



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA MOTA MILLER

**VARIABILIDADE GENÉTICA E NUCLEAÇÃO DE GELO EM  
ISOLADOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA BRANCA DO MILHO**

---

Londrina  
2014

AMANDA MOTA MILLER

**VARIABILIDADE GENÉTICA E NUCLEAÇÃO DE GELO EM  
ISOLADOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA BRANCA DO MILHO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de mestre.

Orientador(a): Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles

Londrina  
2014

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

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

M647v	<p>Miller, Amanda Mota. Variabilidade genética e nucleação de gelo em isolados de <i>Pantoea ananatis</i>, agente causal da mancha branca do milho/ Amanda Mota Miller. – Londrina, 2014. 73 f.: il.</p> <p>Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014. Inclui bibliografia</p> <p>1. Milho – Doenças e pragas – Teses. 2. Milho – Resistência a doenças e pragas – Aspectos genéticos – Teses. 3. Bactérias fitopatogênicas – Aspectos genéticos – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 632.35:633.15</p>
-------	--

AMANDA MOTA MILLER

**VARIABILIDADE GENÉTICA E NUCLEAÇÃO DE GELO EM  
ISOLADOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA BRANCA DO MILHO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cleide Aparecida Bomfeti.  
UFVJM – Diamantina – MG

---

Fernando Gomes Barcellos  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

**Dedico**

**À minha família e ao meu noivo,  
pelo apoio, carinho e incentivo  
transmitidos durante todas as etapas  
da minha vida**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar a vida e força para seguir em busca dos meus objetivos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Agronomia pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus queridos pais, Maria e Evadir, pelo amor e apoio incondicional durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos de sangue e de coração, Fábio, Gabriel, Josi e Larissa, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu noivo Murillo Bianco, por sempre me dar amor, consolo, incentivo e principalmente pela paciência nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Luzia Doretto Paccola-Meirelles, pela sábia orientação, paciência, dedicação, carinho e amizade dedicados nestes dois anos de curso.

Ao pós-doutorando Eduardo Ruas, pelo ensinamento da técnica de AFLP e auxílio parcial no desenvolvimento prático e teórico deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular dos professores Paulo Ruas e Claudete Ruas, por cederem equipamentos e materiais para o desenvolvimento do trabalho, em especial a colega Kátia Real Rocha.

Ao técnico do Laboratório de Genética de Microrganismos, Ideval Azarias de Souza, por toda ajuda e suporte durante a condução dos trabalhos; pela paciência e conselhos nos momentos de estresse.

À professora Elisete Rodrigues pelas sugestões, ensinamentos e incentivo.

À todos os professores da Universidade Estadual de Londrina que contribuíram para a minha formação, em especial aqueles do Centro de Ciências Agrárias e Ciências Biológicas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Ao IAPAR, em especial o Dr. Rui Pereira Leite Júnior, por me permitir utilizar seu espaço e reagentes na realização deste trabalho.

Aos amigos de mestrado, em especial a minha amiga Daiane Cristina Martins Barros, pela amizade fiel de anos e por sempre acreditar em mim.

Aos amigos da vida, Déborah Costa e Andrey Cordeiro por sempre estarem ao meu lado em qualquer circunstância.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu Muito Obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

**Theodore Rossevelt**

MILLER, Amanda Mota. **Variabilidade genética e nucleação de gelo em isolados de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho.** 2014. 73 f. Dissertação (mestrado em agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

Medidas de controle da doença Mancha Branca do Milho (MBM), causada por *Pantoea ananatis* (*Pa*), são baseadas preferencialmente no desenvolvimento de cultivares resistentes, porém o desconhecimento e a falta de informações sobre a variabilidade genética do patógeno dificultam o estabelecimento de estratégias de manejo mais estáveis no sistema. Assim, os objetivos do trabalho foram investigar a variabilidade genética de isolados de *Pa* obtidos de diferentes regiões do Brasil e caracterizá-los quanto à presença e expressão fenotípica do gene *inaA*, responsável pelo surgimento inicial dos sintomas da doença. Para os estudos, foram utilizados isolados pertencentes ao banco de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, os quais tiveram seu DNA extraído e identidade confirmada por PCR utilizando os *primers* espécie-específicos ANAF/ANAR. A investigação da variabilidade genética foi conduzida com marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Na seleção das combinações com maior quantidade de *locus* polimórficos, foram selecionados para *Pa* os *primers*: *EcoRI-ACG/MseI-CT*, *EcoRI-ACG/MseI-CAC* e *EcoRI-ACG/MseI-CAG*. Com o intuito de encontrar possíveis variações no número de plasmídios na espécie, foi realizada a extração do mesmo por lise alcalina. A caracterização dos isolados quanto à presença do gene *inaA* foi realizada por PCR utilizando os *primers* upper INA A/ lower INA A. A expressão do fenótipo INA+ foi avaliada adicionando-se 0,1mL de cultura bacteriana em água ultra-pura com temperatura de -10 °C. Dados de similaridade genética permitiram separar os isolados em dois grupos, porém sem correlação entre o local de origem do hospedeiro com a composição dos mesmos. A porcentagem de polimorfismo de *Pa* variou de 24,64% a 92,46% e a diversidade gênica de 0,07 a 0,09. A análise de variância molecular mostrou que 99,18% da variabilidade genética encontra-se dentro das populações. Os resultados obtidos para variabilidade genética apontam para a ação de forças evolutivas sobre as populações estudadas. Este é o primeiro relato da descrição de plasmídio de *Pa* provenientes de lesões de MBM. *P. ananatis* apresenta pelo menos um plasmídio, com tamanho estimado com base na literatura entre 280-352 kb. Correlação positiva entre a detecção do gene *inaA* e a atividade de nucleação de gelo foi obtida em *Pa*. Dos 90 isolados em estudo, apenas três não amplificaram para o *primer*, e cerca de 20% dos isolados, embora portadores do gene, não expressaram o fenótipo nas condições avaliadas. Concluiu-se que a expressão de gene *inaA* é dependente de características de cada indivíduo, pois sua presença no genoma não implica na manifestação fenotípica.

**Palavras-chave:** AFLP. Diversidade genética. Pinta branca do milho. Plasmídio. Resistência genética.

MILLER, Amanda Mota. **Genetic variability and ice nucleation in isolates of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize with spot.** 2014. 73 p. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Londrina State University, 2014.

## ABSTRACT

Measures of control the disease Maize White Spot (MWS), caused by *Pantoea ananatis* (*Pa*), are based preferably on the development of resistant cultivars, but the lack of information about the genetic variability of the pathogen, hampers to establish management strategies more stable in the system. The objectives of the study were to investigate the genetic variability of isolates of *Pa* obtained from different regions of Brazil and characterize them for the presence and phenotypic expression of *inaA* gene, responsible for the initial appearance of disease symptoms. For the studies, was used isolates belonging to the stock strains of the Laboratory of Genetics of Microorganisms, State University of Londrina, that had their DNA extracted and identity confirmed by PCR using species-specific primers ANAF/ANAR. The investigation of the genetic variability was conducted with molecular markers AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). In selecting the combinations with the highest number of polymorphic loci were selected for *Pa* the *EcoRI*-ACG/*MseI*-CT, *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAC and *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAG primers. In order to find possible variations in the number of plasmids in the species, the extraction was performed by the alkaline lysis. The characterization of isolates for the presence of *inaA* gene was performed by PCR using the primers upper INA A/lower INA A. The expression of INA+ phenotype was assessed by adding 0.1 mL of bacterial culture in ultra-pure water to a temperature of -10 °C. Database of genetic similarity allowed to separate the isolates into two groups, but no correlation between the location of origin of the host with the composition. The percentage of polymorphism *Pa* ranged from 24.64% to 92.46 % and gene diversity from 0.07 to 0.09. The analysis of molecular variance showed that 99.18 % of genetic variation is found within populations. The results obtained for genetic variability point to the action of evolutionary forces on the populations studied. This is the first report describing *Pa* plasmid from injuries MBM. *P. ananatis* has at least one plasmid, with size estimated based on the literature between 280-352 kb. Positive correlation between detection of gene *inaA* and ice nucleation activity was obtained in *Pa*. Of the 90 isolates studied, only three non-amplified for the primer, and about 20% of the isolates, although gene carriers, did not express the phenotype in the conditions evaluated. It was concluded that the *inaA* gene expression is dependent on characteristics of each individual, because their presence in the genome does not imply the phenotypic manifestation.

**Key-words:** AFLP. Genetic diversity. Genetic resistance. Maize white spot. Plasmid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Sintomas da doença Mancha Branca do Milho.....19
- Figura 2** – Lesões características da Mancha Branca do Milho classificadas de acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001). Estágio 1: manchas esverdeadas do tipo anasarca; estágio 2: manchas acinzentadas; estágio 3: manchas necróticas sem estruturas reprodutivas fúngicas visíveis; estágio 4: manchas necróticas com estruturas fúngicas visíveis.....20
- Figura 3** – Colônias típicas de *Pantoea ananatis* cultivadas *in vitro* .....25
- Figura 4** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para identificação dos isolados bacterianos obtidos de lesões anasarcas em folhas de milho, utilizando os *primers* específicos para *Pantoea ananatis* (ANAF/ANAR). MM – Marcador Molecular 1kb *plus* DNA ladder Invitrogen. 1 a 19 representam diferentes isolados submetidos à confirmação de um total de 90 isolados. (+) Controle positivo WT2; (-) Controle negativo: mix da reação.....44
- Figura 5** – Padrão de bandas amplificadas por AFLP para quatro isolados de *Pantoea ananatis* (isolados 7, 65, 70 e 89, respectivamente) com as combinações de *primers* *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAG (A), *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAC (B) e *EcoRI*-ACG/*MseI*-CT (C).....46
- Figura 6** – Dendograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 90 isolados de *Pantoea ananatis*, utilizando locos polimórficos de AFLP, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard. Marcações em vermelho destacam os indivíduos negativos para expressão fenotípica do gene *inaA* .....47
- Figura 7** – Coordenada principal calculada a partir do coeficiente de similaridade genética de Jaccard para 90 isolados de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho, provenientes de três regiões do Brasil. (Para maiores informações sobre os isolados consulte tabela 1) .....48

<b>Figura 8</b> – Estimativa do número de agrupamentos (K) por análise de estrutura populacional em três populações de <i>Pantoea ananatis</i> .....	49
<b>Figura 9</b> – Frequências alélicas atribuídas aos 90 isolados de <i>Pantoea ananatis</i> , provenientes de três regiões brasileiras (1: região Sul, 2: região Sudeste e 3: região Centro-Oeste). (Para informações sobre isolados e cidades/região consulte tabela 1).....	50
<b>Figura 10</b> – Gel de agarose a 0,6% ilustrando a presença de um plasmídeo em isolados de <i>Pantoea ananatis</i> , extraídos de lesões da Mancha Branca do Milho 1 a 8 representam diferentes isolados submetidos à extração de um total de 90 isolados avaliados .....	57
<b>Figura 11</b> – Gel de agarose a 1% ilustrando o produto da amplificação do DNA genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR) com o <i>primer</i> INA A para <i>Pantoea ananatis</i> ( <i>Pa</i> ). MM – Marcador Molecular 1Kb plus DNA ladder Invitrogen. Marcações de 1 a 17 representam diferentes isolados de <i>Pa</i> de um total de 90 isolados e marcações 18 e 19, controle negativo (mix) e positivo (isolado WT2), respectivamente .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Localização, número e identificação dos isolados de <i>Pantoea ananatis</i> utilizados no estudo de variabilidade genética com marcadores AFLP.....	37
<b>Tabela 2</b> – Combinação de <i>primers</i> e número de fragmentos amplificados para <i>Pantoea ananatis</i> utilizando marcadores AFLP.....	45
<b>Tabela 3</b> – Medidas de variabilidade genética de populações de <i>Pantoea ananatis</i> coletadas de três regiões brasileiras produtoras de milho.....	51
<b>Tabela 4</b> – Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando marcadores AFLP em três populações de <i>Pantoea ananatis</i> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Adenina-Citosina-Guanina
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AHL	Acil-homoserine-lactona
AMOVA	Análise de Variância Molecular
CAC	Citosina-Adenina-Citosina
CDS	Coding Sequences (Sequências Codificantes)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CT	Citosina-Timina
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
D.O <sub>600</sub>	Densidade ótica a 600 nm
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
Fst	Índice de Fixação alélica
g	Gramas
ITS	Internal Transcribed Spacer (Espaçador Interno Transcrito)
INA	Ice Nucleation (Nucleação de gelo)
INP	Ice Nucleation Protein
kb	Kilobase (1000 pares de base)
kDa	Kilo Daltons (1000 daltons)
MBM	Mancha Branca do Milho
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MFP	Mancha Foliar de Phaeosphaeria
Min	Minutos
mg	Miligramas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
rcf	Relative Centrifugal Force (Força Centrifuga Relativa – Força G)
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico)
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Seg	Segundos
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
THG	Transferência Horizontal Gênica
TSA	Tryptic Soy Ágar
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Unidade
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µL	Microlitros
µg	Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO (ZEA MAYS L.).....	17
2.2	MANCHA BRANCA DO MILHO .....	18
2.2.1	Aspectos Gerais da Doença .....	18
2.2.2	Sintomatologia .....	19
2.2.3	Condições para o Desenvolvimento da MBM .....	21
2.2.4	Manejo da Mancha Branca do Milho (MBM).....	21
2.2.5	Etiologia da Doença.....	22
2.3	PANTOEA ANANATIS: AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO.....	25
2.3.1	“Ice Nucleation” ou Nucleação de Gelo .....	27
2.4	VARIABILIDADE GENÉTICA DE PANTOEA ANANATIS.....	29
2.5	MARCADORES AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM (AFLP) EM ESTUDOS DE POPULAÇÕES .....	31
<b>3</b>	<b>ARTIGO: VARIABILIDADE GENÉTICA E NUCLEAÇÃO DE GELO EM ISOLADOS DE PANTOEA ANANATIS, AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO</b> .....	<b>33</b>
3.1	RESUMO E ABSTRACT .....	33
3.2	INTRODUÇÃO.....	34
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.3.1	Isolados de Pantoea ananatis.....	36
3.3.2	Extrações de DNA .....	38
3.3.2.1	Extração de DNA genômico e identificação dos isolados por PCR .....	38
3.3.2.2	Extração de DNA genômico bacteriano para estudo da variabilidade genética via AFLP .....	39
3.3.2.3	Extração de DNA plasmidial de Pantoea ananatis.....	40
3.3.3	Variabilidade Genética de P. ananatis por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	40
3.3.4	Análises dos Dados de AFLP .....	42

3.3.5	Caracterização dos Isolados de <i>Pantoea ananatis</i> Quanto à Presença do Gene <i>inaA</i> por PCR. ....	42
3.3.6	Caracterização dos Isolados de <i>Pantoea ananatis</i> Quanto à Expressão Fenotípica do Gene <i>inaA</i> .....	43
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.4.1	Identificação Via PCR dos Isolados Bacterianos .....	44
3.4.2	Seleção de Primers para AFLP em <i>P. ananatis</i> .....	45
3.4.3	Variabilidade Genética de <i>Pantoea ananatis</i> .....	46
3.4.4	Plasmídios em <i>Pantoea ananatis</i> .....	55
3.4.5	Presença e Expressão Fenotípica do Gene <i>inaA</i> em <i>Pantoea ananatis</i> .....	57
3.5	CONCLUSÕES .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		61
<b>ANEXOS</b> .....		71
ANEXO A – Meios de cultura, tampões e soluções utilizadas no desenvolvimento da parte prática da dissertação .....		72
ANEXO B – Presença e expressão fenotípica do gene <i>inaA</i> , responsável pela atividade de nucleação de gelo em <i>Pantoea ananatis</i> .....		73

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema atual de produção de milho (*Zea mays* L.) no Brasil está sujeito à ocorrência de várias doenças que podem afetar significativamente a qualidade e a produtividade das lavouras. Entre essas doenças, a Mancha Branca do Milho (MBM) vem ganhando destaque tanto pela sua distribuição geográfica quanto pelos prejuízos que tem causado principalmente aos cultivares mais suscetíveis.

Presente no país desde a década de 80, a doença tem início com o surgimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, de coloração verde-escuro que posteriormente evoluem para necróticas e de cor palha, afetando diretamente a taxa fotossintética líquida da planta e refletindo em danos que podem superar 60% da produção final (PINTO, 1999; CASELA et al., 2006).

O agente causal da doença, *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001) é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante, de colônias amarelas, que sobrevive epifiticamente sobre as folhas do milho e que tem seu desenvolvimento favorecido pelas condições climáticas de temperatura moderada e alta umidade relativa do ar. Condições estas presentes em diversas regiões brasileiras produtoras de milho. Bactérias do gênero *Pantoea* spp. já foram reportadas como causadoras de doenças em diversas culturas como, abacaxi, melão, cebola, eucalipto e sorgo.

Uma característica de *P. ananatis* é a capacidade da bactéria em produzir cristais de gelo em temperaturas em que normalmente o fenômeno não ocorreria. Este fenômeno é denominado “*Ice nucleation*” e pode estar relacionado com a virulência de bactérias fitopatogênicas. A formação dos núcleos de gelo aumenta a probabilidade do surgimento de lesões em plantas, pois a maioria delas são incapazes de tolerar a formação desse gelo em seus espaços intercelulares. Quando sua formação ocorre, a célula vegetal entra em colapso e tem-se o surgimento da mancha de aspecto anasarca nas folhas de milho.

