHOSHI, T.; OSEKI, K.; IKEDA, T. Exopolysaccharide production is influenced by sugars, n-acylhomoserine lactone, and transcriptional regulators RcsA and RcsB, but does not affect pathogenicity in the plant pathogen *Pantoea ananatis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.75, p. 997-999, 2011.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.51, p. 263-273, 1986.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p. 4321-4325, 1980.

OLIVEIRA, M. F.; ALVARENGA, R. C.; OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. C. Efeito da palha e da mistura atrazine e metolachlor no controle de plantas daninhas na cultura do milho, em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p. 37-41, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; CERVELATTI, E. P.; MAKI, C. S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; FERREIRA, A. S.; Caracterização

morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em híbridos de milho e avaliação da incidência do estágio sexuado e assexuado do patógeno. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Anais...** Recife, 1998. CD-ROM.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARRIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARRIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananatis* isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p. 578-590, 2002.

PARENTONI, S. N.; FERNANDES, F. T.; GAMA, E. E. G.; LOPES, M. A.; GUIMARÃES, P. E. P.; SANTOS, M. X.; SILVA, A. E. Efeito de níveis de nitrogênio sobre a severidade da doença foliar causada por *Phaeosphaeria maydis* em milho. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 21, Londrina-PR, 1996, p. 164.

PASQUALETTO, A.; COSTA, L. M.; SILVA, A. A.; SEDIYAMA, C. S. Ocorrência de plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sucessão a culturas de safrinha no sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.31, p. 133-138, 2001.

PEGORARO, D. G.; VACARO, E.; NUSS, C. N.; SOGLIO, F. K.; SERENO, M. J. C. M.; BARBOSA NETO, J. F. Efeito de época de semeadura e adubação na mancha-foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p. 1037-1042, 2001.

PEGORARO, D. G.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K.; VACARO, E.; NUSS, C. N.; CONCEIÇÃO, L. D. H. Herança da resistência à mancha-foliar de feoféria em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p. 32-336, 2002.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J. A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. **Australasian Plant Disease Notes**, v.4, p. 96–99, 2009.

PEREIRA, A. O. P.; CAMARGO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Ed) **Manual de Fitopatologia** – Doenças de Plantas Cultivadas. Piracicaba: Ceres, cap. 55, v.2. 2005. p. 477-488.

PEROMBELON, M. C. M. The genus *Erwinia*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes**. Springer-Verlag. 1992. p. 2899-2921.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak & Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, v.23, p. 1006-1009, 1999.

POMINI, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. isolated from the "maize white spot" foliar disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 1200-1204, 2007.

PUNITHALINGAM, E.; TULLOCH, M.; LEACH, C. M. *Phoma epicoccina* sp. nov. on *Dactylis glomerata*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.59, p. 341-345, 1972.

RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. A *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathology Bulletin**, v.3, p. 8-10, 1966.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p. 802-808, 2007.

ROCHA, K. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Fatores envolvidos na reprodução da doença Mancha Branca do Milho. In: ENCONTRO DE BOLSISTA DO PROGRAMA DE APOIO A AÇÕES AFIRMATIVAS PARA INCLUSÃO SOCIAL, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina, 2008. CD-ROM.

ROCHA, K. R.; ANDRADE-NOBREGA, G. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Caracterização comparativa entre isolados de *Pantoea ananatis* oriundos de lesões de capim-colchão com aqueles de lesões de Mancha Branca do Milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2010. p. 701-708, CD-Rom.

ROLIM, G. S.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; FANTIN, G. M.; BRUNINI, O.; DUARTE, A. P.; DUDIENAS, C. Modelo agrometeorológico regional para estimativa da severidade da mancha de *Phaeosphaeria* em milho safrinha no Estado de São Paulo, Brasil. **Bragantia**, v.66, p. 721-728, 2007.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, p. 40-43, 2009. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2011.

SACCAS, A. M. À propos de quelques champignons nouveaux parasites et saprophytes sur maïs. **Revue de Pathologie et d'Entomologie Agricole de France**, v.30, p. 161-196, 1951.

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALVÃO, J. C. C.; CASTRO, J. L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p. 585-589, 1997.

SERRANO, F. B. Bacterial fruitlet Brown-rot of pineapple in the Philippines. **Philippine Journal of Science**, v.36, p. 271-305, 1928.

SILVA, H. P. **Genética da resistência à *Phaeosphaeria maydis* em milho**. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2002.

SOUZA, J. C.; DUARTE, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p. 325-331, 2002.

STALL, R. E.; ALEXANDER, L. J.; HALL, C. B. Effect of tobacco mosaic virus and bacterial infections on occurrence of graywall of tomato [*Erwinia ananas*]. **Florida State Horticultural Society**, v.81, p. 157-161, 1969.

TRÜPER, H. G.; DE´ CLARI, L. Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 908-909, 1997.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, p. 327-338, 1999.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C.; SANDERS, J. R. F. H.; DIAZ-PEREZ, J. C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. **Plant Disease**, v.86, p. 106-111, 2002.