As principais estratégias de controle da doença são baseadas na obtenção de genótipos resistentes, pois sua utilização constitui a fonte mais segura, viável e de menor impacto ambiental para o manejo da MBM (PEREIRA et al., 2005). No entanto, o desenvolvimento de genótipos resistentes, pode muitas vezes ter seu desenvolvimento dificultado pela ausência de informações sobre a

diversidade genética patogênica, resultando na rápida adaptação do microrganismo aos materiais disponíveis no mercado. Desta maneira, o conhecimento da variabilidade genética do patógeno é de fundamental importância para a elaboração e estabelecimento de estratégias de manejo visando a obtenção de níveis mais estáveis de resistência no patossistema.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: (i) investigar a variabilidade genética de isolados de *P. ananatis* de algumas regiões brasileiras produtoras de milho com marcadores *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), a fim de gerar informações relevantes que possam direcionar o manejo da doença e auxiliar os programas de melhoramento de cultivares e (ii) caracterizar estes isolados quanto à presença e expressão do gene *inaA* por PCR e teste físico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

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

O Milho (*Zea mays L.*) é considerado uma das plantas mais cultivadas e uma das mais estudadas. Sua importância é dada pelas diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Seu cultivo é realizado em locais de clima tropical, subtropical e temperado e em altitudes que vão desde o nível do mar até altitudes superiores a 3000 metros. Devido à sua alta adaptabilidade a diversos ambientes, o milho é o cereal mais cultivado do mundo (FILGUEIRA, 2007).

A importância social e econômica se dá principalmente pela geração de empregos e por fornecer produtos largamente utilizados na alimentação humana, tanto na forma “*in natura*” quanto processada, e ainda para a alimentação animal, representando o principal insumo para produção de rações (SILVA, 2005). Os diferentes usos dos seus derivados estendem-se ainda às aplicações industriais e farmacêuticas, podendo ser usado para produção de etanol de amido, plásticos e como base para a produção de antibióticos (HUANG et al., 2006; PAES, 2008). Estima-se que o milho participe como matéria prima de mais de 600 produtos (PINAZZA, 1993).

Os três maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, China e Brasil, que, na safra de 2010/11, produziram: 339,60; 160,00; e 57,122 milhões de toneladas, respectivamente. Esses três países representam um total de 66,68% da produção mundial (FAO, 2012). No Brasil, cerca de 93% da produção e 79% da área total concentram-se nos Estados do Centro-Sul, sendo o Paraná o maior produtor. Em termos de área plantada, a cultura do milho é a segunda mais cultivada do país, com 15,84 milhões de hectares e produtividade média de 4.991 Kg/ha, considerando primeira e segunda safra (CONAB, 2013).

O rendimento de uma lavoura de milho é o resultado do potencial genético da variedade e das condições edafoclimáticas do local de plantio, além do manejo da lavoura. De acordo com Cruz et al. (2004), o potencial da cultivar é responsável por 50% do rendimento final. Contudo, nos últimos anos as doenças têm se tornado uma grande preocupação para o agronegócio do milho, pois relatos

de perdas na produtividade devido ao ataque de patógenos têm sido cada vez mais frequentes nas principais regiões produtoras do cereal no país (EMBRAPA, 2009).

As modificações ocorridas ao longo dos anos no sistema de produção, que resultaram no aumento da produtividade na cultura, foram ao mesmo tempo, as responsáveis pelo aumento e severidade das doenças. Assim, a expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, ausência de rotação de cultura, utilização de híbridos suscetíveis, entre outros fatores, têm favorecido modificações importantes na dinâmica populacional de patógenos, resultando no aparecimento, a cada safra, de novos problemas fitossanitários (EMBRAPA, 2009).

A importância de cada doença varia de ano para ano e de região para região, em função das condições climáticas, do nível de suscetibilidade das cultivares utilizadas e do sistema de plantio utilizado. No entanto, algumas das doenças são de ocorrência mais generalizada nas principais regiões de plantio, como por exemplo, a Mancha Branca do Milho (MBM) (EMBRAPA, 2009).

## 2.2 MANCHA BRANCA DO MILHO

### 2.2.1 Aspectos Gerais da Doença

Presente em quase todas as áreas onde o milho é cultivado, a Mancha Branca do Milho (MBM) (Figura 1), também conhecida como Pinta Branca, é considerada uma doença de caráter endêmico em algumas regiões do Brasil. Seu agente causal é a bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PACCOLA-MEIRELLES, 2008; BOMFETI et al., 2008), e vem se destacando como uma das mais importantes entre as doenças foliares do milho.

A alta incidência e a severidade com que ocorre, tem contribuído significativamente para a redução dos índices de produtividade da cultura, e estes são ainda maiores em genótipos mais suscetíveis (PINTO, 1997). Híbridos que antes eram considerados resistentes em determinados locais têm se tornados suscetíveis em outros, o que demonstra certa instabilidade na resistência genética a MBM (SOUZA; DUARTE, 2002).

Em materiais mais suscetíveis, a ocorrência da MBM antes ou durante o florescimento pode provocar um aspecto de queima intensa na planta,

reduzindo o ciclo da cultura em decorrência da redução da área fotossintética. A presença de 10-20% de severidade reduz a fotossíntese líquida em aproximadamente 40%, ocasionando neste caso, reduções equivalentes a 60% na produção final da cultura (PINTO, 1999; GODOY et al., 2001). Reduções de até 60% na produtividade da cultura também foram relatados por Rolim et al. (2007) quando as condições ambientais foram favoráveis ao desenvolvimento da doença.

No Brasil, até a década de 1980, a doença era restrita ao milho de final de ciclo, sem provocar danos importantes na qualidade e no rendimento final de grãos. Desta maneira, ela foi considerada de importância econômica secundária. No entanto hoje, a doença tem surgido em plantas mais jovens ocasionando a seca prematura quando em ataques mais severos (CERVELATTI et al., 2002). Além disso, apresenta-se distribuída em todas as áreas produtoras de milho, predominando nas regiões altas dos trópicos, onde se registra maior intensidade de chuvas e temperaturas mais amenas (CARSON, 1999 e 2001).

**Figura 1** – Sintomas da doença Mancha Branca do Milho.



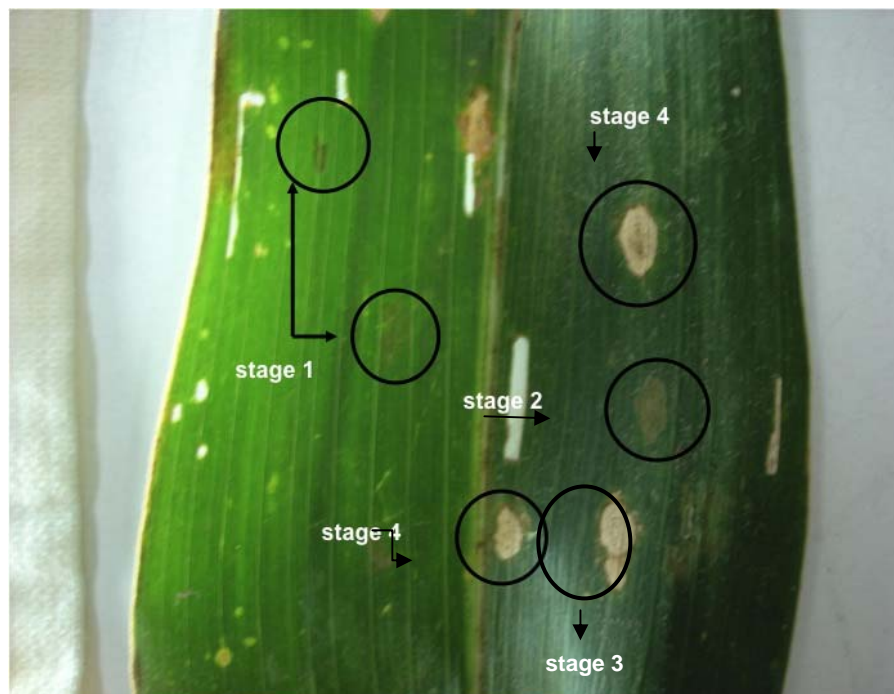
### 2.2.2 Sintomatologia

O início da doença se dá com o surgimento de lesões aquosas, do tipo anasarca, de coloração verde-escuro e que evoluem para lesões necróticas e de coloração palha (Figura 2). Em geral, as lesões apresentam formato oblongo e

irregular, medindo entre 0,3 a 2,0 cm, dependendo do nível de resistência genética do material (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002). Na maioria dos genótipos de milho, os sintomas surgem inicialmente nas folhas inferiores, progredindo rapidamente em direção ao ápice da planta, tornando-se mais severos após o pendoamento (SAWAZAKI et al., 1997).

As lesões são classificadas de acordo com a sua morfologia e estágios, sendo o estágio 1: manchas esverdeadas do tipo anasarca; estágio 2: manchas acinzentadas; estágio 3: manchas necróticas sem estruturas reprodutivas fúngicas visíveis; estágio 4: manchas necróticas com estruturas fúngicas visíveis (Figura 2) (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), como pseudotécios e picnídios (FANTIN,1994), ou peritécios e picnídios (PINTO et al., 1997; FERNANDES; OLIVEIRA (2000).

**Figura 2** – Lesões características da Mancha Branca do Milho classificadas de acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001). Estágio 1: manchas esverdeadas do tipo anasarca; estágio 2: manchas acinzentadas; estágio 3: manchas necróticas sem estruturas reprodutivas fúngicas visíveis; estágio 4: manchas necróticas com estruturas fúngicas visíveis.



### 2.2.3 Condições para o Desenvolvimento da MBM

A doença é favorecida por temperaturas moderadas, em torno de 14 °C e alta umidade relativa do ar associada a frequentes períodos de chuva (SAWAZAKI et al., 1997). Altos níveis de severidade foram observados quando a temperatura mínima do ar e a umidade relativa foram inferiores a 14°C e 60%, respectivamente, ou quando a temperatura foi superior a 14 °C e umidade relativa superior a 65%. Sob temperatura mínima superior a 14 °C e umidade relativa abaixo de 60%, não foi relatada incidência da doença, indicando que a umidade é um fator determinante para o surgimento das lesões foliares (FERNANDES et al., 1995).

Estudos referentes à ocorrência da MBM no Estado de São Paulo entre os anos de 2001 e 2005, durante o período de safrinha, demonstraram que houve favorecimento da doença quando ocorreu acúmulo térmico de 2900 °C, concomitante a um acúmulo de 350 mm de precipitação no período de cinco meses contabilizados desde a semeadura (ROLIM et al., 2007), independente da cultivar ser resistente, moderadamente resistente ou suscetível.

Outros fatores além do clima podem predispor as plantas ao ataque de patógenos, como por exemplo, o manejo da adubação, a época da semeadura e o método de plantio empregado. A prática de semeadura direta pode elevar significativamente o potencial de inóculo na área ao longo do tempo, sujeitando a ocorrência da doença em alta severidade (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000).

### 2.2.4 Manejo da Mancha Branca do Milho (MBM)

Atualmente, o método de controle mais empregado e mais eficiente é o uso da resistência genética, principalmente em regiões onde as condições meteorológicas são mais favoráveis ao desenvolvimento da doença (PEREIRA et al., 2005), pois seu uso não exige custo adicional ao produtor, nem impacto negativo sobre o meio ambiente.

No entanto, algumas medidas gerais de controle podem auxiliar na redução do inóculo inicial e nos danos causados pela doença, como por exemplo: (a) utilização de cultivares menos suscetíveis; (b) plantio em época adequada, de modo a evitar que os períodos críticos para a cultura não coincidam com condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento da doença; (c) utilização de

sementes tratadas e de boa qualidade; (d) realização da rotação com culturas não suscetíveis; (e) rotação de cultivares; (f) manejo adequado de adubação da lavoura, (g) eliminação de restos culturais, entre outras (EMBRAPA, 2009).

Com relação à época da semeadura, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, os plantios tardios realizados entre os meses de novembro a março são os mais favoráveis às altas infecções. Recomenda-se sempre que possível, realizar o plantio antecipado, entre os meses de setembro e outubro (EMBRAPA, 2009).

Tais medidas contribuem, sobretudo para uma maior durabilidade e estabilidade da resistência genética existente nas cultivares comerciais, por reduzirem a população do agente patogênico (EMBRAPA, 2009).

#### 2.2.5 Etiologia da Doença

No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência da doença constam da década de 80. Inicialmente ela foi descrita por Fantin (1994) como sendo a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* (MFP), descrita na Índia e causada pelo ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* (Henn.) Rane, Payak and Renfro (sin. *Sphaerulina maydis* Henn.), forma imperfeita *Phyllosticta* sp. (RANE et al., 1966). Posteriormente, a forma anamórfica para *P. maydis* foi descrita como *Phoma maydis* por Carson (1999).

Desde então muitas publicações aceitaram *P. maydis* como o agente causal da doença. No entanto, nas últimas décadas este tem sido motivo de controvérsias e discussão entre a comunidade científica. Vários autores relataram a dificuldade em isolar e completar os postulados de Koch com o referido fungo, gerando desta forma, dúvidas a respeito do verdadeiro agente etiológico da doença (SAWAZAKI et al., 1997; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; AMARAL et al., 2005),

O diagnóstico da doença no Brasil era feito considerando-se apenas os aspectos visuais de lesões na planta a campo, e descrições visuais das estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas, presentes nas lesões (FANTIN, 1994). No entanto, alguns autores relataram um baixo, ou até mesmo nulo índice de isolamento do fungo *P. maydis*, mesmo em áreas onde a incidência da doença é considerada alta (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001, CERVELATTI et al., 2002; AMARAL et al., 2004; 2005; CARLI, 2008). Além disso, estruturas características de

*P. maydis* (peritécios) ou *Phyllosticta* sp (picnídios) nem sempre podem ser encontrados nas lesões (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1998; FERNANDES, 2004).

A confusão aumentou quando AMARAL et al. (2004, 2005), descreveram os fungos *P. sorghina*, *Phoma* sp. (Seção Plenodomus), *Phyllosticta* spp. e *Sporormiella* sp. como os agentes causadores dos sintomas da doença. No entanto, a incidência de cada uma dessas espécies foi restrita a uma condição ambiental específica e variou de acordo com as regiões e estações do ano (AMARAL et al., 2005). Segundo esses autores, os resultados suportam a hipótese de que vários patógenos estariam envolvidos com os sintomas MFP e que as condições ambientais poderiam influenciar a predominância de um ou outro agente causal. Carli (2008) também relatou a ocorrência de *P. sorghina* e *Phoma* sp. associados com a MFP em seis ambientes diferentes, sendo que a espécie *P. sorghina* predominou em quatro locais e *Phoma* sp. mostrou-se muito frequente em dois deles.

Paccola-Meirelles et al., (2001) descreveram a bactéria *Pantoea ananatis* como sendo o agente causador da doença. Plantas inoculadas com a bactéria em condições controladas reproduziram os sintomas típicos da doença entre 5 a 7 dias após a inoculação. Os autores confirmaram os postulados de Koch e sugeriram a denominação de Mancha Branca do Milho (MBM) à doença (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001, 2002).

A interação entre a bactéria *P. ananatis* com as diferentes espécies de fungos foi proposta por Vieira et al. (2009) como necessária para a reprodução dos sintomas da doença.

O conjunto de informações conflitantes sobre o agente causal da MFP apontou para a necessidade de estudos mais detalhados sobre essa doença. Assim, recentemente, Gonçalves et al., (2013) estudaram conjuntamente os fungos e as bactérias presentes nas lesões da MBM, e por meio de técnicas moleculares de análise, concluíram que a bactéria *Pantoea ananatis* é o agente causal da MBM e que diferentes espécies de fungos oportunistas, incluindo aquelas descritas por alguns autores como sendo o agente etiológico da doença, podem colonizar as lesões pré-estabelecidas pela bactéria.

Os autores realizaram o isolamento do DNA genômico de: 1) cada um dos quatro estágios de desenvolvimento das lesões da MBM; 2) fungos e bactérias presentes em lesões naturais a campo e de lesões artificiais produzidas a

campo com nitrogênio líquido; 3) fungos isolados de lesões induzidas em casa de vegetação após inoculação com a bactéria *Pantoea ananatis*. Estes DNAs foram utilizados em reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando *primers* universais para genes RNAr específicos para bactérias e fungos, e os *primers* espécie-específicos para *Pantoea ananatis*. Amplicons bacterianos foram observados em todos os estágios das lesões e amplicons fúngicos foram obtidos somente em lesões de estágios adiantado de necrose (estágios 3 e 4). Os amplicons bacterianos obtidos diretamente das lesões foram identificados como pertencentes à *P. ananatis*, enquanto que os amplicons fúngicos eram pertencentes às espécies *Phaeosphaeria* sp. e *Phoma* sp. O DNA das bactérias isoladas de lesões naturais, lesões artificiais, e lesões em casa de vegetação permitiram identificá-las como *Pantoea ananatis*, *Bacillus subtilis* e *Pantoea ananatis*, respectivamente, enquanto que os fungos pertenciam às espécies: *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaeria sacchari*, *Cochliobolus geniculatus*, *Pithomyces chartarum*, *Alternaria alternata*, *A. ricini*, *Gibberella intricans*, *G. fujikuroi*, *Phaeosphaeria* sp., *P. avenaria*, *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Sarocladium strictum*, *Glomerella graminicola*, and *Cochliobolus heterostrophus*. Neste mesmo trabalho, Gonçalves et al. (2013) relataram que os sintomas da doença foram reduzidos em 90% após aplicação foliar a campo do antibiótico oxitetraciclina. A adição deste ao meio de cultivo inibiu completamente o crescimento de *Pantoea ananatis*.

Os resultados apresentados por Gonçalves et al. (2013) mostraram que a bactéria *P. ananatis* está presente desde os primeiros estádios de desenvolvimento das lesões da MBM, enquanto diferentes espécies de fungos aparecem apenas em lesões de estágio avançado e o crescimento de diferentes espécies fúngicas encontradas frequentemente em lesões naturais da doença, incluindo algumas descritas como o agente causal da doença, ocorrem também em lesões artificiais. Esse conjunto de resultados reforça a hipótese de que a doença “MFP” de milho é causada pela bactéria *Pantoea ananatis* conforme foi postulado por Paccola-Meirelles et al. (2001), e não por uma espécie-específica de fungo ou mesmo por um complexo de espécies de fúngicas, conforme relatado anteriormente (RANE et al., 1966; CARSON et al., 1991; FANTIN, 1994; AMARAL et al., 2004, 2005; CARSON, 2005; CARLI, 2008).

### 2.3 PANTOEA ANANATIS: AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO

*Pantoea ananatis* é uma bactéria Gram-negativa, formadora de colônias mucóides de coloração amarelo brilhante, bordos regulares, não esporulante, anaeróbica facultativa (Figura 3). Pertence à família *Enterobacteriaceae* no grupo *Gammaproteobacteria*, apresentando um cromossomo e um plasmídeo (CHOI et al., 2012; DE MAAYER et al., 2012). De acordo com Paccola-Meirelles et al. (2001), a frequência de isolamento desta bactéria é de 63% maior em estágios iniciais de desenvolvimento das lesões em plantas de milho, diminuindo consideravelmente em estágios seguintes.

**Figura 3** – Colônias típicas de *Pantoea ananatis* cultivadas *in vitro*.



A espécie *P. ananatis* têm sido reportada como patogênica a várias culturas. Em milho ela foi descrita causando a doença foliar pela primeira vez no Brasil por Paccola-Meirelles et al. (2001), na África do Sul por Goszczynska et al. (2007), no México por Pérez-y-Terrón et al. (2009), na Argentina por Alippi & López (2010) e na Polônia por Krawczyk et al. (2010).

Estudos de Azad et al. (2000), descreveram *P. ananatis* como a causadora de uma nova doença em capim-sudão (*Sorghum sudanense*), onde manchas brancas de margens marrom-escuras estiveram associadas à presença de *P. ananatis*. A espécie também já foi relatada na cultura do abacaxi (*Ananas comosus* L.) (SERRANO, 1928), cebola (*Allium cepa* L.), nesta última, causando podridão central (GITAITIS et al., 2002). É também considerada o agente causal de doenças em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) (COTA et al., 2010), eucalipto

(*Eucalyptus* spp) (COUTINHO et al., 2002) e melão (*Cucumis melo* L.) (BRUTON et al., 1991).

*Pantoea ananatis* sobrevive epifiticamente em folhas de milho. Populações de bactérias fitopatogênicas que residem epifiticamente sobre plantas podem progredir em tamanho mesmo na ausência da manifestação da doença sobre as folhas. O tamanho destas populações pode variar em função da linhagem bacteriana e da suscetibilidade do hospedeiro (O'BRIEN; LINDOW, 1989). A idade e estrutura da planta também contribuem para o aumento da população bacteriana. Elementos como pilosidade, densidade estomática e taxa de transpiração, são características que podem apresentar correlação positiva com populações de microrganismos foliares, podendo fornecer microclima favorável ao crescimento epifítico na filosfera (DE COSTA et al., 2006).

Algumas espécies bacterianas, incluindo as do gênero *Pantoea*, apresentam mecanismos químicos de comunicação intercelular descritos como “*quorum-sensing*” (POMINI et al., 2006), que permitem a percepção da densidade populacional entre as bactérias. Esta comunicação é resultado da secreção de sinais moleculares, sintetizados por células individuais (RUMJANEK et al., 2004). Em *P. ananatis*, a molécula sinalizadora da *quorum-sensing* é a acil-homoserine-lactona (AHL) e sua produção já foi reportada em isolados de abacaxi (POMINI et al., 2006) e de milho (POMINI et al., 2007). Esta substância é a mesma produzida por *Pantoea stewartii*, agente causal da murcha do milho doce, e que regula a expressão de exopolissacarídeos que conferem proteção à célula bacteriana contra mecanismos de defesa do hospedeiro, obstruindo a circulação de fluídos no tecido vegetal, podendo levar a morte da planta (BODMAN; FARRADN, 1995).

Para várias espécies bacterianas esse fenômeno é de grande importância para a sobrevivência como também para a patogenicidade, uma vez que a expressão da virulência pode se encontrar sob controle do sistema de “*quorum-sensing*” (PEARSON et al., 1994). De modo geral, as bactérias utilizam este mecanismo para regular atividades como simbiose, conjugação, produção de antibióticos, mobilidade, entre outros (MILER; BASSLER, 2001).

### 2.3.1 “Ice Nucleation” ou Nucleação de Gelo

Outra característica de *P. ananatis* é a capacidade de catalisar a produção de cristais ou núcleos de gelo em temperaturas em que normalmente o fenômeno não ocorreria, temperaturas um pouco abaixo de 0 °C (WYSMIERSKI et al., 2005). É sabido que a água pura exposta a pressão atmosférica e em temperatura de 0 °C não congela espontaneamente, ao contrário ela permanece líquida e sofre apenas um super resfriamento. O congelamento da água pura acontece em temperaturas abaixo de -40 °C (RASMUSSEN; MACKENZIE, 1973). Por outro lado, a presença de determinadas substâncias ou de pequenas impurezas na água super-resfriada, provoca seu congelamento. Partículas químicas inorgânicas (incluindo AgI – iodeto de prata) provocam o congelamento da água mesmo esta não estando super-resfriada. Segundo Zettlemeier et al. (1961), quando pequenas quantidades de AgI é adicionada na água ocorre a formação de gelo a temperatura de -8 °C. No entanto, Maki et al. (1974) descreveram uma bactéria indutora de nucleação de gelo em água supercongelada. Posteriormente Lindow (1982), encontrou isolados bacterianos que provocaram o congelamento da água a uma temperatura de -1 °C a -3 °C. Algumas espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Pantoea* (*Erwinia*) são ativas na nucleação de gelo e são fenotipicamente conhecidas como INA+ (LINDOW et al., 1982). Estão amplamente distribuídas no ambiente sendo encontradas no solo, na superfície foliar de plantas e na palhada (Lindow, 1982).

As bactérias nucleadoras de gelo podem causar danos à planta devido ao congelamento, pois diversas plantas são incapazes de suportar a formação de gelo nos espaços intercelulares e quando isso ocorre, causam colapso da célula vegetal, surgindo então a mancha de aspecto anasarca. Esta é uma propriedade que pode estar relacionada à virulência de bactérias fitopatogênicas e é denominado como “Ice Nucleation” ou Nucleação de gelo (LINDOW, 1983; LINDOW; ARNY; UPPER, 1982).

Na maioria dos casos a nucleação do gelo é uma característica resultante do produto de um único gene (ORSER et al., 1983). A partir de várias espécies de bactérias foram identificados os seguintes genes: *inaZ* (GREEN; WARREN, 1985), *inaC* (LINDOW et al., 1989) e *inaV* (WARREN, 1995) de *Pseudomonas syringae*; *inaW* (WARREN et al., 1986) de *P. fluorescens*; *inaE*

(WARREN; COROTTO, 1989) de *Erwinia herbicola*; *inaA* (ABE et al., 1989) de *Pantoea ananatis* (*E. ananas*); *inaU* (MICHIGAMI et al., 1994) de *E. uredovora*; *inaX* (ZHAO & ORSER, 1990) de *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*.

Sequências do gene *ina*, que codifica para uma proteína, denominada INP (*ice nucleation protein*), foram identificadas em espécies bacterianas como *Pantoea ananatis* (syn *Erwinia ananas*), *E. herbicola*, *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava* e *Xanthomonas campestris*, (GREEN; WARREN, 1985; WARREN et al., 1986; ABE et al., 1989; WARREN; COROTTO 1989; ZHAO; ORSER 1990). Esta proteína está localizada na superfície da membrana celular e de acordo com Lindow (1983), os genes para nucleação de gelo encontram-se agrupados no cromossomo da bactéria.

Segundo Kawahara (2002) estes genes, codificam proteínas INPs de 120-180 kDa, com estruturas primárias semelhantes entre as espécies bacterianas. A INP é composta de *repeats* contíguos de um octapeptídeo (Ala-Gly-Tyr- Gly-Ser-Thr-Leu-Thr). O ativador da nucleação de gelo contido na INP consiste de três domínios distintos: um único domínio N-terminal (aproximadamente 15% da sequência total), o qual é relativamente hidrofóbico e contém uma âncora, um mannan – phosphatidylinositol, que liga a proteína à membrana; um domínio C-terminal único (aproximadamente 4%), rico em resíduos básicos e muito hidrofílico; e um *repeat* central (cerca de 80%), o qual é hidrofílico e rico em alanina, glicina, tirosina, treonina, serina e leucina.

A comparação dos dados da sequência da proteína INP revelou uma leve semelhança na identidade de aminoácidos (60,6% a 65,0%) entre os genes das diferentes espécies de bactérias (WARREN, 1995). Em contraste, uma elevada semelhança na identidade de aminoácidos (98,3%) foi detectado entre *inaA* (*P. ananatis*) e *inaE* (*E. herbicola*), como a similaridade (96,7%) entre *inaW* e *inaZ* da espécie *P. syringae*. Watanabe e Sato (1998) sugerem que o tamanho ou a estrutura dos genes *ina* podem variar dentro da mesma espécie bacteriana.

Em *Erwinia herbicola*, a atividade *Ice nucleation* é influenciada pelo meio de cultivo da bactéria, sendo ela mais ativa em meio de cultura acrescido com 2,5% de glicerol ou glucose (LINDOW et al., 1978). Nesta mesma espécie, Phelps et al. (1986) descreveram a liberação de gelo no meio de cultura através de vesícula limitadas por membranas, quando a bactéria foi cultivada a 15 °C.

*Erwinia ananas* (cepa IN-10), teve sua atividade descrita por Watanabe e Arai (1987). Neste trabalho foi relatado que esta cepa possuía capacidade de congelamento de água mais eficiente que outras cepas dentro da espécie também avaliadas, indicando que variações quanto à capacidade de nucleação do gelo podem ocorrer dentro de uma mesma espécie, e até mesmo dentro de uma mesma população. Nem todos isolados bacterianos portadores do gene obrigatoriamente expressam o fenótipo para nucleação de gelo. Esta distribuição variada sugere que o gene INA possivelmente tenha seguido um caminho evolutivo, como por exemplo, a transferência horizontal (EDWARDS et al., 1994).

#### 2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE *PANTOEA ANANATIS*

A diversidade genética é a variação hereditária devido à constituição genética dos indivíduos de uma população, sendo responsável por parte das suas diferenciações fenotípicas (TORRES et al., 2000). Sua amplitude e distribuição são de grande interesse para o conhecimento do potencial genético de espécies e de suas populações, além de ser fator fundamental para mudanças evolucionárias. É assim, responsável pela adaptação e sobrevivência dos organismos frente às mudanças ambientais, barreiras biológicas, genéticas ou geográficas (RAJORA; PLUHAR, 2003).

A importância das bactérias como patógenos de plantas se dá pela severidade das doenças que provocam em culturas de interesse econômico, pela sua rápida disseminação e dificuldades em controlá-las (ROMEIRO, 2005). Estes atributos estão associados à alta adaptabilidade que as bactérias apresentam, capacitando sua sobrevivência em diversas condições como: diferentes climas, estágios fenológicos de hospedeiro e a capacidade em desenvolver resistência a defensivos utilizados para seu controle (ROMEIRO, 2005). Portanto, é importante que sejam compreendidos os processos evolutivos das populações bacterianas, para que seja possível traçar e avaliar os impactos de ações dentro de um programa de controle de doenças, como por exemplo, a utilização adequada de determinado antibiótico (HANAGE et al., 2006).

Os principais mecanismos responsáveis pelo surgimento e ampliação da diversidade genética em bactérias são: mutação, recombinação e

aquisição de sequências de DNA de outros organismos, esta última denominada transferências horizontais gênicas (THG), onde os genes podem ser adquiridos de outros microrganismos da mesma geração por mecanismos denominados como transdução, transformação ou conjugação (ARBER, 2000).

Ao se estudar a estrutura de populações de patógenos de plantas, é possível mensurar a variabilidade genética que ocorre dentro da população e assim estabelecer as relações genéticas que existem dentro e entre subpopulações e até mesmo comparar populações de isolados (MUNHOZ, 2009).

Estudos sobre a diversidade genética de *Pantoea ananatis* ainda são escassos, porém um trabalho já realizado com a técnica de rep-PCR com isolados obtidos de plantas de milho, sorgo e capim-colchão, mostrou existir aparentemente alta variabilidade genética entre os isolados dos diferentes hospedeiros. No entanto, o trabalho foi conduzido com uma pequena população bacteriana obtida de uma única região do país. Os autores citam a importância de mais estudos sobre a variabilidade genética de *P. ananatis* em outras regiões geográficas do país, para o estabelecimento de estratégias de controle eficientes e duráveis para a doença (LANA et al., 2012).

O sequenciamento completo do genoma de *P. ananatis* (LMG20103), um isolado patogênico altamente virulento em eucalipto foi realizado recentemente, porém, a epidemiologia de doenças causadas por esta espécie em diferentes hospedeiros é relativamente desconhecida, apesar de relatos da influência de fatores ambientais na severidade das doenças (DE MAAYER et al., 2010).

Assim, o conhecimento da variabilidade genética pode fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da perspectiva evolutiva, interação patógeno x hospedeiro e definição das melhores estratégias de controle, principalmente para aquelas voltadas ao desenvolvimento de cultivares resistentes, que se destaca como a forma mais viável, segura e de menor impacto ambiental para o manejo de doenças em plantas (PEREIRA; et al., 2005).

## 2.5 MARCADORES *AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM* (AFLP) EM ESTUDOS DE POPULAÇÕES

Entre os marcadores mais utilizados atualmente para estudos de genética populacional, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados) destaca-se por se tratar de uma técnica multilocus, com alto poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade no ensaio. É uma técnica que apresenta alto índice de eficiência devido à possibilidade de analisar um grande número de polimorfismos simultaneamente, com ampla cobertura do genoma, onde o perfil de bandas gerado é resultado de variações nos sítios de restrição das enzimas utilizadas (VOS et al., 1995).

A metodologia é baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmentos e é aplicada em quatro etapas: (a) inicialmente é realizada clivagem do DNA genômico com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (corte em sítios de 6-8 nucleotídeos), como por exemplo, a *EcoRI*, e uma outra enzima de corte frequente, que reconhece sítios de corte com quatro nucleotídeos, como a *MseI*. Em seguida, (b) é realizada a ligação de adaptadores (*primers*) às extremidades complementares geradas na clivagem das enzimas restrição. Posteriormente (c) é realizada a amplificação pré-seletiva utilizando-se *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' dos adaptadores, e por fim (d) é promovida um amplificação seletiva com *primers* contendo de dois a três nucleotídeos adicionais na extremidade 3' dos *primers* pré-seletivos (VOS et al., 1995).

As vantagens do AFLP é que a técnica pode ser usada em organismos para os quais não se tem informações genéticas anteriores (BONIN et al., 2007); resulta em um alto número de bandas que podem ser analisadas em um único gel, proporcionando uma amostragem ampla e simultânea de um genoma; fácil reprodução entre laboratórios devido ao fato dos *primers* usados na reação serem específicos para o adaptador, o que permite o uso de condições mais estridentes para o anelamento do *primer*, aumentando assim a especificidade da reação (VOS et al., 1995).

Os marcadores AFLP encontram-se amplamente dispersos no genoma e são considerados anônimos e neutros, pois representam áreas genômicas que podem ou não estarem sujeitas à pressão de seleção. Assim, com

estas marcas, é possível acessar diferentes *back grounds* genéticos de linhagens bacterianas (RESTREPO et al., 1999).

Por outro lado, a técnica apresenta algumas limitações, como por exemplo, a necessidade de otimização prévia para obtenção máxima no padrão de bandas; custo elevado quando comparado a outros marcadores, como por exemplo, o RAPD. No entanto, depois de implementada, a técnica pode ser aplicada em qualquer genoma. Por tratar-se de um marcador dominante, o AFLP não permite a diferenciação entre genótipos heterozigotos e homozigotos e por isso gera um menor conteúdo de informação por *locus* (FERREIRA, 2003). Para uso eficiente dos marcadores AFLP, é necessário que o DNA extraído apresente ótima qualidade e alta pureza, para que as etapas de digestão enzimática e amplificação não sejam afetadas (OLIVEIRA et al., 2011).

Estes marcadores, por permitirem a análise de um grande número de locus por reação e reprodutibilidade de resultados, já foram utilizados para análises moleculares de diversos microrganismos fitopatogênicos (BENTES; COSTA NETO, 2011; DINI-ANDREOTE et al., 2009; LORETI et al., 2001; MUNHOZ, 2009).