WATANABE, K.; KAWAKITA, H.; SATO, M. (1996) Epiphytic bacterium, *Erwinia ananas*, commonly isolated from rice plants and brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) in hopperburn patches. **Applied Entomology and Zoology**, v.31, p. 459-462, 1996.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. DNA fingerprinting in plants and fungi, **CRC Press**, Boca Raton, 322 p., 1995.

WELLS, J. M.; SHENG, W. S.; CEPONIS, M. J.; CHEN, T. A. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology**, v.77, p. 511-514, 1987.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. eds. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Academic Press. New York: 1990. p. 315-322.

WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, cap. 2.4.1-2.4.5, 1997.

WYSMIERSKI, P. T.; ESCANFERLA, M. E.; PACCOLA-MEIRELES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e produção de exoenzimas em *Pantoea ananatis*, agente causal da pinta branca do milho. In: 38º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, v.30. 2005, p. 57.

WYSMIERSKI, P.T.; REAL, K.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Pantoea ananatis*: Monitoramento da população epifítica sobre folhas de milho e avaliação de métodos artificiais de inoculação. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – II SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO – SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2006. p. 1-5.

ZHANG, Y.; SCHOCH, C. L.; FOURNIER, J.; CROUS, P. W.; DE GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J. H. C.; HIRAYAMA, K.; TANAKA, K.; POINTING, S. B.; HYDE, K. D. Multi-locus phylogeny of the Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. **Studies in Mycology**, v.64, p. 85-102, 2009.

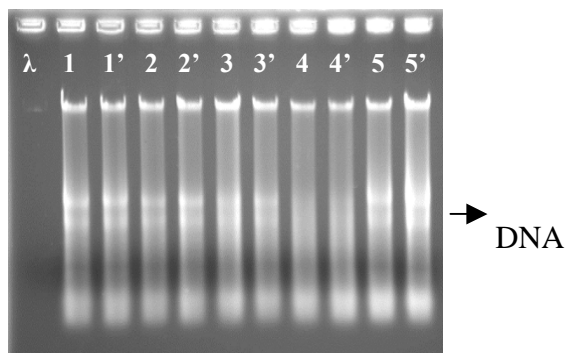
**ANEXO**

## ANEXO A

### Teste do protocolo de extração de DNA total direto da lesão MBM

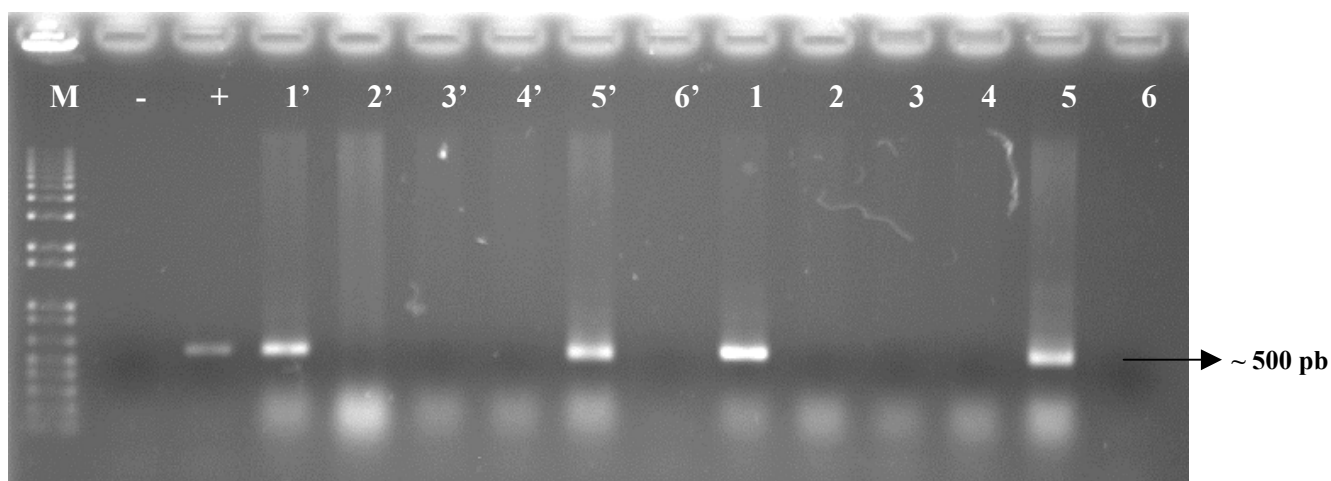
Antes de ser utilizado o protocolo de extração de DNA de Wilson (1997), foi testado o protocolo modificado de Murray e Thompson (1980), o qual utiliza o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (NaCl 1,4 M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; PVP 10000 2%; CTAB 2%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) como princípio para solubilizar as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (Weising et al., 1995). Com este protocolo verificou-se que o DNA extraído estava em alta quantidade (Figura 12), porém com qualidade questionável.