### 3 ARTIGO: VARIABILIDADE GENÉTICA E NUCLEAÇÃO DE GELO EM ISOLADOS DE *PANTOEA ANANATIS*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA BRANCA DO MILHO

#### 3.1 RESUMO E ABSTRACT

Resumo: A variabilidade genética de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho (MBM), foi realizada através de marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), utilizando os *primers* *EcoRI-ACG/MseI-CT*, *EcoRI-ACG/MseI-CAC*, e *EcoRI-ACG/MseI-CAG*. Os isolados também foram caracterizados quanto ao número de plasmídios, extraídos por lise alcalina; e caracterizados quanto à presença e expressão fenotípica do gene *inaA*, responsável pela ocorrência da nucleação de gelo na espécie. A presença do gene foi realizada por PCR utilizando *primers* bacterianos específicos (upper INA A/lower INA A). A expressão do caráter foi confirmada através da adição de 0,1mL de cultura bacteriana em água ultra-pura na temperatura de -10 °C. Dados de similaridade genética permitiram separar em dois grupos noventa isolados de *Pa*, entretanto, não foi observada correlação entre o local de coleta com a composição dos mesmos. A porcentagem de polimorfismo encontrada em *P. ananatis* variou de 24,64% a 92,46% e a diversidade gênica de 0,07 a 0,09. A análise de variância molecular mostrou que 99,18% da variabilidade genética observada encontra-se dentro das populações. Os resultados obtidos apontam para a ação de forças evolutivas sobre as populações estudadas, o que, no entanto, só serão elucidadas através de novos estudos, com amostragens populacionais mais homogêneas. Este é o primeiro relato da descrição de plasmídio de *P. ananatis* provenientes de lesões da MBM. Isolados de *P. ananatis* apresentam pelo menos um plasmídio com tamanho estimado com base na literatura entre 280-352 kb. Estudos subsequentes irão promover quantificação real do tamanho deste plasmídio. Correlação positiva entre a detecção do gene *inaA* e a atividade de nucleação de gelo foi obtida em *P. ananatis*. Três isolados não amplificaram para o *primer* e 20% dos isolados, embora portadores do gene *inaA*, não manifestaram o fenótipo INA+. Concluiu-se que esta é uma propriedade dependente de características de cada indivíduo, pois sua presença no genoma não implica na manifestação fenotípica.

**Palavras-chaves:** AFLP. Diversidade genética. Pinta branca do milho. Plasmídios. Resistência genética.

## GENETIC VARIABILITY AND ICE NUCLEATION IN ISOLATES OF *PANTOEA ANANATIS*, CAUSAL AGENT OF MAIZE WITH SPOT

**Abstract:** The genetic variability of *Pantoea ananatis*, causal agent of Maize White Spot (MWS) was performed using molecular markers AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) with primers *EcoRI*-ACG/*MseI*-CT, *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAC and *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAG. The isolates were also characterized regarding the number of plasmids extracted by alkaline lysis, and characterized for phenotypic expression and the presence of the *inaA* gene, responsible for the occurrence of ice nucleation in the species. The presence of the gene was performed by PCR using specific bacterial primers (upper INA / INA lower A). The character expression was confirmed by addition of 0.1 mL of bacterial culture in ultra-pure water at temperature of -10 °C. Database of genetic similarity allowed separating into two groups ninety isolates of *Pa*, however, there was no correlation between the collection site with their composition. The percentage of polymorphism found in *P. ananatis* ranged from 24.64% to 92.46% and gene diversity from 0.07 to 0.09. The analysis of molecular variance showed that 99.18% of the genetic variability was found within populations. The results point to the action of evolutionary forces on the populations studied, which, however, will only be elucidated by further studies with more homogeneous population. This is the first report describing plasmid of *P. ananatis* from the MWS lesions. Isolates of *Pa* has at least one plasmid with size estimated based on literature between 280-352 kb. Subsequent studies will promote accurately quantify the size of this plasmid. A positive correlation between detection of gene *inaA* and ice nucleation activity was obtained for *P. ananatis*. Three isolates were not amplified for the primer and 20 % of the isolate, although carriers of *inaA* gene not expressed INA+ phenotype. It was concluded that this property is dependent on characteristics of each individual, since its presence in the genome does not imply phenotypic manifestation.

**Key-words:** AFLP. Genetic diversity. Genetic resistance. Maize white spot. Plasmids.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Considerada uma das plantas mais antigas e mais estudadas, o milho (*Zea mays* L.) tem sua importância econômica e social atribuída principalmente à geração de empregos e pelo fornecimento de produtos extensivamente utilizados para a alimentação humana e animal. A cultura encontra-se amplamente distribuída no Brasil, porém está sujeita à incidência de várias doenças que acarretam perdas significativas na produção, dentre as quais se destaca a Mancha Branca do Milho (MBM).

Causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), a doença tem início na maioria dos genótipos de milho nas folhas

inferiores da planta, atingindo rapidamente o ápice da mesma (SAWAZAKI et al., 1997), manifestando-se na forma de lesões aquosas do tipo anasarcas. Estas lesões apresentam inicialmente coloração verde-escuro e em estágios mais avançados, evoluem para necróticas e de cor palha (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

Algumas espécies bacterianas, incluindo as do gênero *Pantoea* possuem a capacidade de formar núcleos ou cristais de gelo sob temperaturas em que normalmente o fenômeno não ocorreria, temperaturas um pouco abaixo de 0 °C. Fenômeno conhecido como nucleação de gelo ou “*Ice nucleation*” (MAKI et al., 1978; LINDOW; ARNY; UPPER, 1982). Diversas plantas são incapazes de suportar a formação de gelo nos espaços intercelulares e quando isso ocorre, provoca um colapso da célula vegetal, com rompimento da parede celular, ocasionando o surgimento de uma mancha de aspecto encharcado. Este fenômeno pode ser o responsável pelo surgimento das lesões anasarcas em folhas de milho e está relacionado com a virulência de muitas bactérias causadoras de doenças em plantas. Bactérias que apresentam esta característica são fenotipicamente conhecidas como INA+ (LINDOW; ARNY; UPPER, 1982) e na maioria dos casos, é devido ao produto de um único gene (ORSER et al., 1983). Não são todos os isolados bacterianos portadores do gene que expressam o fenótipo positivo, o que sugere que a capacidade para nucleação de gelo pode ser dependente de características individuais dos isolados ou das condições de crescimento, como por exemplo, a temperatura ou nutrientes adicionados ao meio de cultivo (NEJAD et al., 2006).

A medida mais eficiente e econômica de controle da doença é a utilização da resistência genética, principalmente em locais onde as condições meteorológicas são favoráveis ao desenvolvimento da MBM (PEREIRA et al., 2005). Entretanto, o desenvolvimento e sucesso dos programas de melhoramento de plantas visando resistência a doenças, especialmente quanto à estabilidade e durabilidade da mesma, dependem do conhecimento sobre a variabilidade genética do patógeno.

A variabilidade genética é a variação hereditária devido à constituição genética dos indivíduos de uma população, sendo responsável por parte das suas diferenciações fenotípicas (TORRES et al., 2000). Sua amplitude e distribuição são de grande interesse para o conhecimento do potencial genético de espécies e de suas populações, além de ser fator fundamental para mudanças

evolucionárias. Tais informações podem fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da perspectiva evolutiva da espécie, das interações patógeno x hospedeiro, além de auxiliar no desenvolvimento e aplicação de melhores estratégias de controle e manejo de doenças de plantas (PEREIRA et al., 2005).

Embora o conhecimento sobre a variabilidade genética de *Pantoea ananatis* ainda seja incipiente, estudos tem indicado alta presença de variabilidade do patógeno em milho quando comparados a isolados bacterianos de *P. ananatis* de outras culturas, no entanto, estes trabalhos foram conduzidos com um número reduzido de indivíduos e coletados de uma única região geográfica do Brasil (LANA et al., 2012).

Neste sentido, este trabalho teve por objetivos estudar a variabilidade genética de isolados de *P. ananatis* de diferentes regiões brasileiras produtoras de milho, a fim de gerar informações relevantes que possam direcionar o manejo da doença e auxiliar os programas de melhoramento de cultivares, e também caracterizar estes isolados quanto à presença e expressão do gene *ina A*.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Isolados de *Pantoea ananatis*

Foram utilizados 90 isolados pertencentes ao banco de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, obtidos de lesões da Mancha Branca do Milho e oriundos de diferentes regiões brasileiras produtoras de milho (Tabela 1).

**Tabela 1** – Localização, número e identificação dos isolados de *Pantoea ananatis* utilizados no estudo de variabilidade genética com marcadores AFLP.

Região	Estado	Cidades	N	ID
1	Paraná	Londrina	13	1-13
1	Paraná	Pinheirinho	7	14 - 20
1	Paraná	Campo Mourão	24	21 - 45
1	Paraná	Warta	4	46 - 49
1	Paraná	Rolândia	4	50 - 53
1	Paraná	Cafelândia	4	54 - 57
1	Paraná	Palmeirinha	1	71
1	Paraná	Cascavel	1	72
1	Paraná	Assis Chateaubriand	1	73
1	Paraná	Sertanópolis	1	74
1	Paraná	Pitangueiras	1	75
1	Paraná	Toledo	1	76
1	Paraná	Juranda	1	77
1	Paraná	Engenheiro Beltrão	1	78
1	Paraná	São Miguel do Iguaçu	1	79
1	Paraná	Peabiru	1	80
1	Paraná	Ponta Grossa	1	81
1	Paraná	Tamarana	1	82
1	Paraná	Il Centenário	1	83
1	Paraná	Guaira	1	84
2	São Paulo	Ribeirão do Sul	2	67 - 68
2	São Paulo	Cândido Mota	2	69 - 70
2	Minas Gerais	Sete Lagoas	7	58 - 64
2	Minas Gerais	Uberlândia	2	65 - 66
3	Goiás	Morrinhos	1	85
3	Goiás	Planaltinha de Goiás	1	86
3	Goiás	São João da Aliança	1	87
3	Mato Grosso	Dourados	1	88
3	Mato Grosso	Maracaju	1	89
3	Mato Grosso	Douradina	1	90

1, 2 e 3 Regiões amostradas (Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, respectivamente), seguidas dos Estados e cidades correspondentes. N=Número de isolados coletados por cidade. ID=Identificação numérica dos isolados. Isolado 1 = WT2.

Para a composição da coleção bacteriana, folhas de milho contendo lesões em estágio anasarca (estágios 1 e 2) foram coletadas e lavadas com sabão neutro. Depois de retiradas das folhas, as lesões foram desinfestadas com álcool 70% durante 1 minuto, colocadas em cloramina-T 0,25% durante 4 minutos e lavadas três vezes em água destilada esterilizada durante 1 minuto (cada lavagem). A água da última lavagem foi plaqueada em meio Tryptic Soy Ágar (TSA) (ANEXO A). Com auxílio de um bisturi esterilizado foram retiradas as bordas (aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>) de cada segmento foliar contendo a lesão. A seguir, as extremidades de cada lesão foram transferidas para placas contendo meio TSA. O

material foi incubado em estufa  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas, colônias típicas de *P. ananatis* foram então isoladas e purificadas em novas placas de TSA por esgotamento (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

### 3.3.2 Extrações de DNA

#### 3.3.2.1 Extração de DNA genômico e identificação dos isolados por PCR

Para identificação prévia dos isolados bacterianos, o DNA genômico foi extraído por fervura e amplificado por PCR seguindo a metodologia descrita por Mullis et al. (1986). Cada isolado foi cultivado separadamente por 24 horas em 5 mL do meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) (ANEXO A). Após este período, 1 mL da suspensão bacteriana permaneceu em banho-maria a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 16435 rcf (ou 14000 rpm) por 3 min e 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi reservado. O DNA foi precipitado com isopropanol a 75% (5:1, v/v), lavado uma vez com álcool 70% e ressuscitado em 25  $\mu\text{L}$  de tampão TE (ANEXO A).

A região intergênica ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos genes 16S-23S rRNA de bactérias foi amplificado com os iniciadores espécie-específico desenhados para *P. ananatis*: ANAF (“forward”) (5'-CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC-3') e ANAR (“reverse”) (5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGTACGCT-3') que permite a amplificação de uma sequência de DNA com aproximadamente 360 ou 388 pb (FIGUEIREDO & PACCOLA-MEIRELLES, 2012).

As reações de PCR foram feitas com 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10X (ANEXO A); 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 1,0  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (3 mM); 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTP MIX (2,5 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA (~20 ng, quantificado em aparelho Scandrop® Analytik-jena) com volume final completado para 25  $\mu\text{L}$  com água Mili-Q. As reações de PCR foram incubadas em termociclador TX 96 (Amplitherm), nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação das amostras de DNA em temperatura de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 min; 29 ciclos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, anelamento a  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 seg e  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, e extensão final a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Após a amplificação, aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  das amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%. O tampão utilizado para preparo

dos géis e eletroforese foi o TAE 1X (ANEXO A) (80 volts). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL), visualizados sob luz ultra-violeta e fotografados com sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

### 3.3.2.2 Extração de DNA genômico bacteriano para estudo da variabilidade genética via AFLP

Para o estudo da variabilidade genética de *P. ananatis* através de marcadores AFLP, foi realizada uma nova extração de DNA total utilizando o protocolo descrito por Ausubel et al. (1992) com modificações, para obtenção de maior pureza e quantidade de DNA/ng.

Alíquotas de 1 mL de suspensões bacterianas de cada isolado, cultivadas sob agitação por 24h a 28 °C em meio de cultura TSB, foram centrifugadas a 16435 rcf por 2 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspendidos em 567 µL de TE (pH 7,6), 30 µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 1 hora e meia. Após este período, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, e os tubos agitados em vórtex. Em seguida, foram adicionados 80 µL de tampão CTAB/NaCl (ANEXO A) seguindo-se de agitação em vórtex. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. Adicionou-se igual volume (780 µL) da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguindo-se de agitação manual por 10 min e centrifugação a 16435 rcf por 5 min a 4 °C. Após esse processo, a fase superior de cada tubo foi transferida para novo tubo (aproximadamente 600 µL) e adicionado um volume igual (600 µL) de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) seguindo-se agitação manual por 10 min e centrifugação a 16435 rcf por 5 min a 4 °C. A fase superior de cada tubo foi transferida para novo tubo (aproximadamente 450 µL). Nessa etapa adicionou-se 0,6 volumes de isopropanol, agitando-se gentilmente até precipitação do DNA, permanecendo incubado por 10 minutos a -80 °C. A seguir procedeu-se a centrifugação a 16435 rcf por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 16435 rcf por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de TE (ANEXO A) e armazenado a -20°C.

### 3.3.2.3 Extração de DNA plasmidial de *Pantoea ananatis*

Com o objetivo de encontrar possíveis variantes para número de plasmídios, foi realizada a extração do mesmo nos isolados de *Pantoea ananatis* por lise alcalina (KADO; LIU, 1981).

Os isolados foram cultivados em 5 mL de meio de cultura TSB por 24 horas a 28 °C e a suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro  $DO_{600} = 0,3$  (concentração de células em torno de  $5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, 1,5 mL da suspensão foram transferidos para tubos eppendorfs e centrifugados por 2 minutos a 16435 rcf. Os *pellets* formados foram ressuspensos em 1 mL de água destilada e centrifugados novamente. Adicionou-se 50 µL de tampão TAE 1X (ANEXO A) aos *pellets*, e estes foram agitados para ressuspender as células. Adicionou-se 350 µL de solução de lise (ANEXO A) a 30 °C, misturando 3 vezes cuidadosamente, com inversão dos tubos, seguida de incubação por 15 min a 30 °C sem agitação. Após este período, adicionou-se 800 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e procedeu-se com agitação vigorosa por 2 min, até o homogeneizado obter coloração leitosa. Prosseguiu-se com centrifugação por 7 min e 30 seg a 16435 rcf e 50 µL dos sobrenadantes (contendo os plasmídios) foram removidos e armazenados em novos tubos.

Para visualização, 15 µL de plasmídios acrescidos de 1,5 µL de corante azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,6%. O tampão utilizado para preparo dos géis e na eletroforese foi o TAE 1X a 70 volts. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL), visualizados sobre luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

### 3.3.3 Variabilidade Genética de *P. ananatis* por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

A técnica de AFLP foi empregada segundo a metodologia descrita por Voz et al.(1995). Amostras de DNA bacteriano foram quantificadas em Scandrop® Analytik-jena e cerca de 800-1000 ng por amostra foram submetidos à restrição com 5U de *EcoRI* (enzima de corte de sítios raros: G/AATTC) e 5U de *MseI*

(enzima de corte de sítios frequentes: T/TAA) em tampão de digestão *Mse* 10X com volume total igual a 20 µL. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 20 horas.

Os fragmentos gerados foram ligados aos adaptadores (*Eco*RI-1: 5'– CTC GTA GAC TGC GTA CC – 3' e *Eco*RI-2: 5'– AAT TGG TAC GAC GTC – 3'; *Mse*I-1: 5'– TAC TCA GGA CTC AT – 3' e *Mse*I-2: 5'– GAC GTA GAG TCC TGA G – 3') nas extremidades coesivas por incubação em termociclador com 1,0 µL de T4 DNA ligase 1U; 3,0 µL de água miliQ; 2,0 µL de Tampão 5X T4 DNA ligase; 1,0 µL NaCl 0,5 M; 0,5 µL BSA (1mg/mL); 0,5 µL DTT 5mM; 1,0 µL *Mse*I adaptador e 1,0 µL *Eco*RI adaptador a 37 °C por 3 horas, seguido de 30 min a 17 °C e 10 min a 70 °C. A amplificação pré-seletiva foi feita com 4,5 µL GoTaq® Green Master mix; 0,58 µL do *primer* pré-seletivo que possui um nucleotídeo arbitrário para cada *primer*: *Eco*+A e *Mse*+C e 3,0 µL do produto da ligação, que foi diluído 4 vezes.

O programa de PCR para amplificação pré-seletiva consistiu de um ciclo de 72 °C por 2 min, 20 ciclos de 90 °C por 1seg, 56 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min e um ciclo final de 60 °C por 30 min. Posteriormente, 5µL da reação pré-seletiva foi diluída em 20 µL de água pura.

Para reação seletiva, utilizou-se 3,5 µL de GoTaq® Green Master mix; 0,54 µL de cada *primer* seletivo *Eco*RI e *Mse*I, e 2,5 µL do produto pré-amplificado, consistindo em um ciclo de 94 °C por 2 min, 65 °C por 30 s e 72 °C por 2 min; 8 ciclos de 94 °C por 1 s, 64 °C por 30 s e 72 °C por 2 min; 23 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min e um ciclo final de 60 °C por 30 min. Para amplificação seletiva foram testadas inicialmente 9 combinações de *primers* com 2 ou 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3', com o objetivo de selecionar aquelas que apresentariam maior grau de polimorfismos.

Para verificação do grau de polimorfismo das combinações de *primers Eco*RI e *Mse*I testadas, o produto da amplificação foi preparado em gel de poliacrilamida (acrilamida 29:1 bis-acrilamida) a 7% em eletroforese vertical a 200 Volts por 3 horas e 20 minutos, corado em nitrato de prata 20% e fotografado com câmera digital (Sony cyber-shot DSC-W110).

As três melhores combinações de *primers Eco*RI e *Mse*I foram selecionadas para reação seletiva, com *primers Eco*RI marcados com os fluoróforos 6-FAM, NED e HEX, que emitem picos em azul, amarelo e verde, respectivamente, permitindo assim eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems, Foster City Ca, USA).

### 3.3.4 Análises dos Dados de AFLP

A genotipagem dos alelos (seleção de bandas entre 50 e 500 pares de base (pb)), foi feita através do programa GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems Foster City Ca, USA). Todos os indivíduos de *P. ananatis* foram analisados para presença e ausência de bandas (1 ou 0) para construção de uma matriz binária. O número de locos polimórficos, diversidade gênica, análise de variância molecular (AMOVA) e o índice de fixação alélica ( $F_{st}$  par a par), seguindo a distância genética de Reynold et al. (1983), foram calculadas através do programa Arlequin v.3.11 (EXCOFFIER et al., 2005).

Análise da coordenada principal e o dendograma foram realizados pelo programa FAMD versão 1.2 (SCHLÜTER; HARRIS, 2006), utilizando o coeficiente de similaridade genética de Jaccard com a transformação para a distância utilizando a fórmula “ $d=1-s$ ” e o coeficiente UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para agrupamento das amostras.

Análise bayesiana para K número de agrupamentos foi feita com o auxílio do programa STRUCTURE versão 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009) utilizando *burn-in* de 10000 com 10000 interações. Os resultados obtidos para o número de agrupamento foram analisados seguindo os parâmetros determinados por Pritchard e Wen (2004) e Evano et al. (2005), através do programa STRUCTURE HARVESTER versão 0.6.93 online.

### 3.3.5 Caracterização dos Isolados de *Pantoea ananatis* Quanto à Presença do Gene *inaA* por PCR.

O DNA extraído pelo protocolo de Ausubel et al. (1992) com modificações, foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados os *primers* específicos para *Pantoea ananatis* (syn. *Erwinia ananas*), desenhados para amplificação de uma sequência de DNA com aproximadamente 350 - 400 pb (INA A *upper primer* 5'- AGGCTT TGA GAA CGG ACT AAC G - 3' / INA A *lower primer* 5' - TTT CTG TCG GCT GCG TAC TG - 3'), conforme metodologia descrita por Nejad et al., 2006.

Aproximadamente 50 ng de DNA de cada isolado foram utilizados para amplificação. Os reagentes foram ajustados para volume final de 20  $\mu$ L (2,5  $\mu$ L

tampão 10X; 2,5 µL de 2,5 mM de dNTP MIX; 1 µL de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 µL de 5 µM de cada *primer*; 0,5 µL de 5 U/µL de DNA Taq Polimerase; 1 µL de DNA e 10,5 µL de H<sub>2</sub>O). Os reagentes foram combinados e mantidos em termociclador TX 96 (Amplitherm) a 94 °C por 5 min. Trinta e cinco ciclos foram realizados utilizando os *primers* (INA A upper/ INA A lower), por aquecimento a 94 °C por 45 seg, 60 °C por 45 seg, e 72 °C por 1 min, seguido por um período final a 72 °C por 5 min.

Ao término da programação, 10 µL das amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, para confirmar a amplificação. O tampão utilizado para preparo dos géis e na eletroforese foi o TAE 1X a 80 volts por uma hora. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL), visualizados sob luz ultra-violeta e fotografados com sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

### 3.3.6 Caracterização dos Isolados de *Pantoea ananatis* Quanto à Expressão Fenotípica do Gene *inaA*

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (ANEXO A) com adição 2,5 % (v/v) de glicerol (composto que favorece a produção de núcleos de gelo), durante 24 horas a 28 °C. Após esse período o material foi homogeneizado e 0,1mL da cultura foram adicionados à tubos de ensaio contendo 1mL de água ultra pura esterilizada, os quais encontravam-se acondicionados em banho de gelo, com temperatura externa abaixo de -10 °C por aproximadamente 2 minutos. A formação instantânea de gelo no tubo ao acrescentar a solução bacteriana, revelou o fenótipo INA positivo (INA+) do isolado. O controle consistiu na adição de meio TSB com 2,5% de glicerol (v/v) livre de bactéria, nos tubos contendo água ultra pura (milli-Q) estéril. O teste foi realizado pelo menos três vezes com cada isolado.

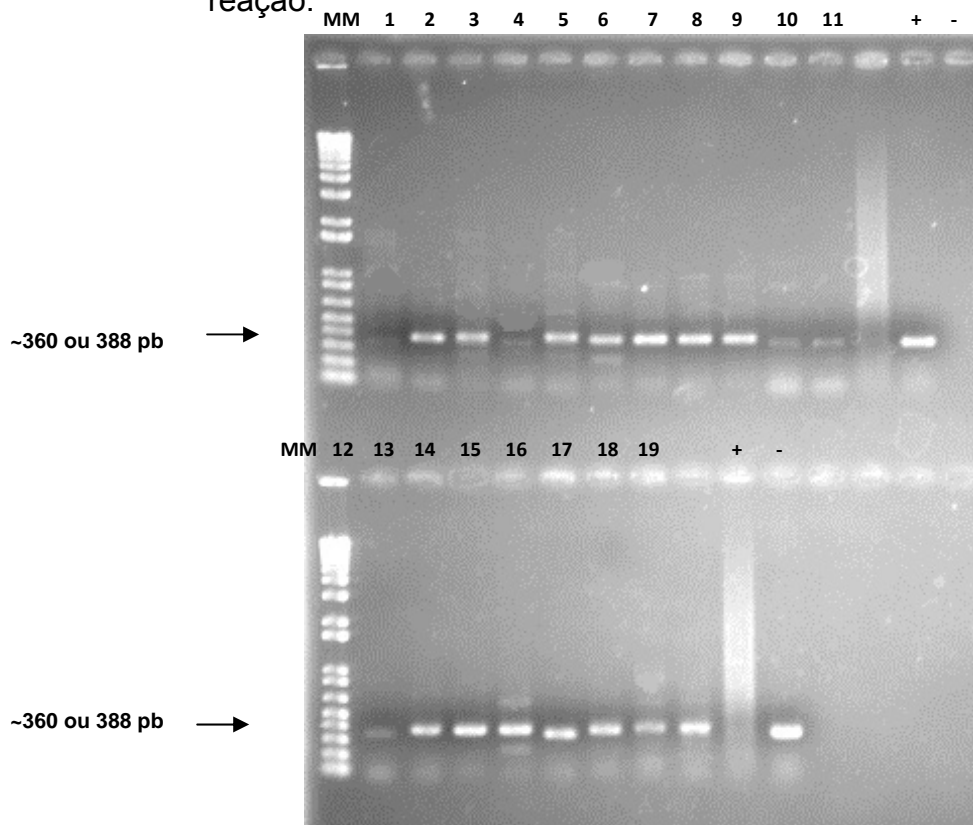
### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Identificação Via PCR dos Isolados Bacterianos

Foram utilizados 90 isolados de *Pantoea ananatis* nos estudos da variabilidade genética; extração plasmidial; presença do gene *inaA* e atividade de nucleação de gelo (Tabela 1).

Os *primers* ANAF/ANAR, específicos para *P. ananatis* confirmaram a identidade dos isolados bacterianos. Os produtos de PCR amplificados, geraram um único fragmento de DNA por amostra com tamanho aproximado de 360 ou 388 pb (Figura 4). Estes resultados encontram-se em concordância com aqueles apresentados por Figueiredo e Paccola-Meirelles (2012), que descreveram estes *primers* para identificação de isolados de *P. ananatis* de lesões da MBM em milho.

**Figura 4** – Gel de agarose a 1% com o produto da PCR para identificação dos isolados bacterianos obtidos de lesões anasarcas em folhas de milho, utilizando os primers específicos para *Pantoea ananatis* (ANAF/ANAR). MM – Marcador Molecular 1kb plus DNA ladder Invitrogen. 1 a 19 representam diferentes isolados submetidos à confirmação de um total de 90 isolados. (+) Controle positivo WT2; (-) Controle negativo: mix da reação.



### 3.4.2 Seleção de *Primers* para AFLP em *P. ananatis*

Na seleção das combinações com maior quantidade de *locus* polimórficos, foram identificados os seguintes *primers* para o estudo da variabilidade genética de *Pantoea ananatis*: *EcoRI-ACG/Msel-CT*, *EcoRI-ACG/Msel-CAC*, e *EcoRI-ACG/Msel-CAG*.

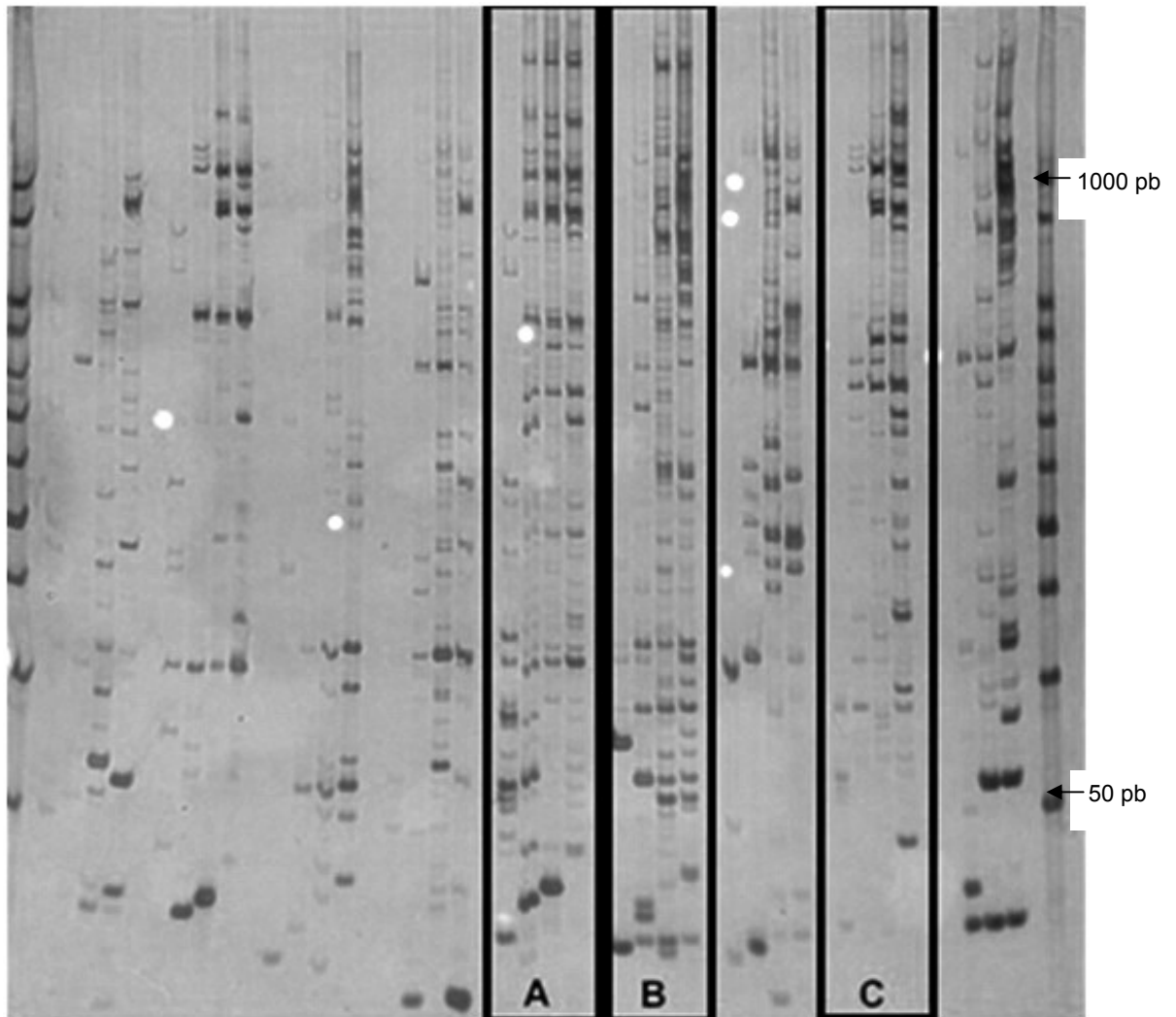
Os critérios para a seleção levaram em conta, a qualidade dos produtos de amplificação e a quantidade de polimorfismo gerado preliminarmente (Tabela 2). As três combinações produziram 247 fragmentos (bandas), com média de 82,3 bandas por *primer*, com tamanhos dos fragmentos variando de 50 pb a 1000 pb.

**Tabela 2** – Combinação de *primers* e número de fragmentos amplificados para *Pantoea ananatis* utilizando marcadores AFLP.

<b>Combinação de primers</b>	<b>Número de fragmentos amplificados</b>	<b>% de fragmentos polimórficos</b>
<i>EcoRI-ACG/Msel-CT</i>	93	89,2
<i>EcoRI-ACG/Msel-CAC</i>	91	82,4
<i>EcoRI-ACG/Msel-CAG</i>	63	79,3

A Figura 5 ilustra o padrão de bandas obtido para quatro isolados testados com as combinações selecionadas. Na eletroforese capilar em sequenciador automático, estas mesmas combinações permitiram a obtenção total de 982 fragmentos para *Pantoea ananatis*, com média de 327,33 bandas por *primer*.

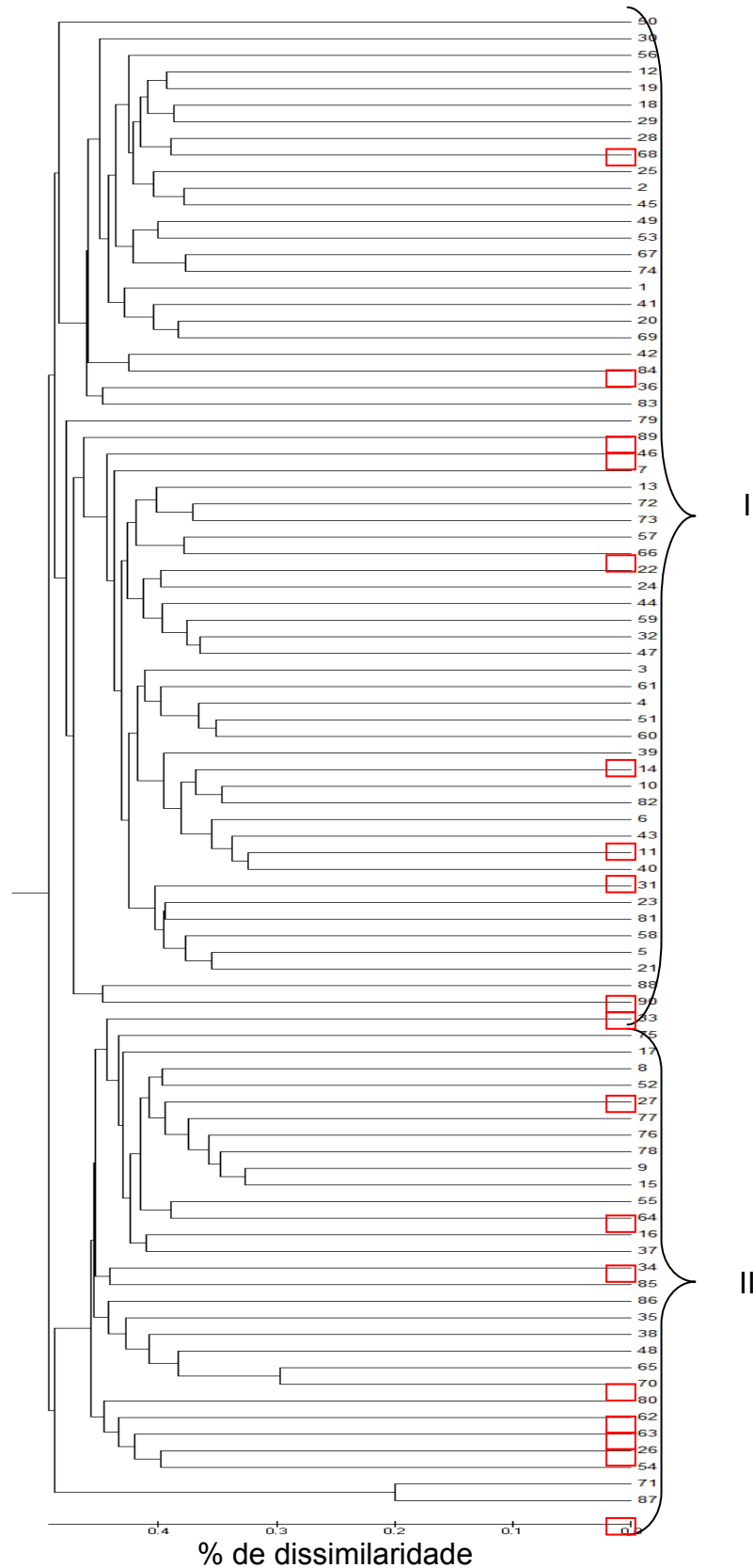
**Figura 5** – Padrão de bandas amplificadas por AFLP para quatro isolados de *Pantoea ananatis* (isolados 7, 65, 70 e 89, respectivamente) com as combinações de primers *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAG (A), *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAC (B) e *EcoRI*-ACG/*MseI*-CT (C).