**Figura 12** – Gel de agarose a 1 % para diagnóstico da qualidade do DNA extraído nos diferentes estádios de desenvolvimento da mancha branca do milho com o protocolo modificado de Murray e Thompson (1980). Na figura,  $\lambda$ : lambda de 50 ng/ $\mu$ L de DNA; 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesão acinzentada; 3: lesão necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesão necrótica com estrutura fúngica no centro e 5: tecido foliar assintomático. De 1' a 5' representa repetição dos respectivos tratamentos.

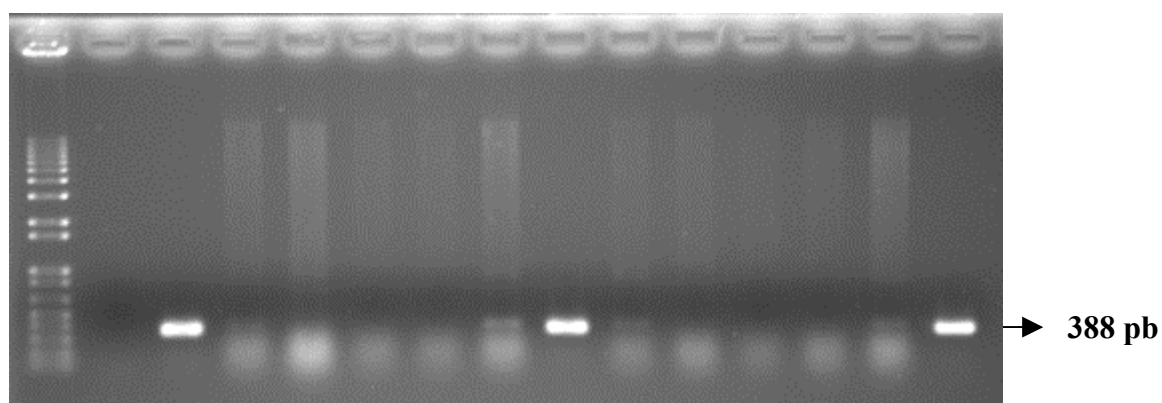


A qualidade do DNA extraído pelo protocolo modificado de Murray e Thompson (1980) mostrou-se questionável quando no processo de secagem foi possível observar pellet de coloração marrom, principalmente nos estádios mais desenvolvidos da doença MBM (estádios 3 e 4). Esta coloração pode estar relacionada com o acúmulo de compostos fenólicos, os quais oxidam o DNA de forma irreversível, dificultando ou até inviabilizando a ação de enzimas de restrição (ROMANO; BRASILEIRO, 2009). Observou-se que este DNA quando submetido a PCR não resultava amplificação, mostrando que a *Taq* DNA polimerase estava inativa (Figura 13 e 14).

**Figura 13** – Gel de agarose a 1 % com o produto de PCR com DNA extraído dos diferentes estádios de desenvolvimento da mancha branca do milho, amplificados com os *primers* ITS1/ITS4. M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado I-12 de *Colletotrichum gloeosporioides*); 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesões acinzentada; 3: lesões necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesões necrótica com estrutura fúngica no centro; 5: tecido foliar assintomático e 6: DNA do isolado WT-2 (*P. ananatis*). De 1' a 6' representa repetição dos respectivos tratamentos.



**Figura 14** – Gel de agarose a 1 % com produto de PCR do DNA extraído dos diferentes estádios das lesões mancha branca do milho, amplificado com os *primers* específicos para *P. ananatis* (ANAF/ANAR). M: marcador molecular de 1 Kb plus da Invitrogen; -: controle negativo da reação de PCR; +: controle positivo da reação de PCR (DNA do isolado WT-2 de *P. ananatis*); 1: lesões mancha branca do milho no estágio anasarca; 2: lesões acinzentada; 3: lesões necrótica mas sem estrutura fúngica; 4: lesões necrótica com estrutura fúngica no centro; 5: tecido foliar assintomático e 6: DNA do isolado WT-2 (*P. ananatis*). De 1' a 6' representa repetição dos respectivos tratamentos.



Analisando as figuras anteriores, podemos inferir que a ação da enzima *Taq* DNA polimerase estava com atividade comprometida pelo fato de que, na Figura 13, PCR com os *primers* universais para fungos, não apresentou amplificação no estágio 4, caracterizado por tecido necrótico e estruturas fúngicas.

facilmente visualizadas no centro das lesões. Na figura 14, PCR com os *primers* específicos para a bactéria, observa-se que apenas os estádios 1 e 6 (controle positivo, DNA do isolado WT-2 de *P. ananatis*), apresentaram pouca amplificação, porém com DNA degradado. Com isso, podemos inferir que nos estádios iniciais de desenvolvimento da doença MBM, lesões ainda do tipo anasarca, há menos compostos fenólicos e polissacarídeos interferindo na reação da PCR, do que nos estádios mais avançados 3 e 4, onde há mais lignina e impurezas, dificultando e até inviabilizando a ação da enzima.