### 3.4.3 Variabilidade Genética de *Pantoea ananatis*

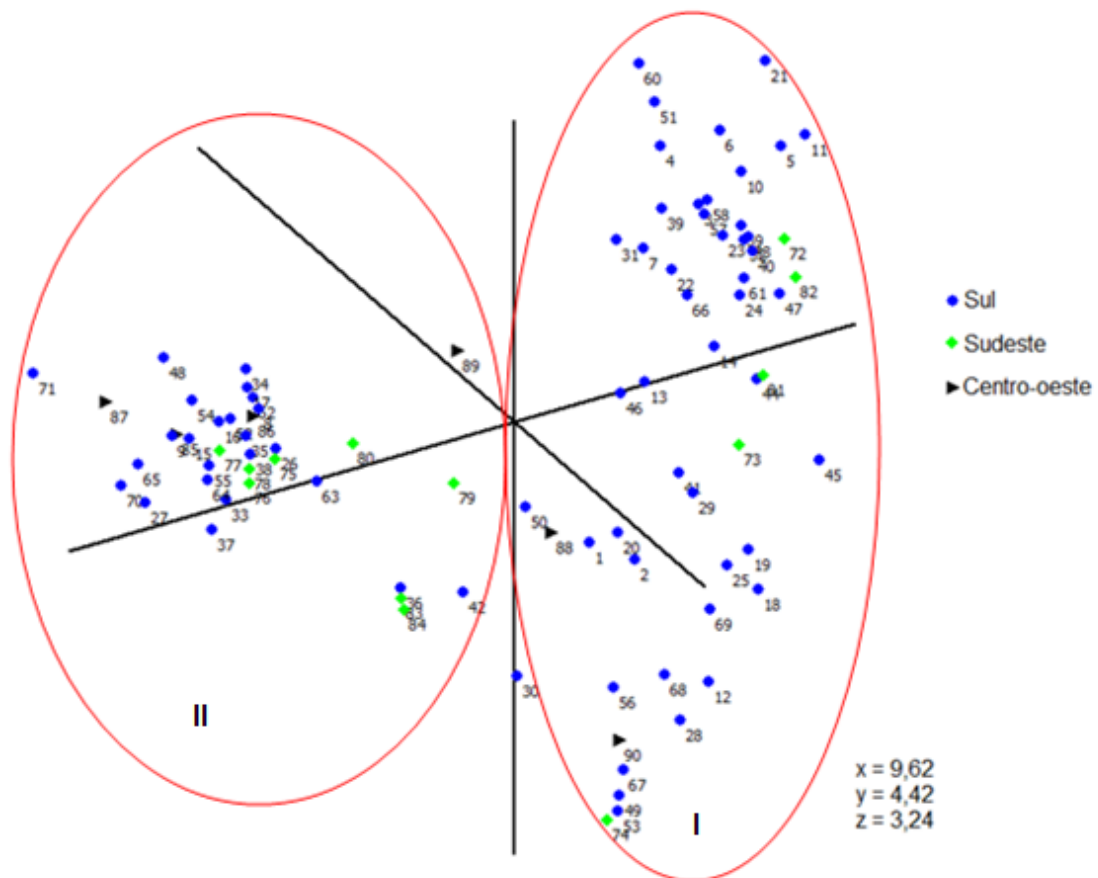
O estudo da variabilidade genética dos 90 isolados de *Pantoea ananatis* por meio de marcadores AFLP, coletados de três regiões brasileiras, permitiu separá-los em dois grupos denominados I e II, de acordo com os padrões de fragmentos gerados. O Grupo I alocou 60 isolados e o grupo II alocou 30 isolados, com similaridades entre 60 – 50% (Figura 6).

**Figura 6** – Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 90 isolados de *Pantoea ananatis*, utilizando locos polimórficos de AFLP, baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard. Marcações em vermelho destacam os indivíduos negativos para expressão fenotípica do gene *inaA*.



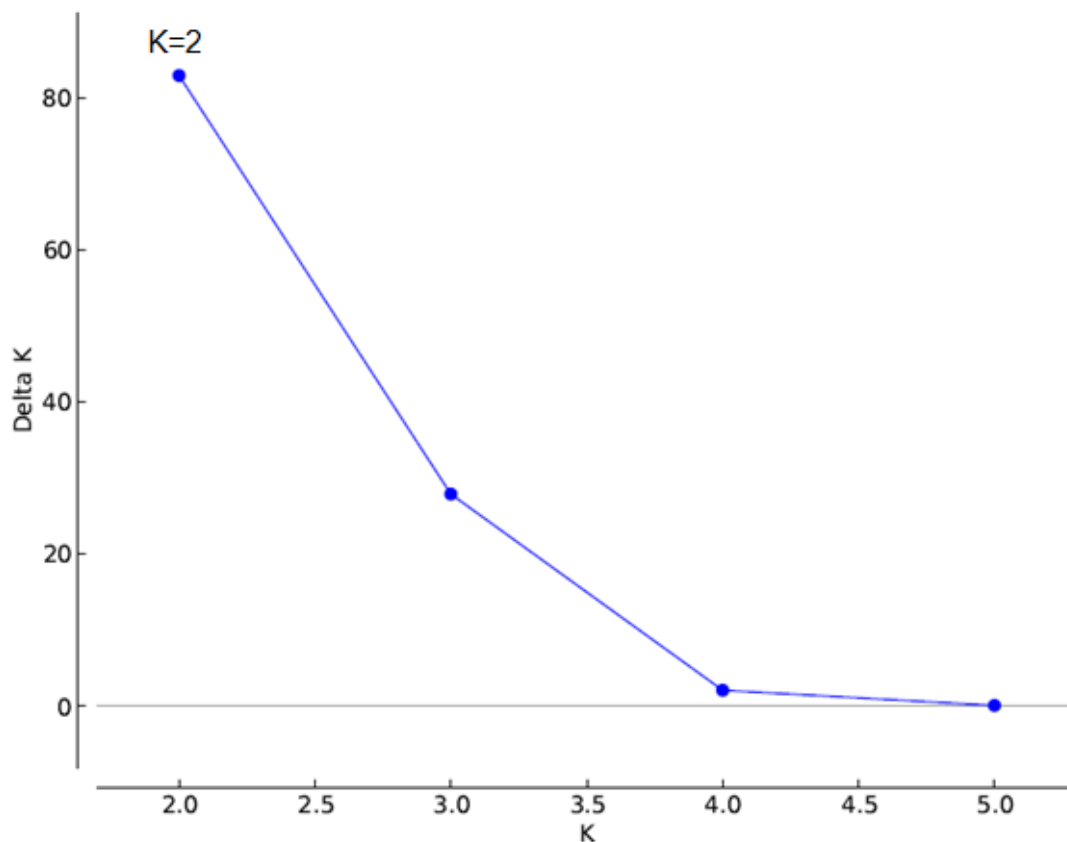
A figura 7, mostra uma representação simplificada em forma de coordenada principal (Pco), de como os isolados de *Pantoea ananatis* encontram-se dispersos no plano. A análise foi executada a partir da matriz de distâncias genéticas, evidenciando também a formação de dois agrupamentos (I e II).

**Figura 7** – Coordenada principal calculada a partir do coeficiente de similaridade genética de Jaccard para 90 isolados de *Pantoea ananatis*, agente causal da Mancha Branca do Milho, provenientes de três regiões do Brasil. (Para maiores informações sobre os isolados consulte tabela 1).



No presente estudo, os dados foram arranjados de acordo com a região de origem (1 a 3 da tabela 1). A estimativa do número de possíveis agrupamentos populacionais pela análise bayesiana foi  $k=2$  (Figura 8), conforme o modelo proposto por Evano et al. (2005), ou seja, há formação de 2 *clusters*. Cada *cluster* corresponde a um conjunto de isolados genotipicamente similares. Esta análise demonstra que tanto o dendograma, quanto a análise de Pco, explicam adequadamente a formação dos dois grupos.

**Figura 8** – Estimativa do número de agrupamentos (K) por análise de estrutura populacional em três populações de *Pantoea ananatis*.



O agrupamento observado demonstrou que a região de amostragem não é fator preponderante na determinação da similaridade genética dos isolados, pois não houve relação evidente entre o local de coleta com a composição de grupos. Isolados procedentes do mesmo Estado, ou mesma região encontraram-se misturados na formação dos agrupamentos.

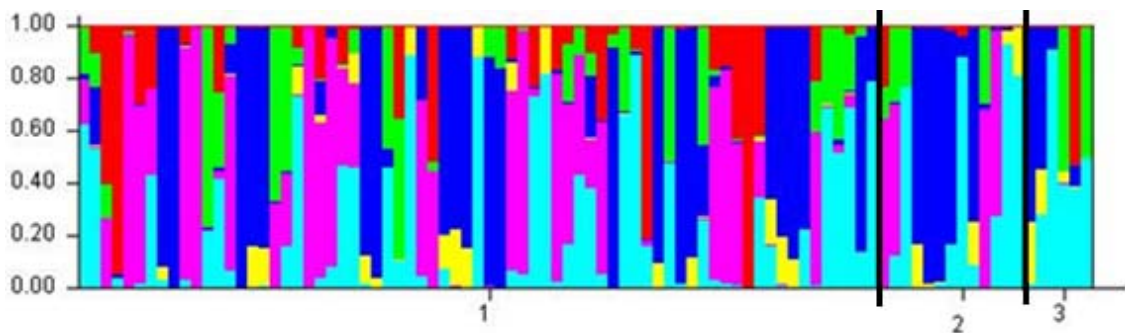
Loreti et al. (2001) ao estudarem a variabilidade genética de isolado de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, através de marcadores moleculares AFLP, sugeriram que a diversidade encontrada era em função da origem geográfica. Gonçalves e Rosato (2000) encontraram relação entre região de coleta e a similaridade genética em isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, agente causal da mancha bacteriana em maracujazeiro, sendo os grupos formados em função da região amostrada. Contudo, os autores, realizaram as amostragens em regiões mais dispersas geograficamente, localizados em sete Estados brasileiros. Em contra partida, Nakatani et al. (2009), ao estudarem a variabilidade genética de 50 isolados *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, não encontraram

relação entre a região de coleta (municípios) com a formação de grupos, porém com amostragem limitada a um Estado brasileiro. No presente estudo, a coleta das amostras foi realizada em três regiões, com amostragens diferenciadas, o que pode ter influenciado na constituição de apenas dois grupos.

Estudos realizados por McManus e Jones (1995), utilizando a técnica de rep-PCR para caracterização de isoladas de *Erwinia amylovora*, obtidos em diferentes regiões, detectou alta similaridade entre os isolados avaliados, mas também sem relação dos grupos com a época ou local de isolamento da bactéria. Teixeira et al. (2009) também não observaram correlação entre grupos e subgrupos com época ou local de coleta para *Erwinia psidii*, causadora da seca dos ponteiros em goiabeira.

A figura 9 mostra o padrão hierárquico de estrutura populacional, calculado através do log likelihood dos dados de cada passo do MCMC (Markov chain Monte Carlo). As frequências alélicas, representadas pelas diferentes cores, formam padrões específicos ou estruturas genéticas para cada população. Esta análise permite identificar qual a participação real de cada genótipo, (neste caso, isolado), pertencente a grupos de origens geográficas distintas, em determinado *cluster* genotípico (MUNHOZ, 2009). Neste trabalho, foi possível observar quais regiões possuem isolados de genótipos mais similares ou distintos, como por exemplo, a região 3 (Centro-Oeste do Brasil). Nesta, a frequência representada pela cor rosa foi ausente, não sendo compartilhada pelos indivíduos que representam o grupo.

**Figura 9** – Frequências alélicas atribuídas aos 90 isolados de *Pantoea ananatis*, provenientes de três regiões brasileiras (1: região Sul, 2: região Sudeste e 3: região Centro-Oeste). (Para informações sobre isolados e cidades/região consulte tabela 1).



A porcentagem de polimorfismo obtida para *Pantoea ananatis* com marcadores AFLP foi de 92,46% para a população Sul, 35% para a região Sudeste e 24,64% no Centro-Oeste (Tabela 3). Essa diferença entre a região Sul e as demais também pode ter sido influenciada pela diferença amostral que foi de 71 isolados para o Sul e, 13 e 6 para Sudeste e Centro-Oeste, respectivamente. A diversidade gênica nas populações estudadas variou entre 0,07 e 0,09 (Tabela 3).

**Tabela 3** – Medidas de variabilidade genética de populações de *Pantoea ananatis* coletadas de três regiões brasileiras produtoras de milho.

Populações	N	P	P%	Hs
Sul	71	908	92,46	0,092
Sudeste	13	344	35,03	0,079
Centro-Oeste	6	242	24,64	0,090
Total	90	982		

N=Número de isolados de *Pantoea ananatis* por população. P=Sítios polimórficos. P%=Porcentagem de polimorfismo. Hs=Diversidade gênica.

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior parte da variabilidade genética dos isolados está dentro das populações, 99,18%. Entre as populações a variabilidade foi menor que 1% (Tabela 4). Nakatani et al. (2009) ao estudarem a variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, também encontraram os maiores valores de variação genética dentro das populações (89,4%), embora tenham observado diferenças significativas entre populações (10,6%).

Um resultado do  $F_{st}$  de 0,01 (Tabela 4) é classificado segundo Wright (1978) como de baixa variabilidade genética. Essa variabilidade observada pode ou não ter resultado de alguma troca gênica ou fluxo gênico entre as subpopulações, que de alguma forma pode ter mantido interligados conjuntos gênicos, limitando a divergência genética entre elas. A baixa variabilidade, assim como a diversidade gênica entre as regiões amostradas e uma estruturação populacional ainda não muito bem definida, com a formação de somente dois agrupamentos confirmam a não diferenciação dessas subpopulações.

**Tabela 4** – Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando marcadores AFLP em três populações de *Pantoea ananatis*.

Fonte de Variação	G.L	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	2	100,191	0,366	0,82
Dentro populações	87	3852,687	44,283	99,18
Total	89	3952,878	44,650	
Índice de Fixação (Fst): 0,01				

\*P ≤ 0,01 (Significância dada por 1023 permutações).

Um baixo fluxo gênico, segundo Clark e Hartl (2010), pode impedir a divergência genética significativa entre subpopulações, apesar de desempenhar um papel relativamente pequeno na homogeneização das frequências alélicas em populações bacterianas. Nestes organismos, a consequência primária do fluxo gênico é que determinadas células adquirem alelos de outras células bacterianas, proporcionando vantagens adaptativas à célula receptora, tais como resistência a antibióticos ou ainda capacidade de utilização de outra fonte energética (FREEMAN; HERRON, 2009).

Rotineiramente ocorre transferência de alelos entre membros divergentes das linhagens bacterianas pelo mecanismo conhecido como Transferência Horizontal (ou Lateral) Gênica (THG). Para Freeman e Herron (2009), em alguns casos, as espécies envolvidas pode ter genoma cujas sequências de bases divergem em até 16%, enquanto que, a troca de genes entre eucariotos, geralmente fica limitada a organismo cujos genomas têm divergência total de 2% ou menos. Porém, alguns autores relataram a ocorrência de eventos de transferência de genes entre bactérias de gêneros diferentes, criando genomas extremamente dinâmicos em quantidades substanciais de DNA introduzidos e excluídos do cromossomo. Estas transferências têm modificado tanto o caráter ecológico, quanto patogênico de espécies bacterianas. Análises de composição revelaram que grande parte dos genomas bacterianos consistem de genes horizontalmente adquiridos (OCHMAN et al., 2000; THOMAS; NIELSEN, 2005; BARCELLOS et al., 2007).

Lawrence e Ochman (1998) propuseram que a aquisição de novos alelos por THG é o mecanismo primário de especiação das bactérias. A troca de material genético entre células ou genomas de espécies relacionadas ou não, e ocorre através dos mecanismos conhecidos como conjugação, transdução e a transformação; e apesar de descritos a muitos anos, os impactos da THG na

evolução dos procariotos só puderam ser compreendidos nos últimos anos, com o aumento do sequenciamento genético de certos organismos e o advento da biologia molecular, que permitiram rastrear o surgimento, desaparecimento e reaparecimento de genes em bactérias (PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003).

Como os genomas bacterianos estão em um estado constante de fluxo gênico, qualquer segmento de DNA de uma população bacteriana pode ser horizontalmente transferido (QUECINE, 2007), desta forma, o DNA é mantido na célula receptora e posteriormente transferido para gerações subsequentes, apesar de que em alguns casos, alguns mecanismos podem limitar as aquisições horizontais de genes, tais como modulações fisiológicas, ambientais ou genéticas (ARBER, 2000).

De maneira geral, a THG constitui-se em uma importante ferramenta na adaptação das bactérias a um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto gênico já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade destes organismos, além de ser rapidamente distribuído dentro da população bacteriana (LAWRENCE, 2002). Uma das mais fortes evidências da THG são as ilhas genômicas: os mesmos genes em distintos organismos que apresentam a mesma função em diferentes contextos ecológicos (QUECINE, 2007). As ilhas genômicas são classificadas de acordo com as atividades desenvolvidas por um conjunto gênico adquirido, sendo as mais conhecidas as ilhas de simbiose, as de resistência a antibióticos, as metabólicas e as ilhas de patogenicidade. Essas são, geralmente, adquiridas em *clusters*, em fragmentos de 10 a 200 kb, nos quais, além de vários genes, encontram-se também os promotores destes genes, além de integrases e transposases (HENTSCHEL; HACKER, 2001).

Alguns fatores podem limitar ou reduzir a variabilidade genética em populações como, por exemplo, a seleção natural que é caracterizada pela remoção de variantes não adaptados, impedindo aumento da frequência de novos alelos; e a deriva genética, que são mudanças nas frequências alélicas devido ao acaso. Em populações pequenas, a variação na taxa de mudança de frequências alélicas é maior que em grandes populações. Entretanto, a taxa geral de deriva genética é independente do tamanho da mesma, assim grandes e pequenas populações perdem alelos à deriva à uma mesma taxa (COLBY, 2005).

Possivelmente, a amostragem realizada neste trabalho pode ter interferido na apuração dos resultados, já que as populações Sudeste e Centro-

Oeste tiveram poucos organismos as representando. Segundo Barak e Gilbertson (2003), o estudo de variabilidade genética quando realizado com apenas alguns isolados pode não representar de maneira acurada um organismo como ele realmente ocorre na natureza, deixando assim alguns questionamentos a respeito de qual fator realmente pode estar agindo sobre as populações do patógeno.

Esta “homogeneidade” encontrada nos isolados de *P. ananatis*, sugere que talvez possa haver uma baixa frequência de recombinação nas populações, com distribuição de sequências “repetitivas” no genoma da bactéria, assim como já foi relatado anteriormente com *Erwinia amylovora* (McMANUS & JONES, 1995) e *Erwinia psidii* (TEIXEIRA et al., 2009), pois quando comparados dados de diversidade gênica (Hs) entre as três populações estudadas, observam-se valores muito próximos entre elas (Tabela 3). Estes resultados indicam ainda uma possível adaptação de *P. ananatis* aos locais de sobrevivência e talvez a especialização do patógeno a um nicho ecológico, no caso a planta de milho, ou vice-versa, caracterizando uma “coevolução patógeno-hospedeiro” (LAWRENCE, 2002).

A atuação de forças evolutivas no processo de coevolução podem ou não, gerar variabilidade tanto nas populações de plantas como nas de microrganismos fitopatogênicos. Através de mutações podem surgir novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados por recombinação genética, promovendo a dispersão destes alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local a outro (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Segundo Burdon e Silk (1997), a combinação de seleção, deriva genética, migração e mutação definem a estrutura genética e a diversidade das populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores varia em função das diferentes associações planta-patógeno; entre os estádios do ciclo epidemiológico e entre associações em ecossistemas naturais ou agrícolas.

De modo geral, a coevolução favorece uma mudança adaptativa em uma relação equilibrada, onde a maior probabilidade de que ela ocorra é dentro de comunidades de um ecossistema e entre hospedeiros relacionados bioquimicamente, com frequências gênicas e genotípicas constantes. Contudo, frequências gênicas e genotípicas são entidades não independentes e, portanto, coadaptadas. Mudanças na frequência de genes ou genótipo resultam em mudanças nas populações, que por sua vez provocam direcionamento para um novo

ajuste genético que pode resultar em uma nova coadaptação dentro de populações. Nos patossistemas agrícolas atuais, a coevolução deve ser encarada ligeiramente diferente da que ocorre em patossistemas naturais, pois nestes, melhoristas controlam metade da interação coevolutiva, determinando quais os genes estarão presentes na planta hospedeira. Desta maneira, a população de patógenos é forçada a responder a qualquer mudança feita na população hospedeira, e, portanto, a evolução da população patogênica é provavelmente o reflexo da evolução dos hospedeiros cultivados, dirigida pelo homem (BARBIERI; CARVALHO, 2001).

Sabe-se que populações com grande variabilidade genética, na maioria dos casos se adaptam melhor a diferentes condições, o que favorece sua sobrevivência em casos de mudanças ambientais ou na capacidade de defesa da planta hospedeira (WICKERT et al., 2007; MUNHOZ, 2009), porém os resultados aqui obtidos são de grande importância no estudo populacional deste patógeno, pois fornecem direcionamentos na compreensão a respeito da forma como o patógeno tem evoluído, que podem vir a contribuir na elaboração e definição das melhores estratégias de controle para a Mancha Branca do Milho.

#### 3.4.4 Plasmídios em *Pantoea ananatis*

Entre os 90 isolados, todos apresentaram pelo menos um plasmídio no genoma (Figura 10). Este é o primeiro relato da descrição de plasmídio de *P. ananatis* isolada de lesões da MBM. Os resultados aqui obtidos estão em concordância com aqueles encontrados na literatura. Choi et al. (2012), por meio do sequenciamento do genoma de uma *P. ananatis* isolada de arroz, descreveram a existência de apenas um plasmídio de 281 kb (52,25% G+C, 242 sequências codificantes (CDS) de proteínas e 9 pseudogenes). De Maayer et al. (2012), também encontraram para sete espécies de *Pantoea* um plasmídio comum que foi denominado como LPP-1. Este plasmídio varia em tamanho de 281 a 794 kb e contribui entre 5,6% a 12,6% do teor total do genoma, o que indica que o LPP-1 participa significativamente para o genótipo de *Pantoea* sp. Neste mesmo trabalho, um único plasmídio de 352,8 kb com 51,3% de G+C e 262 CDS foi observado em *P. ananatis* isolada epifiticamente de milho.

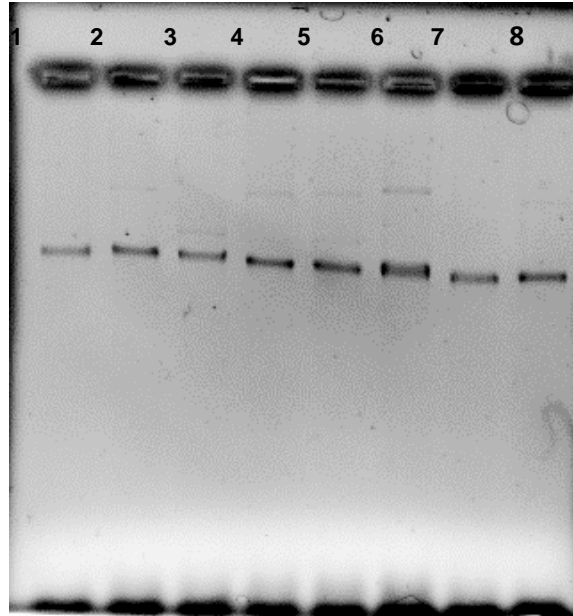
Vivian et al. (2001), analisou o papel dos plasmídios em bactérias fitopatogênicas e salientou a escassez de conhecimento em relação a quase todos

os aspectos da sua biologia entre as bactérias. Para os autores, um dos meios pelos quais podem ocorrer diversificações em bactérias fitopatogênicas é através da aquisição de elementos genéticos extra-cromossomais, como os plasmídios. Estes podem ser transferidos entre linhagens, espécies e gêneros, e posteriormente tornam-se passíveis de transmissão vertical estável na linhagem bacteriana. O papel dos elementos genéticos móveis (“DNA exógeno”) e sua associação com ilhas de patogenicidade em plasmídios e cromossomos bacterianos, fornecem indicadores de possíveis rotas evolucionárias na aquisição de capacidade de induzir doenças em plantas e de evitar as defesas do hospedeiro, com um número substancial de genes atribuídos aos plasmídios.

De acordo com De Maayer et al. (2012), os genes que estes plasmídios carregam podem conferir diversos fenótipos à bactéria, incluindo produção de hormônios, toxinas e fatores de virulência que contribuem para a patogênese e especificidade pelo hospedeiro; resistência a antibióticos e metais pesados; sobrevivência em condições adversas, entre outros. A aquisição de plasmídio pode assim contribuir tanto para a sobrevivência da bactéria em um determinado ambiente, quanto na colonização de novos nichos.

O sequenciamento dos plasmídios dos isolados utilizados neste trabalho poderia revelar diferenciações entre eles, no entanto, para De Maayer et al. (2012) o plasmídio LPP-1 é comum em todos os membros do gênero *Pantoea* que foram sequenciados até o momento, e mostraram que de modo igual, este plasmídio desempenha uma papel importante na adaptação ecológica e biológica de *Pantoea* spp, contendo um conjunto básico de genes conservados, sugerindo que este plasmídio é estável, herdado e mantido por *Pantoea* sp., e possivelmente, evoluído a partir de um único plasmídio ancestral comum.

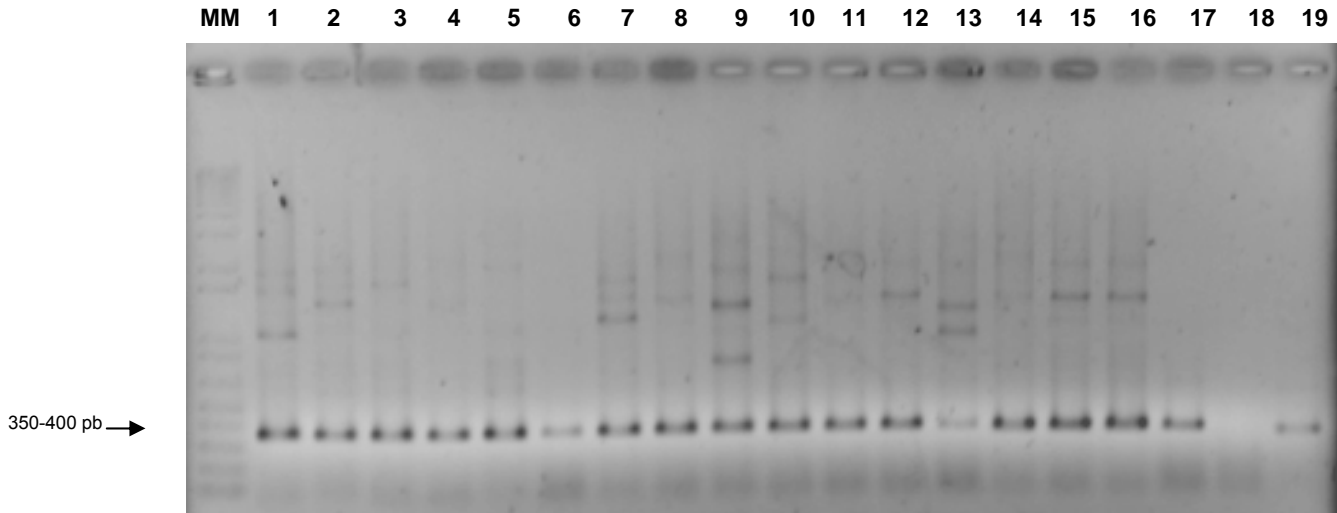
**Figura 10** – Gel de agarose a 0,6% ilustrando a presença de um plasmídio em isolados de *Pantoea ananatis*, extraídos de lesões da Mancha Branca do Milho 1 a 8 representam diferentes isolados submetidos à extração de um total de 90 isolados avaliados.



#### 3.4.5 Presença e Expressão Fenotípica do Gene *inaA* em *Pantoea ananatis*

Entre os 90 isolados de *Pantoea ananatis* estudados, três não amplificaram para o *primer* INA A na PCR (isolados 37, 84 e 87) (ANEXO B). Nos demais, fragmentos de aproximadamente 350-400 pb resultaram da amplificação positiva para o gene *inaA* (Figura 11).

**Figura 11** – Gel de agarose a 1% ilustrando o produto da amplificação do DNA genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR) com o *primer* INA A para *Pantoea ananatis* (*Pa*). MM – Marcador Molecular 1Kb plus DNA ladder Invitrogen. Marcações de 1 a 17 representam diferentes isolados de *Pa* de um total de 90 isolados e marcações 18 e 19, controle negativo (mix) e positivo (isolado WT2), respectivamente.



Correlação positiva entre a detecção do gene *inaA* e a atividade de nucleação de gelo foi observada em *Pantoea ananatis*, ou seja, na maioria dos casos em que a amplificação do gene ocorreu, a atividade também foi registrada. No entanto, 20% dos isolados portadores do gene *inaA* não expressaram o fenótipo INA+ (ANEXO B). Isto demonstra que a capacidade de nucleação de gelo depende de cada isolado e das condições de crescimento e de avaliação, como por exemplo, a temperatura (NEJAD et al., 2006).

Dos dezoito isolados negativos para a expressão fenotípica do gene *inaA*; 10 foram agrupados no grupo I e 8 no grupo II (Figura 6), não evidenciando também nenhuma correlação entre as formações dos grupos e subgrupos com a expressão ou não do fenótipo. Lindow et al. (1982) também observaram variação fenotípica entre isolados. Para eles fatores como idade da cultura, genótipo da bactéria e meio de crescimento podem estar relacionados com a manifestação da atividade. Os autores descrevem que a quantidade de núcleos de gelo aumenta consideravelmente quando glicerol é adicionado ao meio de cultivo. A adição deste componente é considerada fator determinante para criar condições ótimas para produção dos núcleos em situações de incubação *in vitro* (LINDOW et al., 1982).

Como citado anteriormente o fenótipo INA+ é geralmente resultado de um único gene. Segundo Edwards et al. (1994) o gene *ina* pode estar presente

em algumas linhagens mas ausentes em outras da mesma espécie, indicando uma via evolucionária incomum, provavelmente por meio de uma transferência horizontal. É de se supor que esses isolados sofreram alguma mutação no seu DNA que resultou na alteração da produção ou da atividade da proteína INP, responsável pela nucleação de gelo, localizadas na membrana externa das bactérias (PHELPS et al., 1986; KAWAHARA, 2002). Em experimentos de hibridização, utilizando fragmentos que flanqueiam o gene *ina*, foi observado um dimorfismo do gene que pode ser considerado anômalo. Um fragmento de 800 pb que flanqueia o final 3' do gene *ina* hibridizou o DNA de todos os patovares de *X. campestris*, embora o gene *ina* estivesse presente em somente 50% destes. Interessante é que esta sequência flanqueadora no final 3' foi encontrada em todos os isolados portadores do gene *ina+* e *ina-* de *E. herbicola*, *P. syringae* e *P. fluorescens* (EDWARDS et al., 1994).

As vesículas protéicas localizadas na parede celular externa da bactéria, reportadas por Phelps et al. (1986), seriam as responsáveis pela liberação dos núcleos de gelo. De acordo com Hirano e Upper (2000), as proteínas responsáveis pela produção dos cristais ou núcleos de gelo se reúnem para formar agregados de diversos tamanhos em associação com a membrana externa de células bacterianas. Quanto maior o agregado, mais eficiente é a nucleação. Para os autores, o número de monômeros de proteína que são montados em uma conformação em um dado momento, podem ser os responsáveis pelas diferentes temperaturas na qual as células individuais estão ativas na nucleação.

A nucleação de gelo promovida por bactérias aumenta a probabilidade do surgimento de lesões em plantas. A fração de células dentro de uma população ativa para núcleos de gelo aumenta com a diminuição de temperatura inferior a 21 °C, e de acordo com Burke et al. (1976), a produção de cristais de gelo tanto intra e extracelularmente provoca a ruptura mecânica das membranas celulares e os danos ocasionados podem levar a morte da planta ou reduções expressivas na sua produtividade.

Como a maioria das células dentro de uma população de bactérias INA+ não está ativa em um determinado tempo e temperatura, neste caso, quanto maior for a população bacteriana, maior será a probabilidade de que uma ou mais células se tornem ativas a temperaturas relativamente elevadas (por exemplo, a 22 °C). Assim, a quantidade de lesões provocadas a certa temperatura, pode ocorrer

também em função do tamanho das populações bacterianas presentes na filosfera (HIRANO; UPPER, 2000).

Testes de patogenicidade com os isolados INA+ e INA- deverão ser conduzidos a fim de avaliar o papel deste gene na virulência de *P. ananatis*. Sauer et al. (*in press*) estudando 15 isolados de *P. ananatis* oriundos de lesões da MBM verificaram que apenas nove expressaram o fenótipo INA+ e sintomas da doença foram reproduzidos sob condições controladas somente nas inoculações com os isolados INA<sup>+</sup>, reafirmando assim a relação do caráter com o desenvolvimento da doença.

### 3.5 CONCLUSÕES

Apesar do elevado número de fragmentos encontrados para *Pantoea ananatis* com marcadores AFLP, as baixas taxas de variabilidade genética e de diversidade gênica encontrada entre populações deste trabalho, apontam para a ação de algum fator evolutivo sobre a bactéria.

Isolados de *Pantoea ananatis* da MBM apresentam pelo menos um plasmídio, de tamanho estimado com base na literatura de aproximadamente 280 a 352 kb. Estudos subsequentes irão promover a determinação real do tamanho deste plasmídio,

Com relação à caracterização dos isolados quanto à presença e expressão do gene *inaA*, conclui-se que esta é uma propriedade que depende exclusivamente de cada indivíduo, pois a presença deste gene no genoma não implica necessariamente na sua expressão fenotípica.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K.; WATABE, S.; EMORI, Y.; WATANABE, M.; ARAI, S. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. **FEBS Letters**, v.258, p: 297–300, 1989.
- 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.
- 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.
- ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.1-7, 2000.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, v.1, 1992.
- 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.
- BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J.S.S, HUNGRIA, M. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. **Applied an Environmental Microbiology**. p. 2635 – 2643, 2007.
- BARAK, J.D.; GILBERTSON, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agente of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology**, v.95, p.596-603, 2003.
- BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p.79-161. 2001.
- BENTES, J.L. S.; COSTA NETO, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **Acta Amazonica**, v.41, p.251-256, 2011.
- 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.

BONIN, A.; EHRICH, D.; MANEL, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, v.16, p.3737-3758, 2007.

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.

BURDON, J.J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, v.87, p.664-669, 1997.

BURKE, M. J.; GUSTA, L.V.; QUAMME, H.A.; WEISER, C.J.; LI, P.H. Freezing and injury in Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.27, p.507-258, 1976.

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.

CARLI, Marcio Luiz de. **Aspectos Etiológicos e epidemiológicos do complexo mancha branca do milho**. 2008. 88 fls. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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. Yield loss potential of *Phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis* in the United States. **Plant Disease**, v.89, p.986-988, 2005.

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.

CHOI, O.; LIM, J.Y.; SEO, Y.S.; HWANG, I.; KIM, J. Complete genome sequence of the rice pathogen *Pantoea ananatis* strain PA13. **Journal bacteriology**, v.194, p.531, 2012.

CLARK, A.G.; HARTL, D.L. **Princípios de Genética de Populações**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 660p.

COLBY, C. (2005). **Introdução à Biologia Evolutiva**. Disponível em: <<http://www.evoluindo.biociencia.org/evidenciamacro.htm>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2013). Levantamento de dados. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 1 ago. 2013.

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.

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.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I, A.; CORREIA, L. A.; FALCÃO PERREIRA, F. T.; VERSIANI, R. P. **Cultivares**. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção I. 2004.

DE COSTA, D. M.; RATHNAYAKE, R. M. P. S.; DE COSTA, W. A. J. M.; KUMARI, W. M. D.; DISSANAYAKE, D. M. N. Variation of Phyllosphere Microflora of Different Rice Varieties in Sri Lanka and its Relationship to Leaf Anatomical and Physiological Characters. **Agronomy & Crop Science**, v.192, p.209-220, 2006.

DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; VENTER, S.N.; TOTH, I.K.; BIRCH, P.R.J.; JOUBERT, F.; COUTINHO, T.A. Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. **Journal Bacteriology**, v.19, p.2936–2937, 2010.

DE MAAYER, P.; CHAN, W.Y.; BLOM, J.; VENTER, S.N.; DUFFY, B.; SMITS, T. H. M.; COUTINHO, T. A. The larger universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. **BMC Genomics**, v.13, p.625-637, 2012.

DINI-ANDREOTE, F.; PIETROBON, V.C.; DINI-ANDREOTI, F; ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ARAÚJO, W.L. Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.670-677, 2009

EDWARDS, A. R.; VAN DEN BUSSCHET, R. A.; WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 911-920, 1994.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. **Sistemas de Produção II**. Embrapa Milho e Sorgo, 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: 01 nov. 2013.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Evolution Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FANTIN, G.M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, v.56, p.39, 1994.

FAO – Food and Agriculture Organization (2012) – Disponível em: <www.fao.org.br>. Acesso em: 01 ago. 2013.

FERNANDES, F. T.; SANS, L. M. A.; PINTO, N. F. J. A. Influência de fatores climáticos na ocorrência de *Phyllostica* sp. em milho. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 20, 1995, Brasília. **Anais...Brasília**, p.309, 1995.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. **Circular técnica Embrapa**, v.2, p.80, 2000.

FERNANDES, F.T. Mancha por *Phaeosphaeria* em milho. In: Oliveira, E. & Martins, C. (Eds). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha foliar por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, Embrapa informação tecnológica, 2004, p. 267-276.

FERREIRA, M.A.J.F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima. 2003, 63p.

FIGUEIREDO, J.E.F.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Diagnóstico molecular de *Pantoea ananatis* em Milho, Sorgo e *Digitaria* SP**. 21 ed. Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo, 2012, 19 p.

FILGUEIRA, T.R.S. **A origem do milho: identificação de *Saccharum* como um dos parentais alotetraploides**. 2005. 64fls. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Análise Evolutiva**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 831p.

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. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.209-215, 2001.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of *xanthomonas* strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.811-821, 2000.

GONÇALVES, R.M.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PEDRO, E.S.; MEIRELLES, W.F.; LEITE JUNIOR, R. P.; SAUER, A.V.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Etiology of *Phaeosphaeria* leaf spot disease of maize. **Journal of Plant Pathology**, v.95, p.559-569, 2013.

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.

GREEN, R.L ; WARREN, G.J. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. **Nature**, v.317, p.645–648, 1985.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.239, p.210–219, 2006.

HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, v.3, p.545–548, 2001.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 624-653, 2000.

HUANG, R.; BIRCH, C. J.; GEORGE, D. L. Water use efficiency in maize production – the challenge and improvement strategies. 2006. In: Water to gold: Maize Association of Australia 6th Triennial Conference: **Proceedings**... 21-23 fev. 2006.

HUBISZ, J.M.; FALUSCH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.1322-1332, 2009.

KADO, C.L.; LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**. v.145, p.1365-1373, 1981.

KAWAHARA, H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, p.492-496, 2002.

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.

LANA, U.G. PAULA DE.; GOMES, E. A.; SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D.F.; SOUZA, I.R.P.; GUIMARAES, C.T. Detection and Molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with White Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.160, p.441-448, 2012.

LAWRENCE, J.G.; OCHEMAN, H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, v.95, p.9413-9417, 1998.

LAWRENCE, J. G. Gene Transfer in Bacteria: Speciation without Species?. **Theoretical Population Biology**, v.61, p.449–460, 2002.

LINDOW, S.E. Epiphytic ice nucleation-active bacteria. In: MOUNT, M. S. & LACY, G. H. (ed.), *Phytopathogenic prokaryotes*. **Academic Press**, p.335-362, 1982.

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.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. **Plant Physiology**, v.70, p.1084-1089, 1982.

LINDOW, S. E.; HIRANO, S. S.; BARCHET, W. R.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. **Plant Physiology**, v.70, p.1090-1093, 1982.

LINDOW, S. E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.21, p.363-384, 1983.

LINDOW, S.E.; LAHUE, E.; GOVINDARAJAN, A.G.; PANOPOULOS, N.J.; GIES, D. Localization of ice nucleation activity and the iceC gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.2, p.262–272, 1989.

LORETI, S.; GALLELI, A.; BELISARIO, A.; WAJNBERG, E.; CORAZZA, L. Investigation of genomic variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* by AFLP analysis. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.583-591, 2001.

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

McMANUS, P.S.; JONES, A.L. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains from tree-fruit crops and *Rubus* spp. **Phytopathology**, v.85, p.1547-1553, 1995.

MICHIGAMI, Y.; WATABE, S.; ABE, K.; OBATA, H.; ARAI, S. Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p.762–764, 1994.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.

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.

MUNHOZ, Carla de Freitas. **Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de primers específicos para diagnose**. 2009. 75 fls. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba, 2009.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L.E.A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.116-120, 2009.

NEJAD, P.; RAMSTEDT, M.; GRANHALL, U.; ROOS, S.; MCIVOR, I. Biochemical characterization and identification of ice-nucleation-active (INA) willow pathogens by means of BIOLOG® MicroPlate, INA gene primers and PCR-based 16S rRNA-gene. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.113, p.97–106, 2006.

O'BRIEN, R.D.; LINDOW, S.E. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria.

**Phytopathology**, v.79, p.619-627, 1989.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E. A . Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**. v.405, p.299–304, 2000.

OLIVEIRA, A. P.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; MOREIRA, N. M.; OLIVEIRA, J, J. *Salmonella* entérica: Genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Bioesfera**, v.9, p.1947-1972, 2013.

OLIVEIRA, E.J.; SILVA, A. S. dos; HOHENFELD.; JESUS, O.N. Otimização da análise molecular com marcadores AFLP para estudos de diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (1 ed.): Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011, 20p.

ORSER, C.; STASKAWICZ , B. J.; LOPER ,J.; PANOPOULOS ,N. J.; DAHLBECK, D.; LINDOW, S. E.; SCHROTH, M. N. Cloning of genes involved in bacterial ice nucleation and fluorescent pigment/siderophore production. **Molecular genetics of the bacteria-plant interaction**. v. p.353–361, 1983.

PACCOLA-MEIRELLES LD; MEIRELLES, WF; CERVELATTI, EP; MAKI, CS; CASELA, CR; FERNANDES,FT; FERREIRA, AS. Caracterização morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em híbridos de milho e avaliação da incidência do estágio sexuado e assexuado do patógeno. **XXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 1998.

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 a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.587-590, 2002.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Mancha Branca X *Pantoea ananatis*. In: Congresso nacional de milho e sorgo: Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, 27, 2008, Londrina. **Anais...** Londrina, 2008. CD ROM.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. In: CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Cap.2, p.48-61.

PEARSON, J. P.; GRAY, K. M.; PASSADOR, L.; TUCKER, K. D.; EBERHARD, A.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.197-201, 1994.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v.2, p. 478-488, 2005.

- PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M.C.; CUELLAR, B.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.
- PHELPS, P.; GIDDINGS, T. H.; PROCHODA, M.; FALL, R. Release of cell-free ice nucleation by *Erwinia herbicola*. **Journal of Bacteriology**, v.167, p.496-502, 1986.
- PINAZZA, L. A. Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. 1993. p.1-10.
- PINTO, N.F.J.A. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares do milho. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.271-274, 1997.
- 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.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis* Serrano 1928. **Journal Chemical Ecology**, v.32, p.1769-1778, 2006.
- 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 Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1200 -1204, 2007.
- PORWOLLIK, S.; McCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.5, p.977-989, 2003.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, W. (2004). **Documentation for STRUCTURE software, version 2**. Disponível em: < <http://pritch.bsd.uchicago.edu>>. Acesso em: 05 dez. 2013.
- QUECINE, M.C. (2007). **Transferência horizontal gênica: um importante mecanismo na evolução e variabilidade genética de procariontos**. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/MCQuecine-200701-Resumo.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2014.
- RAJORA, O. P., PLUHAR, S. A. Genetic diversity impacts of forest fires, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*picea mariana*). **Theoretical and applied genetics**, v.106, p.1203-1212, 2003.
- RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. A. *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathology Bulletin**, v.3, p.8-10, 1966.
- RASMUSSEN, D. H.; MACKENZIE, A.P. Clustering in supercooled water. **Journal of Chemical Physics**, v. 59, p.5003-5013, 1973.
- RESTREPO, S.; VALLE, T.L.; DUQUE, M.C.; VERDIER, V. Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through

restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism analyses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.754-763, 1999.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v.105, p.767-769, 1983.

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.

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

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C. da; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procaríoto via comunicação intercelular. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.35-50, 2004.

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

SCHLÜTER, P.M.; HARRIS, S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.569-572, 2006.

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

SILVA, E. C. **Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) da uréia, do milho e da crotalária pelo milho sob semeadura direta em solo de cerrado**. 2005. 111p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

TEIXEIRA, A.C.O.; MARQUES, A.S.A.; FERREIRA, M.A.S.V. Baixa diversidade genética entre estirpes patogênicas de *Erwinia psidii* no Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.678-684, 2009.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature**. v. 3, p. 711 – 721, 2005.

TORRES, A.C., FERREIRA, A.T., SÁ, F.G., BUSO, J.A., CALDAS, L.S., NASCIMENTO, A.S., BRÍGIDO, M.M., ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 2000, 128p.

VIEIRA R.A.; TESSMANN D.; SCAPIM C.A.; HATA F.T.; RODOVALHO M.A.; BARRETO R.R. Genetic resistance of new popcorn hybrids to foliar diseases. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.140-146, 2009.

VOS, P.; HOGERS, R. ; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M; FRIJTERS, A.; POT, J.; JPELEMAN; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

VIVIAN, A.; MURILLO, J.; JACKSON, R.W. The role of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? **Microbiology**, v.147, p.762-780, 2001.

WARREN, G.J.; COROTTO, L.; WOLBER, P. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. **Nucleic Acids Research**, v.14, p.8047–8060, 1986.

WARREN, G.J.; COROTTO, L. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. **Gene**, v.85, p.239–242, 1989.

WARREN, G.J. Identification and analysis of *ina* genes and proteins. In: Lee RE, Warren, G.J.; Gusta, L.V. (eds) **Biological ice nucleation and its applications**, p.85–99, 1995.

WATANABE, M.; ARAI, S. Freezing of water in the presence of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia ananas*, and its application for efficient freeze-drying of foods. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.51, p.557-563, 1987.

WATANABE, K.; SATO, M. Detection of Variation of the R-Domain Structure of Ice Nucleation Genes in *Erwinia herbicola*-Group Bacteria by PCR-RFLP Analysis. **Current Microbiology** v. 37, p. 201–209. 1998.

WICKERT, E.; MACHADO, M.A.; LEMOS, E.G.M. Evolution of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. **Phytopathology**, v.97, p.1543-1549, 2007.

WRIGHT, S. Evolution and the Genetic of Populations: **Variability within and among Natural Populations**. University of Chicago Press, v.4,1978.

WYSMIERSKI, P. T.; ESCANFERLA, M. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de nucleação de gelo e produção de exoenzimas em *Pantoea ananatis*, agente causal da Pinta Branca do Milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.57, 2005.

ZHAO, J.L.; ORSER, C. S. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Molecular and General Genetics**, v.223, p.163–166, 1990.

ZETTLEMEYER, A. C.; TCHEUREKDJIAN, N.; CHESSICK, J. J. Surface properties of silver iodide. **Nature**, v.162, p.653, 1961.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Meios de cultura, tampões e soluções utilizadas no desenvolvimento da parte prática da dissertação:

**Meio Tryptic Soy Ágar (TSA):** 15 g/L<sup>-1</sup> de caseína enzimática hidrolisada, 5 g/L<sup>-1</sup> de peptona de soja, 5 g/L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio e 15 g/L<sup>-1</sup> de Agar.

**Meio Tryptic Soy Broth (TSB):** 15 g/L<sup>-1</sup> de caseína enzimática hidrolisada, 5 g/L<sup>-1</sup> de peptona de soja, 5 g/L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio.

**Tampão TE:** Tris-HCl 10 mM e EDTA 50 mM, com pH ajustado para 8,0.

**Tampão 10X:** 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100.

**Tampão TAE 1X:** 0,004 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA, pH 8,0.

**Tampão CTAB/NaCl:** 4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água.

**Solução de Lise:** 0,151 g de Tris-base; 0,750 g de SDS; 0,830g de NaCl e 1000 µL de NaOH 1N para 25 mL de água destilada. Mantida a 30 °C.

## ANEXO B

Presença e expressão fenotípica do gene *inaA*, responsável pela atividade de nucleação de gelo em *Pantoea ananatis*.

Isolado*	INA A PCR	INA teste	Isolado*	INA A PCR	INA teste
1	+	+	46	+	-
2	+	+	47	+	+
3	+	+	48	+	+
4	+	+	49	+	+
5	+	+	50	+	+
6	+	+	51	+	+
7	+	+	52	+	+
8	+	+	53	+	+
9	+	+	54	+	+
10	+	+	55	+	-
11	+	+	56	+	+
12	+	+	57	+	+
13	+	+	58	+	+
14	+	+	59	+	+
15	+	+	60	+	+
16	+	+	61	+	+
17	+	+	62	+	-
18	+	+	63	+	-
19	+	+	64	+	+
20	+	+	65	+	-
21	+	+	66	+	-
22	+	+	67	+	+
23	+	+	68	+	-
24	+	+	69	+	+
25	+	+	70	+	+
26	+	+	71	+	+
27	+	+	72	+	+
28	+	+	73	+	+
29	+	+	74	+	+
30	+	+	75	+	+
31	+	+	76	+	+
32	+	+	77	+	+
33	+	+	78	+	+
34	+	+	79	+	+
35	+	+	80	+	-
36	+	+	81	+	-
37	-	-	82	+	+
38	+	+	83	+	+
39	+	-	84	-	-
40	+	-	85	+	+
41	+	+	86	+	+
42	+	+	87	-	-
43	+	-	88	+	-
44	+	+	89	+	-
45	+	+	90	+	-

\* Para informações sobre isolados consulte tabela 1.